

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos

**ASPECTOS FUNDAMENTAIS À IMPLANTAÇÃO DA TECNOLOGIA
DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS
COM POTENCIAL APLICAÇÃO TERAPÊUTICA**

CARLOS HUMBERTO MARQUES

**Rio de Janeiro
2005**



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS HUMBERTO MARQUES

**ASPECTOS FUNDAMENTAIS À IMPLANTAÇÃO DA TECNOLOGIA
DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS
COM POTENCIAL APLICAÇÃO TERAPÊUTICA**

**Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Imunobiológicos**

**RIO DE JANEIRO
2005**

Ficha Catalográfica na Fonte
CICT/FIOCRUZ
Biblioteca de Manguinhos – Setor de Processamento Técnico de
Monografias/Multimeios

M357 Marques, Carlos Humberto.

Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial, aplicação terapêutica./ Carlos Humberto Marques. – Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005.

xv, 109 p.: il.

Tese (Mestrado). Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular.

1. Anticorpos. 2. Anticorpos Monoclonais . I. Título.

CDD. 571.967



Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico – VDTEC, sob a orientação da Professora Dra. Maria da Glória Martins Teixeira



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS HUMBERTO MARQUES

**ASPECTOS FUNDAMENTAIS À IMPLANTAÇÃO DA TECNOLOGIA
DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS
COM POTENCIAL APLICAÇÃO TERAPÊUTICA**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Maria da Glória Martins Teixeira

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

EXAMINADORES:

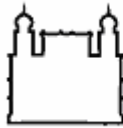
Prof. Dr.

– Presidente

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Rio de Janeiro, de maio de 2005.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Fiocruz

À minha esposa Cynthia e aos meus filhos Lucas, Sylvia e Laura, por sua compreensão e apoio na elaboração deste trabalho, que ocupou sempre preciosas horas de convivência familiar.



AGRADECIMENTOS

À Doutora Maria da Glória Martins Teixeira, minha orientadora.

À Doutora Rugimar Marcovitz, pelo apoio técnico, científico e profissional e, em especial, pela boa vontade, atenção dispensada, disposição e grande ajuda nas sugestões e correções.

À Doutora Elezer Monte Blanco Lemes, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento do trabalho e caráter profissional.

À Doutora Leda dos Reis Castilho, pelas indicações, colaboração, revisão e atenção dispensadas.

À Doutora Andréa Queiroz Maranhão, pela atenção e sugestões.

À Doutora Sheila Farage, coordenadora do mestrado profissional, à primeira turma do MPTI, pelas horas compartilhadas e aos diversos professores das disciplinas cursadas, pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Ao mestre Ruy Porto Fernandes, pelo espírito de companheirismo e fundamental colaboração nas difíceis horas de estudo.

À Gisele Albuquerque Chads, pela ajuda, incentivo e tempo de estudo conjunto.

À Aline Stelling Zanatta, pela colaboração e apoio na formatação desse trabalho.

À amiga Zaíra Antunes Prado, pela grande força, carinho e auxílio nos momentos mais difíceis.

À Cláudia Maria Dias pela espirtuosidade, companheirismo e alegria transmitidos.

À equipe do LATAM, pela compreensão e colaboração e a Claudia Elaine, pelo auxílio e apoio prestados.

À mestre Nádia Maria Batoreu, grande amiga e fundadora do Setor de Híbridomas, concretizando um sonho e ao parceiro João Luiz Sampaio Queiroz, pela ajuda na condução das atividades laboratoriais.

Aos meus pais e à minha irmã.

A todos os demais aqui não mencionados, que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a estruturação e sucesso dessa dissertação.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VIII
SÍMBOLOS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
R E S U M O.....	XIV
ABSTRACT	XV
I N T R O D U Ç Ã O	1
OBJETIVOS	5
PARTE I - ANTICORPOS	6
1 - ANTICORPOS.....	7
1.1 Conceito e Origem	7
1.2 Estrutura e Funções.....	9
1.3 Classes e Subclasses	13
1.4 Mecanismos de Ação dos Anticorpos	18
2 - ANTICORPOS MONOCLONAIS	22
2.1 Anticorpos Monoclonais Murinos	22
2.2 Anticorpos Monoclonais Quiméricos e Humanizados	25
2.3 Outras Estratégias para Geração de Anticorpos Monoclonais com Fins Terapêuticos	27
2.3.1 Anticorpos monoclonais obtidos por biblioteca genômica	29
2.3.2 Anticorpos monoclonais obtidos em camundongos transgênicos	33
2.4 Anticorpos Monoclonais para Uso Terapêutico	34
3 - SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS	39
3.1. Sistemas de Expressão de Proteínas Heterólogas	39
3.1.1 Vantagens e desvantagens dos vários sistemas para expressão heteróloga de proteínas:.....	44
3.1.2 Expressão em bactérias, leveduras e células de mamíferos.....	48
3.2 Sistemas de Cultivo.....	54
3.2.1 Os processos de cultivo em biorreatores.....	56
3.3 Sistemas de Purificação.....	62

PARTE II – PROPOSTA PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS	69
1 - HUMANIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20	70
1.1 O Antígeno CD20	70
1.2 O Linfoma Não-Hodgkin – LNH.....	72
1.3 O Anticorpo Monoclonal Rituximab	75
2 - O LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS – LATAM.....	77
2.1 Impactos da Implantação da Tecnologia de Humanização	82
3 - PROJETO DE PRODUÇÃO	86
3.1 Recursos Físicos.....	86
3.1.1 Reestruturação do Laboratório	86
3.1.2 Equipamentos Necessários para Aquisição	92
3.2 Recursos Humanos – Parcerias e Colaborações.....	93
3.2.1 Recursos Humanos	93
3.2.2 Parcerias e Colaborações	95
4 - MERCADO	97
CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ABREVIATURAS

ADCC – *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo)

BALB/c – Bagg -Albino C

BCG – Bacilo de Calmet-Guérin

BHK – *Baby Hamster Kidney* (rim de hamster neonato)

BPL – Boas Práticas de Laboratório

CD – *Clusters of Differentiation* (conjunto de diferenciação)

CDR – *Complementary Determining Regions* (regiões determinantes de complementaridade)

CEMIB – Centro de Bioterismo

C_H – *Heavy Chain* (cadeia pesada)

CHO – *Chinese Hamster Ovary* (ovário de hamster chinês)

C_L – *Light Chain* (cadeia leve)

CO₂ - Dióxido de Carbono

COPPE – Coordenação dos Programas de Pós-graduação de Engenharia

COS – Células de rim de macaco modificadas com SV-40

DEDET – Departamento de Desenvolvimento Tecnológico

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DEPEM – Departamento de Engenharia e Manutenção

DREAD – Divisão de Reativos para Diagnóstico

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorvência por ligação enzimática)

Fab – *antigen binding fragment* (fragmento de ligação com o antígeno)

Fc – *crystallizable fragment* (fragmento cristalizável)

FDA – *Food and Drug Administration* (agência regulatória americana)

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos do Ministério da Ciência e Tecnologia

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FR – *Framework* (arcabouço, estrutura da molécula)

Fv – *variable fragment* (Fragmento variável)
HACA – *Human anti-chimeric antibody* (anticorpo humano anti-quimérico)
HAHA – *Human anti-human antibody* (anticorpo humano anti-humano)
HAMA – *Human anti-mouse antibody* (anticorpo humano anti-camundongo)
HAT – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HAV – Vírus da Hepatite A
HBV – Vírus da Hepatite B
HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
HBsAgRec – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B recombinante
HCV – Vírus da Hepatite C
HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
IFI – Imunofluorescência indireta
Ig – Imunoglobulina
IgA – Imunoglobulina A
IgD – Imunoglobulina D
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
kDa – kilo Dalton
LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal
LANEU – Laboratório de Neurovirulência
LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais
LDGC-B – Linfoma difuso de grandes células do tipo B
LECC – Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares
LNH – Linfoma Não-Hodgkin
LPS – Lipopolissacarídeos
Mabs – *monoclonal antibodies* (anticorpos monoclonais)
MPTI – Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
NK – *Natural-killer* (matadora natural)
NSO – Células de mieloma de camundongo

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação da polimerase em cadeia)

pH – Potencial de Hidrogênio

RH – Recursos Humanos

RNA – Ácido ribonucléico

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

Sc – *single chain* (cadeia única)

scFv – *single chain variable fragment* (fragmento variável de cadeia única)

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SLE – *Systemic Lupus Erythematosus* (lupus eritematoso sistêmico)

TNF – *Tumoral necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

UCG – Universidade Católica de Goiás

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNB – Universidade de Brasília

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

VDTEC – Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

V_H – Região variável da cadeia pesada

V_L – Região variável da cadeia leve

SÍMBOLOS

α - Alfa - pág. 13

γ - Gama - pág. 13

δ - Delta - pág. 13

ε - Épsilon - pág. 13

κ - Capa - pág. 13

λ - Lâmbda - pág. 13

μ - Mi - pág. 13

ÍNDICE DE FIGURAS

PARTE I

- Fig. 1.1 – Esquema de produção de anticorpos – pág. 8
- Fig. 1.2 – Estrutura das imunoglobulinas – pág. 10
- Fig. 1.3 – Grau de hipervariabilidade das CDR e estrutura molecular da V_L - pág. 11
- Fig. 1.4 – Estrutura molecular das regiões variáveis V_H e V_L – pág. 12
- Fig. 1.5 – Cadeias leves e pesadas – pág. 12
- Fig. 1.6 – Idiótipo, paratopo e epítipo – pág. 14
- Fig. 1.7 – Classes de imunoglobulinas – pág. 17
- Fig. 1.8 – Mecanismos de ação dos anticorpos – imunidade humoral – pág. 19
- Fig. 1.9 – Opsonização – pág. 19
- Fig. 1.10 – Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos – pág. 20
- Fig. 2.1 – Ciclo de produção de anticorpos monoclonais – pág. 24
- Fig. 2.2 – Ciclo de humanização – pág. 26
- Fig. 2.3 – Comparação entre os métodos de produção de anticorpos – pág. 28
- Fig. 2.4 – Biblioteca de expressão genômica em fagos – pág. 29
- Fig. 2.5 – Triagem para formação de biblioteca de expressão em fagos – pág. 30
- Fig. 2.6 – Seleção de ligantes de biblioteca de expressão em fagos – pág. 32
- Fig. 2.7 – Chave de eventos e fatos marcantes na indústria – pág. 35
- Fig. 3.1 – Ciclo de humanização e sistemas de expressão utilizados – pág. 39
- Fig. 3.2 – Relação custo/rendimento em diferentes sistemas de expressão – pág. 43
- Fig. 3.3 – Frasco *spinner* – pág. 53
- Fig. 3.4 – Diferentes sistemas de cultivo – pág. 59
- Fig. 3.5 – Biorreator de tanque agitado – pág. 60
- Fig. 3.6 – Biorreator BioFlo 110, painel e acessórios – pág. 61
- Fig. 3.7 – Integração de etapas e aumento de rendimento pela cromatografia de afinidade – pág. 63
- Fig. 3.8 – Cromatografia de afinidade – pág. 64
- Fig. 3.9 – Filtro dinâmico de disco rotatório – pág. 65



ÍNDICE DE FIGURAS

PARTE II

Fig. 1.1 – Estrutura e expressão do CD20 em células B – pág. 70

Fig. 1.2 – Diferenciação dos linfócitos B – pág. 71

Fig. 1.3 – As 10 maiores incidências de câncer – EUA 2001 – pág. 72

Fig. 2.1 – Planta atual do LATAM – pág. 77

Fig. 3.1 – Área proposta para o LATAM – pág. 87

Fig. 3.2 – Planta proposta para o LATAM – pág. 88

Fig. 3.3 – Setores a serem criados com a reestruturação do LATAM – pág. 90

Fig. 4.1 – Crescimento do mercado de anticorpos monoclonais em 2002 – pág. 98

ÍNDICE DE TABELAS

PARTE I

- Tab. 2.1 – Anticorpos aprovados pelo FDA – págs. 37 e 38
- Tab. 3.1 – Principais sistemas e suas vantagens e desvantagens na expressão de proteínas de interesse biotecnológico – págs. 44/45/46
- Tab. 3.2 – Comparação entre diferentes sistemas de expressão – pág. 47
- Tab. 3.3 – Biofármacos aprovados produzidos em CHO – págs. 51/52/53
- Tab. 3.4 – Comparação entre processos de produção para cultivo em biorreatores de tanque agitado – pág. 57
- Tab. 3.5 – Comparação: diferentes sistemas de cultivo / rendimento celular – pág. 59
- Tab. 3.6 – Exemplos de anticorpos purificados e seus derivados obtidos por engenharia genética. Métodos de separação por afinidade, baseados em ligantes convencionais – pág. 71

PARTE II

- Tab. 1.1 – Estimativa de novos casos câncer e relação de mortes por sexo – EUA 2004 – pág. 73
- Tab. 1.2 – Principais classes de leucemias e linfomas de células B – pág. 73
- Tab. 1.3 – Gastos com o CD20 entre Janeiro 2002 e Agosto de 2003 - pág. 75

RESUMO

Os anticorpos monoclonais possuem diversas aplicações em transplantes, na composição de conjuntos de reativos para diagnóstico, grande variedade de doenças auto-imunes e, principalmente, na terapia do câncer. A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais recombinantes revolucionou a geração de imunoglobulinas, possibilitando a obtenção de anticorpos humanizados dirigidos a uma grande variedade de antígenos específicos. A baixa seletividade das metodologias atuais para diagnóstico e terapia de neoplasias constitui um dos principais empecilhos para a prática oncológica. Nesse particular, a utilização de imunoglobulinas submetidas à engenharia genética já é uma realidade e significa um avanço estratégico, abrangendo cerca de 25% do mercado biofarmacêutico global de proteínas terapêuticas. Este trabalho aponta os aspectos fundamentais à concretização da metodologia de humanização de anticorpos por transplante das regiões determinantes de complementaridade – CDR, com ênfase em uma proposta de produção do anticorpo anti – CD20 contra o Linfoma Não-Hodgkin. A introdução do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos nesse promissor e importante mercado de biofármacos através da implantação da metodologia de humanização do anticorpo monoclonal murino anti-CD20 é objeto desta dissertação. Viabilizar sua produção torna-se extremamente importante, tanto para a identificação precisa e precoce da enfermidade, quanto para atender um segmento do mercado brasileiro ainda desprovido de tratamento abrangente e eficaz. A apresentação do estudo dos anticorpos, sua estrutura e características, o estudo dos diferentes sistemas de expressão, cultivo, purificação, bem como a proposta de reestruturação e redimensionamento do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, parcerias, colaborações, recursos humanos necessários e aspectos de mercado, são aqui considerados.

Palavras-chave: Anticorpo; Humanização de Anticorpos Monoclonais; Anticorpos Monoclonais Terapêuticos; Antígeno CD20; Biofármacos.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (Mabs) have several applications in transplants, reagents for diagnosis, a great variety of auto-immune diseases and mainly, in cancer therapy. Mabs production employing recombinant technology made a revolution in immunoglobulins generation, enabling the production of humanized antibodies that recognize specific antigens. The low selectivity of the current techniques for neoplasm diagnosis and therapy is one of the major impediments for oncology practice. In this regard, the use of genetically engineered immunoglobulins has become a reality and means a strategic development comprising around 25% of the global biopharmaceutical market. This work shows the most important aspects in Mabs humanization through complementary determining regions (CDR) graft methodology, emphasizing a proposal of anti-CD20 Mab production against non-Hodgkin lymphoma. Introducing the Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos in this important and promising biopharmaceutical market through the establishment of humanization methodology is the main object of this dissertation. Making humanized Mabs production feasible is very important not only for the early and precise identification of illnesses, but also to meet a demand of the Brazilian market that still lacks comprehensive and efficient treatment. The study of Mabs, their structure and properties, expression systems, cultivation, purification, new dimensions and structure of the laboratory, partnerships, cooperation, human resources and market analysis are considered herein.

Keywords: Antibody; Humanized Monoclonal Antibodies; Therapeutic Monoclonal Antibodies; CD20 Antigen; Biopharmaceuticals.

INTRODUÇÃO

A primeira evidência experimental do uso de anticorpos foi proposta pelo médico alemão Emil Adolf von Behring, que demonstrou, juntamente com Shibasaburo Kitasato, a utilização de imunoglobulinas para neutralizar a toxina diftérica, fato que gerou grande revolução no pensamento científico da época. Por este feito, recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1901 (Nobelpreis, 2004).

Paul Ehrlich foi médico e bacteriologista alemão, agraciado com o Prêmio Nobel de Medicina de 1908 por trabalhos sobre as teorias da imunidade (Nobelpreis, 2004). Propôs a teoria da cadeia lateral (*side-chain*), da formação do anticorpo (*antikörper*), muito semelhante ao pensamento atual sobre os receptores de superfície. Referia-se a essas novas moléculas como balas mágicas (*magic bullets*), pela sua capacidade de encontrar o antígeno-alvo e, por meio de interações específicas, neutralizá-lo e destruí-lo. Demonstrou também que poderiam ser de grande interesse na aplicação terapêutica, conforme descrito em seu artigo:

“Eu aqui me refiro à produção de anticorpos contra as células da organização dos animais superiores. Esses anticorpos são também de uma natureza complexa. Eles obedecem a já descrita lei da absorção eletiva e sua origem está em harmonia com a teoria da cadeia lateral. É esperado que tais imunizações, que são de grande interesse teórico, também possam se tornar disponíveis para aplicação terapêutica” (Ehrlich, 1900).

“É possível hibridizar células produtoras de anticorpos de origens diversas. Esses híbridos podem ser cultivados in vitro, em grandes quantidades e fornecer anticorpos específicos, o que poderia ter importância na medicina e na indústria” (Köhler & Milstein, 1975).

No ano de 1975, os médicos imunologistas Georges Jean Franz Köhler, alemão, e César Milstein, argentino - aos quais a descoberta valeu o prêmio Nobel de medicina de 1984, pelo desenvolvimento da tecnologia de hibridomas e dos princípios de produção de anticorpos monoclonais - provaram que, da fusão de células tumorais capacitadas para sobreviver e se reproduzir em cultura com

linfócitos provenientes de animais imunizados, originavam-se os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais (Véliz, 2002).

Produzir anticorpos monoclonais consiste na obtenção de imunoglobulinas secretadas por células híbridas, derivadas de um único clone específico denominado hibridoma, a partir de prévia imunização de camundongos com o antígeno específico.

A preparação de hibridomas constituiu um marco na imunquímica. A primeira aplicação dessa tecnologia foi a produção de anticorpos monoclonais em substituição aos anticorpos policlonais obtidos por meios convencionais. Talvez a mais importante contribuição dos anticorpos monoclonais tenha sido ajudar a compreender os diversos processos imunes e possibilitar a manipulação *in vitro* de anticorpos, permitindo dissecar as respostas do sistema imune contra antígenos específicos e o entendimento da estratégia que um animal emprega para produzir anticorpos de alta afinidade.

Uma enorme expectativa foi gerada em torno da possibilidade de uso dos anticorpos para o tratamento de inúmeras doenças. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais com especificidade definida e disponibilidade ilimitada, reviveu o interesse da comunidade científica na sua aplicação como forma de terapia para o câncer. Contudo, havia um impedimento ao emprego dessa nova descoberta. Por serem de origem animal, mais precisamente de camundongos, o uso em seres humanos gerava uma resposta de anticorpos humanos contra aqueles de origem murina, denominada resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*). O desenvolvimento de anticorpos pelo hospedeiro, gerando resposta imune contra as imunoglobulinas administradas, culminava na neutralização destas ou forte reação imune. Isso foi um grande desalento para o meio científico no que diz respeito à sua utilização como agente terapêutico, pois levava o paciente a sofrer com as fortes reações alérgicas, podendo inclusive chegar à anafilaxia. Essa é a grande e potencial complicação no tratamento soroterápico, especialmente se múltiplas aplicações forem necessárias e administradas por períodos prolongados (Schroff *et al.*, 1985; Shawler *et al.*, 1985).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e engenharia genética, foram possíveis as primeiras tentativas de minimizar este potencial imunogênico através da obtenção de anticorpos quiméricos, por meio da fusão das regiões variáveis da cadeia leve (*light chain*) e da cadeia pesada (*heavy chain*) do anticorpo de camundongo, com as cadeias constantes de imunoglobulinas humanas. Contudo, essas moléculas, ainda imunogênicas, geravam a resposta HACA (*human anti-chimeric antibody*) pelos anticorpos humanos anti-quiméricos. Para contornar este problema, um outro método foi desenvolvido. Este, preconiza o transplante das regiões determinantes de complementaridade - CDRs (*complementary determining regions*) murinas, para a região variável das cadeias leves e pesadas do arcabouço da molécula de anticorpo humano, que, além disso, mantêm as cadeias constantes da imunoglobulina humana, buscando assim diminuir sua imunogenicidade (Maranhão & Brígido, 2001).

Outras formas de obtenção de anticorpos para aplicação terapêutica através do emprego da engenharia genética são pela formação de uma biblioteca de expressão em fagos (*Phage-Display*) e também por uma outra técnica que utiliza modelos animais, como, por exemplo, camundongos transgênicos (Kipriyanov, 2004).

O emprego de fármacos à base de anticorpos recombinantes está se estabelecendo de forma consistente e relevante. O mercado mundial para anticorpos terapêuticos é de cerca de US\$ 5-6 bilhões, como mostra a figura 4.1 na página 98. Até o presente, a agência de administração de drogas e medicamentos americana (*food and drug administration* - FDA) liberou os seguintes anticorpos para fins terapêuticos: Infliximab, Simulect, ReoPro, Abciximab, Rituxan e Cetuximab (quiméricos), e Zenapax, Synagis, Trastuzumab, Gemtuzumab, Alemtuzumab, Bevacizumab e, recentemente, o Natalizumab Tysabri (humanizados). Além destes, um grande número se encontra em fase de testes clínicos. Nos próximos anos, o mercado deverá ser invadido por essas imunoglobulinas de última geração (Glennie & Johnson, 2000; Harris, 2004; FDA, 2004). Comercialmente, vários já se encontram disponíveis no mercado externo e conseqüentemente, com custo muito elevado, inviabilizando sua utilização em nosso sistema público de saúde, impedindo que as classes menos favorecidas possam ser beneficiadas pelo uso desses medicamentos.

A tecnologia de humanização de anticorpos monoclonais integra-os a uma nova classe de medicamentos, os biofármacos. Estes são direcionados ao tratamento de doenças de significativa importância na medicina como câncer, artrite reumatóide, asma, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), na prevenção de infecções bacterianas e na rejeição de transplante de órgãos. Portanto, o enorme potencial econômico agregado a essa nova classe de drogas é extremamente vasto, induzindo à busca da auto-suficiência tecnológica para a sua produção.

A implantação da tecnologia de produção de anticorpos humanizados para fins terapêuticos está indicada como sendo uma das prioridades da Unidade de Bio-Manguinhos, cabendo ao Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais - LATAM, viabilizar o desenvolvimento desses anticorpos.

Para tanto, esta dissertação foi desenvolvida em duas partes. A primeira discorre genericamente sobre os anticorpos, sua estrutura, classes, mecanismos de ação e, mais especificamente, sobre anticorpos monoclonais murinos humanizados. Nesse momento, é feita uma análise detalhada dos sistemas de expressão, cultivo e purificação empregados para essa finalidade.

Na segunda parte, o trabalho enfatiza o projeto próprio para a produção de anticorpos monoclonais humanizados pelo LATAM, destacando não só os aspectos biotecnológicos da proposta, como também os recursos físicos e humanos necessários para a implantação dessa metodologia. Parcerias, colaborações e análise mercadológica fazem parte da pesquisa.

Entendendo a amplitude da capacidade teórica e prática do tema escolhido para o presente trabalho, não terá este a pretensão de esgotar o conhecimento sobre a potencialização da implantação da tecnologia em questão.

Ressalta-se que esta dissertação se propõe a fornecer dados concretos para introduzir o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, nesse promissor mercado de anticorpos terapêuticos.

OBJETIVOS

I - Destacar as necessidades práticas, em relação à reestruturação do laboratório, espaço físico e equipamentos que viabilizem a implantação do desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanizados;

II – Selecionar, através da literatura e análise de mercado, um modelo de anticorpo para humanização, cujo investimento se justifique pela aplicação médica;

III - Identificar as exigências para a formação de recursos humanos (RH), visando a capacitação e qualificação da equipe em treinamentos voltados para essa nova metodologia;

IV - Estudar os diferentes sistemas de cultivo de células animais em biorreatores através da literatura, enfatizando suas vantagens e desvantagens.

PARTE I - ANTICORPOS

1 - ANTICORPOS

1.1 Conceito e Origem

Os anticorpos são moléculas glicoprotéicas, originárias das células B, que circulam através do sangue e da linfa. São responsáveis pela notável capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno. Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura única que lhe permite ligar-se especificamente ao seu antígeno correspondente. Todos possuem a mesma estrutura geral e são também chamados de imunoglobulinas (Silverton, 1977).

Antígeno é qualquer substância não reconhecida, estranha ao organismo. Possui uma região denominada determinante antigênico ou epítopo, onde ocorre a ligação com o anticorpo. Os antígenos podem ser compostos por vários epítopos distintos que possibilitam a ligação com anticorpos específicos para cada um deles. Os anticorpos são capazes de reconhecer uma grande variedade de moléculas biológicas antigênicas como determinados polissacarídeos, hormônios e proteínas.

Os microorganismos contam com vários componentes antigênicos capazes de provocar uma resposta imune, por exemplo, a parede das células bacterianas, cápsulas, fímbrias, flagelos e as toxinas, podem ser notadas como antígenos, assim como a cápside, os envoltórios e os componentes internos das partículas virais. Portanto, ao desenvolver uma vacina, é imprescindível identificar e empregar o antígeno correto para provocar uma resposta imunológica específica e protetora contra o patógeno correspondente. O processo de formação de anticorpos em resposta à presença do antígeno resulta na produção de moléculas de alta afinidade, com capacidade de distinção entre espécies de moléculas semelhantes.

Produzir anticorpos é basicamente simples (Fig.1.1). Inicialmente, seleciona-se o antígeno contra o qual se deseja o anticorpo. Estabelece-se a

dosagem e a via de inoculação mais adequada, de acordo com o modelo animal escolhido. Injeta-se o conteúdo da seringa no animal selecionado. Este procedimento se repetirá por duas ou três vezes aproximadamente, com intervalos de 14 dias entre cada inoculação. Cobaias, coelhos, cabras, camundongos, cavalos, entre outros, são os mais utilizados para a produção de anticorpos, sendo o camundongo o mais comumente empregado para a produção dos anticorpos monoclonais. Finalmente, cerca de 30 - 45 dias após a primeira inoculação, esse animal é sangrado e no seu soro estarão presentes os anticorpos que irão reconhecer o antígeno previamente aplicado. Os anticorpos produzidos desse modo constituem uma mistura heterogênea de imunoglobulinas específicas para diferentes epítopos de um mesmo antígeno e para epítopos de diferentes antígenos, sendo denominados policlonais (Silverton, 1977; Roque, 2004).

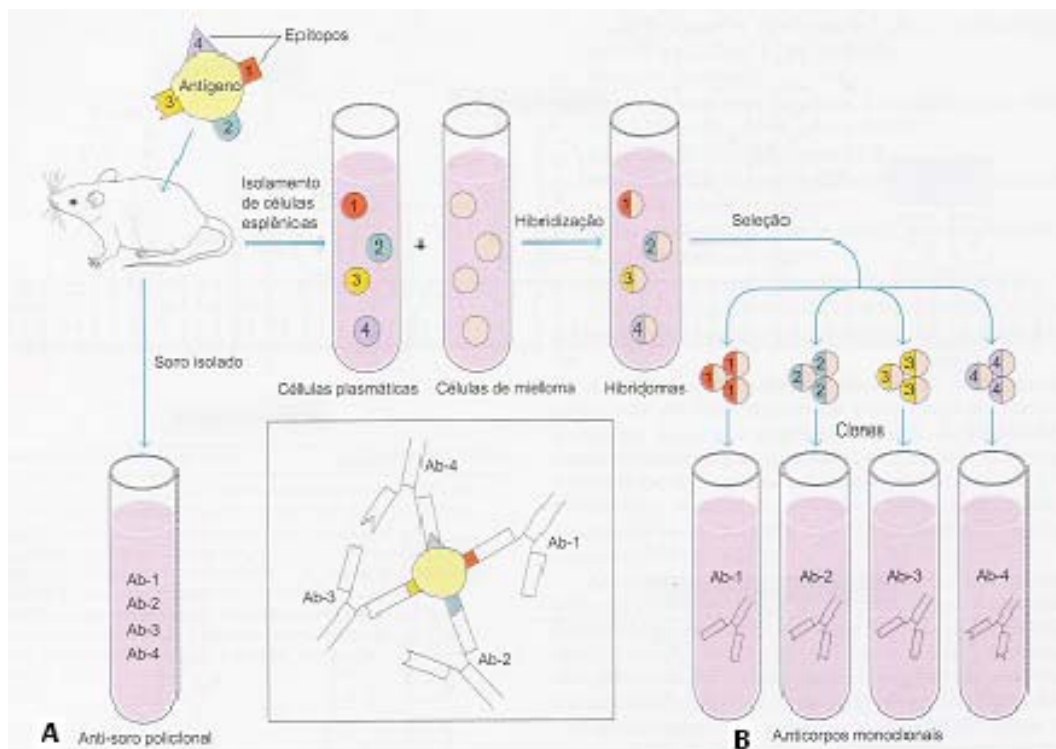


Figura 1.1 - Esquema da produção de anticorpos a partir da inoculação do antígeno em camundongo. **A** – Soro policlonal. **B** – Anticorpos monoclonais. Fonte: Kuby, 2002.

O processo de se isolar, em uma mistura de células esplênicas, um linfócito secretor do anticorpo específico a uma determinada região do antígeno, permite a obtenção do anticorpo monoclonal, isto é, aquele originário e produzido por um único clone de linfócitos B. Os hibridomas, células híbridas secretoras de

anticorpos específicos, provêm da fusão de células de mieloma com células esplênicas imunes, como será descrito posteriormente. Este híbrido isolado será clonado e ampliado, formando um banco de células secretoras de anticorpos com alta especificidade para o antígeno alvo da imunização que se precedeu. Técnicas diferenciadas, como ensaios imunoenzimáticos (*enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA) ou citometria de fluxo, podem ser empregadas para selecionar a célula híbrida secretora de anticorpo (Silverton,1977; Kuby, 2002).

1.2 Estrutura e Funções

Os anticorpos têm sua estrutura em forma de “Y”, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas pesadas C_H , (*heavy chain*) e duas leves C_L , (*light chain*), ligadas principalmente por pontes dissulfídricas, compostas por domínios distintos. Em cada cadeia leve e pesada, os 110 aminoácidos da porção amino-terminal constituem um domínio variável (V_L e V_H). O remanescente de cada cadeia leve consiste de um domínio constante único (C_L) e o restante de cada cadeia pesada contém três ou quatro domínios constantes (C_H) (Fig.1.2).

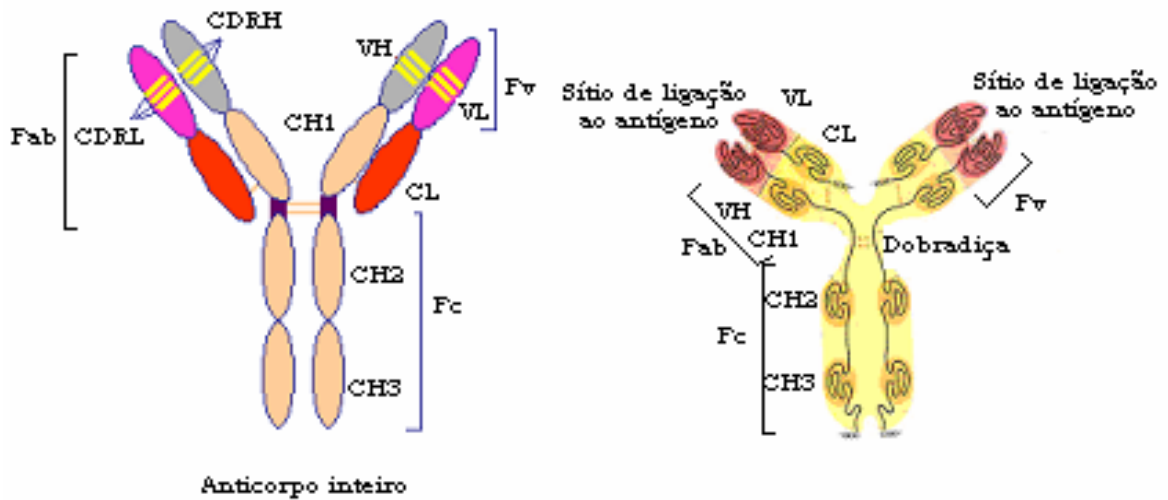


Figura 1.2 – Estrutura da molécula de imunoglobulinas. (Fonte: UFMG, 2005), onde:

Fab – Fragmento de ligação com o antígeno (*Fragment antigen binding*);

Fv – Região de domínio variável das cadeias leves e pesadas;

Fc – *Crystallizable Fragment*) fragmento cristalizável;

CDR – Região determinante de complementaridade (L leve e H pesada) (*Complementarity Determining Regions*);

C_L – Região constante da cadeia leve;

V_L – Região variável da cadeia leve;

V_H – Região variável da cadeia pesada;

V_HV_L – Domínios variáveis das cadeias pesada e leve;

C_HC_L – Domínios constantes das cadeias pesada e leve;

C_{H1}; C_{H2}; C_{H3} – Domínios carboxi-terminais constantes, da cadeia pesada;

Na extremidade C-terminal está localizado o fragmento F_C , denominado fragmento cristalizável (*crystallizable fragment*). Esta região é reconhecida pelas células do sistema imune, ligando-se aos receptores da membrana celular de macrófagos, entre outras células efetoras do sistema imune. Também é responsável pela ativação do complemento pela via clássica, contribuindo no processo de destruição de microorganismos. Na extremidade N-terminal localizam-se os fragmentos Fab de ligação com o antígeno (*antigen binding fragment*), que possuem dois sítios de ligação ao antígeno. Dentro do domínio variável de cada cadeia leve e pesada, há uma região descrita como hipervariável, em função da alta variabilidade de aminoácidos observada em relação ao restante do domínio, constituindo 15-20% deste (Fig.1.3). Estas regiões hipervariáveis são complementares ao epítipo de um antígeno, sendo denominadas regiões determinantes de complementaridade CDRs (*complementarity determining regions*). Cada sítio de ligação ao antígeno é constituído por seis CDRs, sendo três da região variável da cadeia leve e três da região variável da cadeia pesada, com função de estabelecer contato físico com o antígeno (Silverton, 1977; Abbas, 2000; Kuby, 2002; Kipriyanov, 2004) (Figs.1.4 e 1.5).

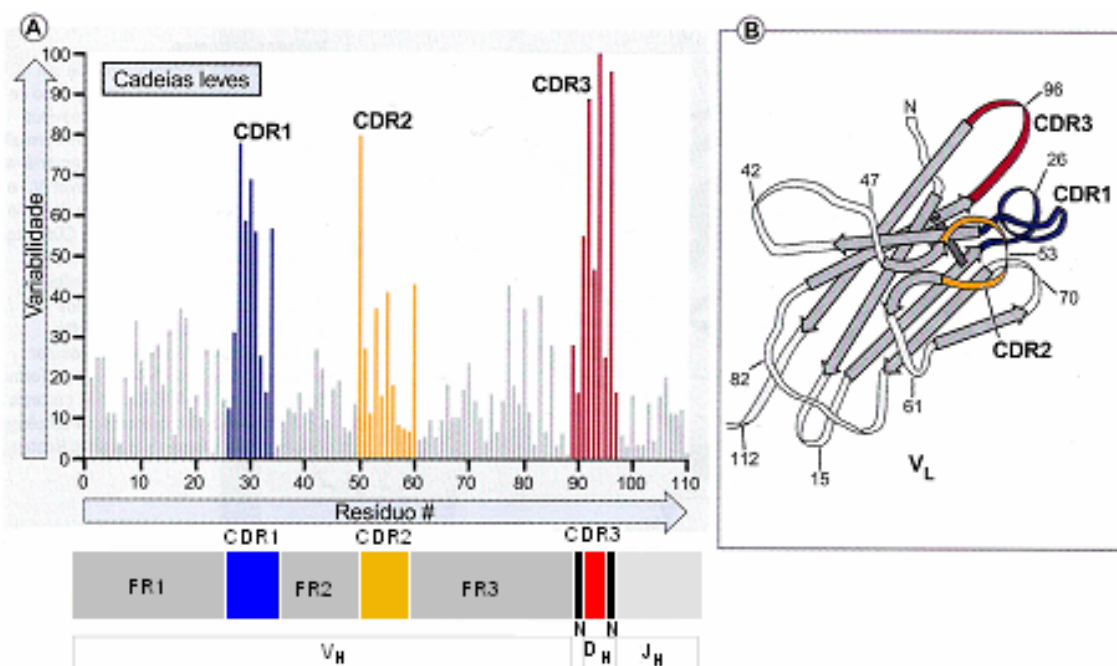


Figura 1.3 – **A** – Representação da variabilidade em cada posição das distintas regiões determinantes de complementaridade dos segmentos V_H (CDR1, CDR2, CDR3). No esquema inferior, a região variável do gen IgH rearranjado, interrompida por três regiões do arcabouço (*framework*) de aminoácidos relativamente conservados. A região CDR3 é a mais hipervariável e compreende a sequência que resulta da união dos segmentos gênicos $V_H - D_H - J_H$, além dos segmentos N (barras pretas) inseridas durante a recombinação. **B** - Estrutura molecular da região variável da cadeia leve V_L com três alças das CDRs. Fonte: Adaptação de Kuby, 2002.

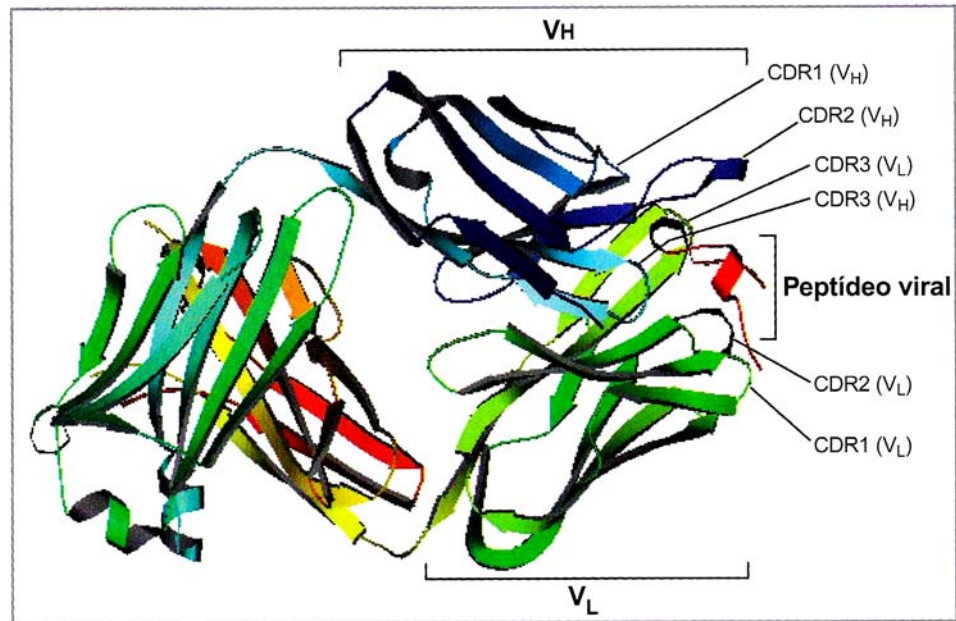


Figura 1.4 - Estrutura molecular das regiões variáveis da cadeia pesada V_H e da cadeia leve V_L com as alças das CDR identificadas. Notar a ligação com o peptídeo viral. Fonte: Kuby, 2002.

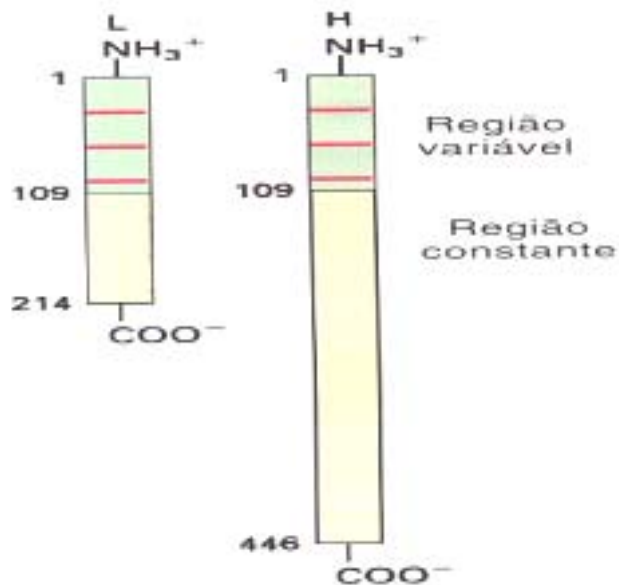


Figura 1.5 - As cadeias leve (L) e pesada (H) das imunoglobulinas consistem em uma região variável (verde) e uma região constante (amarelo). As regiões hipervariáveis (regiões determinantes de complementaridade - CDR) são mostradas em vermelho. NH₃⁺ - região amino-terminal. COO⁻ - região carboxi-terminal. Fonte: UFMG, 2005.

1.3 Classes e Subclasses

Como citado anteriormente, cada molécula de anticorpo possui dois sítios de ligação ao antígeno, constituídos por seis alças hipervariáveis. Nesses sítios identifica-se o paratopo, que é a região do anticorpo constituída pelos peptídeos contendo os aminoácidos complementares àqueles constituintes do epítipo do antígeno. A produção de anticorpos inicia-se com a ligação específica entre os epítipos dos antígenos com paratopos dos anticorpos na superfície das células B, levando à produção de anticorpos de mesma especificidade, mas de classes ou isótipos diferentes, os quais são encontrados na porção líquida (plasma) do sangue e nos fluidos extracelulares. No passado, esses fluidos eram conhecidos como humores. Denominou-se então a imunidade mediada pelos anticorpos como imunidade humoral.

A forma de “Y” de um anticorpo facilita a sua descrição. Os fragmentos Fab que formam dois sítios idênticos de ligação com o antígeno possui as regiões V_H e V_L que são altamente variáveis de uma molécula para outra, proporcionando assim, a diversidade necessária para o reconhecimento do antígeno. As cadeias leves podem ser do tipo κ (capa) ou λ (lambda). Já as cadeias pesadas definem a classe e as propriedades funcionais do anticorpo, podendo se apresentar de cinco formas ou isótipos. Cada classe ou isótipo comporta um diferente conjunto de mecanismos efetores para a eliminação do antígeno, uma vez que este é reconhecido (Fig.1.6).

Apesar de apresentarem muita semelhança, diferem entre si, possuindo características distintas no tamanho, no conteúdo de carboidratos e na carga elétrica. São identificados como IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, designando-se por isótipos às características típicas das suas cadeias pesadas definidas pelas letras gregas γ , α , μ , δ e ϵ , (gama, alfa, mi, delta e épsilon), respectivamente (Janeway & Travers, 1997; USP, 2004) (Fig.1.7).

Imunoglobulina G

A IgG é a principal imunoglobulina do sangue, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. É monomérica e é a própria classe de anticorpo presente nas respostas imunes secundárias, quando são produzidas em grande quantidade. São encontradas no sangue e líquido extracelular, onde podem neutralizar toxinas, vírus e bactérias, opsonizá-los para fagocitose e também ativar o sistema do complemento. É a única que atravessa a barreira placentária e confere um alto grau de imunidade passiva ao recém-nascido. A IgG apresenta quatro subclasses distintas: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, que possuem quatro cadeias pesadas similares, porém não-idênticas, já que apresentam diferenças em suas estruturas, tais como número de pontes dissulfídicas, seqüências de aminoácidos e propriedades biológicas.

Imunoglobulina A

A IgA representa cerca de 10 a 15% das imunoglobulinas totais. É a imunoglobulina predominante nas secreções: saliva, lágrimas, secreções nasais, colostro, leite, secreções traqueobrônquicas e gastrintestinais. Sua estrutura pode variar, dando origem a duas subclasses: IgA1 e IgA2. A maior parte das IgA é da subclasse IgA1, a mais encontrada no soro, e a IgA2, mesmo em menor quantidade, tem um papel importante, por se tratar da subclasse dominante nas secreções, nas quais tem a função de proteger a mucosa de agressões. Não atravessa a barreira transplacentária, mas, por sua grande concentração no colostro, tudo indica que contribua para a proteção dos recém-natos contra infecções, principalmente do tubo gastrintestinal.

Imunoglobulina M

Representa 5 a 10% das imunoglobulinas totais. Apresenta-se na forma de um pentâmero e não possui subclasses. É reconhecida como o anticorpo precoce, visto ser a primeira imunoglobulina encontrada na resposta a um estímulo antigênico. Por isso, é útil no diagnóstico diferencial das infecções virais ou parasitárias agudas. É a única que o neonato sintetiza.

Imunoglobulina D

Representam menos de 1% das imunoglobulinas plasmáticas. Aparecem em grande quantidade na membrana dos linfócitos B circulantes. Sua função biológica ainda não é bem conhecida, mas parece desempenhar um papel importante na diferenciação dos linfócitos antigenicamente estimulados, sendo um dos principais receptores para antígenos na superfície das células B.

Imunoglobulina E

Entre todas as classes de imunoglobulinas, a IgE é encontrada em menor quantidade. Pode ligar-se à superfície de basófilos e mastócitos através de receptores, o que resulta na liberação de mediadores da resposta de hipersensibilidade imediata. Tem um papel importante na imunidade ativa contra parasitos, especialmente os helmintos, e nas doenças alérgicas.

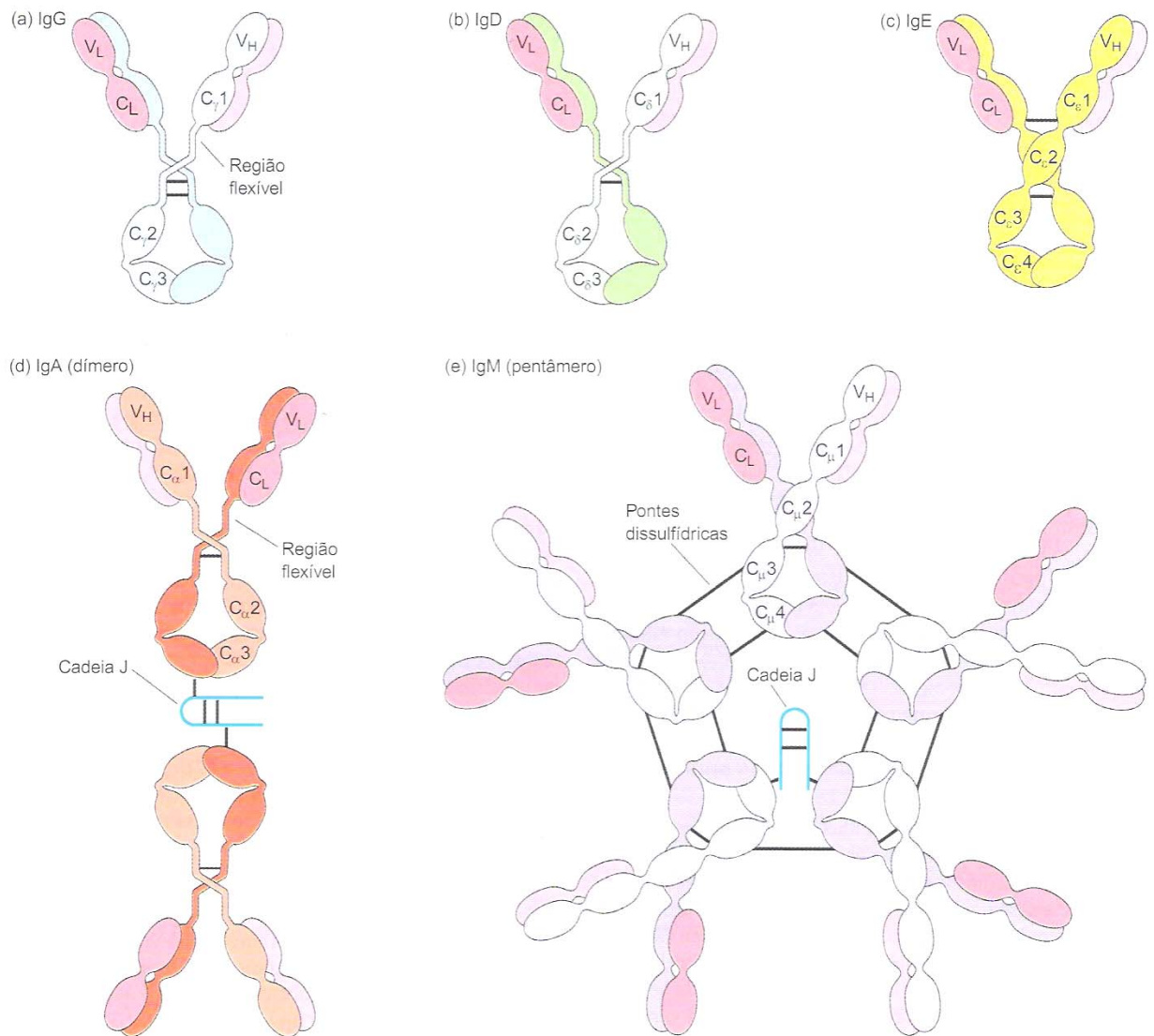


Figura 1.7 – As classes de imunoglobulinas IgG, IgD, IgE, IgA e IgM.
 Fonte: Kuby, 2002.

1.4 Mecanismos de Ação dos Anticorpos

A resposta imune humoral mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B (Fig.1.8) leva à destruição de organismos extracelulares e previne a disseminação das infecções intracelulares. Dentre as principais maneiras pelas quais os anticorpos contribuem para a imunidade estão a neutralização, a opsonização, a facilitação da fagocitose, a ativação do sistema complemento e a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), pela via clássica.

Neutralização

A maneira mais simples e direta para os anticorpos protegerem contra agentes patogênicos ou seus produtos tóxicos é pela ligação com estes, bloqueando seu acesso às células que podem infectar ou destruir. Tal mecanismo é conhecido como neutralização e protege contra toxinas microbianas e contra patógenos intracelulares como os vírus, impedindo-os de penetrar nas células onde se replicariam. Os anticorpos recobrem os sítios tóxicos do agente antigênico, neutralizando-o.

Opsonização

Em relação às bactérias que se multiplicam no meio extracelular, apenas a ligação pelos anticorpos não é suficiente para eliminá-las. Neste caso, uma função do anticorpo é a de permitir que a célula fagocitária, como neutrófilo e macrófago, ingira e destrua a bactéria. Alternativamente, os fagócitos possuem receptores de membrana que reconhecem a região Fc dos anticorpos IgG que recobrem a bactéria, resultando na fagocitose do complexo antígeno-anticorpo. O mecanismo de revestimento de patógenos e de partículas estranhas pelos anticorpos é chamado de opsonização (Fig.1.9).

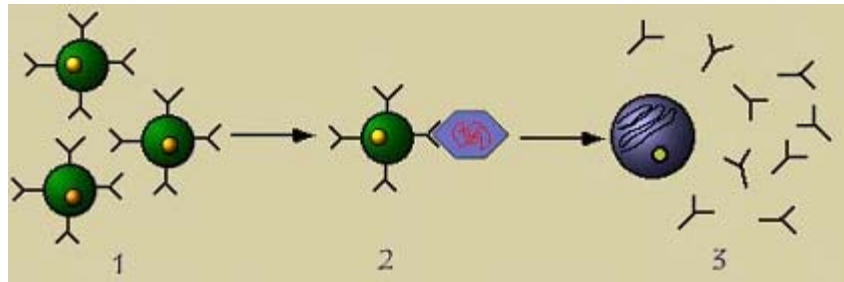


Figura 1.8 – Mecanismos de ação de anticorpos – imunidade humoral. O corpo produz células B com pequenas diferenças em seus receptores de superfície (1). Quando uma célula B encontra um antígeno para o qual tem forte afinidade (2), ela se torna ativada. Além da ativação, ela se prolifera rapidamente, produzindo muitas células plasmáticas. Cada uma dessas células secreta anticorpos específicos para a molécula estranha, o antígeno (3). Entre as etapas 2 e 3, os anticorpos produzidos pelas células B sofrem modificações evolutivas estruturais, a fim de tornarem-se mais específicos para o antígeno, aumentando sua afinidade de ligação. Fonte: USP, 2005.

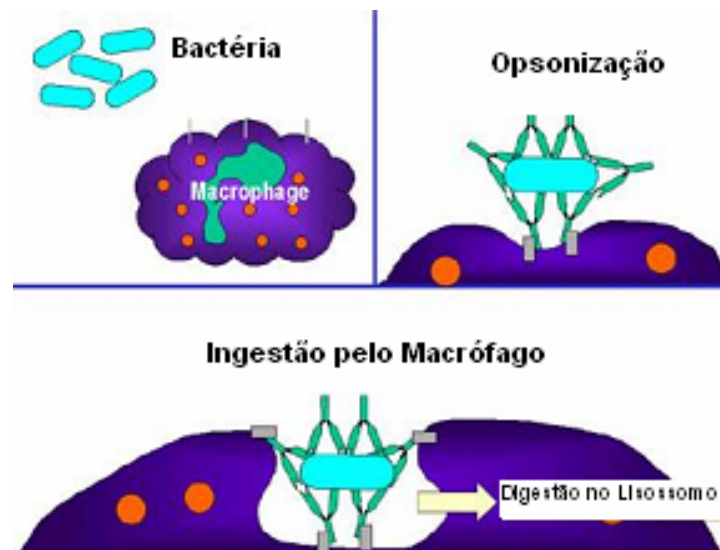


Figura 1.9 – Opsonização: A reação com os anticorpos não é suficiente para conter a replicação de bactérias que se multiplicam no meio extracelular. O anticorpo estimula a célula fagocitária a ingerir e destruir o microorganismo. Os fagócitos reconhecem a região constante dos anticorpos que recobrem a bactéria. Este processo de cobertura de germes patogênicos e partículas estranhas pelos anticorpos é denominada opsonização, que culmina com a fagocitose da célula bacteriana. Fonte: USP, 2005.

Citotoxicidade Mediada por Células Dependentes de Anticorpo - ADCC

Diversas células, como as NK (*Natural Killer*), macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, possuem potencial citotóxico e expressam receptores de membrana para a região Fc da molécula do anticorpo (IgG e IgE). A destruição pelas células NK de células alvo recobertas por anticorpos é denominada citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC - *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) e ocorre quando anticorpos ligados à superfície de uma célula interagem com os receptores Fc nas células NK. Inicia-se então a destruição citotóxica das células alvo através da liberação de grânulos citoplasmáticos da célula NK contendo perforinas e granzimas (Janeway & Travers, 1997) (Fig.1.10).

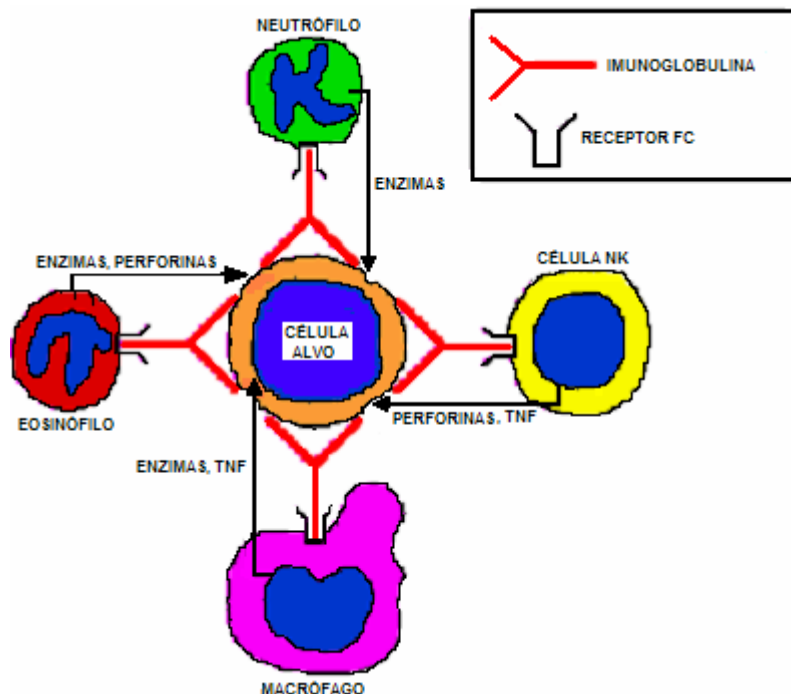


Figura 1.10 – Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos: os receptores Fc ativam as células linfóides especializadas denominadas matadoras naturais ou *natural killer* (NK). A destruição de células-alvo recobertas por imunoglobulinas por essas células NK é chamada de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) e é deflagrada quando anticorpos ligados à superfície de uma célula interagem com receptores Fc nas células NK. TNF – fator de necrose tumoral (*tumoral necrosis factor*). Fonte: Janeway & Travers, 1997; USP, 2005.

Ativação do complemento

Uma outra função dos anticorpos IgM e IgG é a de ativar, pela via clássica, um sistema de proteínas plasmáticas conhecido como complemento. Os poros formados pelos componentes ativos do complemento podem destruir diretamente os microorganismos. Alguns dos componentes do complemento são opsoninas que se ligam ao antígeno alvo e direcionam os fagócitos que possuem receptores específicos para estas, promovendo a fagocitose.

Lesão física e lesão química

As células podem morrer de duas formas diferentes. A primeira por lesão física ou química (quimiotaxia): o complemento induz a quimiotaxia pelos neutrófilos e macrófagos, causando, assim, a migração de grande número de fagócitos para área tecidual adjacente ao agente antigênico e também por danos causados à membrana (lesão física), pelo anticorpo e complemento, que levarão à desintegração celular ou necrose.

A segunda forma é conhecida como morte celular programada ou apoptose, que leva a fragmentação do DNA, à ruptura do núcleo e à modificações na morfologia celular. A célula se autodestrói de dentro para fora, contraindo-se e degradando-se. Essa degradação também leva a destruição aos agentes patogênicos que nela se encontrem, como vírus, por exemplo. Desta forma, o mecanismo de apoptose é preferível à necrose como meio de eliminação celular, pois, nesta última, os agentes patogênicos intactos são liberados pela célula morta, podendo dar continuidade à infecção de células saudáveis, ou podem parasitar os macrófagos que os ingeriram (Janeway & Travers, 1997).

2 - ANTICORPOS MONOCLONAIS

2.1 Anticorpos Monoclonais Murinos

A descoberta de Köhler & Milstein, em 1975, refere-se ao processo de produção de anticorpos monoclonais com afinidades específicas, que poderiam ser empregados como fármacos ou direcionados a qualquer parte do organismo humano, visando atingir um único tecido ou mesmo um determinado tipo celular. Isso foi possível através da obtenção dos hibridomas, que são células viáveis, originárias da fusão entre duas células que possuem características genéticas distintas. Utilizam-se células com características neoplásicas (tumorais), denominadas células mielômicas, que têm a capacidade de reprodução indefinida, podendo ser cultivadas *in vitro*, continuamente, por longos períodos. Essas células não são capazes de secretar anticorpos. Uma segunda linhagem celular empregada nesse processo, corresponde às células linfocitárias originárias do baço de um animal previamente imunizado, denominadas células esplênicas ou linfócitos B, que têm como característica uma baixíssima reprodutibilidade *in vitro*, porém são essencialmente excelentes secretoras de anticorpos (Köhler & Milstein, 1975).

Essas células linfocitárias são fusionadas com as células mielômicas empregando-se a técnica desenvolvida por Köhler & Milstein (1975). Assim, são geradas células híbridas, os hibridomas, que reunirão as características genéticas de ambas, ou seja, serão células capazes de se reproduzirem constitutivamente e também secretarem anticorpos contra o antígeno específico, aplicado previamente na imunização. Esses hibridomas são células derivadas de um único clone, que produzem e secretam imunoglobulinas idênticas, as quais denominamos anticorpos monoclonais. Estes anticorpos interagem específica e exclusivamente com aquele determinante antigênico usado como imunizante (Silverton, 1977) (Fig.2.1).

O desenvolvimento da tecnologia de obtenção de anticorpos monoclonais foi extremamente importante para a compreensão de respostas imunes, diversidade de imunoglobulinas, respostas primária e secundária e hipermutação somática, ou seja, a mudança na seqüência da região variável do

anticorpo produzido por uma célula B, após estímulo antigênico, levando a um aumento na sua afinidade para o referido antígeno. Constitui o meio mais específico para a identificação e determinação de variações antigênicas de tipos e subtipos de um mesmo agente etiológico, aplicação esta inviável para os soros policlonais, em função da reatividade cruzada causada por antígenos comuns dominantes e conseqüentemente a sua baixa especificidade.

A preparação de hibridomas constituiu um marco na imunquímica. É um processo laborioso, porém com muitas possibilidades. A primeira aplicação dessa tecnologia foi a produção de anticorpos monoclonais para substituir, em grande parte dos ensaios, os anticorpos policlonais obtidos por meios convencionais. Talvez a sua mais importante contribuição tenha sido ajudar a compreender alguns processos imunes e possibilitar a manipulação *in vitro* dos anticorpos. Com o desenvolvimento da biologia molecular, tornou-se possível a síntese do anticorpo monoclonal, que permitiu a dissecação das respostas do sistema imune contra antígenos específicos. Ajudaram também na compreensão da estratégia que um animal faz uso para produzir anticorpos de alta afinidade. Dessa forma, pôde-se entender e descrever o processo de maturação da resposta imune. Este processo pode ser resumido do seguinte modo: os anticorpos que se produzem em seguida a uma estimulação antigênica, caracterizando a resposta primária, são diferentes daqueles que se originam como resultado de uma segunda estimulação, a resposta secundária e também da hiperimunização, que é o resultado de múltiplas inoculações. Depois de cada estímulo, há uma melhora da especificidade (caráter complementar) e da afinidade (força de ligação) do anticorpo com relação ao antígeno.

Os anticorpos monoclonais possuem diversas aplicações no tratamento e diagnóstico de diversas doenças e podem ser utilizados como marcadores celulares, moduladores da rejeição em pacientes transplantados, na desintoxicação por drogas, na composição de conjuntos de reativos (*kits*) para diagnóstico como por exemplo, sarampo, dengue 1, 2, 3 e 4, hepatite A, B e C, leptospirose, febre amarela e na terapia de uma grande variedade de doenças auto-imunes, como artrite, lúpus eritematoso, anemia e asma (Hon, 2004).

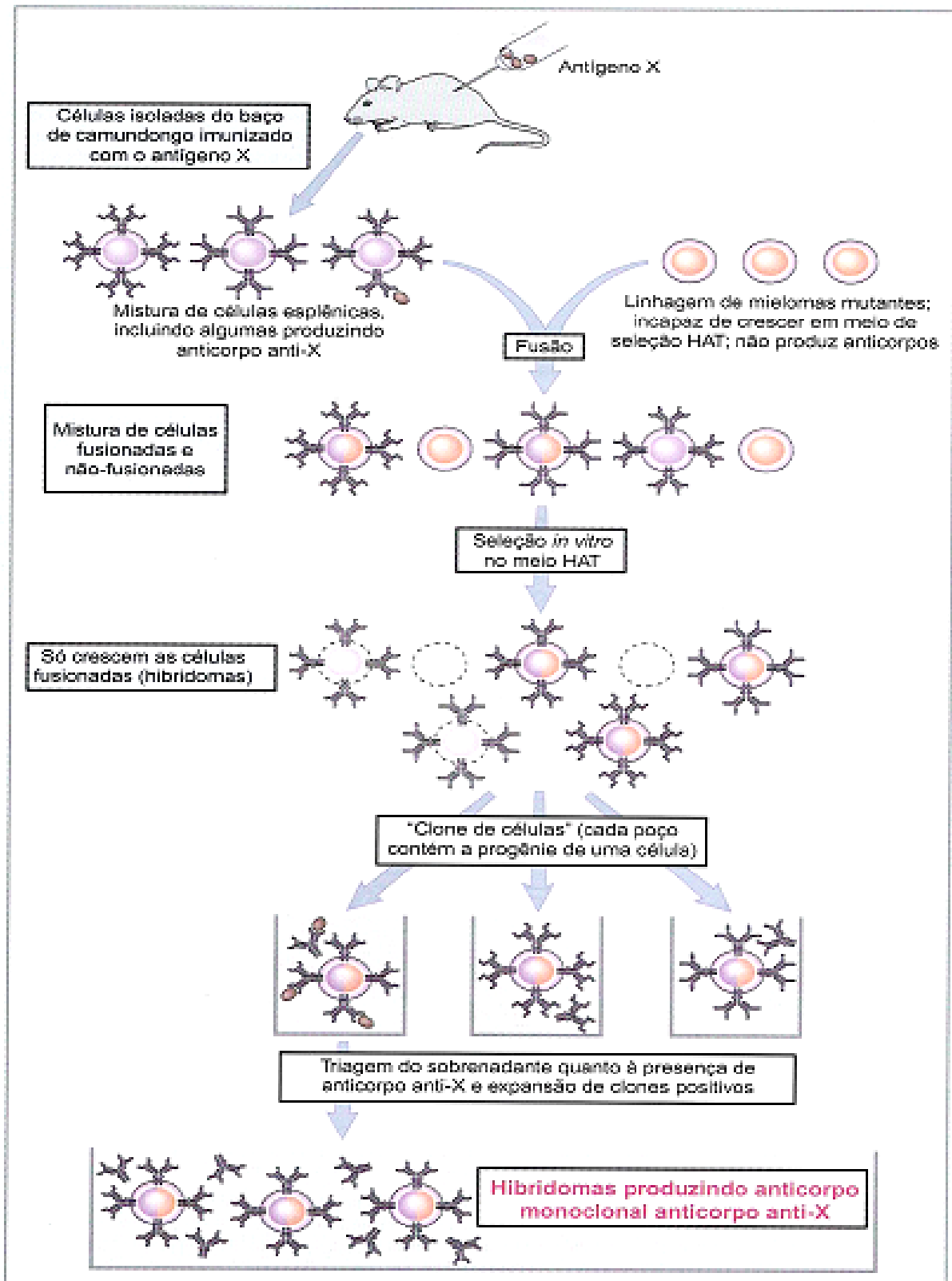


Figura 2.1 – Ciclo de produção de anticorpos monoclonais. Meio HAT: Hipoxantina, Aminopterina e Timidina. Fonte: Kuby, 2002.

2.2 Anticorpos Monoclonais Quiméricos e Humanizados

O principal problema da aplicação de anticorpos monoclonais em seres humanos é a reação imunogênica gerada pelo paciente, em função da presença de moléculas murinas em seu organismo. Na década de 80, foram iniciados trabalhos visando tornar os anticorpos monoclonais com características mais humanas e, dessa forma, menos imunogênicos. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular (tecnologia do DNA recombinante) e sua integração com a tecnologia de hibridomas, foi possível proceder as primeiras tentativas de reduzir esse potencial imunogênico, causado pelos anticorpos monoclonais heterólogos (Roque, 2004).

Por meio da fusão dos segmentos do DNA codificante das cadeias variáveis leve e pesada de um anticorpo murino, específicos para um determinado antígeno, com os segmentos do DNA codificante das cadeias constantes humanas, formaram-se moléculas quiméricas, denominadas anticorpos quimerizados. Essas moléculas eram ainda imunogênicas e geravam uma reação imunológica com anticorpos humanos anti-quiméricos, identificada como resposta HACA (*human anti-chimeric antibody*) (Glennie & Johnson, 2000; Mirick *et al.*, 2004). Em outras palavras, a porção murina ainda se encontrava em concentrações suficientes para gerar reação imunogênica no organismo hospedeiro (Maranhão & Brígido, 2001).

Assim, com o objetivo de minimizar a resposta imune do hospedeiro, propôs-se a humanização de anticorpos. Os protocolos mais modernos de humanização preconizam o transplante das CDRs murinas (*CDR-grafted*) para as cadeias variáveis da estrutura da molécula de um anticorpo humano (Roque, 2004). Como resultado, obtém-se uma molécula que possui afinidade e especificidade características da original murina para o antígeno alvo, porém com uma mínima porção murina em sua composição.

Para a construção de um anticorpo humanizado, uma porção constante F_C é fusionada a uma região de domínio variável, desenhada de forma tal que sua seqüência de aminoácidos seja a mais próxima possível da região homóloga do anticorpo humano. Essa molécula mantém as cadeias constantes da imunoglobulina humana, podendo receber as cadeias variáveis V_H e V_L murinas tornando-se um

anticorpo quimérico ou recebendo somente as CDRs murinas transplantadas para as referidas cadeias variáveis tornando, dessa forma, a molécula suficientemente invisível para o sistema imune do paciente que a receberá, diminuindo sensivelmente sua imunogenicidade ou suprimindo-a completamente. O limite desse processo é se obter uma molécula o mais humana possível, sem que esta perca a sua atividade biológica original (Fig.2.2).

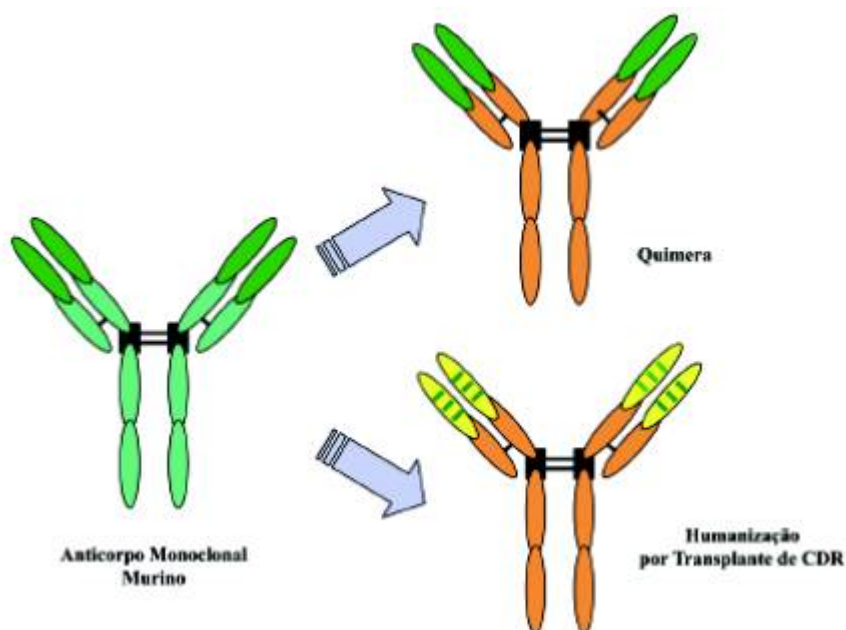


Figura 2.2 – Ciclo de Humanização – Anticorpos Murinos, Quiméricos e Humanizados:

Um anticorpo monoclonal murino (em verde) apresenta limitações quanto ao seu uso repetitivo como fármaco, devido à resposta HAMA. As primeiras tentativas de minimizar este potencial imunogênico foram feitas por meio da fusão das cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo do camundongo (em verde escuro), com as cadeias constantes humanas (em laranja), formando moléculas quiméricas. Essas moléculas eram ainda imunogênicas ocasionando a resposta HACA. Assim, os protocolos mais modernos de humanização preconizam o transplante das CDR murinas (linhas verdes) para cadeias variáveis humanas (em amarelo). Essa molécula teria ainda as cadeias constantes de imunoglobulinas humanas como na quimera e se apresenta de forma suficientemente invisível, passando praticamente despercebida para o sistema imune, gerando baixa ou nenhuma reação.

Fonte: Maranhão & Brígido, 2001.

2.3 Outras Estratégias para Geração de Anticorpos Monoclonais com Fins Terapêuticos

Além dos anticorpos quiméricos e dos humanizados, outras alternativas existem para a produção de anticorpos totalmente humanos, bem como de reagentes derivados de anticorpos humanos. Através do isolamento de genes codificantes de várias regiões humanas, como na biblioteca de anticorpos em fagos e por meio da tecnologia do DNA recombinante, obtém-se um anticorpo monoclonal integralmente humano da classe IgG (Vaughan, 1998) (Fig.2.3).

Muitos fatores influenciam na imunogenicidade de determinados anticorpos terapêuticos. Alguns são inerentes à sua construção, ao passo que outros são relacionados à maneira como esses anticorpos são administrados ou como o paciente responde. Até hoje, não há método adequado *in vitro* que possa prever a imunogenicidade *in vivo* de anticorpos construídos, e os ensaios clínicos são ainda o único meio seguro e eficaz de avaliar se o anticorpo é ou não imunogênico. As respostas *human anti-humanized antibody* – HAAA, contra os anticorpos humanizados administrados aos pacientes, podem apresentar formas diferentes, que variam de hospedeiro para hospedeiro. Seria desejável desenvolver um método sensível, específico e rápido para avaliação da HAAA, que permita discriminação entre os tipos de resposta imune que são prejudiciais ao paciente, de forma a exigir a interrupção do tratamento com os anticorpos que gerem esse tipo de resposta. O desenvolvimento desse novo método permitiria o tratamento prolongado com anticorpos humanizados, oferecendo total segurança aos pacientes (Ritter *et al.*, 2001; Mirick *et al.*, 2004).

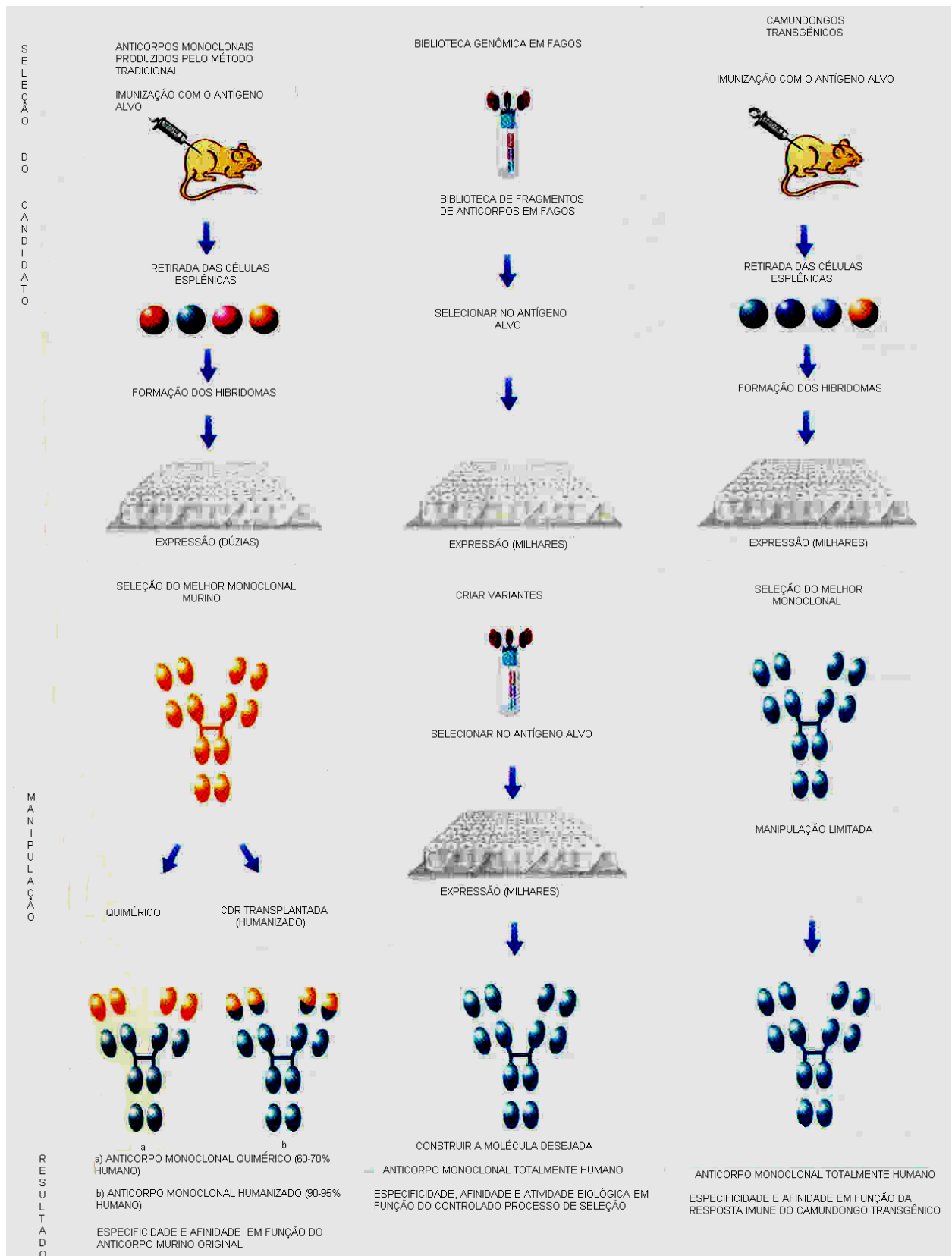


Figura 2.3 – Comparação entre os métodos de Produção de Anticorpos Monoclonais. Pelo método tradicional ou através da tecnologia do DNA recombinante, o anticorpo monoclonal final é uma IgG completa. Pelo método da biblioteca genômica em fagos, o painel dos monoclonais são em formato scFv ou Fab. Isso facilita engenharias posteriores para alcançar a característica desejada. Em todos os casos, os anticorpos monoclonais candidatos à clínica requerem reclonagem em vetores de expressão em células de mamíferos e estabelecimento da produção em cultura celular. Fonte: Vaughan, 1998.

2.3.1 Anticorpos monoclonais obtidos por biblioteca genômica

A biblioteca de expressão em fagos pode imitar a estratégia utilizada pelo sistema imune humoral para produzir anticorpos ou fragmentos de anticorpos completamente humanos *in vivo* e pode evitar a imunização e a construção de hibridomas. Um pré-requisito está no isolamento e clonagem da região variável dos genes das cadeias leve e pesada da imunoglobulina para apresentá-la funcionalmente em um fago (Fig.2.4).

A fonte dos genes dos doadores da imunoglobulina pode ser animal ou humana, imunizada ou não imunizada. Pequenas bibliotecas de fontes de animais imunizados geralmente promovem anticorpos de grande afinidade para o antígeno (Roque, 2004).

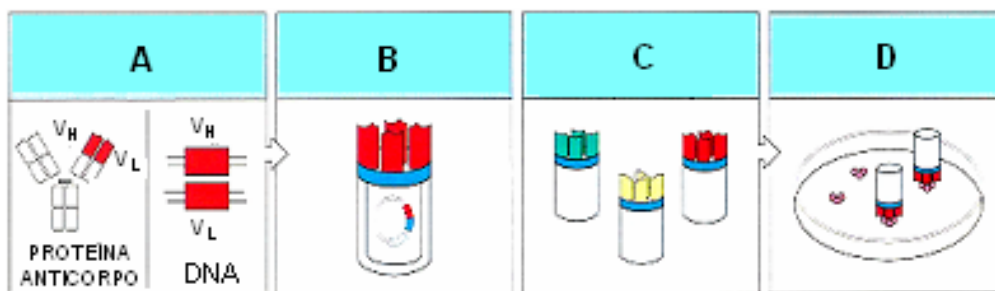


Figura 2.4 - Biblioteca de expressão genômica em fagos. **A** - Isolar a população de genes que codificam regiões variáveis de cadeia leve - V_L - e pesada - V_H - de anticorpo. **B** - Construir proteína de fusão da região V com uma proteína de cobertura de bacteriófago. **C** - A clonagem de uma população randomizada de regiões variáveis dá origem a uma mistura de bacteriófago – uma biblioteca de expressão em fago. **D** – Selecionar o fago com regiões V desejadas mediante a ligação específica com o antígeno. Adaptação da Fonte: Janeway & Travers, 1997.

Fagos são estruturas virais constituídas por uma molécula de ácido nucléico, que pode ser DNA ou RNA, envolvida por um capsídeo. Para se replicarem precisam infectar uma célula, que em geral apresenta sítios receptores específicos para determinados vírus. A interação célula-vírus é específica.

Fagos semelhantes a anticorpos podem ser produzidos por uma nova técnica para produção de moléculas semelhantes. Os segmentos genéticos que

codificam domínios variáveis que se ligam ao antígeno (domínios V dos anticorpos), são fusionados com os genes responsáveis pela proteína do capsídeo de um fago ou bacteriófago. Aqueles que contêm as mesmas fusões de genes são usados para infectar bactérias, e as partículas fágicas resultantes têm capsídeos que expressam a proteína de fusão semelhante ao anticorpo, com o domínio variável exposto por fora do fago. Uma coleção de fagos recombinantes, cada um deles exibindo um domínio antígeno-específico diferente em sua superfície, é conhecida como sendo uma biblioteca de expressão em fago (Fig.2.5).

Quase que da mesma maneira segundo a qual os anticorpos específicos para um dado antígeno podem ser isolados de uma mistura complexa por cromatografia de afinidade, os fagos que expressam domínios antígeno-específicos para uma substância em particular podem ser isolados na biblioteca de expressão em fago, por sua ligação àquele antígeno.

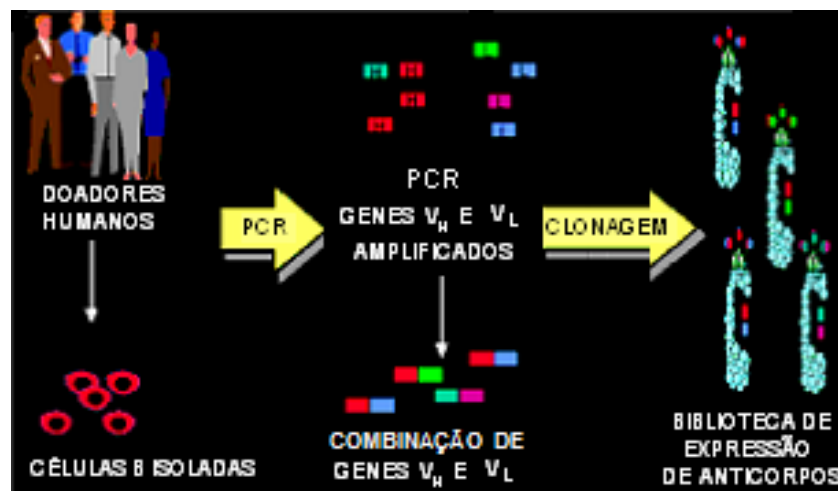


Figura 2.5 – Triagem de anticorpos para formar biblioteca de expressão em fagos. As células B são isoladas dos doadores. As regiões V_H e V_L são amplificadas por PCR. Combinação de genes V_H e V_L. Formação da biblioteca genômica de anticorpos em fagos. Adaptação da fonte: UFMG 2005.

As partículas fágicas ligantes são recuperadas e usadas na infecção de novas bactérias. Cada fago isolado produzirá desta maneira uma partícula antígeno-ligante monoclonal análoga a um anticorpo monoclonal. Os genes codificantes do sítio ligante ao antígeno, únicos para cada fago, podem ser então recuperados do DNA fágico e usados na construção de genes para uma molécula de anticorpo

completa, mediante sua união com os segmentos genéticos que codificam as regiões constantes de um anticorpo.

Quando tais genes reconstruídos são introduzidos numa linhagem celular hospedeira apropriada, como as células mielomatosas não secretoras de anticorpos usadas nos hibridomas, as células transfectadas secretam anticorpos com todas as características dos anticorpos monoclonais originários dos hibridomas. Em uma última análise, esta técnica pode vir a substituir a rota tradicional de fusão celular para a produção de anticorpos monoclonais.

O desempenho do reagente fágico obtido quanto à sua capacidade de reconhecimento do antígeno depende de dois fatores fundamentais: primeiro, o tamanho da biblioteca inicial, isto é, a capacidade de representar o repertório do animal imunizado; segundo, o procedimento de seleção utilizado. Várias estratégias têm sido utilizadas para se alcançar esse êxito e se baseiam em obter uma biblioteca inicial de tamanho igual ou superior ao repertório imune (em torno de 10^7), buscando melhor eficiência de transformação e de amplificação dos genes variáveis dos anticorpos (Brígido & Maranhão, 2002) (Fig.2.6).

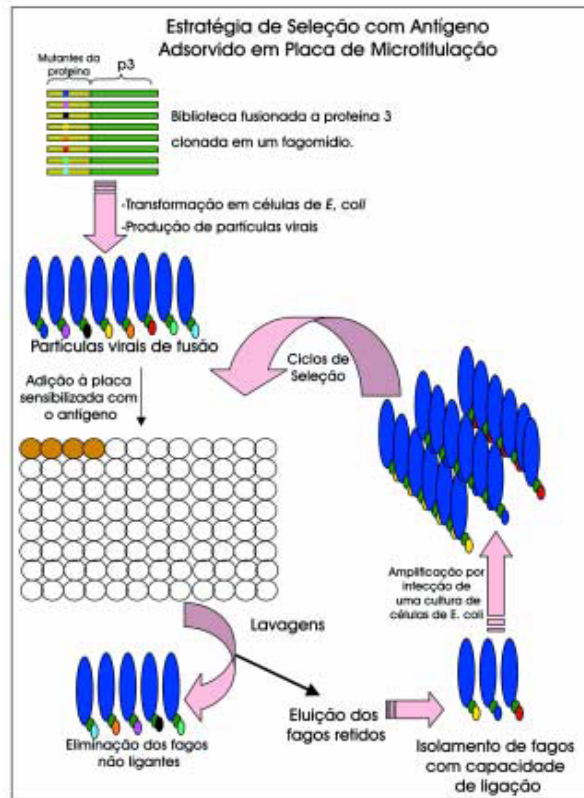


Figura 2.6 - Seleção de ligantes da biblioteca de expressão em fagos: Seleção de ligantes de uma biblioteca utilizando-se o antígeno adsorvido em placa de microtitulação. Bibliotecas de formas variantes do gene de interesse são obtidas e clonadas em fagomídeos para incorporação do peptídeo ao capsídeo viral. As partículas virais de fusão apresentando a biblioteca são produzidas e colocadas em contato com o antígeno fixado a um suporte. Sucessivas lavagens são realizadas e os fagos remanescentes são eluídos da placa e amplificados por meio de infecção de células bacterianas. Fonte: Brígido & Maranhão, 2002.

2.3.2 Anticorpos monoclonais obtidos em camundongos transgênicos

Uma alternativa estratégica para produzir anticorpos construídos completamente humanos é oferecida pela técnica da transgenia em camundongos. Camundongos que não possuem genes de imunoglobulinas endógenas podem ser tornados transgênicos para os *loci* das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina humana, utilizando cromossomos artificiais de levedura. Isso é possível substituindo-se os *loci* da imunoglobulina murina do genoma do hospedeiro pela respectiva região da imunoglobulina humana. A hiperimunização dos animais transgênicos com um antígeno tumoral resulta na ativação clonal dos linfócitos B, produzindo assim anticorpos humanos. Desafiando o antígeno de interesse contra o camundongo transgênico, pode-se gerar anticorpos de afinidade. A imortalização das células B expressando esses anticorpos pode ser obtida pela tecnologia padronizada de hibridização, resultando na produção de anticorpos totalmente humanos a partir de células de linhagem estabelecida (Krauss, 2003).

As células B desses camundongos têm receptores codificados pelos genes de imunoglobulinas humanas, mas não são tolerantes à maioria das proteínas humanas. Assim, é possível induzir nestes camundongos, a produção de anticorpos monoclonais humanos, contra determinantes de células ou proteínas humanas.

Os camundongos transgênicos têm sido especialmente úteis no estudo do papel dos receptores de células T e B no desenvolvimento dos linfócitos (Vaughan, 1998).

2.4 Anticorpos Monoclonais para Uso Terapêutico

Os anticorpos se ligam às moléculas-alvo com grande afinidade e especificidade. Embora produzidos naturalmente pelo sistema imune, a necessidade de anticorpos com especificidade única produzidos em larga escala tem estimulado a geração de novas tecnologias para a sua produção em escala biofarmacêutica. A produção de anticorpos pela tecnologia de hibridomas murinos foi o primeiro passo no sentido de iniciar-se o desenvolvimento de sistemas de engenharia de anticorpos.

Havia uma grande expectativa quanto ao uso de anticorpos como poderosa ferramenta em imunoterapias. Sendo identificados há mais de um século como potenciais agentes terapêuticos sugerindo possibilidades de tratamento, antes impensáveis, para diversas doenças, os anticorpos monoclonais representavam a solução para qualquer enfermidade e a esperança de cura.

Em 1986, o FDA aprovou a primeira aplicação de um anticorpo monoclonal murino, o Orthoclone OKT3 anti-CD3. Este foi o primeiro anticorpo reconhecido e oficialmente aprovado para reverter o quadro de rejeição a transplantes de órgãos, introduzido na clínica médica (Moro & Rodrigues, 2001). Sua aprovação iniciou uma grande expectativa para o uso clínico de anticorpos monoclonais (Fig.2.7).

Porém, apesar do grande potencial, a esperada revolução terapêutica não se confirmou. Diversos anticorpos monoclonais entraram em ensaios clínicos e obtiveram resultados negativos em função da sua alta toxicidade e imunogenicidade. Por serem de origem murina, o sistema imunológico reconhecia a molécula como estranha, iniciando um processo de reação imune no organismo do hospedeiro contra a molécula do anticorpo aplicado. A este processo de resposta imunológica humoral mediada por anticorpos, é dado o nome de resposta HAMA (Glennie & Johnson, 2000; Mirick *et al.*, 2004). Descobriu-se então que o anticorpo monoclonal murino apresentava limitações quanto ao seu uso repetitivo como fármaco, devido à resposta imune humana ao anticorpo de camundongo. O Orthoclone permaneceu por cerca de oito anos como sendo o único anticorpo monoclonal bem sucedido. Além do Orthoclone OKT3 anti-CD3, outros anticorpos murinos foram propostos como imunossupressores, numa forma alternativa contra outros marcadores

celulares, a saber, o anti-CD4 e o anti-CD18. Este último foi humanizado recentemente pelo grupo do Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília - UnB. É indicado na terapia de rejeição de transplantes, em casos de meningite bacteriana, isquemia, reperfusão cardíaca e inflamação aguda (Maranhão & Brígido, 2001; Caldas *et al.*, 2003).

Hoje em dia, existe uma série de anticorpos monoclonais murinos aprovados pelo FDA, entre eles, Muromonab – OKT3 para rejeição a transplantes (Cosimi *et al.*, 1981) aprovado em 1986; Edrecolomab – Panorex, indicado para câncer de cólon aprovado somente na Alemanha em 1995; Zevalin Y-Ibritumomab Tiuexetan anti-CD20, aprovado em 2002; e Bexxar I-Tositumomab anti-CD20, aprovado em 2003 (Harris, 2004; Roque, 2004) (Tab. 2.1).

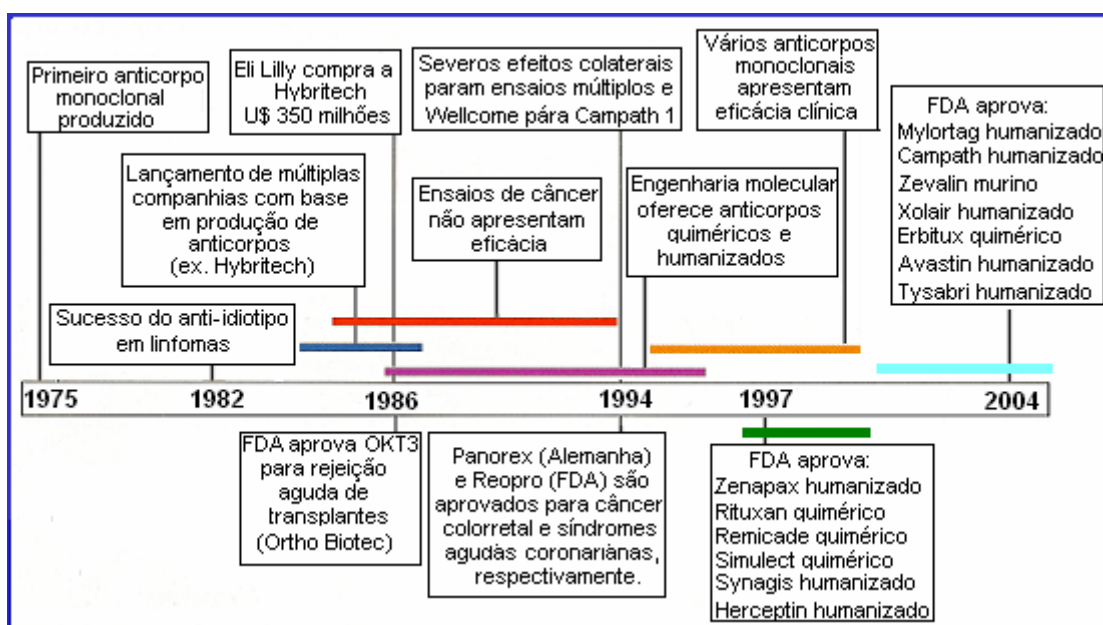


Figura 2.7 – Chave de eventos e fatos marcantes na indústria terapêutica de anticorpos monoclonais. Adaptação de Glennie & Johnson, 2000.

Passou-se então a pesquisar mecanismos para tornar esses anticorpos menos imunogênicos, proporcionando maior segurança na sua aplicação.

Com o advento da biologia molecular e da engenharia genética, outras abordagens e estratégias foram criadas para tentar resolver esse problema. São construídos anticorpos praticamente invisíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, evitando-se desta forma reações adversas como alergias e anafilaxia em tratamentos prolongados. A alta afinidade e especificidade destes, aliados à engenharia molecular, têm sido largamente explorada numa grande variedade de aplicações. De fato, a maioria dos anticorpos destinados à aplicação na terapêutica de doenças tem origem na engenharia genética. São exemplos os quiméricos, onde as regiões constantes do animal são substituídas pelas homólogas de origem humana e os anticorpos “*human-like*” (como humano ou humanizados) “*CDR-grafted*” (CDR transplantada) que são aqueles onde só há uma pequena fração murina, reduzindo assim sua imunogenicidade (Co & Queen, 1991).

Em 1980, dois anticorpos foram submetidos a ensaios clínicos e desde então esse número vem aumentando consideravelmente nos últimos 25 anos. Atualmente, cerca de 200 anticorpos monoclonais e seus derivados estão em ensaios clínicos, visando o tratamento de diversas doenças. Diversos outros alcançaram o mercado. O tratamento com anticorpos na rejeição de transplantes, nas doenças auto-imunes e em diversas formas de câncer, como os melanomas, o Linfoma Não-Hodgkin e o câncer colorretal, tem potencial terapêutico evidente e baixa ou total ausência de toxicidade (Hon, 2004).

No ano de 2003, descobriu-se que anticorpos monoclonais podem neutralizar os prions causadores de uma variante da Doença de Creutzfeldt-Jacob em camundongos infectados. Com base nesses resultados, estima-se que o desenvolvimento de anticorpos monoclonais possa ser impulsionado no combate a outras doenças causadas por proteínas anormais, como o Mal de Alzheimer. Esses anticorpos são potenciais candidatos à humanização (White *et al.*, 2003).

A manufatura de anticorpos terapêuticos envolve várias etapas, reguladas por procedimentos bem estabelecidos e leva cerca de 10 anos ou mais para se chegar a um produto comercialmente aprovado. A aprovação desses produtos biofarmacêuticos é muito criteriosa por parte do FDA e outras agências regulatórias.

Tabela 2.1 - Seleção de alguns anticorpos monoclonais já aprovados pelo FDA americano (exceto o Panorex, que foi aprovado pela agência regulatória da Alemanha) para uso terapêutico ou diagnóstico *in vivo*.

INDICAÇÃO	ANTÍGENO ALVO	ANTICORPO	CARACTERÍSTICA	FABRICANTE / PAÍS	APROVAÇÃO
Rejeição a transplantes	CD3	Orthoclone OKT3 Muromonab	Murino (IgG2a)	Ortho Biotech / USA	FDA 1986
Complicações de angioplastia coronária	Glicoproteína receptor GP II _b GPII _a	ReoPro Abciximab	Quimérico (Fab)	Centocor B.V. Holanda	FDA 1994
Câncer colon-retal	17-IA antígeno de superfície celular	Panorex Edrecolomab	Murino (IgG2a)	Centocor B.V. / Holanda Glaxo Wellcome / USA	Aprovado na Alemanha em 1995
**Agente de contraste para imagem cardíaca	Miosina	Myoscint Imciromab Pententate	Murino	Centocor B.V. / Holanda	FDA 1996
**Agente de imagem diagnóstica para detectar o câncer de próstata	PSMA – Antígeno específico de membrana da próstata	ProstaScint Capromab Pendetide	Murino	Cytogen Corp. / USA	FDA 1996
**Agente de contraste de imagem para detecção de câncer colorretal	nd	CEA-SCAN Arcitumomab	Nd	Immunomedics Inc. / USA	FDA 1996
**Agente de imagem para detectar câncer em células pulmonares	nd	Verluma Nofetumomab	Murino	Dr. Karl Thomae / Alemanha	FDA 1996
Rejeição aguda a transplantes de Rim	CD25	Zenapax Daclizumab	Humanizado (IgG1)	Hoffman-La Roche Inc. / USA	FDA 1997
Linfoma Não-Hodgkin –LNH	CD20	Rituxan, Rituximab	Quimérico (IgG1)	Genentech Inc. / USA	FDA 1997
Doença de Crohn	TNF- α	Remicade, Infliximab	Quimérico (IgG1)	Centocor Inc. / Holanda	FDA 1998
Rejeição aguda a transplante de rim	CD25	Simulect Basiliximab	Quimérico (IgG1)	Novartis Pharm. / USA	FDA 1998
Vírus RSV – Epítipo do vírus respiratório sincicial	Proteína F	Synagis Palivizumab	Humanizado (IgG1)	MedImmune / USA	FDA 1998
Câncer de Mama	HER2/neu	Herceptin Trastuzumab	Humanizado (IgG1)	Genentech Inc. / USA	FDA 1998
Artrite Reumatóide	TNF- α	Remicade Infliximab	Quimérico (IgG1)	Centocor Inc. / Holanda	FDA 1999
Anemia Mieloide Aguda / Leucemia	CD33	Mylortag Gemtuzumab Ozogamicin	Humanizado	Wyeth Pharms. / USA	FDA 2000
Células B – Leucemia crônica linfocítica	CD52	Campath Alemtuzumab	Humanizado	Millenium and Illex Partners / USA	FDA 2001
LNH	CD20	Zevalin Y-Ibritumomab tiuxetan	Murino rádio-marcado	IDEC Pharmaceuticals / USA	FDA 2002
Artrite Reumatóide	Receptor de fator de necrose tumoral humana TNF	Humira Adalimumab	Humano (desenvolvido em biblioteca genômica de fagos – Phage-Display)	Abbott Laboratories / USA	FDA2002

Tabela 2.1 – (cont.)

INDICAÇÃO	ANTÍGENO ALVO	ANTICORPO	CARACTERÍSTICA	FABRICANTE / PAÍS	APROVAÇÃO
Psoríase severa de placas	nd	Raptiva Efalizumab	nd	Genentech / USA	FDA 2003
Asma nas manifestações moderada e severa	Impede ligação da IgE com o receptor Fcε RI	Xolair Omalizumab	Humanizado	Genentech Inc. / USA	FDA 2003
Tratamento de pacientes com LNH CD20 ⁺ refratários ao Rituxan	CD20	Bexxar I-Tositumomab	Murino rádio-marcado	Corixa Corporation / USA	FDA 2003
Câncer colorretal em metástase cabeça, pescoço, carcinoma de células de pulmão	Domínio extracelular do EGFR – Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico	Erbix Cetuximab	Quimérico	ImClone Systems Inc. / USA	FDA 2004
Fator de Crescimento Vascular Endotelial tumor sólido / câncer colorretal em metástase	Inibição da atividade biológica do receptor de fator de crescimento vascular endotelial VEGFR	Avastin Bevacizumab	Humanizado	Genentech Inc. / USA	FDA 2004
Esclerose Múltipla	Sub α -4 / α 4 β 1 integrinas	Tysabri Natalizumab	Humanizado IgG4 κ	Biogen Idec Inc. / USA	FDA 2004
Marcador para apendicite	nd	Technetium 99m Tc Fanolesomab Neutrospect	Murino tecnécio-marcado	Palatin Technologies / USA	FDA 2004

** utilizados para diagnóstico *in vivo*. nd – não divulgado. Adaptação das Fontes: (Glennie & Johnson, 2000; Harris, 2004; FDA, 2005).

3 - SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS

3.1. Sistemas de Expressão de Proteínas Heterólogas

Diversos sistemas de expressão como células animais, microorganismos, plantas e glândulas mamárias de mamíferos, podem ser utilizados para a obtenção de anticorpos monoclonais (Fig.3.1).

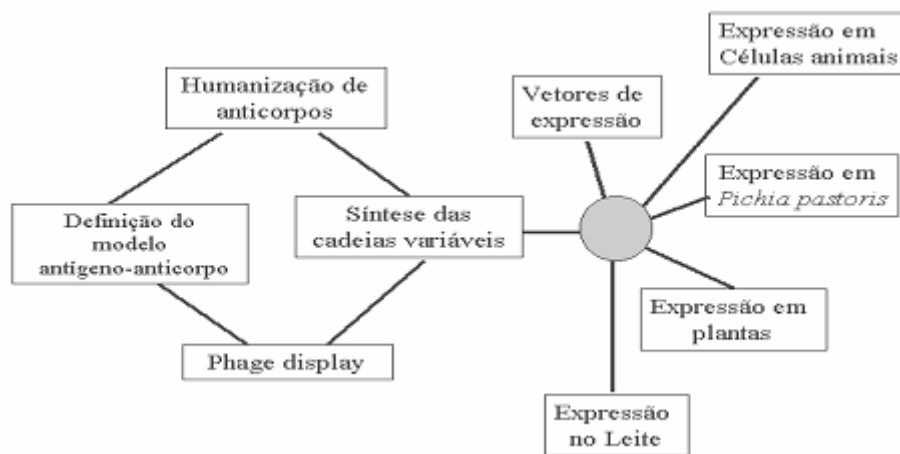


Figura 3.1 – Ciclo de humanização de anticorpos e alguns sistemas de expressão utilizados.
Fonte: BRÍGIDO 2004.

A tecnologia de cultivo de células animais vem sendo utilizada há muito tempo, especialmente na produção de vacinas para uso humano e veterinário. Diversos processos utilizando essas células como hospedeiras são atualmente empregados na indústria biofarmacêutica para produção de proteínas terapêuticas, como por exemplo, fatores de coagulação, anticorpos monoclonais, eritropoetina, entre outros (Tonso, 2000).

Hospedeiros procariotos (células bacterianas) são utilizados devido à sua simplicidade genética e à existência de vetores de expressão definidos e potentes. Contribuem para a utilização de células de origem bacteriana, como a *Escherichia coli*, a facilidade de cultivo e a alta produtividade que apresentam em processos de fermentação, viabilizando a obtenção de proteínas simples e de pequeno tamanho. A insulina humana e hormônios de crescimento podem ser

enquadrados entre estas. Porém, esses hospedeiros não são empregados para a produção de proteínas de grande complexidade e tamanho, como os anticorpos monoclonais, por impossibilidade de realização das modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação, carboxilação, amidação, sialização, acetilação, sulfatação e formação de ligações de enxofre (Mains *et al.*, 1987).

Com isso, o uso de organismos procariotos como hospedeiros traz uma série de limitações que dificultam o processo de expressão heteróloga de genes de natureza eucariota, por não processarem adequadamente a informação genética e não configurarem corretamente a proteína recombinante sintetizada.

A glicosilação exerce um papel fundamental na adesão intercelular e oferece uma enorme vantagem ao uso das células de animais como sistema hospedeiro. É um processo que ocorre em células eucarióticas, no qual os oligossacarídeos se adicionam à proteína durante sua síntese. São processadas no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi (Kratje, 2004). A pouca similaridade, ausência ou deficiência da glicosilação, ou seja, de realizar adequadamente as adições de açúcar, em células bacterianas podem refletir na inatividade e suscetibilidade biológica da proteína sintetizada de interesse, podendo limitar a aproximação de outras macromoléculas à superfície do produto obtido (Cavalcanti, 2003).

As cadeias polissacarídicas ligadas à proteína alvo têm várias funções. Algumas proteínas não podem se enovelar a menos que estejam glicosiladas. Polissacarídeos ligados ao nitrogênio amilado da asparagina na proteína conferem estabilidade sobre algumas glicoproteínas secretadas. A ligação pela hidroxila em resíduos de serina e treonina gera as O-glicoproteínas. Vários experimentos demonstram que proteínas não glicosiladas degradam-se muito rapidamente (Kratje, 2004). Por essa razão, na produção de moléculas que necessitam da glicosilação para apresentarem uma função normal, é necessário o uso de organismos que realizem, o mais similar e corretamente possível, as adições de açúcar.

Anticorpos monoclonais recombinantes são administrados, de uma forma geral, por via parenteral. A presença de oligossacarídeos tende a conferir mais

resistência a uma glicoproteína contra sua digestão por proteases, o que, em contrapartida, lhe confere maior estabilidade na corrente sanguínea.

Adicionalmente, o uso de células de mamíferos para a produção de biofármacos é favorecido pelo fato de que grande parte destas células libera para o meio extracelular a proteína de interesse, ou seja, o produto desejado, ao contrário da maioria das bactérias que retém a proteína intracelularmente, sob forma de corpos de inclusão. Isto acarreta um alto custo de purificação da molécula em questão, pois a célula bacteriana ao ser rompida, libera diversas proteínas bacterianas constituintes, dificultando a separação e purificação daquela de real interesse, podendo assim prejudicar sua função biológica. As células animais, por outro lado, secretam as proteínas para o meio extracelular com reduzidas concentrações de proteínas, podendo ser separadas do produto de interesse, sem ter seus componentes intracelulares extravasados para o meio (Cavalcanti, 2003).

Por outro lado, as desvantagens do processo de uso de células animais são: (a) baixa velocidade específica de crescimento; (b) requerimentos nutricionais complexos; (c) inibição decorrente do acúmulo de subprodutos do próprio metabolismo, como o lactato e a amônia; (d) fragilidade estrutural da membrana celular (células sujeitas ao cisalhamento, por exemplo, pelo atrito com as paredes internas do sistema de cultivo e pelo rompimento das bolhas de ar na superfície do líquido) (Tonso, 2000; Castilho, 2001; Cavalcanti, 2003).

A escolha de um sistema de expressão deve ser feita de forma a obedecer alguns critérios. A aplicação da proteína desejada a ser expressa deve ser sempre considerada. A otimização do rendimento na obtenção do produto expresso nos diferentes sistemas é de fundamental importância. O sistema deve ser capaz de expressar a proteína recombinante heteróloga de modo a se obter o máximo de rendimento por célula cultivada e paralelamente, estudar e monitorar a influência dos parâmetros do sistema de produção sobre o nível de expressão da proteína, melhorando a taxa de rendimento por litro de cultura, a um custo não muito elevado (Fig.3.2).

Manter a alta densidade celular é uma das variáveis a serem superadas. São aplicados sofisticados modelos matemáticos e programas de computação para executar o cálculo e analisar todos os parâmetros inerentes à adição de nutrientes concentrados, na proporção da taxa de consumo, como estratégia para aumentar a densidade celular nos processos e controle rigoroso dos metabólitos secundários (Lemes, 1998).

Como foi descrito anteriormente, há diversas aplicações para o uso de proteínas heterólogas, ditas também recombinantes, entre elas, a pesquisa em estrutura e função da proteína, imunizações, anticorpos monoclonais terapêuticos, vacinas, hormônios, fatores de coagulação, diagnóstico, cosméticos, entre outros.

As proteínas recombinantes apresentam vantagens como:

- Podem ser produzidas em grandes quantidades.
- São de fácil purificação, comparadas com o tecido de origem.
- O risco de transferência de patógenos e material oncogênico é reduzido.

Desvantagens:

- Podem ser imunogênicas.
- Podem conter contaminantes pirogênicos.
- O material produzido pode não ser autêntico (depende das modificações pós-traducionais).

Aspectos de relevância na expressão de proteínas heterólogas:

- Escolha da célula hospedeira (microbiana, inseto ou mamífero).
- Escolha do vetor de expressão.
- Uso de um promotor forte e regulável.
- Condições de cultivo e expressão.
- Sítio de acumulação do produto recombinante.
- Processos de recuperação do produto.
- Processos de purificação.

Sistemas alternativos para expressão de proteínas recombinantes:

- Procariotos (como bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter*).
- Leveduras (como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*).
- Fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Trichoderma*).
- Células de mamíferos (*Chinese Hamster Ovary* - CHO, *Baby Hamster Kidney* - BHK)
- Células de insetos (*Baculovirus Autographa californica*).
- Animais transgênicos (roedores, suínos, caprinos, ovinos, bovinos).
- Plantas transgênicas (milho, soja, tabaco, trigo, banana).

Características desejáveis da célula hospedeira para produção de proteínas heterólogas:

- Crescimento rápido.
- Capacidade de crescimento em um meio de cultivo de características simples e de baixo custo.
- Não ser nocivo ou patogênico.
- Ser capaz de receber DNA exógeno.
- Ser estável em culturas.

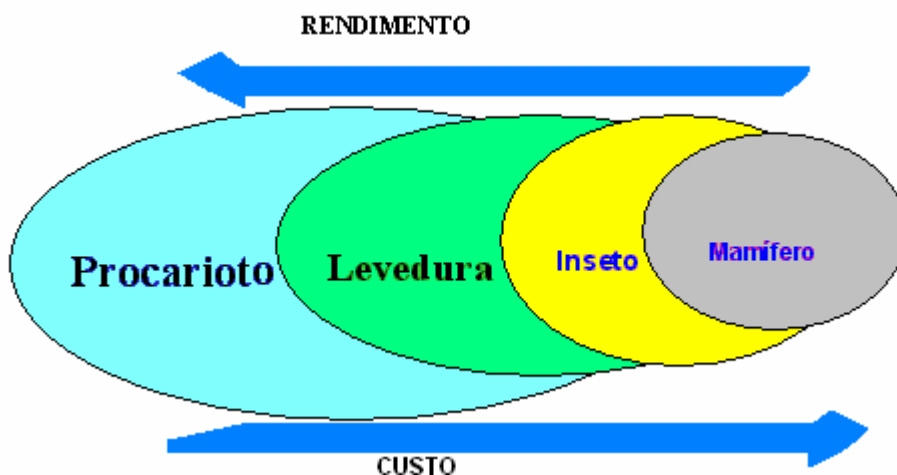


Figura 3.2 - Relação custo/rendimento em diferentes sistemas de expressão. Fonte: Lemes, 2004.

3.1.1 Vantagens e desvantagens dos vários sistemas para expressão heteróloga de proteínas:

Os sistemas alternativos empregados para expressão de proteínas admitem uma série de vantagens e desvantagens que estão expostas na tabela 3.1:

Tabela 3.1 - Principais sistemas e suas vantagens e desvantagens na expressão de proteínas de interesse biotecnológico:

Bactérias (<i>Escherichia coli</i>):	
Vantagens:	Desvantagens:
-fácil crescimento	-não fazem modificações pós-traducionais
-alto rendimento da proteína heteróloga expressa	-precipitado insolúvel intracelular (formam corpos de inclusão)
-fisiologia, bioquímica e genética bem conhecidas	-apresentam endotoxinas (Lipopolissacarídeos LPS)
-baixo custo	-indução de proteólise e destruição da proteína expressa
	-formação de ligações sulfeto limitadas
Leveduras (<i>Pichia pastoris</i>):	
Vantagens:	Desvantagens:
-fácil aumento de escala (<i>scale-up</i>)	-secreção ineficiente de proteínas complexas
-integração estável em múltiplas cópias	-poucos vetores disponíveis
-glicosilação com alguma similaridade à de mamíferos	
-não fermentadora	
-indução controlada em altas densidades celulares	
-altos níveis de expressão (até 12g/L)	
Fungos filamentosos (<i>Aspergillus niger</i>):	
Vantagens:	Desvantagens:
-facilidade de cultivo em larga escala	-grande quantidade de proteases
-secreção (purificação facilitada)	-difícil manipulação
-capazes de realizar algumas modificações pós-traducionais	-vetores não disponíveis – ausência de plasmídeos
-alta expressão na maioria das vezes	-a proteína de interesse nem sempre é produzida em altos níveis

Tabela 3.1 – (cont.)

Células de mamíferos (<i>Chinese Hamster Ovary</i> – CHO):	
Vantagens:	Desvantagens:
-grande versatilidade na produção de diferentes classes de proteínas heterólogas	-baixa velocidade específica de crescimento
-amplo conhecimento de cultivo com meios quimicamente definidos	-ausência de parede celular (células frágeis, principalmente quando expostas à ação do cisalhamento nos diferentes sistemas de cultivo)
-linhagem bem caracterizada	-cultivo muito dispendioso
-crescimento tanto em suspensão quanto de forma aderida	-requerimentos nutricionais complexos
-realizam modificações pós-traducionais de forma muito similar às células humanas	-baixa produção
-amplo conhecimento fisiológico.	
-segurança em relação à susceptibilidade a patógenos humanos (baixo índice de replicação de agentes virais)	
-secretam a proteína recombinante para o meio extracelular	
Células de insetos:	
Vantagens:	Desvantagens:
- as proteínas recombinantes expressas são similares à proteína original	-vírus se replicam na cultura das células de inseto
-altos níveis de expressão	-custo elevado
-realizam modificações pós traducionais	-construção do vetor é trabalhosa
-facilidade de purificação	-rendimento abaixo de 30% da proteína recombinante de interesse
-não são patogênicos para vertebrados ou vegetais	-glicosilação deficiente de ácido siálico
-tecnologia bastante empregada em vários sistemas desenvolvidos (bioinseticidas e vacinas, por exemplo)	-são necessários inibidores para as proteases produzidas pelo Baculovírus e pela célula, em resposta a infecção
-capacidade para expressar proteínas de grande tamanho	

Tabela 3.1 – (cont.)

Animais transgênicos:	
Vantagens:	Desvantagens:
-possibilitam a maioria das modificações pós-traducionais	-os primeiros animais são caríssimos
-fácil <i>scale-up</i>	-os ruminantes não fazem todas as modificações pós-traducionais
-são biorreatores naturais e baratos	-exigem muitos cuidados, entre os quais, o principal é com a biossegurança (encarecem o produto)
-muito produtivos (à exceção de roedores)	
-boa estabilidade genética (banco de sêmem e óvulos)	
Plantas transgênicas:	
Vantagens:	Desvantagens:
-custo baixo de crescimento	-desconhecimento pela população
-grande biomassa	-baixos níveis de expressão
-cultivo bem estabelecido	-estabilidade genética ruim
-produtos para aplicação oral (vacinas)	-questões de biossegurança (polinização, campos abertos)
	-não realizam modificações pós-traducionais de proteínas de mamíferos
	-monopólio da empresa detentora da patente dificulta manipulação (Monsanto)

Adaptação das Fontes: Lemes, 2004; Silva, 2004.

Entre todas as vantagens e desvantagens apresentadas, há de se considerar sempre o sistema que ofereça o melhor rendimento seguido de baixo custo na expressão da proteína de interesse (Tab.3.2).

Tabela 3.2 - Comparação entre os sistemas mais utilizados para expressão de proteínas: relação tempo/custo/rendimento dos principais sistemas de expressão utilizados.

Hospedeiro	Duplicação/Indução	Rendimento	Pós-tradução	Custo
<i>Escherichia coli</i>	30 min. / 5 h.	Muito alto	Não	Baixo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 h. / 2–4 h.	Alto	Todos / hiperglicosilação	Médio
<i>Pichia pastoris</i>	2 h. / 48-90 h.	Muito alto	Todos	Baixo
Células de inseto/ Baculovírus	48 h. / 48 h.	Muito alto	Todos	Alto
Células de Mamíferos	24 h. / 24 h.	Baixo	Todos	Alto

Adaptação da Fonte: Lemes, 2004.

3.1.2 Expressão em bactérias, leveduras e células de mamíferos

Expressão em bactérias *Escherichia coli*

É o mais estudado sistema de produção de proteínas recombinantes. Como já citado anteriormente, este sistema apresenta características vantajosas como a fácil manipulação dos genes, a possibilidade de se obter altos rendimentos com grandes quantidades de proteína expressa em pequenos volumes de cultura, a rapidez do processo produtivo e um baixo custo. É originalmente empregada para expressar proteínas menos complexas. Embora o sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* seja bastante difundido, existem sérias limitações, entre as quais a incapacidade de realizar as modificações pós-traducionais típicas das células eucariotas e a freqüente formação de corpos de inclusão, que são grandes agregados protéicos acumulados intracelularmente, que prejudicam o processo de purificação do produto. Sua aplicação na produção de proteínas animais gera, habitualmente, a desnaturação ou a perda da configuração tridimensional e, conseqüentemente, da atividade biológica da proteína (Lemes, 1998; Tonso, 2000).

Expressão em leveduras *Pichia pastoris*

O grande interesse existente no estudo das leveduras deve-se ao fato de que se trata de organismos eucariotos inferiores e, como tais, possuem organização celular similar à dos eucariotos superiores. Além disso, muitas proteínas de leveduras são similares, estrutural e funcionalmente, às suas homólogas em mamíferos.

A levedura *Pichia pastoris* tem sido apresentada, ao longo das últimas duas décadas, como sistema alternativo de expressão. É capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono. O fato de crescer em alta densidade celular em meio simples e barato levou à sua transformação em um eficiente sistema de produção de proteínas recombinantes. Apresenta duas características que a tornam uma atraente hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor derivado do gene da enzima álcool-

oxidase (AOX I), usado para transcrever genes heterólogos. A segunda está no fato de não ser considerada uma forte fermentadora. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, que em culturas de alta densidade pode rapidamente atingir níveis tóxicos. São facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores. A maioria dos genes expressos nesta levedura tem seu produto secretado para o meio extracelular, mas alguns, como o fator de necrose tumoral humana, foram produzidos no meio intracelular.

Em se tratando da expressão, sendo este um organismo eucariótico, a produção de proteínas heterólogas nesse sistema consiste em um processo mais complexo do que aquele empregado em bactérias *E. coli*. A levedura *Picchia pastoris* é de grande aceitação como organismo hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas de interesse farmacológico, como por exemplo, a albumina sérica humana e o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (Lemes, 2004). Entretanto, no caso de proteínas glicosiladas, a estrutura da molécula recombinante pode não ser satisfatória.

Expressão em células de mamíferos CHO

A tecnologia de expressão de moléculas recombinantes em células de mamíferos é o principal meio de produção comercial de anticorpos terapêuticos. As células CHO (*Chinese Hamster Ovary* ou Ovário de Hamster Chinês) são o sistema de expressão predominantemente empregado para a produção de biofármacos (Tab.3.3) pelo amplo conhecimento fisiológico e de cultivo que se tem dessas células, bem como pela segurança que oferece em relação à suscetibilidade a patógenos humanos. Essas células possuem enzimas que realizam a glicosilação de forma bastante similar às enzimas de linhagem celulares humanas. A linhagem de células CHO é bem caracterizada, relativamente estável, capaz de produzir proteínas heterólogas com eficiência, e pode crescer tanto em suspensão, como aderida a suportes (Kratje, 2004).

A célula CHO é escolhida por três razões: em primeiro, essa linhagem de células vem sendo usada extensivamente e com sucesso, com um excelente prognóstico em segurança viral. São consideradas hospedeiras seguras para a

expressão de proteínas de alto valor terapêutico que, em grande parte, serão administradas por via parenteral em pacientes humanos. Viroses humanas patogênicas como Pólio, Rubéola, Herpes, Hepatite B, HIV, Sarampo, Influenza e Adenovirose não se replicam em células CHO. Assim, o risco de contaminação involuntária e transmissão de um agente viral adventício é extremamente reduzido. Em segundo, é muito bem caracterizada com respeito à variedade de aspecto, incluindo o cariótipo, estrutura cromossomal, mapeamento genético, condições de cultivo e meios de cultura requeridos. É uma linhagem de fácil manipulação e controle de cultivo. Com isso, é empregada na produção de diversos produtos recombinantes. Em terceiro, apresentam a capacidade de glicosilação e outras modificações pós-traducionais, sendo bem adaptadas ao cultivo e crescimento em suspensão em alta densidade, podendo crescer em meio livre e isento de produtos de origem humana ou animal. Estas são características práticas importantes na produção em escala industrial (Kauffman *et al.*, 1986; Hauser & Wagner, 1997).

Para reforçar a seleção das células CHO para essa finalidade, ressalta-se, por exemplo, que não foram detectadas transmissões virais ou geração de anticorpos de relevância clínica nas proteínas expressas por essas células em nenhum dos mais de 100 milhões de tratamentos com utilização de produtos derivados de células CHO (Harrison *et al.*, 1998). Por todas estas razões e por sua utilização por parte do laboratório da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, com o qual se pretende estabelecer parceria, a linhagem de células CHO é a escolhida pelo LATAM para expressar os anticorpos humanizados.

As etapas para a produção de anticorpos monoclonais humanizados em cultura de células, a partir de um sistema com agitação, são:

- inoculação em frascos *spinner* (Fig.3.3) com células do banco de trabalho;
- inoculação do conteúdo do referido frasco em biorreator;
- expansão da cultura, aumentando a concentração celular (geralmente o volume é constante. Apenas em batelada alimentada o volume é variável);
- inoculação deste conteúdo em um biorreator de maior capacidade;
- expansão da cultura celular;
- colheita do meio com as células cultivadas;
- separação das células por microfiltração ou outra técnica de separação sólido-líquido;
- recuperação, concentração e purificação do produto.

Tabela 3.3 - Alguns biofármacos e proteínas de uso diagnóstico *in vivo*, aprovados para uso humano, produzidos em células de mamíferos:

PRODUTO	PROTEÍNA / ANTICORPO MONOCLONAL	INDICAÇÃO	CÉLULAS	APROVAÇÃO	EMPRESA / PAÍS
Activase	rh-t-PA	Isquemia aguda	CHO	1987	Genentech / USA
Aranesp	rh- EPO	Tratamento da anemia	CHO	2001	Amgen / USA
Abones	rh-Interferon- β	Esclerose múltipla	CHO	1996	Biogen / USA
Benefix	rh-Fator IX	Hemofilia B	CHO	1997	Genetics Institute / USA
Cerezyme	Glucocerebrosidase	Doença de Gaucher	CHO	1994	Genzyme / USA, Áustria, Nova Zelândia
Enbrel / Etanercept	Proteína de fusão (TNFR/hlgG1)	Artrite Reumatoide	CHO	1998	Wyeth Europa / USA
Epogen / Procrit	rh-EPO	Anemia	CHO	1989	Amgen / USA
Epogin / Recormon	rh-EPO	Anemia	CHO	1990	Amgen / USA, Japão, Europa
Fabrazyme	rh- α -galactosidase	Doença de Fabry – deficiência de α -galactosidase	CHO	2003	Genzyme / USA
GenHevac B Pasteur	HBsAg	Hepatite	CHO	1989	Aventis Pasteur / França
Gonal-F	rh-FSH	Infertilidade feminina	CHO	1995	Serono / Suécia, Finlândia, USA
Granocyte	g-CSF	Anemia / Neutropenia	CHO	1991	Aventis / Europa, Japão
HB Gama	HBsAg	Hepatite	CHO	1990	ne / Japão
Helixate NexGen	rh-Fator VIII	Hemofilia A	BHK	2000	Aventis Behring / Suíça
Herceptin / Trastuzumab ^a	Anticorpo monoclonal HER2	Cáncer de mama metastático (HER2)	CHO	1998	Genentech / USA
Infliximab / Remicade ^{a, b}	Anticorpo monoclonal TNF α	Doença de Crohn / artrite reumatóide	nd	1998 / 1999 respectivamente	Centocor / USA
Kogenate	rh-Fator VIII	Hemofilia A	BHK	1993	Bayer / USA
Luveris	rh-LH	Infertilidade	CHO	2000	Ares-Serono / n.e
Myoscint ^c	Anticorpo monoclonal / miosina	Agente de imagem cardíaca	nd	1996	Centocor / Holanda, USA
Neorecormon	rh-EPO	Tratamento da anemia	CHO	1997	Boehringer Mannheim / Alemanha
Nespo	rh-EPO	Tratamento da anemia	CHO	2001	Dompe Biotec / Itália
Novo Seven	rh-Fator VIIA	Hemofilia A e B	BHK	1996	Novo Nordisk / Suíça, Europa, USA

Tabela 3.3 – (cont.)

PRODUTO	PROTEÍNA / ANTICORPO MONOCLONAL	INDICAÇÃO	CÉLULAS	APROVAÇÃO	EMPRESA / PAÍS
Ovidrelle	rh-CG	Usado nas técnicas de reprodução assistida	CHO	2001	Serono / Suíça
Panorex ^a	Anticorpo monoclonal	Câncer colorretal	n.d	1995	Glaxo Wellcome / Centocor / USA, Alemanha
Prosta Scint ^c	Anticorpo monoclonal / PSMA	Câncer de próstata	n.d	1996	Cytogen / USA
Pulmozyme	DNase I	Fibrose cística	CHO	1998	Genentech / Suécia, USA, Suíça
Puregon	rh-FSH	Infertilidade feminina	n.d	1996	NV Organon / Dinamarca
Rebif	rh-IFN β 1a	Protelar sintomas da esclerose múltipla	CHO	2002	Ares-Serono / USA, Suíça
Recombinante	Fator VIII	Hemofilia A	CHO	1992	Baxter Healthcare / USA
Refacto	Fator antihemofílico	Hemofilia A	CHO	2000	Genetics Institute / USA
ReoPro ^a	Anticorpo monoclonal / Platelet IIb/IIIa	Complicações de isquemia cardíaca	n.d	1994	Centocor / USA
Retevase / Reteplase	rh-t-PA	Infarto agudo do miocárdio	n.d	1996	Boehringer Mannheim / Alemanha, USA
Rituxan ^a / MabThera	Anticorpo monoclonal / CD20	LNH de células B	CHO	1997	Genentech / Roche / USA
Simulect / Basiliximab ^a	Anticorpo monoclonal / IL2R α	Rejeição aguda de transplante de fígado	Mieloma de camundongo	1998	Novartis / USA
Synagis	Anticorpo humanizado contra um epítipo de superfície do vírus sincicial respiratório	Profilaxia da doença do trato respiratório causada pelo vírus sincicial respiratório em crianças	n.d	1998	Medimmune / USA
Thyrogen	rh-TSH	Deteção e tratamento de câncer da tireóide	CHO	2000	Genzyme / USA
TNKase / Tenecteplase	rh-t-PA	Infarto agudo do miocárdio	CHO	2000	Boehringer Ingelheim / USA

Tabela 3.3 – (cont.)

PRODUTO	PROTEÍNA / ANTICORPO MONOCLONAL	INDICAÇÃO	CÉLULAS	APROVAÇÃO	EMPRESA / PAÍS
Verluma ^c / Nofetumomab	Anticorpo monoclonal murino	Agente de imagem para detecção de câncer em células pulmonares	n.d	1996	Dr. Karl Thomae / Alemanha, USA
Wellferon	Interferon α -N1	Hepatite C	Linfoblastoide humano	1999	Glaxo Wellcome / USA
Zenapax / Daclizumab	Anticorpo humanizado contra a cadeia α do receptor de IL-2	Prevenção da rejeição aguda ao transplante de rim	n.d	1997	Hoffman La Roche / USA

n.d – não disponível; n.e – não encontrado; a – anticorpo monoclonal terapêutico; b – produzido por processo de perfusão contínua; c - anticorpo monoclonal para diagnóstico *in vivo*. Adaptação das Fontes: Castilho, 2001; Cavalcanti, 2003; FDA, 2005.



Figura 3.3 - Frasco *Spinner* para cultivo de células em suspensão. Fonte: Corning, 2005.

3.2 Sistemas de Cultivo

Para as células que têm características aderentes, ou seja, necessitam aderir a uma superfície, são necessários suportes de adesão para proporcionar o seu desenvolvimento. Para as que podem crescer em suspensão, sistemas específicos com diferentes tipos de agitação são empregados (Schmidell & Facciotti, 2001).

Existem diferentes sistemas de cultivo, cada qual com suas particularidades específicas de operação. Os sistemas estacionários compreendem os frascos T, sistemas de multidiscos, multibandejas e multiplacas (Fig.3.4). O crescimento celular nesses tipos de sistema de cultivo é estacionário, com as células aderidas em superfícies planas e apresenta um baixo rendimento. Há dificuldade em se medir as concentrações de oxigênio dissolvido, pH e subprodutos do metabolismo celular. O monitoramento é visual.

As garrafas giratórias (*roller bottles*) exigem manipulação constante, têm seu monitoramento basicamente visual como nos cultivos estacionários, não há como medir o pH, as concentrações de oxigênio dissolvido e metabólitos celulares. Contudo, já apresentam um rendimento até cinco vezes maior ao obtido no cultivo estacionário.

Os biorreatores de fibras ocas proporcionam uma produtividade alta, com elevadas concentrações de células e, por conseguinte, de produto. O monitoramento não é simplificado, sendo difícil a obtenção de dados. É adequado às aplicações em escalas intermediárias de produção.

Há biorreatores agitados, de leito fixo ou fluidizado, onde se utilizam microcarregadores (*microcarriers*). Nestes, as células estão aderidas e imobilizadas na superfície das esferas (Augusto & Oliveira, 2001).

Outros tipos empregados, com produtividades intermediárias, que merecem citação são:

- biorreatores de superfície permeável aos nutrientes e subprodutos do meio de cultivo, tais como aqueles chamados de *wave bioreactor*;
- biorreatores com células aderidas de agitação magnética;
- frascos *spinner* com agitação, que possibilitam o monitoramento de pH e pO₂.

Os biorreatores do tipo coluna de bolhas (*air lift*) são um outro tipo de sistema mais homogêneo, com capacidade de até 2000 litros, que permitem monitoramento e têm alta produtividade.

Tanque agitado (Fig.3.5) é um tipo de biorreator que proporciona alto rendimento e possibilita o monitoramento das condições de cultivo. É adequado para produção em larga escala e operação em perfusão onde as densidades celulares e as concentrações do produto final de interesse são altas. O mais utilizado possui pás para agitação do meio e tem um sistema de aeração através de borbulhamento, proporcionando altas taxas de transferência de oxigênio. As células se encontram em suspensão ou aderidas a microcarregadores (Schmidell & Facciotti, 2001).

Os biorreatores do tipo tanque agitado podem ter diferentes modos de operação, sendo os principais modos os processos em batelada simples, batelada alimentada, fluxo contínuo normal (onde há coleta contínua contendo biomassa) e o de perfusão contínua com reciclo celular (no qual a coleta é contínua, porém isenta de biomassa) (Lemes, 1998).

3.2.1 Os processos de cultivo em biorreatores

Os biorreatores podem ser operados de diferentes modos: batelada simples, processo contínuo, batelada alimentada e perfusão.

Batelada simples

No processo de batelada simples todos os nutrientes necessários para o crescimento celular são adicionados no início do processo e os produtos são removidos após completar o período de crescimento.

Processo Contínuo

Nesses processos de cultivo, a adição de nutrientes é contínua e a retirada do meio contendo células também é feita continuamente, mantendo-se o volume constante e atingindo-se o estado estacionário. Depois de estabelecido, o estado estacionário pode ser mantido por longos períodos. Os efeitos do processo de formação dos produtos e crescimento das células devido à mudança dos parâmetros físico-químicos são facilmente detectáveis e monitoráveis. Contudo, o longo período de cultivo proporcionado por esse sistema favorece a contaminação. Devido às baixas velocidades específicas de crescimento de células animais e à remoção contínua de células neste modo de operação, as concentrações celulares e de produto atingidas são relativamente baixas.

Batelada alimentada

Este processo caracteriza-se por ser uma combinação dos outros dois anteriores. Um volume inicial de meio com nutrientes é disponibilizado no início do processo e, à medida que alguns nutrientes essenciais do meio vão sendo consumidos, uma fonte de alimentação extra, com novos nutrientes concentrados, vai sendo fornecida em proporções correspondentes às taxas de consumo, aumentando progressivamente o volume de meio no reator. São algumas vantagens do processo a eliminação da repressão catabólica, o aumento do tempo de cultivo e a diminuição da formação de subprodutos indesejáveis (ex. lactato e amônia).

Sistema de perfusão contínua com reciclo de células

O sistema de perfusão contínua oferece uma série de vantagens, propiciando alto rendimento (Tab.3.4). Permite a contínua adição de nutrientes ao meio e a remoção dos subprodutos metabolizados, com retenção das células no biorreator, favorecendo altas produtividades em cultivos de alta densidade celular (Medronho, 2004). Isso vem a ajudar a superar as desvantagens do cultivo de células animais, cuja velocidade específica de crescimento é baixa e são sensíveis aos metabólitos acumulados. Entre outras vantagens, apresenta um melhor controle das condições ambientais de cultivo como tensão de oxigênio dissolvido, pH, concentração de nutrientes, produto e sub-produtos. Os subprodutos tóxicos às células são removidos e o produto de interesse é recuperado de forma contínua, evitando o risco de degradação. Pode-se obter altas concentrações celulares, da ordem de 5×10^7 células/mL, com altas vazões de alimentação e alta produtividade (Tab.3.5). Esses biorreatores têm como característica um menor volume para uma mesma produção das proteínas de interesse (Castilho, 2004).

Tabela 3.4 - Comparativo entre processos de produção para cultivo em biorreatores de tanque agitado

Modo de operação	Concentração Celular (cels/mL)	Complexidade	Volume do Biorreator (L)	Produtividade (mg/L/dia)
Batelada simples e alimentada	10^6	baixa	Até 10000	10-30
Perfusão	Até 5×10^7	média	30-2000	50-100

Fonte: Castilho, 2004

De acordo com Tonso (2004), vários parâmetros devem ser monitorados durante um processo de cultivo celular em alta densidade celular em biorreatores:

- Temperatura do processo
- pH
- Nível de espuma
- Frequência de agitação
- Viscosidade
- Potência consumida para agitação
- Oxigênio dissolvido
- Potencial redox
- Gás carbônico dissolvido
- Pressão do reator
- Vazões de entrada e saída de gases
- Glicose e glutamina
- LDH (Lactato desidrogenase)
- Composição de gases de entrada e saída
- Volume / massa de meio
- Vazões de entrada e saída de líquidos
- Imagem do caldo
- Concentração de biomassa
- Viabilidade
- Distribuição de tamanho de célula
- Densidade óptica
- Capacitância
- Concentração de substratos e produtos
- Fluxos metabólicos
- Lactato e amônia (sub-produtos tóxicos)
- Aminoácidos e osmolalidade
- Produto

Tabela 3.5 – Comparação entre diferentes sistemas de cultivo indicando a unidade volumétrica e rendimento celular por sistema:

Escala volume (L)	Sistema	Área para adesão (cm ²)	Células por lote por litro
–	Garrafa giratória	1750 (x100)	2x10 ¹⁰ (2x10 ⁸)
–	Bandeja múltipla	24000 (x10)	3x10 ¹⁰ (3x10 ⁹)
–	Multiplacas (Cell cube)	85000 (x4)	4x10 ¹⁰ (9x10 ⁹)
1	Biorreator de fibra ôca	20000	10 ¹⁰ (10 ¹¹)
20	Microcarreador microporoso	2.5x10 ⁶	10 ¹² (5x10 ¹⁰)
100	Esferas de vidro	10 ⁶	10 ¹¹ (10 ⁹)
200	Multiplacas	2x10 ⁵	2x10 ¹⁰ (1x10 ⁸)
500	Microcarregador em biorreator operando em perfusão com filtro de malha rotatória	2x10 ¹⁰	10 ¹⁰ (5x10 ¹⁰)
2000	Biorreator do tipo coluna de bolhas	–	4x10 ¹² (2x10 ⁹)
4000	Microcarregador	5x10 ⁶	8x10 ¹² (2x10 ⁹)
10000	Biorreator de tanque agitado	–	2x10 ¹³ (2x10 ⁹)

Fonte: Castilho, 2004.



Sistema bandeja



Garrafa giratória



microcarregadores



Sistema multiplacas

Figura 3.4 – Diferentes sistemas de cultivo. Fonte: Corning, 2005.



Figura 3.5 - Biorreator de tanque agitado com monitoramento e controle de parâmetros. Adequado para operação em perfusão em escala industrial. Fonte: Systems Biology, 2005.

O sistema de cultura celular e fermentação BioFlo 110 da firma New Brunswick, apresenta volumes de reator na faixa de produção de 1.3 até 13 litros (Fig.3.6). É autoclavável e o seu painel de controle indica os parâmetros para o monitoramento da produção. É este sistema que o LATAM pretende adquirir para o processo de cultivo de células em alta densidade. Para operá-lo em perfusão, pode-se usar um equipamento de retenção celular, como por exemplo, o filtro de disco rotatório (Castilho, 2001) para reter as células o interior do reator.



BioFlo110



Acessórios



Painel de Controle

Figura 3.6 – Biorreator BioFlo 110 – acessórios e painel de controle.

Fonte: New Brunswick, 2005.

3.3 Sistemas de Purificação

A produção de biofármacos implica na presença de outras moléculas que fazem parte do meio de cultivo ou são produzidas pela célula hospedeira utilizada. Como esses produtos não podem estar presentes e nem ser aceitos no produto final desejado, a biomolécula de interesse deve ser recuperada e purificada. Com freqüência, esses processos são considerados bem estabelecidos e se baseiam em procedimentos empíricos que foram desenvolvidos em bancadas de laboratório. A produção industrial em larga escala requer altos níveis de rendimento a um baixo custo de processo. Dessa forma, o processo de purificação deve ser aplicado sob forma de uma seqüência otimizada e bem ajustada dos diferentes métodos empregados durante as fases de recuperação e purificação da molécula de interesse (Anspach, 2004).

Após o processo de perfusão o produto que é retirado do biorreator passa por um processo de purificação, que envolve a separação de células e debris celulares remanescentes, o isolamento e a purificação do biofármaco de interesse.

A purificação envolve uma seqüência de estágios de recuperação e purificação do produto de interesse (Fig.3.7) de maneira que se possa obtê-lo no grau de pureza requerido para a sua aplicação final.

Entre as técnicas que podem ser empregadas pode-se destacar a centrifugação, microfiltração, processos de cromatografia, remoção de endotoxinas e ultrafiltração (esterilizante e diafiltração).

A cada estágio deste processo há perda do produto inerente à metodologia aplicada. Dessa forma, é imprescindível a necessidade de aumentar o rendimento das etapas de purificação, minimizando as perdas em cada estágio ou reduzindo o número total de etapas em um processo de produção. Isto pode ser alcançado, por exemplo, através do uso de uma técnica altamente seletiva, como a cromatografia de afinidade, em substituição a uma seqüência de etapas menos seletivas, aumentando o rendimento global do processo em termos de produto recuperado, como demonstra a figura 3.7.

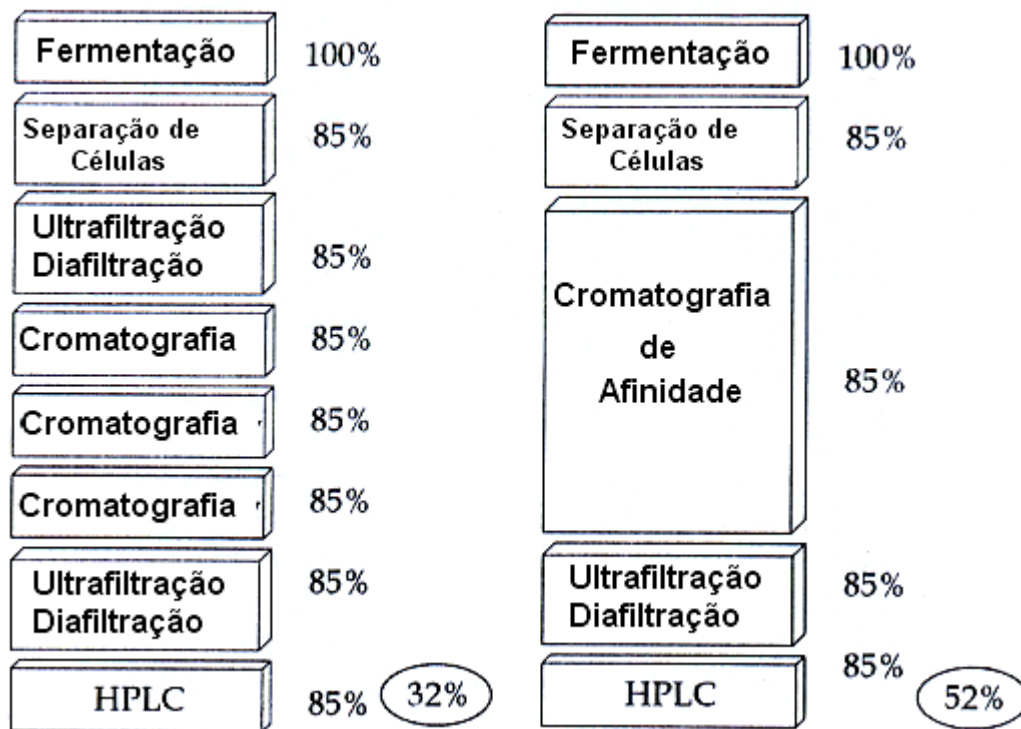


Figura 3.7 – Integração de etapas e aumento de rendimento através do uso da cromatografia de afinidade. Fonte: Castilho, 2004.

A cromatografia de afinidade (Fig.3.8) é a metodologia mais utilizada para a purificação de anticorpos. Consiste em se dispor de um ligante com reconhecimento biológico específico pela proteína, com alta seletividade. Pode isolar uma proteína presente de forma diluída, em meio a uma mistura complexa, sendo possível processar grandes volumes da amostra utilizando-se pouco volume de eluentes. Apresenta rendimentos bastante elevados, com altos níveis de recuperação e fatores de purificação e concentração aumentados (Castilho, 2004).

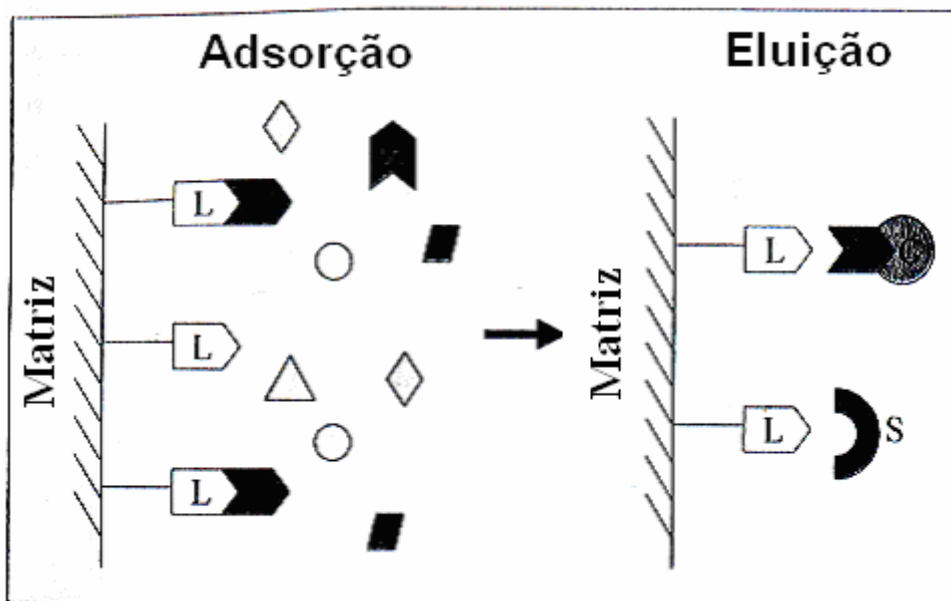


Figura 3.8 – Esquema geral da cromatografia de afinidade
Reconhecimento biológico específico: alta seletividade; Fonte: Castilho, 2004.

Os diferentes métodos aplicados pela indústria biofarmacêutica e o processo a jusante (*downstream processing*) variam não somente de produto para produto, mas dependem também do sistema de expressão utilizado.

Os filtros com membranas podem ser usados para clarificação e esterilização de soluções aquosas e gases introduzidos nos biorreatores, para a separação de células e durante o processo de recuperação e purificação da proteína desejada. Podem ser membranas derivadas de cerâmica ou derivadas de materiais poliméricos orgânicos, com várias porosidades e tamanhos. A filtração pode ser feita pelo método tangencial ou por fluxo normal.

Um módulo especial de filtro com membranas, denominado filtro dinâmico de disco rotatório (Castilho, 2001), quando dotado de membranas de afinidade, permite a integração entre o processo de cultivo de células de mamíferos em perfusão e a purificação do produto de interesse. A geometria deste filtro reduz a tensão de cisalhamento sobre as células, permitindo a retenção daquelas com alta viabilidade no biorreator, ao mesmo tempo em que o produto de interesse é adsorvido e purificado quando o meio líquido permeia através da membrana. Este sistema se apresenta como uma grande novidade, adequando-se a sistemas de cultivo em alta densidade e otimizando a etapa de purificação de proteínas recombinantes, de modo a promover altos rendimentos e produtividade (Fig.3.9).

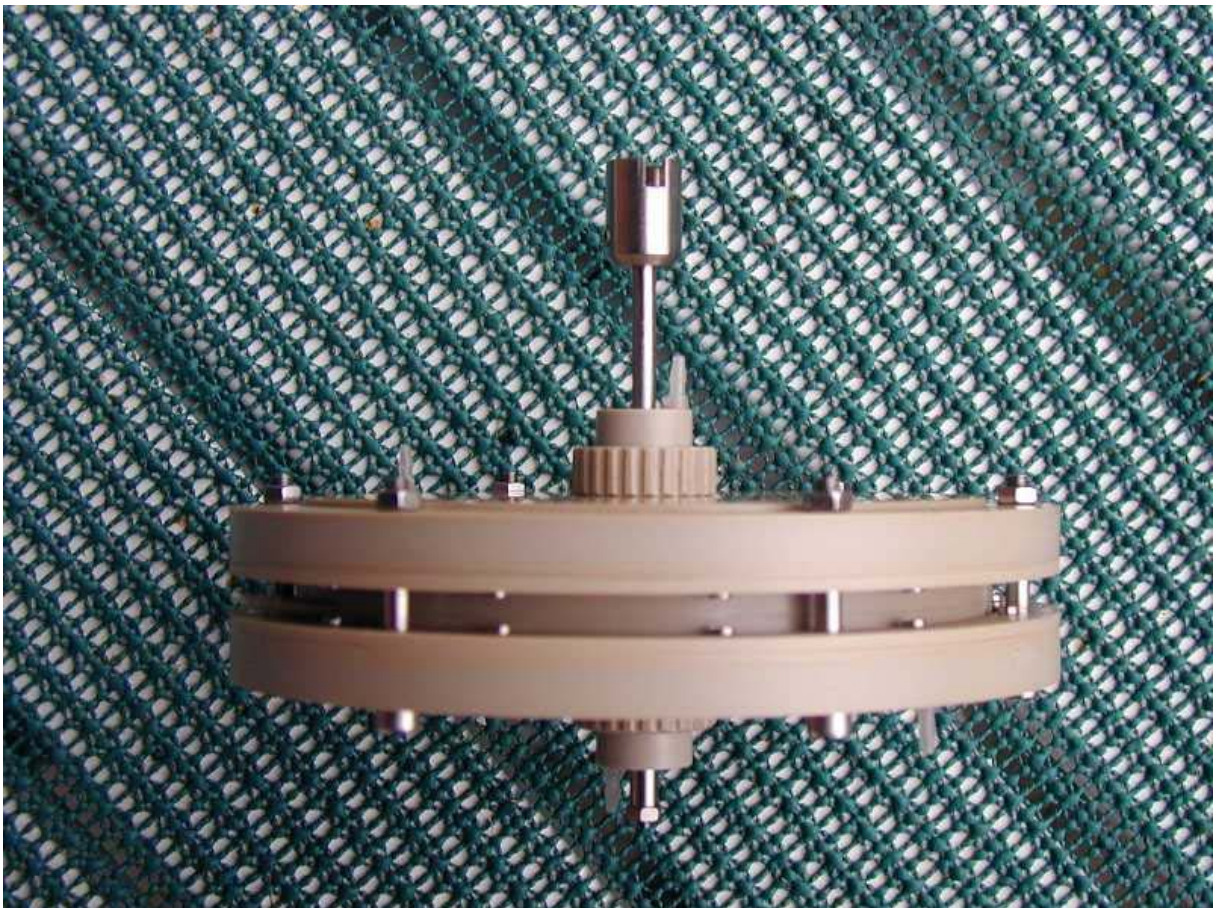


Figura 3.9 - Filtro dinâmico de disco rotatório. Fonte: Castilho, 2001.

As membranas de adsorção por afinidade acima citadas têm capacidade de adsorção seletiva da proteína diretamente do meio de cultura celular. Por isto, quando são utilizadas membranas de afinidade no filtro de disco rotatório, é possível integrar a retenção das células (e seu reciclo ao biorreator) com a purificação do produto de interesse. Algumas características necessárias para selecionar a membrana de afinidade a ser utilizada são:

- adsorção direta proveniente do meio de cultura sem adição de soluções salinas ou diluições, para que o retido contendo as células possa ser diretamente reciclado para o biorreator;
- a seletividade do ligante pelo produto deve ser alta, permitindo purificação e concentração diretamente do fluido de cultura;
- as condições de eluição devem ser compatíveis com a manutenção da atividade biológica e da estrutura do produto de interesse;
- como os cultivos em perfusão são idealizados como de longa duração, a membrana de adsorção deve manter um desempenho estável durante os repetidos ciclos de adsorção-eluição;
- a membrana de adsorção deve ser esterilizável.

Para a purificação de imunoglobulinas, podem ser empregadas membranas de afinidade contendo proteína A como ligante. A proteína A é uma proteína de *Staphylococcus aureus*, com peso molecular de 42 kDa e diferentes sítios de ligação que apresentam forte afinidade por imunoglobulinas de diversas classes e subclasses de diferentes espécies. Esta é o ligante clássico, empregado extensivamente na cromatografia de afinidade e aplicações para detecção de anticorpos. Existem diferentes fontes de proteína A comercialmente disponíveis, tanto de cepas do *S. aureus*, quanto de cepas de *E. coli* recombinantes.

Membranas comerciais Ultrabind[®], feitas de polissulfona, e Sartobind[®], de celulose regenerada, mostraram-se como sendo os melhores suportes para a imobilização de proteína A, uma vez que as membranas de afinidade delas resultantes apresentaram bom desempenho na purificação de imunoglobulinas (Castilho, 2002).

A cromatografia de afinidade com proteína A é considerado o método ideal para a recuperação de moléculas de anticorpos e seus derivados, por duas razões estratégicas: a vantagem da especificidade de ligação com o antígeno e capacidade de apontar os domínios constantes do fragmento Fc (Roque, 2004).

Os requerimentos das agências regulatórias preconizam um grau de pureza dos produtos maior que 99%, particularmente no caso de proteínas injetáveis. Com o objetivo de atingir estes elevados graus de pureza, pode-se empregar a cromatografia de imunoafinidade, que se baseia em interações antígeno-anticorpo, as quais são muito fortes e específicas.

A cromatografia de afinidade pode ser utilizada em escala industrial e tem ajudado a indústria atingir um alto grau de pureza nas proteínas terapêuticas que receberam aprovação das agências regulatórias, como mostram os exemplos na tabela 3.6 (Kalyanpur, 2002).

Os processos de validação permitem ao fabricante se assegurar que o método aplicado na manufatura de um produto funcione com desempenho esperado. Quando a metodologia é executada da maneira correta, bem documentada e de acordo com o estabelecido nos procedimentos operacionais, o fabricante pode assegurar às agências regulatórias, de que a tecnologia empregada é reprodutível, e gera produtos de qualidade consistente.

Tabela 3.6 – Exemplos de anticorpos e seus derivados purificados por diferentes técnicas baseadas em afinidade, obtidos por engenharia genética. Métodos de separação por cromatografia de afinidade, baseada em ligantes convencionais.

Fonte de produção	Alvo	Metodologia de separação	Ligante	Referências
Hibridoma (sobrenadante de cultura)	Anticorpo monoclonal (IgG humana)	AC	Proteína A	Giovannini & Freitag, 2001
Hibridoma (sobrenadante de cultura)	Anticorpo monoclonal (IgG camundongo)	AC SMB	Proteína A	Gottschlich & Kasche, 1997
Hibridoma (sobrenadante de cultura)	Anticorpo monoclonal (IgG camundongo)	AC (EBA)	Proteína A	Thommes <i>et al.</i> , 1996
Células COS (sobrenadante de cultura)	Anticorpo monoclonal humano (bi-específico)	AC	Proteína G	Zuo <i>et al.</i> , 2000
Células NSO (sobrenadante de cultura)	Fragmento bi-específico (<i>diabody</i>)	AC	Proteína L	Kriangkum <i>et al.</i> , 2000
<i>Pichia pastoris</i> (sobrenadante de cultura)	Proteína de fusão Sc-Fv-Fc	AC	Proteína G	Powers <i>et al.</i> , 2001
<i>Pichia pastoris</i> (sobrenadante de cultura)	Glico -ScFv	AC	Concavalina A	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>E. coli</i> (periplasma)	Fragmento Fab	AC	Tiofílico	Fiedler & Skerra, 1999
<i>E. coli</i> (periplasma)	Fragmentos bi-específicos (<i>diabodies</i>)	AC	Antígeno / Íon metálico	Holliger P, Prospero T, Winter G. 1993; Holliger & Winter, 1997
<i>E. coli</i> (periplasma)	Fragmento bi-específico (<i>diabody</i>)	AC (IMAC)	Cu ²⁺	Cochlovius <i>et al.</i> , 2000

AC - Cromatografia de afinidade; SMB - Leito móvel simulado; IMAC - Cromatografia de afinidade com metal imobilizado; Fab – Fragmento de ligação com o antígeno (*Antigen Binding Fragment*); Fv – Região de domínio variável das cadeias leves e pesadas (*Variable fragment*); Sc – Cadeia única (*Single-chain*); Fc – Região constante da cadeia pesada (formada unicamente pela cadeia pesada - *Crystal Fragment*); EBA – Adsorção em leito expandido; COS – células de rim de macaco modificadas com SV-40; NSO - células de mieloma de camundongo. Adaptação da Fonte: Roque, 2004.

PARTE II – PROPOSTA PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS

1 - HUMANIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD20

1.1 O Antígeno CD20

O CD20 é uma proteína transmembrana com regiões hidrofóbicas de comprimento suficiente para transpor a membrana celular por cerca de quatro vezes. As longas terminações nas regiões carboxi (C) e amino terminais (N) da molécula estão localizadas dentro do citoplasma, somente com uma pequena porção da molécula exposta na superfície da célula. O seu peso varia entre 33 a 37 kDa (Fig.1.1).

Expresso nas linhagens de células B, o CD20 é um antígeno de superfície. Está relacionado com a regulação do crescimento e diferenciação dos linfócitos B, possivelmente por funcionar como um canal regulador de cálcio.

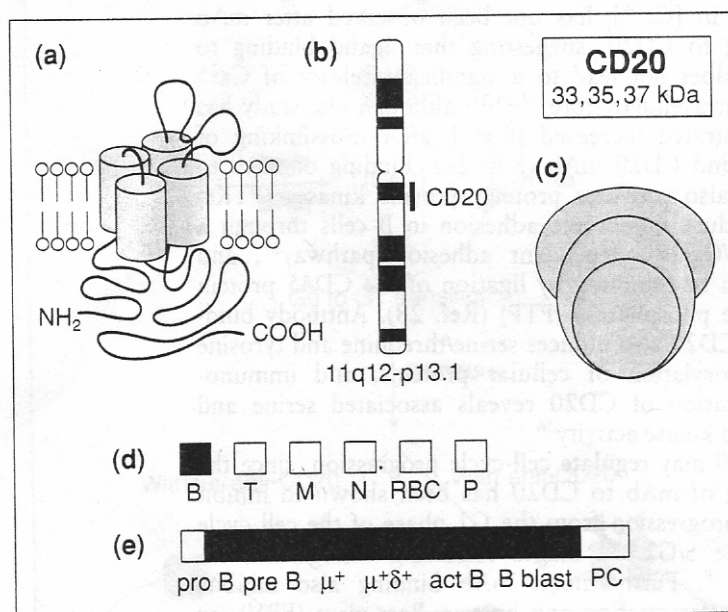


Figura 1.1 - Estrutura e expressão do CD 20 durante o desenvolvimento da célula B. (a) representação esquemática dos domínios da proteína; (b) localização no cromossomo; (c) expressão em tecidos linfóides onde regiões representando os centros germinais, a zona do manto folicular e as zonas marginais, estão indicadas por círculos crescentes progressivos; (d) expressão em células linfóides; (e) expressão durante o desenvolvimento da célula B. Abreviaturas: B: célula B; T: célula T; M: macrófago; N: neutrófilo; RBC: *red blood cell* (célula vermelha do sangue); P: plaqueta; act B: célula B ativada; PC: célula do plasma; *B blast*: célula B rompida. Fonte: Tedder & Engel, 1994.

Este foi o primeiro antígeno de superfície de diferenciação de células B humanas a ser identificado por um anticorpo monoclonal (Tedder & Engel, 1994).

Sua expressão ocorre por precursores de células B e por estas já maduras, sendo perdido no momento da diferenciação das células B normais em células plasmáticas secretoras de anticorpos (Fig.1.2).

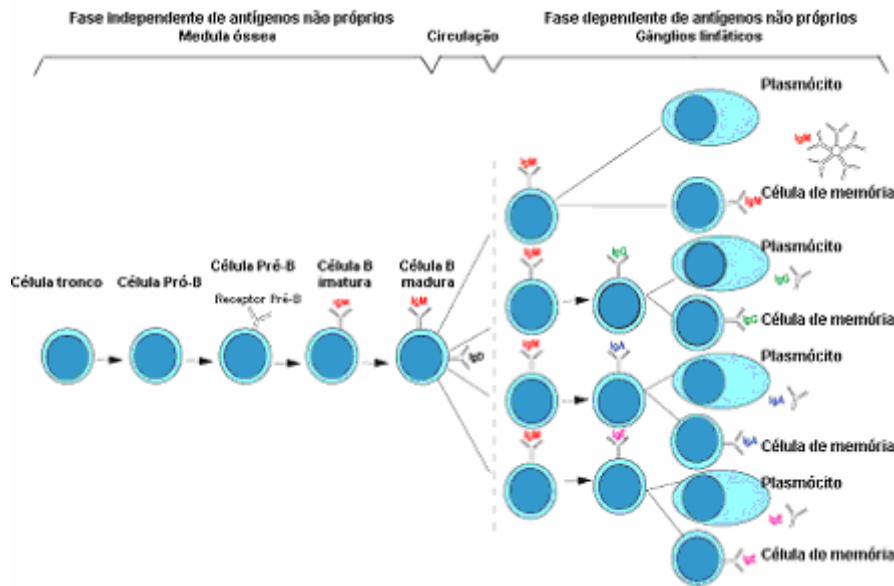


Figura 1.2 - Diferenciação dos linfócitos B. Fonte: Lefranc, 2005.

Estudos recentes sugerem que o CD20 é um componente do sinal do complexo de transdução, envolvido na regulação do crescimento dos linfócitos B ativados. Sugere-se que o CD20 atua como um canal direto, regulando o fluxo de íon cálcio (Ca^{2+}) conduzido através da membrana das células B, assumindo um papel regulador de proliferação e diferenciação destas células. Sendo assim, um anticorpo monoclonal que altere essa função endógena do CD20 alterará também indiretamente o transporte e fluxo de cálcio através da membrana de células B, adquirindo dessa forma as características desejadas para sua aplicação terapêutica, resultando na interrupção da progressão das células B através do ciclo celular. (Tedder & Engel, 1994).

1.2 O Linfoma Não-Hodgkin – LNH

O Linfoma Não-Hodgkin (LNH) inclui um grupo diverso de doenças malignas que se originam predominantemente dos linfócitos B. Em contraste às taxas em declínio de muitos outros tipos de câncer, a incidência de LNH está aumentando rapidamente em todo o mundo.

O LNH é o quinto câncer mais freqüente nos Estados Unidos (Fig.1.3) com aproximadamente 56.000 casos novos registrados em 2001, representando um aumento anual na incidência de 3-4% (Greenlee et al., 2001) (Tab.1.1).

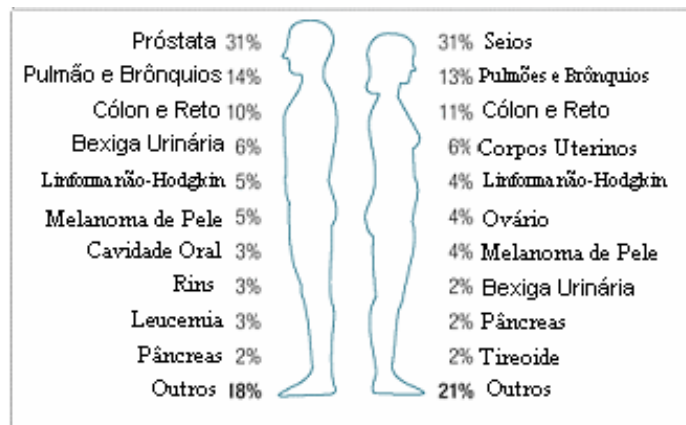


Figura – 1.3 - As 10 maiores incidências de câncer – EUA 2001

Fonte: Greenlee *et al.*, 2001.

Observou-se tendência similar na Europa, onde uma análise recente, realizada em oito países, mostrou aumento anual de 4,2% no número de casos novos de LNH (Morgan *et al.*, 1997).

Esta forma de câncer pode ser classificada de duas formas (Tab. 1.2):

a) Indolente - que é a forma mais comum dentre as consideradas de baixo grau (com 22% dos casos).

b) Agressivo - graus intermediário e alto, onde o linfoma difuso de grandes células do tipo B (LDGC-B) é a forma mais comum dentre estas, responsável por 30% de todos os casos.

Tabela 1.1 - Estimativa de novos casos de câncer e relação de mortes por sexo (E.U.A. / 2004)

	Avaliação de Novos Casos			Mortes Estimadas		
	Ambos os sexos	Homens	Mulheres	Ambos os sexos	Homens	Mulheres
Linfoma	62.250	33.580	28.070	20.730	11.090	9.440
Doença de Hodgkin	7.580	4.330	3.550	1.320	700	620
Linfoma Não-Hodgkin	54.370	28.280	25.520	19.410	10.390	9.020

Fonte: Jemal *et al.*, 2004.

Tabela 1.2 - Principais classes de leucemias e linfomas de células B

Curso	Grau	Classificação	Características
Indolente	Baixo	A	Linfócito pequeno, consistente com LLC Linfócito pequeno, plasmacitóide
Indolente	Baixo	B	Folicular, predominantemente de pequenas células clivadas
Indolente	Baixo	C	Folicular, misto de pequenas e grandes células
Agressivo	Intermediário	D	Folicular, predominantemente de grandes células
Agressivo	Intermediário	E	Difuso, pequeno e clivado
Agressivo	Intermediário	F	Difuso, misto
Agressivo	Intermediário	G	Difuso, grandes células (LDGC-B)
Agressivo	Alto	H	Imunoblástico, grandes células
Agressivo	Alto	I	Linfoblástico
Agressivo	Alto	J	Linfoblástico, pequeno, não clivado

LLC: leucemia linfocítica crônica; LDGC-B: linfoma difuso de grandes células B.

Fonte: Hoffmann, 2003.

O LNH folicular indolente caracteriza-se pelo envolvimento da medula óssea em até 60% dos casos. Há relatos de transformação histológica para o LNH mais agressivo em 20-25% dos pacientes dentro de 5 anos após o diagnóstico, aumentando para 60% após 8 anos. A média de sobrevida após a transformação é geralmente menor que 1 ano. As opções de tratamento incluem radioterapia, quimioterapia com agente único ou em combinação, terapias biológicas, tais como interferon, anticorpos monoclonais e transplante de células-tronco (Hoffmann, 2003).

O LNH é o causador de muitas mortes no mundo e a sua incidência está crescendo. Embora possam estar associados à imunodeficiência, autoimunidade ou infecções virais, na maioria dos casos as causas desta doença são desconhecidas.

Entretanto, têm ocorrido importantes avanços no conhecimento, no desenvolvimento dos linfócitos saudáveis e na patogenia do LNH na última década. Esses avanços vieram acompanhados pela melhora nos tratamentos para o LNH. Antes de 1990, a única opção de tratamento disponível era a quimioterapia citotóxica. Contudo, nos últimos 10 anos, doses elevadas de quimioterapia e reconstituição autóloga das células tronco foram estabelecidas como etapas do tratamento dos linfomas agressivos. Além disso, os anticorpos monoclonais se tornaram uma outra opção terapêutica (Hennessy *et al.*, 2004).

1.3 O Anticorpo Monoclonal Rituximab

Em recente pesquisa feita no Instituto Nacional do Câncer – INCA do Rio de Janeiro, constatou-se que, também no Brasil, o LNH é um dos tipos de câncer de maior relevância, com um número cada vez maior de pacientes portadores necessitando de tratamento precoce e nas diversas fases da doença.

Em alguns casos, os pacientes são submetidos a tratamento contra o LNH com um anticorpo monoclonal quimérico, o anti-CD20. Este anticorpo é importado e conseqüentemente caro. Somente no Rio de Janeiro, são gastos cerca de US\$ 100 mil a cada 18 meses, com a compra deste produto (Tab.1.3).

Tabela 1.3 - Gastos com o CD20 entre Janeiro 2002 e Agosto 2003

PRODUTO	APRESENTAÇÃO	QUANTIDADE	VALOR UNITÁRIO	FABRICANTE
ANTI-CD20	100 mg (10mL)	105 frascos	US\$ 270,00	ROCHE
ANTI-CD20	500 mg (50mL)	57 frascos	US\$ 1340,00	ROCHE

Fonte: INCA, 2003.

O anticorpo monoclonal quimérico Rituximab anti-CD20 é produzido e comercializado somente por um fabricante (Roche), para terapia do LNH. Em razão disso, o INCA efetua compra direta, isto é, feita sem licitação. O produto está em fase introdutória e ainda não tem a sua compra padronizada. A requisição é feita por paciente (INCA, 2003).

O Rituximab anti-CD20 é o anticorpo monoclonal mais avançado já aprovado para terapia do câncer e se tornou parte do tratamento padrão para alguns tipos de linfomas. Este e muitos outros anticorpos monoclonais continuam a ser avaliados em estudos clínicos para outras aplicações em diversos tipos de doenças. Além da sua aprovação na terapia do LNH, o Rituximab vem sendo testado para a determinação da segurança e efetividade da sua aplicação, entre outras, no tratamento de anemia, lupus eritematoso sistêmico - SLE, hemofilia auto-imune,

pênfigo foliáceo, mieloma de pele, púrpura trombocitopênica, herpesvírus, artrite e transplantes (Kawagishi *et al.*, 2005; Looney, 2005; Morimoto *et al.*, 2005; CTG, 2005).

Os anticorpos monoclonais podem ser usados separadamente ou combinados, como no caso do anti-CD 20 combinado com o anti-CD 22 epratuzumab (Stein *et al.*, 2004) com dosagens padrão ou altas de quimioterapia. Também podem ser conjugados com radionucleotídeos para aumentar a citotoxicidade (Hennessy *et al.*, 2004).

2 - O LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS – LATAM

O Setor de Híbridomas foi criado em 1983, dando início ao Departamento de Desenvolvimento Tecnológico – DEDET do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos. Desde então, produz anticorpos monoclonais contra antígenos de interesse para diversas áreas, em especial para a saúde pública.

Como parte da ação de reestruturação do DEDET, em 2004 passou à categoria de laboratório, sendo registrado como Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais – LATAM, membro da Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico – VDTEC (antigo DEDET), da Unidade de Bio-Manguinhos.

Atualmente instalado em uma área de aproximadamente 39 m², situada no 4º andar do Pavilhão Rocha Lima (Fig.2.1), conta com uma equipe composta por cinco profissionais, que será especificada mais adiante. O LATAM está capacitado para produzir anticorpos monoclonais de origem murina contra diversos tipos de moléculas, a partir do antígeno de interesse.

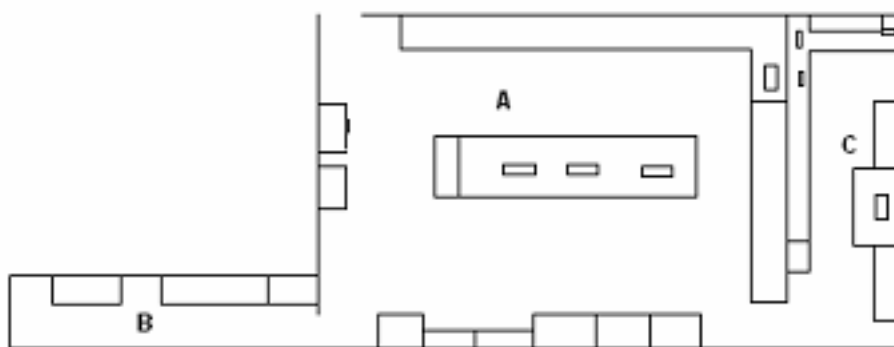


Figura 2.1 - Planta atual do LATAM

A - Sala principal e escritório.

B - Sala de freezer –20 e –70°C

C - Sala de fluxos laminares e incubadoras

O LATAM possui estrutura e profissionais qualificados para o processo de desenvolvimento e produção de anticorpos murinos. Participa de diversos projetos colaborativos entre departamentos da FIOCRUZ e outras instituições de pesquisa, buscando o desenvolvimento de novas metodologias e/ou aprimoramento das já existentes. Entre eles destaca-se o projeto intitulado “Caracterização e Purificação de Anticorpos Monoclonais Contra o Vírus da Hepatite B – Anti-HBsAg e do Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B Recombinante HBsAgRec”, cuja responsabilidade pelo fornecimento dos anticorpos é do LATAM.

Recentemente, o laboratório selecionou do seu banco, hibridomas secretores de anticorpos anti-HBsAg para o desenvolvimento do projeto “Anticorpo Monoclonal Humanizado anti-HBsAg”. Este projeto é mais uma vertente na direção do domínio da metodologia de humanização.

Os anticorpos monoclonais desenvolvidos são utilizados na elucidação das estruturas antigênicas e no estudo de sua imunogenicidade, bem como no desenvolvimento, padronização e otimização de conjuntos para o diagnóstico laboratorial.

Detentor de um banco de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais variado e representativo, o LATAM conta com uma colônia própria de camundongos BALB/c isogênicos, com alto grau de consangüinidade e qualidades atestadas pelo Centro de Bioterismo – CEMIB da Seção de Controle de Qualidade Genética da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, obtendo dessa forma segurança, rendimento e qualidade consideráveis durante o processo de fusão, clonagem, produção do fluido ascítico e sobrenadante de cultura.

Entre as fusões elaboradas pelo LATAM, destacam-se algumas com especificidade definida para:

- a. Hepatite A (HAF 203)
- b. Hepatite B (HBsAg)
- c. Febre Amarela (vacinal 17DD)
- d. Sarampo (vacinal CAM 70)

- e. Dengue (Tipos 1, 2, 3 e 4)
- f. *Neisseria meningitidis* (proteínas, polissacarídeo capsular e endotoxina)
- g. *Mycobacterium bovis* (BCG)
- h. *Leptospira interrogans* (*Copenhageni* e *canícula*)
- i. Imunoglobulinas humanas (IgG, IgM)
- j. Hepatite C (HCV)
- k. *Mycoplasma micoides*

A produção de fluido ascítico anti-Hepatite B, imunoglobulinas humanas IgG/IgM, anti-Dengue 1, 2, 3 e 4 e anti-Febre Amarela é feita periodicamente pelo LATAM para o fornecimento à Divisão de Reativos para Diagnóstico - DREAD de Bio-Manguinhos, que é a responsável pela produção dos conjuntos de reagentes para diagnóstico.

As atividades gerais do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais são as seguintes:

- estudo da viabilização da implantação da técnica de humanização de anticorpos para fins terapêuticos (objeto desta dissertação de mestrado no MPTI de Bio-Manguinhos);
- produção e desenvolvimento de anticorpos monoclonais aplicados em estudos das características de diversos agentes antigênicos de interesse em saúde pública;
- padronização de testes para análise e caracterização dos anticorpos;
- formação, manutenção e criopreservação do banco de hibridomas;
- produção e armazenamento de fluido ascítico e sobrenadante de cultura celular;
- preparo de meios de cultura e reagentes;
- colônia de camundongos BALB-c (manutenção, sangria, imunizações, coleta de fluido ascítico);
- preparo de suspensão antigênica para imunização dos animais;
- organização da pasta/arquivo de fichas de informação das hibridizações;

- implantação da reação de imunofluorescência indireta (IFI), como teste de controle interno para avaliação da sensibilidade e especificidade dos anticorpos monoclonais anti-Dengue tipos 1, 2 e 3;
- acompanhamento dos ensaios de caracterização de anticorpos monoclonais (anti-HBsAg), utilizando peptídeos sintéticos para aplicação no melhoramento dos insumos para diagnóstico e tratamento da hepatite B;
- projeto de obtenção do anticorpo monoclonal anti-CD20 murino;
- projeto de humanização de anticorpo monoclonal anti-HBsAg;
- projeto de avaliação da viabilidade e caracterização de anticorpos monoclonais do banco de hibridomas do LATAM;
 - . levantamento e atualização do material criopreservado no banco de células;
 - . levantamento das informações disponíveis sobre o histórico dos hibridomas (1983 a 2004);
 - . informatização de dados, visando o rastreamento de cada etapa do processo de produção de anticorpos monoclonais;

Participação em diversos projetos em colaboração com laboratórios e centros de pesquisa, tais como:

- projeto de Diagnóstico Sorológico e Molecular da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV): desenvolvimento de conjuntos para a detecção de anticorpos anti-HCV por ensaio imunoenzimático e genotipagem do HCV por hibridização reversa.
- desenvolvimento de insumos (conjugados) para imunofenotipagem e quantificação de CD3/CD4/CD8 por citometria de fluxo, em amostras de indivíduos infectados pelo HIV.
- melhoramento da vacina BCG (sub-cepa Moreau) (Programa de Vacinas Bacterianas).
- produção de anticorpos policlonais contra as proteínas (6) da região RD16 de *M. tuberculosis*.
- produção de soro policlonal contra as proteínas ESAT-6 e CFP-10 de *M. tuberculosis*.
- produção de soro policlonal para proteína LACK.

- produção de anticorpos monoclonais para as proteínas NS1 e NS3 produzidas em *P. pastoris* para produção de *kit* diagnóstico para dengue.
- desenvolvimento de anticorpos monoclonais para as proteínas (*leptospira immunoglobulin like*) Lig.A, Lig.B e LpL32 aplicados ao projeto de desenvolvimento de vacina e diagnóstico para leptospirose.
- produção de anticorpos monoclonais contra proteínas recombinantes Hexon, de adenovírus.
- produção de soro policlonal para a proteína KMP11.
- produção de anticorpos monoclonais contra proteínas recombinantes VP6, de rotavírus.
- produção de anticorpos monoclonais contra proteínas recombinantes VP90, de astrovírus.

2.1 Impactos da Implantação da Tecnologia de Humanização

O desenvolvimento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados para fins terapêuticos é de interesse do LATAM e está indicado como sendo uma das prioridades da Unidade de Bio-Manguinhos. Há um crescente interesse da direção em abrir nova frente de mercado através de novas linhas de produção.

O laboratório identificou este momento como sendo oportuno para dar início ao desenvolvimento de uma nova metodologia, ainda inédita na Unidade, que é a humanização de anticorpos monoclonais. É uma boa oportunidade de conseguir parte desse mercado identificando, desenvolvendo e produzindo o anticorpo humanizado anti-CD20.

Com o domínio dessa tecnologia, pode-se reduzir consideravelmente os gastos não só do INCA, mas também de outras instituições nacionais, da área de oncologia, desonerando a balança comercial com gastos na importação desses anticorpos. Possibilitará também a abertura que permitirá a Bio-Manguinhos dispor de uma tecnologia de ponta, fomentando o país a um mercado em crescente desenvolvimento mundial, podendo se tornar um fornecedor desses produtos ao Ministério da Saúde, após sua devida aprovação e liberação pelas agências reguladoras.

Como impacto social imediato, haverá a redução das taxas de mortalidade da população acometida por essa neoplasia (LNH), com elevação da sua expectativa e qualidade de vida, por meio de emprego de medicamentos de comprovada eficácia. A redução das taxas de internação nos hospitais, decrescendo os custos internos atribuídos a essa prática, também será possível.

Paralelamente, a absorção da tecnologia de humanização estimulará o crescimento científico das equipes participantes dos laboratórios diretamente envolvidos no processo, gerando conhecimento, publicações e participações em congressos e seminários. A capacitação científica e tecnológica através da obtenção de conhecimento básico e específico, assim como de novas tecnologias e produtos

voltados para a humanização de anticorpos de interesse terapêutico, incrementa esta proposta.

Essa plataforma abrirá a possibilidade de se identificar no atual banco de hibridomas do laboratório, aqueles com potencial aplicação terapêutica de doenças de reconhecido impacto social, como, por exemplo, a Hepatite B.

Objetivos e Etapas

Como objetivo geral, cita-se o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-CD20 humanizado.

Como objetivos específicos:

- Estabelecer metodologias de análise de antígenos de superfície de leucócitos.
- Estabelecer metodologia de purificação de linfócitos B de sangue periférico.
- Estabelecer metodologia de análise de anticorpos anti-CD20.
- Obter e caracterizar hibridomas produtores de anticorpo monoclonal anti-CD20 murino.
- Caracterizar anticorpos monoclonais anti-CD20 murinos.
- Desenvolver competência na área de manipulação e remodelagem de anticorpos.

Inicialmente, caberá ao laboratório desenvolver os anticorpos monoclonais murinos anti-CD20 a partir de camundongos BALB/c imunizados.

Para a execução dessa atividade são necessárias as seguintes etapas:

- 1- Estabelecimento de metodologia para obtenção do antígeno alvo (CD20) por meio da purificação de linfócitos B.
- 2- Imunização dos animais.
- 3- Estabelecimento de metodologia para avaliação do título de anticorpos dos animais imunizados.
- 4- Hibridização celular.
- 5- Triagem dos hibridomas secretores.

- 6- Clonagem das células híbridas secretoras.
- 7- Expansão dos clones para criopreservação e obtenção de sobrenadante de cultura e fluido ascítico.
- 8- Purificação e quantificação dos anticorpos monoclonais.
- 9- Isotipagem.
- 10- Ensaio de caracterização.

Posteriormente, o anticorpo monoclonal murino anti-CD20 obtido será submetido ao processo de humanização, que consiste em obter o cDNA do hibridoma produtor do anticorpo de interesse e submetê-lo a uma reação de PCR (*polymerase chain reaction*), utilizando-se um conjunto de iniciadores específicos para as diversos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas murinas. Os produtos de PCR são clonados e suas seqüências de nucleotídeos determinadas. A partir deste dado, as seqüências de aminoácidos das cadeias variáveis são deduzidas e faz-se uma análise topográfica dos sítios de interação, contato e ligação com o antígeno para definir as CDRs (MacCallum, 1996). Com esses dados, monta-se o gene humanizado que deve conter as três CDRs no contexto de um arcabouço de anticorpo humano. O gene é sintetizado e clonado em vetores de expressão de fragmentos de anticorpo.

No processo da expressão, os domínios variáveis humanizados são expressos normalmente em uma das quatro formas abaixo: anticorpo inteiro, contendo os domínios variáveis humanizados (apenas as CDRs são de camundongo) e os domínios constantes humanos; scFv (apenas os domínios variáveis conectados por um peptídeo conector hidrofílico e flexível); Fab (cadeia leve - V_L humanizado e constante humano; e Fd - V_H humanizado e o primeiro domínio constante humano) ou FvFc (um scFv contendo V_H e V_L humanizados, conectados por um peptídeo hidrofílico conector e os dois domínios constantes humanos de cadeia pesada C_{H2} e C_{H3}). Todas essas construções, exceto a primeira, podem ser expressas em levedura *Pichia pastoris*. O anticorpo inteiro deve ser expresso em células de mamífero em cultura (Maranhão & Brígido, 2001).

Detalhadamente, as etapas desse processo podem ser definidas da seguinte maneira:

- Obtenção da seqüência da cadeia V_H murina.
- Obtenção da seqüência V_L murina.
- Análise computacional.
- Obtenção dos genes V - D - J.
- Clonagem em vetor de expressão para *Pichia pastoris*.
- Expressão e produção da proteína humanizada.
- Ensaio biológico.
- Clonagem dos genes em vetores de expressão em células de mamíferos da linhagem CHO (*Chinese Hamster Ovary*).
- Transfecção de células em cultura.
- Obtenção do transfectoma estável.
- Expressão, produção e purificação de proteína.
- Ensaio biológico.
- Avaliação dos resultados

A próxima fase será a de expressão do anticorpo humanizado em células de mamífero da linhagem CHO, produção em alta densidade utilizando biorreatores e purificação do produto. Serão seguidas basicamente as seguintes etapas:

- amplificação, por reação de PCR, do gene do anticorpo previamente humanizado;
- ligação do gene amplificado ao vetor de expressão, de modo a construir o vetor recombinante;
- transfecção das células com o vetor recombinante;
- *screening* dos clones produtores e seleção dos clones estáveis;
- montagem de um banco celular com os clones mais promissores;
- produção do anticorpo humanizado através do cultivo celular em biorreatores;
- purificação do anticorpo a partir do sobrenadante de cultivo, empregando técnicas de cromatografia de afinidade (por exemplo tendo Proteína A como ligante) e cromatografia de troca iônica.

As etapas cromatográficas poderão ser realizadas em membranas de adsorção ou em colunas empacotadas com partículas geliformes porosas.

3 - PROJETO DE PRODUÇÃO

3.1 Recursos Físicos

3.1.1 Reestruturação do Laboratório

Além do objetivo desta dissertação e com base no Plano Diretor de Ocupação de 1999, dentro do escopo da Comissão das Áreas Compartilhadas instituída em Bio-Manguinhos em 2004, para o processo de reestruturação do Departamento de Desenvolvimento Tecnológico – DEDET, o Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais – LATAM necessita ser reestruturado (Figs. 3.1 e 3.2). Instituída a Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico – VDTEC, várias propostas de reestruturação foram elaboradas. Entre elas a proposta do Plano Diretor e da comissão de áreas compartilhadas que consistiu em:

- Ocupação dos espaços físicos (existentes ou programados), pelas Unidades Organizacionais;
- Levantar as necessidades e a viabilidade da criação de novas áreas e manutenção e/ou modificação de áreas existentes;
- Sugerir a localização das áreas propostas, bem como pessoal, equipamentos e outros.

Para melhor atender o objeto desta proposta, fatores correlacionados ao processo, como área física, setorização, equipamentos, insumos necessários e recursos humanos, serão componentes de grande interesse e estarão listados na seqüência.

As plantas que se seguem ainda não são as definitivas. Consistem em anteprojetos que merecerão avaliação do departamento competente de engenharia, podendo, dessa forma, sofrer modificações estruturais e redimensionamentos.



Figura 3.1 - Área proposta para o LATAM hachurada em azul, situada ao lado do Laboratório de Neurovirulência - LANEU.
Fonte: DEPEM/BM.

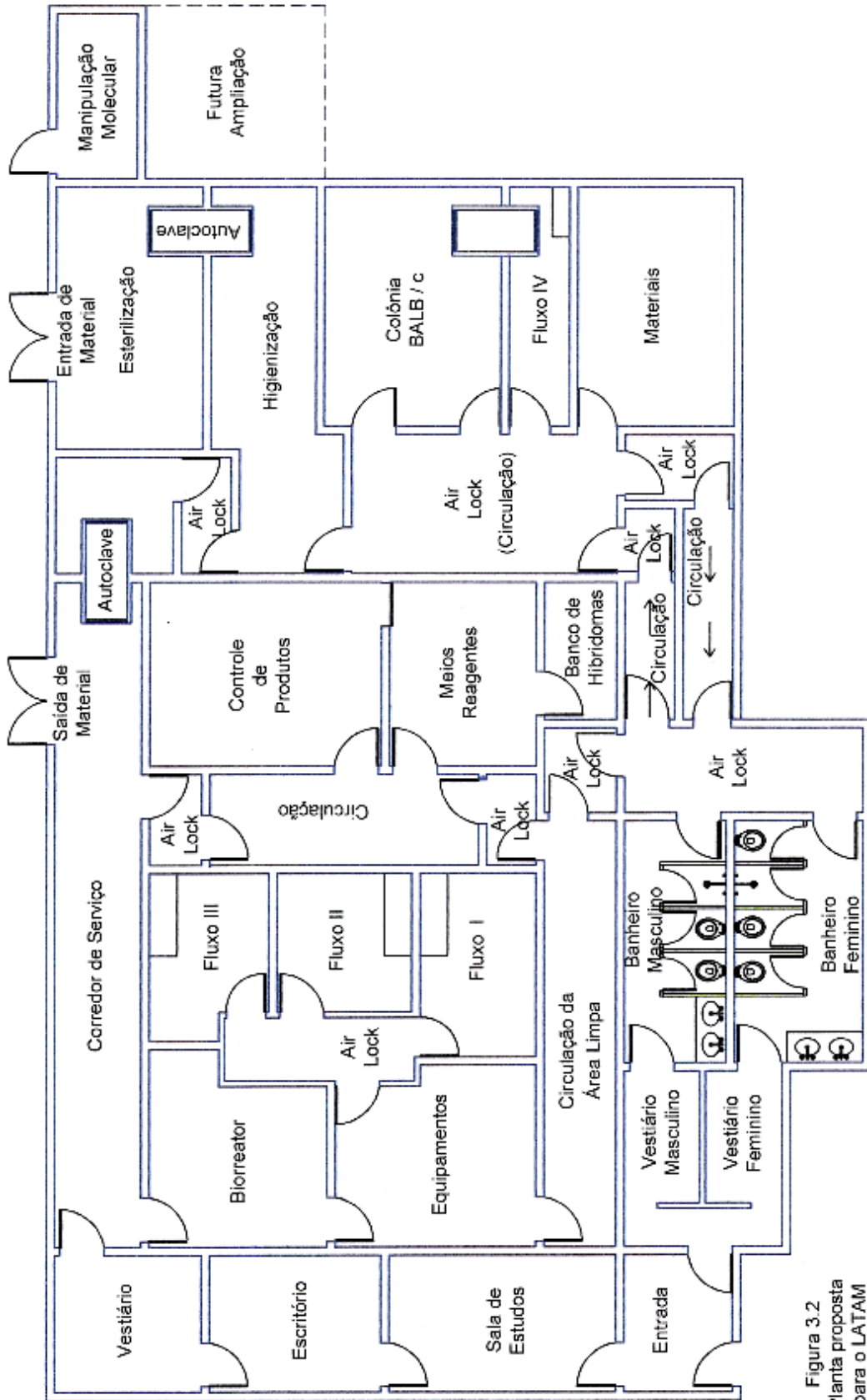


Figura 3.2
 Planta proposta
 para o LATAM

Proposta de definição de áreas do laboratório, buscando adequação às normas de BPL (boas práticas de laboratório).

De acordo com a figura 3.2, a área do LATAM poderá ser subdividida da seguinte forma:

- Escritório / Sala de estudos

- Corredores para circulação (limpo e serviço com vestiário)

- Cultivo de células
 - . Uma sala de fluxo laminar I - cultivo de células.
 - . Uma sala de fluxo laminar II - cultivo de células.
 - . Uma sala de fluxo laminar III - cultivo de células.
 - . Uma sala de biorreator.
 - . Uma sala de equipamentos (concentração e purificação).
 - . Uma sala de controle de produtos e processos.
 - . Uma sala de meios e reagentes (preparo de soluções).
 - . Uma sala para o banco de hibridomas (acondicionamento de botijões de nitrogênio líquido).

- Higienização (área de apoio para a colônia)
 - . Uma sala de higienização.
 - . Uma sala de esterilização e preparo de material.
 - . Uma sala de estoque de material limpo.

- Banheiros com vestiário (masculino e feminino).

- Manipulação de animais
 - . Uma sala para manipulação com animais (camundongos BALB/c).
 - . Uma sala de fluxo laminar IV exclusiva para o trato com animais.

- Sala para manipulação molecular (transplante de CDR e biblioteca genômica).

- Piso técnico – para condicionadores de ar com controle de pressão positiva e outros maquinários.

Três setores serão criados no LATAM, a fim de definir as atividades nele desenvolvidas (Fig. 3.3).

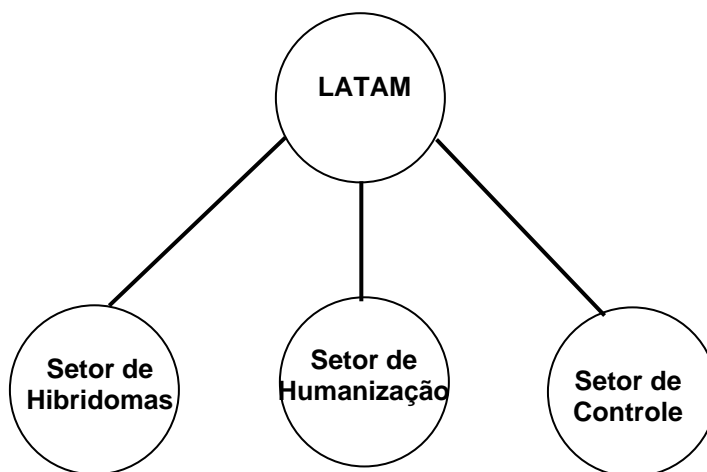


Figura 3.3 – Setores a serem criados com a reestruturação do LATAM.

As finalidades e atribuições desses três setores serão as seguintes:

a) Setor de Hibridomas – SEHIB:

Finalidade:

- produção de anticorpos monoclonais murinos provenientes de células secretoras a partir de antígenos específicos.

Atribuições:

- desenvolvimento de anticorpos monoclonais com aplicação em técnicas de diagnósticos;
- produção de fluido ascítico para atender a outros laboratórios da Unidade de Bio-Manguinhos e da Fiocruz;
- padronização de testes para análise e caracterização dos anticorpos;
- formação e manutenção de banco de hibridomas, fluido ascítico e sobrenadante de cultura celular.

b) Setor de Humanização de Anticorpos:

Finalidade:

- desenvolvimento de competência na área de manipulação e remodelagem de anticorpos executando técnicas de biologia molecular em áreas compartilhadas.

Atribuições:

- análise computacional;
- extração e purificação de ácidos nucleicos;
- amplificação de DNA;
- seqüenciamento de DNA.
- obtenção dos genes V - D - J;
- clonagem em vetor de expressão para *Pichia pastoris*;
- expressão e produção da proteína humanizada;
- ensaio biológico;
- clonagem dos genes em vetores de expressão em células de mamíferos – células de ovário de hamster chinês – CHO;
- transfecção de células em cultura;
- expressão, produção e purificação de proteína;
- avaliação dos resultados;

c) Setor de Controle de Produtos e Documentação:

Finalidade:

- controle das características do produto e documentação das etapas

Atribuições:

- execução de técnicas de análise de proteínas (ELISA, *Western-Blot*, imunofluorescência, eletroforese e *high pressure liquid chromatography* – HPLC, entre outras);
- organização dos dados obtidos, fichamento e documentação do processo através de protocolos;
- elaboração e atualização dos procedimentos operacionais padronizados.

3.1.2 Equipamentos Necessários para Aquisição

- potenciômetro
- cabines de fluxo laminar
- botijões para nitrogênio líquido
- centrífuga
- banho-maria
- biorreator
- computador
- *scanner*
- gravador de CD-Rom
- estufa de CO₂
- microscópio óptico invertido
- freezer –20°C
- freezer –70°C
- geladeiras
- bomba peristáltica simples
- espectrofotômetro para microplaca
- estufa 37°C
- agitadores orbitais
- balança analítica
- agitador magnético
- agitador de tubos
- micro-centrífuga
- microscópio para imunofluorescência
- sistema de eletroforese pra gel de agarose e poliacrilamida

Equipamentos para utilização compartilhada (uso conjunto com outros laboratórios):

- citômetro de fluxo
- termociclador (PCR)
- seqüenciador
- eletroporador
- sistema de cromatografia

3.2 Recursos Humanos – Parcerias e Colaborações

3.2.1 Recursos Humanos

A proposta de viabilizar a introdução da metodologia de humanização de anticorpos monoclonais em Bio-Manguinhos exigirá um significativo processo de reestruturação, não só física, com o redimensionamento das áreas comuns ao LATAM, como também, no que tange aos recursos humanos.

A contratação de profissionais da área de imunologia, engenharia química, biologia celular e molecular para integrar laboratório será imprescindível. Paralelamente, o atual grupo estará sendo treinado, buscando capacitação e qualificação nessa nova técnica de desenvolvimento de anticorpos.

A capacitação científica e tecnológica através da obtenção de conhecimentos básicos, assim como de novas tecnologias e produtos voltados para a humanização de anticorpos, serão fundamentais para a implementação prática desse estudo.

A composição atual do laboratório é a seguinte:

- 1 tecnologista sênior (em fase final de mestrado);
- 2 tecnologistas pleno (sendo 1 com doutorado e 1 com especialização);
- 1 técnico (com especialização);
- 1 biotecnologista (terceirizado com mestrado);

A composição profissional proposta para o laboratório deverá ser a seguinte (quadro atual inclusive):

- Para o processo de produção de anticorpos monoclonais murinos:

2 tecnologistas e 4 técnicos com especialização.

- Para o processo de humanização de anticorpos monoclonais:

1 tecnologista com doutorado, 1 biotecnologista com mestrado e 1 técnico.

- Para o processo de cultivo em sistemas de alta densidade:

2 tecnologistas graduados em engenharia química com mestrado e 2 técnicos.

- Para o processo de controle do produto:

1 tecnologista com especialização.

- Para o processo de documentação (protocolos, fichamentos, entre outros) e atualização dos procedimentos operacionais:

1 tecnologista e 1 técnico, ambos com especialização.

Em síntese, propõe-se a contratação para o laboratório de 4 tecnologistas e 7 técnicos.

3.2.2 Parcerias e Colaborações

A proposta desta dissertação caracteriza-se por ser uma tarefa multidisciplinar que, por tal, exige a interação com outros centros de pesquisa, através de acordos colaborativos e contratos sérios e eficientes.

A metodologia para se desenvolver em escala de produção anticorpos monoclonais humanizados em Bio-Manguinhos, envolve, essencialmente como critério primordial, a criação de competência nessa nova tecnologia, paralelamente à tentativa de saneamento de problemas pontuais que já estão sendo alvo de pesquisa clínica no Brasil, como por exemplo, o LNH.

Neste particular, estão se estabelecendo contratos com o envolvimento do LATAM. Bio-Manguinhos vem formalizando acordos de colaboração e contratos entre as partes competentes, com a participação de:

- **LATAM / INCA**

O INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER DO RIO DE JANEIRO) poderá contribuir para o fornecimento do antígeno CD 20. O objetivo é obter um anticorpo monoclonal murino anti-CD20 para uso terapêutico. Para isso é necessário obter um volume representativo de células B CD 20 positivas para imunizar o modelo animal (camundongos isogênicos da cepa BALB/c). É nesse sentido, ou seja, na obtenção de amostras clínicas de pacientes portadores de LNH, que buscamos efetivar esta colaboração. Esta etapa é necessária para que o LATAM produza os anticorpos monoclonais murinos contra este antígeno, a partir do fornecimento dessas amostras, aplicando metodologia própria, introduzida e adotada no laboratório há 22 anos. Além do suprimento de amostras clínicas caberá ao INCA a aplicação do anticorpo monoclonal humanizado anti-CD20 nas fases dos ensaios clínicos, auxílio na elaboração dos protocolos de imunização e fornecer dados que permitam a previsão de produção do referido anticorpo pela Unidade de Bio-Manguinhos.

- **LATAM / UnB**

A UnB – UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, através do seu Instituto de Imunologia Molecular, é um centro de referência em humanização de anticorpos no Brasil. A essa equipe, coordenada pelo Dr. Marcelo Brígido e pela Dra. Andréa Maranhão, caberá o processo de desenvolvimento de anticorpos humanizados a partir dos anticorpos monoclonais murinos desenvolvidos por Bio-Manguinhos. Como objetivo, estará sendo visado não só a sua utilização clínica, como também a formação de competência necessária para o domínio e implementação dessas tecnologias pela equipe de Bio-Manguinhos.

- **LATAM / UFRJ**

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ, através do Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares da COPPE (equipe da Dra. Leda Castilho) caberá proceder a expressão, assim como o desenvolvimento do processo de produção com alta densidade celular em biorreatores e de recuperação e purificação dos anticorpos humanizados, empregando como sistema de expressão as células de mamífero da linhagem CHO.

No Programa de Biofármacos – VDTEC/Bio-Manguinhos, alguns projetos estão em desenvolvimento e apresentam ênfase na utilização de áreas compartilhadas da Biologia Molecular, do Laboratório de Tecnologia Imunológica - LATIM, além do próprio LATAM e das centrais e áreas de interface como o Laboratório de Experimentação Animal – LAEAN e o Setor de Cultivo Celular. Logo, a estruturação física e organizacional dessas é extremamente importante para o bom andamento das atividades.

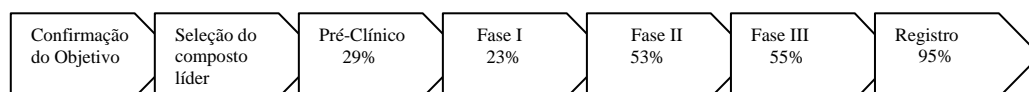
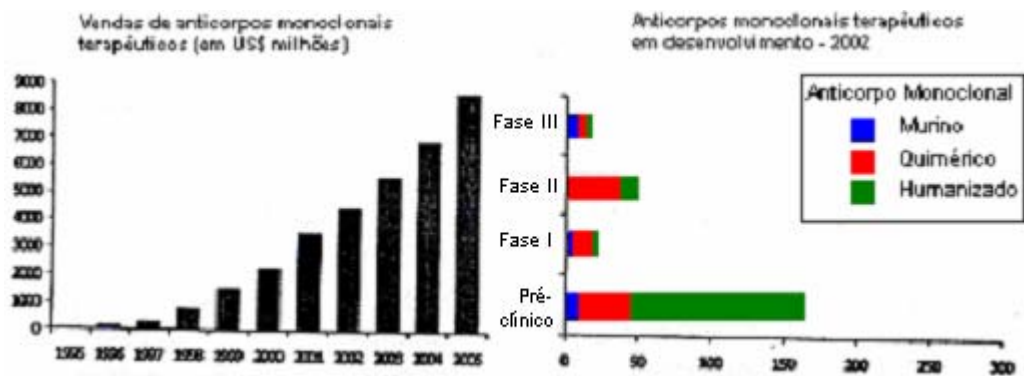
4 - MERCADO

A proposta do Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais de desenvolvimento de anticorpos humanizados anti-CD20 é extremamente viável, sob o ponto de vista de mercado. O produto existente disponível é quimérico e, com uso prolongado, gera reação imune no paciente. O LATAM produzindo este anticorpo humanizado possibilitará sensível redução dessa resposta imune, potencializando a aplicação do produto visando o mercado brasileiro.

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais recombinantes revolucionou a geração de anticorpos, abrindo acesso àqueles humanizados, que reconhecem uma grande variedade de antígenos, por permitir a construção de proteínas de fusão genética que conferem nova função ao sítio de ligação com o antígeno.

A importância dessa inovação biofarmacêutica no desenvolvimento de drogas cresce continuamente, oferecendo excelente e promissor mercado consumidor, capaz de absorver grandes produções, voltadas basicamente para a área médico-farmacêutica.

Como ponto de referência, temos que o valor dos produtos biofarmacêuticos no mercado mundial atingiu 41 bilhões de dólares em vendas no ano de 2003. Especificamente, o segmento que cabe aos anticorpos monoclonais no mercado global de bioterapêuticos está em torno de 5-6 bilhões de dólares, ou seja, em torno de 12-15% do mercado biofarmacêutico (Carius, 2004) (Fig.4.1).



Probabilidade de sucesso no desenvolvimento de anticorpos monoclonais.

Figura 4.1 – Crescimento do Mercado de Anticorpos Monoclonais em 2002.
Adaptação da Fonte: Carius, 2004.

Essa transição de aplicação dos anticorpos monoclonais para uso em técnicas de medicina diagnóstica sofisticadas e purificações específicas para terapêutica, é indicativa do sucesso alcançado. Espera-se que o mercado de anticorpos terapêuticos cresça cerca de duas vezes mais rápido que todo o setor farmacêutico. Aliado a este fato, seu mercado crescerá 25% acima das expectativas atuais que variam entre US\$ 100 e US\$ 125 bilhões (Carius, 2004).

Os únicos pontos que poderão afetar o crescimento desse setor são, principalmente, os conflitos de patente e propriedade intelectual, as questões de aprovação regulatória não resolvidas, produções para satisfazer a demanda da indústria farmacêutica, implicações da significativa redução de custos na produção e a ação de grupos opositores (Miller, 2003).

O mercado mundial para anticorpos terapêuticos encontra-se na casa dos bilhões de dólares. Nos EUA vários anticorpos já foram liberados pelo *Food and Drug Administration* - FDA, sendo cinco quiméricos (Remicade, Simulect, ReoPro, Rituxan, Erbitux), oito humanizados por transplante de CDR (Zenapax, Synagis, Herceptin, Mylortag, Campath, Avastin, Tysabri, Xolair), um humano (Humira) e oito murinos (Orthoclone, Panorex, Zevalin, Bexxar, Neutrospect, Verluma, e os para diagnóstico *in vivo* Myoscint, ProstaScint). Estes são alguns exemplos daqueles já aprovados para o uso terapêutico (Glennie & Johnson, 2000). Diversos outros estão

em fase de testes clínicos, conforme demonstrado na tabela 2.1 da Parte I desta dissertação.

Nos próximos anos, o mercado deverá ser invadido por essas imunoglobulinas de última geração. A perspectiva é de que a tecnologia de anticorpos recombinantes venha a fornecer insumos para diversas áreas da medicina, desde agentes imunomoduladores até vacinas recombinantes. Além disso, a tecnologia de humanização de anticorpos monoclonais se agrega a uma nova classe de medicamentos, os biofármacos. Estes, direcionados ao tratamento de doenças de significativa importância na medicina, como o câncer (no diagnóstico e tratamento de tumores e metástases), focos ocultos de infecção, infecções e condições clínicas diversas tais como sépsis, rejeição de transplantes, SIDA e doenças auto-imunes do sistema nervoso como a glomerulonefrite por IgA, púrpura trombocitopênica idiopática, doença de Graves, anemia hemolítica auto-imune, glomerulonefrite membranosa, artrite reumatóide, asma, lúpus eritematoso sistêmico, entre outras (Hon, 2004). Os anticorpos podem ser usados isoladamente, associados a agentes quimioterápicos ou a agentes radioativos na radioimunoterapia (Maranhão & Brígido, 2001).

Tanto as grandes indústrias farmacêuticas quanto os pequenos laboratórios da área da biotecnologia estão se envolvendo cada vez mais nesse próspero e promissor mercado, na medida em que aumenta a demanda para produtos terapêuticos e proteínas biofarmacêuticas. O aumento de escala dessa produção requer métodos eficientes de bioprocessos, como a utilização de biorreatores e sistemas de purificação eficientes que proporcionem alto rendimento.

O Mercado Global de Terapêutica do Câncer

O mercado total para a comercialização de anticorpos terapêuticos consiste em uma oportunidade multibilionária para as grandes indústrias. Somente o câncer e a artrite, suas maiores aplicações, têm estimativa de US\$ 15 e US\$ 25 bilhões para 2010, respectivamente (Roque, 2004).

A busca por um tratamento efetivo do câncer continua a ser uma das maiores prioridades das empresas farmacêuticas. Nenhuma outra área de pesquisa é comparável em termos de números de drogas em desenvolvimento. Em 2001, cerca de 1700 novos medicamentos candidatos para a terapia das diversas formas do câncer e novas indicações estavam em desenvolvimento, e o potencial do mercado é enorme, após o primeiro produto chegar ao comércio (Miller, 2003).

Portanto, o potencial econômico agregado a essa nova classe de drogas é extremamente vasto. A ampliação do conhecimento dos mecanismos íntimos das doenças, através da biologia molecular, aumenta o número de antígenos correspondentes a pontos cruciais na sua fisiopatogenia, tornando a possibilidade do desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais infindável. A sua utilização tornará cada vez mais eficiente o diagnóstico e tratamento de inúmeras doenças que acometem a humanidade.

A título de comparação, o governo brasileiro, através do INCA, arcou, de janeiro de 2002 a agosto de 2003, com despesas da ordem de US\$ 100 mil, no tratamento de pacientes portadores do Linfoma Não-Hodgkin (LNH), com aquisições do anticorpo monoclonal importado anti-CD20 (INCA, 2003). A intenção de Bio-Manguinhos é assumir esse segmento de mercado, hoje inteiramente sujeito à importação do produto.

A produção por Bio-Manguinhos dos anticorpos monoclonais humanizados em larga escala terá, com toda certeza, grande absorção no mercado nacional.

CONCLUSÃO

A utilização de fármacos à base de biomoléculas recombinantes vem se tornando uma realidade. O mercado mundial para anticorpos humanizados com fins terapêuticos está em franca ascendência, o que se traduz em forte indicativo de que o momento é propício a novos e consistentes investimentos nessa área. Nos próximos anos, é prevista uma disseminação dessas imunoglobulinas de última geração no mercado.

A partir do estudo realizado podem ser extraídas as seguintes e mais importantes conclusões:

1. O LATAM, que já possui o amplo domínio da técnica de produção de anticorpos monoclonais murinos e detendo uma grande diversidade de clones para antígenos específicos, após sua reestruturação, introduzirá a Unidade de Bio-Manguinhos em um crescente e promissor mercado de anticorpos terapêuticos, abrindo assim, a possibilidade de atuar em novas frentes de pesquisa, desenvolvimento e comercialização.

2. Com o domínio da tecnologia de humanização, será possível reduzir consideravelmente os gastos, não só das instituições nacionais da área de oncologia, como do próprio país, desonerando a balança comercial brasileira com a redução de gastos com a importação desses anticorpos e possibilitando o acesso a uma tecnologia de ponta.

3. Como impacto social imediato da produção brasileira de monoclonais humanizados, haverá a redução das taxas de mortalidade da população acometida por neoplasias, especialmente do tipo LNH – doença de difícil tratamento que acomete milhares de pessoas - e a elevação da expectativa e qualidade de vida, por meio de emprego de medicamentos de comprovada eficácia a um custo acessível.

4. A proposta de viabilizar a introdução da metodologia de humanização de anticorpos monoclonais em Bio-Manguinhos exigirá um significativo processo de reestruturação, não só física - com o redimensionamento das áreas

comuns ao LATAM - como também humana, sendo imprescindível a contratação e a qualificação de profissionais nas áreas de imunologia e biologia celular e molecular e engenharia.

5. O desenvolvimento, em escala de produção, de anticorpos monoclonais humanizados em Bio-Manguinhos, envolverá também parcerias e colaborações com outras instituições e centros de pesquisa, tanto por meio de acordos colaborativos quanto por contratos eficientes, qualificando, não só a equipe, como acrescentando conhecimento científico à Unidade.

Pelo exposto, a proposta idealizada nesta dissertação é extremamente viável. O anticorpo hoje disponível no mercado internacional é quimérico e, com o uso prolongado, gera reação imune no paciente. A produção do anticorpo humanizado no Brasil possibilitará, sem dúvida, sensível ou total redução da resposta imune, e potencializará a aplicação do produto, com a conquista do mercado nacional de anticorpos terapêuticos usados do Linfoma Não-Hodgkin (LNH).

Em matéria de humanização de anticorpos, idealizar, discutir, pesquisar, organizar, estruturar, empreender e efetivar, são metas a serem percorridas por Bio-Manguinhos a fim de que, no mais curto espaço de tempo, assuma uma posição de destaque no domínio dessa técnica.

Nesse particular, fica aqui parabenizada a iniciativa de criação do presente Mestrado Profissional que, empregando conhecimento acadêmico-científico e qualificação prática, tornou possível aos seus participantes a introdução de novas idéias, metodologias e sua concretização futura, em prol do crescimento da instituição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia Celular & Molecular**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda; 2000.

Anspach FB. **Recovery and Purification of Biopharmaceuticals** [Resumo constante na apostila do Curso Internacional Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures COPPE/UFRJ; 2004 jul 12 a 23, Rio de Janeiro, Brasil].

Augusto EFP, Oliveira MS. Processos com Células Animais. *In*: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, coord. **Biotecnologia Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda; 2001. v.3. cap. 24. p. 547-582.

Brígido MM. Anticorpos. *In*: ABTEC **Edital FINEP** [on line]. Brasil; 2004 [capturado em 27 out. 2004]. Disponível em: URL: <http://adenina.biomol.unb.br/~brigido/abtec/>

Brígido MM, Maranhão AQ. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Tecnologia Ciência e Desenvolvimento** 2002; 26: 44-51.

Caldas C, Coelho V, Kalil J, Moro AM, Maranhão AQ, Brígido MM. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. **Molecular Immunology** 2003; 39: 941-952.

Carius W. **Development & Production of Biopharmaceuticals – A 2004 Status Report** [Apresentação ao Seminário Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures COPPE/UFRJ; 2004 jul 12 a 23, Rio de Janeiro, Brasil].

Castilho LR. **Development of a dynamic filter for integrated perfusion cultivation and purification of recombinant proteins from mammalian cells**. Heidelberg: VDI-Verlag; 2001. Doutorado. [Biotechnik/Medizintechnik]. Fortschritt-Berichte.

Castilho LR. Processos de Produção de Anticorpos Monoclonais em Biorreatores; - **Disciplina de Híbridomas do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos**; - Laboratório de Engenharia de Cultivos Celulares – LECC – COPPE - UFRJ; junho 2004.

Castilho LR, Anspach FB, Deckwer WD. Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins. **Journal of Membrane Science** 2002; 207: 253-264.

Cavalcanti, JM. **Adaptação de Células CHO-K1 ao Cultivo em Suspensão em Meio Livre de Soro**. Rio de Janeiro; 2003. Monografia de Bacharelado [Microbiologia e Imunologia] - UFRJ.

Co MS, Queen C. Humanized antibodies for therapy. **Nature** 1991; 351: 501-502.

Cochlovius B, Kipriyanov S M, Stassar M, Christ O, Schuhmacher J, Strauss G, Moldenhauer G, Little M. Treatment of human B cell Lymphoma xenografts with a CD3 X CD19 diabody and T cells. **Journal of Immunology** 2000; 165: 888-895.

Corning [on line]. **Product Catalog** 2005. [capturado em 26 jan. 2005]. Disponível em: URL: <http://catalog.corning.com/lifesciences/category.aspx?p=Containers@@@2609®ion=NA&language=EN>

Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, LaQuaglia MP, Tolkoff-Rubin N, Rubin RH, Herrin JT, Russell PS. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation** 1981; 32: 535-539.

CTG Clinical Trials.gov. **Monoclonal Antibody Anti-CD20 in Systemic Lupus Erythematosus** [on line]. 2005. [Capturado em 10/01/2005]. Disponível em: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct/search;jsessionid=45F3F93E977465D9955198002A36B4C3?term=monoclonal+antibody+anti-CD20&submit=Search>

Ehrlich P. On Immunity with Special Reference to Cell Life. **Proceedings of the Royal Society of London**. 1900; 17 (66): 424-448.

FDA – Food and Drug Administration. **First Monoclonal Antibody Treatment for Multiple Sclerosis Approved** [on line] 2004 [capturado em 27 nov. 2004]. Disponível em: URL: <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01141.html>

FDA – Food and Drug Administration. **Therapeutic Biologicals Products Approvals** [on line] 2005 [capturado em 10 jan. 2005]. Disponível em: URL: http://www.fda.gov/cder/biologics/biologics_table.htm

Fiedler M, Skerra A. Use of thiophilic adsorption chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody Fab fragment without the need for an affinity tag. **Protein Expression and Purification** 1999; 17: 421-427.

Giovannini R, Freitag R. Isolation of a recombinant antibody from cell culture supernatant: continuous annular versus batch and expanded-bed chromatography. **Biotechnology and Bioengineering** 2001; 73: 522-529.

Glennie MJ, Johnson PWM. Clinical trials of antibody therapy. **Immunology Today** 2000; 21 (8): 403-412.

Gottschlich N, Kasche V. Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography. **Journal of Chromatography A** 1997; 765: 201-206.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics. **CA Cancer Journal for Clinicians** 2001; 51: 15-36

Harris M. Monoclonal Antibodies as Therapeutic Agents for Cancer. **The Lancet Oncology** 2004; 5 (5): 292-302.

Harrison S, Adamson S, Bonam D, Brodeur S, Charlebois T, Clancy B, Costigan R, Drapeau D, Hamilton M, Hanley K, Kelley B, Knight A, Leonard M, McCarthy M, Oakes P, Sterl K, Switzer M, Walsh R, Foster W. The Manufacturing Process for Recombinant Factor IX. **Seminars in Hematology** 1998; 35 (2) 2: 4-10.

Hauser H, Wagner R. **Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production**. 1st ed. Berlin: Walter de Gruyter & Co; 1997.

Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin Lymphoma: an update **The Lancet Oncology** 2004; 5 (6): 341-353.

Hoffmann F. **MabThera^R Rituximab** 2003. 3^a ed. Roche; Monografia.

Holliger P, Prospero T, Winter G. "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 1993; 90: 6444-6448

Holliger P, Winter G. Diabodies: small bispecific antibodies fragments. **Cancer Immunology and Immunotherapy** 1997; 45: 128-130.

HON – Health on Net. **Doenças Auto-Imunes** [on line] 2004 [capturado em 20 jun.2004] Disponível em: URL: http://129.195.254.71/cgi-bin/HONselect_pt?browse+C20.111

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Pesquisa sobre anticorpos monoclonais humanizados quiméricos CD-20 Rituximab**, Rio de Janeiro, 2003. Entrevista com Dra. Ilva Nolasco e Dr. Fernando Jardim realizada através da Assessoria de Gerência de Projetos – ASGEP, Bio-Manguinhos.

Janeway Jr CA, Travers P. **Imunobiologia – O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença**. 2^a ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda; 1997.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoorm A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer Statistics. **CA Cancer Journal for Clinicians** 2004; 54: 8–29. Disponível em: URL: American Cancer Society.

Kalyanpur M. Downstream Processing in the Biotechnology Industry. **Molecular Biotechnology** 2002; 22: 87-98.

Kaufman RJ, Wasley LC, Furie BC, Furie B, Shoemaker CB. Expression, Purification and Characterization of Recombinant γ -Carboxylated Factor IX Synthesized in Chinese Hamster Ovary Cells. **The Journal of Biological Chemistry** 1986; 261 (21): 9622-9628.

Kawagishi N, Satoh K, Enomoto Y, Akamatsu Y, Sekiguchi S, Fukumori T, Fujimori K, Satomi S. New Strategy for ABO-Incompatible Living Donor Liver Transplantation With Anti-CD20 Antibody (Rituximab) and Plasma Exchange. **Transplant Proceedings** 2005; 37(2):1205-6.

Kipriyanov S, Le Gall F. Generation and Production of Engineered Antibodies. **Molecular Biotechnology** 2004; 26: 39-60.

Köhler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** 1975; 256: 495-497.

Kratje R. **Modificaciones Post-Traduccionales**. [Apresentação ao Seminário Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures COPPE/UFRJ; 2004 jul 12 a 23, Rio de Janeiro, Brasil].

Krauss J. Recombinant Antibodies for the Diagnosis and Treatment of Cancer. **Molecular Biotechnology** 2003; 25: 1-17.

Kriangkum J, Xu B W, Gervais C, Paquette D, Jacobs F A, Martin L, Suresh M R. Development and characterization of a bispecific single-chain antibody directed against T cells and ovarian carcinoma. **Hybridoma** 2000; 19: 33-41.

Kuby J, Cameron J, Todd C, Mitchell J. **Kuby Imunologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda; 2002.

Lefranc MP, Lefranc G. Immunoglobulins and B cells. **IMGT - Immunogenetics** [online] 2005 [capturado em 06 jan 2005] Disponível em: URL: <http://imgt.cines.fr/textes/IMGTeducation/Tutorials/IGandBcells/PT/Genetica>

Lemes EMB. **Estudo da Influência de Diferentes Parâmetros no Processo Fermentativo para a Super-expressão de Proteínas Recombinantes em *Escherichia coli***. Rio de Janeiro, 1998. Doutorado [Tese em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz.

Lemes EMB. Expressão de Proteínas Heterólogas; - **Disciplina de Bacteriologia Aplicada à Produção de Vacinas e Insumos do Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos de Bio-Manguinhos**; - Laboratório de Tecnologia Recombinante – LATER – Bio-Manguinhos – FIOCRUZ; maio 2004.

Looney RJ. B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)** 2005; 44 Suppl 2:ii13-ii17.

Lubiniecky A. **Large-Scale Mammalian Cell Culture Technology**. 1st ed. New York: Marcel Dekker Inc;1990.

MacCallum RM, Martin ACR, Thornton JT. Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. **Journal of Molecular Biology** 1996; 262 (5): 732-745.

Mains RE, Cullen EI, May V, Eipper BA. The role of secretory granules in peptide biosynthesis. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1987; 493: 278-91.

Maranhão AQ, Brígido MM. Anticorpos Humanizados – Humanização de Anticorpos de Interesse Clínico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento** 2001; 23: 38-43.

Medronho R. **Equipamentos de Retenção Celular em Processos em Perfusão** [Apresentação ao Seminário Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures COPPE/UFRJ; 2004 jul 12 a 23, Rio de Janeiro, Brasil].

Miller G. Estudos mostram que setor farmacêutico biotecnológico está se fragmentando dentro da tendência atual. **Pharmaceutical Technology** 2003; 7 (3): 54-58.

Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA and HAHA) responses to monoclonal antibodies. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging** 2004; 48 (4): 251-257.

Morgan G, Vornamen M, Puitinen J, Naukkarinen A, Brincker H, Olsen J, Coeburgh JW, Vrints LW, Clayden D, McNally R, Jack a, Carli PM, Petrella T, Tomino R, D’Lollo S, Barchielli A, Cartwright R. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. Biomed Study Group. **Annals of Oncology** 1997; 8 (2): 49-54.

Morimoto A, Kuriyama K, Tsuji K, Isoda K, Hibi S, Todo S, Sugimoto T, Imashuku S. Use of rituximab to treat refractory Diamond-Blackfan anemia. **European Journal of Haematology** 2005; 74 (5):442-4.

Moro AM, Rodrigues MTA. Anticorpos Monoclonais para a Clínica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 2001; 22: 32-35.

New Brunswick. **Cell Culture Bioreactors – BioFlo 110** [on line] 2005 [capturado em 05 jan. 2005] Disponível em: URL: www.nbsc.com

Nobelpreis. **O Prêmio Nobel**. [on line] 2004 [capturado em 27 jul. 2004] Disponível em: URL: <http://www.nobelpreis.org/portugues>

Ritter G, Cohen LS, Williams JrC, Richards EC, Old LJ, Welt S. Serological Analysis of Human Anti-Human Antibody Responses in Colon Cancer Patients Treated with Repeated Doses of Humanized Monoclonal Antibody A33. **Cancer Research** 2001; 61: 6851-6859.

Roque ACA, Lowe CR, Taipa MA. Antibodies and Genetically Engineered Related Molecules: Production and Purification. **Biotechnology Progress** 2004; 20: 639-654.

Schmidell W, Facciotti MCR. Biorreatores e Processos Fermentativos. *In*: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W, coord. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda; 2001. vol.2. cap.8. p. 179 –192.

Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan ACJr. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. **Cancer Research** 1985; 45: 879-885.

Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO. Human Immune Response to Multiple Injections of Murine Monoclonal IgG. **The Journal of Immunology** 1985; 135; 2: 1530-1535.

Silva FH. **Expressão e Purificação de Proteínas de Interesse Biotecnológico**. [on line] Trabalho apresentado no 50º Congresso Brasileiro de Genética da UFSCar; 2004 [capturado em 08 jan. 2005]; São Carlos. Disponível em: URL: http://www.ufscar.br/~dge/Curso_expressao_SBG_2004_parte1.pdf

Silverton EW, Navia MA, Davies DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 1977; 74 (11): 5140-5144.

Stein R, Qu Z, Chen S, Rosario A, Shi V, Hayes M, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM. Characterization of a new humanized anti-CD20 monoclonal antibody, IMMU-106, and its use in combination with the humanized anti-CD22 antibody, epratuzumab, for the therapy of non-Hodgkin's lymphoma. **Clinical Cancer Research** 2004; 10 (8): 2868-78.

Systems Biology [on line]. **Enabling Technologies – Microbial Cell Dynamics Lab** 2005. [capturado em 26 jan 2005] Disponível em: URL: <http://www.sysbio.org/technologies/mcdl.stm>

Tedder TF, Engel P. B cell special – CD20: a regulator of cell-cycle progression of B-lymphocytes. **Immunology Today** 1994; 15 (9): 450-454.

Thommes J, Bader A, Halfar M, Karau A, Kula M. Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth using a protein A coated adsorbent in expanded beds. **Journal of Chromatography A** 1996; 752: 111-122.

Tonso A. **Monitoramento e Operação de Cultivos de Células Animais em Sistemas de Perfusão**. São Paulo, 2000. Doutorado [Tese em Engenharia Química] – Universidade de São Paulo.

Tonso A. **Monitoramento e Controle de Cultivos de Células Animais** [Apresentação ao Seminário Production of Biopharmaceuticals in Animal Cell Cultures COPPE/UFRJ; 2004 jul 12 a 23, Rio de Janeiro, Brasil].

UCG - Universidade Católica de Goiás [on line]. **Mecanismos de Ação dos Anticorpos** 2005. [capturado em 03 jan. 2005] Disponível em: URL: <http://www.ucg.br>

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais [on line]. **Estrutura, função e diversidade das imunoglobulinas** 2005. [capturado em 10 jan. 2005] Disponível em: URL: <http://www.icb.ufmg.br/~lbcd/grupo3/imunoglobulinas.html>

USP - Universidade de São Paulo [on line]. **O Anticorpo: Estrutura da Molécula de Imunoglobulina** 2004. [capturado em 28 jul. 2004] Disponível em: URL: <http://www.rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/t3.htm>

USP - Universidade de São Paulo [on line]. **Mecanismos Efetores dos Anticorpos** 2005. [capturado em 03 jan. 2005] Disponível em: URL: <http://www.rbi.fmrp.usp.br/imunobiol/aulas/t8.htm>

Vaughan TJ, Osbourn JK, Tempest PR. Human Antibodies by Design. **Nature Biotechnology** 1998; 16: 535-539.

Veliz RV. Alternative Techniques to Obtain Monoclonal Antibodies at a Small Scale: Current State and Future Goals. **Biotecnologia Aplicada** 2002; 19(3/4): 119–131.

Wang M, Lee L S, Nepomich A, Yang J, Conover C, Whitlow M, Filpula D. Single-chain Fv with manifold N-glycans as bifunctional scaffolds for immunomolecules. **Protein Engineering** 1998; 12: 1277-1283.

White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. **Nature** 2003; 422 (6927): 80-3.

Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. **Nature** 1991; 349: 293-299.

Zuo Z, Jimenez X, Witte L, Zhu Z. An efficient route to the production of an IgG-like bispecific antibody. **Protein Engineering** 2000; 13: 361-367.