



Anticorpos monoclonais para a CLÍNICA

Ana Maria Moro

Pesquisador Científico, PhD em Genética
anamoro@usp.br

Maria Teresa Alves Rodrigues

Pesquisador Científico, PhD em Farmácia
Centro de Biotecnologia, Instituto
Butantan

Reagentes específicos controlam a rejeição de transplantes

“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”. O trabalho¹ no qual foram baseadas essas palavras deram a C. Milstein e G. Köhler o Prêmio Nobel de Medicina, em 1984, e significou um salto no desenvolvimento das mais diversas áreas das ciências biológicas. Qualquer estrutura molecular capaz de ativar linfócitos B pode ser usada para a geração de hibridomas, por uma metodologia original básica muito simples na sua concepção, ainda que laboriosa. Animais, principalmente camundongos, são imunizados com a molécula ou célula ou microorganismo de interesse. Quando o teste específico do soro do animal imunizado torna-se positivo, as células do baço são retiradas e fusionadas com células de mieloma, o que lhes confere imortalidade. Cultivados em meio de cultura seletivo em clonagens subsequentes os hibridomas são analisados em relação ao anticorpo que produzem, garantindo especificidade. A metodologia dos anticorpos monoclonais (geralmente denominados MAb, monoclonal antibody), inicialmente praticada por imunologistas, tornou-se rapidamente um instrumento essencial para pesquisadores de várias disciplinas. Foi extremamente importante para a compreensão de respostas imunes, como a diversidade de anticorpos, respostas primária e secundária, hipermutação somática. Permitiu respostas específicas ao reconhecer um epítipo único. A imunização com células do sistema imune resultou em anticorpos monoclonais que possibilitaram um avanço rápido no conhecimento e na diferenciação de células através dos CDs (clusters of differentiation) presentes na superfície das células², que representam a sinalização entre elas e o funcionamento harmônico do sistema imune. Assim foram identificadas as sub-populações de linfócitos T, CD4 e CD8. Em 2000, o número de CDs identificados chegou a 166. Muitas perguntas foram respondidas na identificação de quais células participam de determinados fenômenos biológicos.

Além do impacto óbvio que o uso de anticorpos monoclonais exerce na geração de conhecimento, a obtenção de hibridomas secretando anticorpos monoclonais com alta especificidade e afinidade revolucionou a área de diagnóstico, ao permitir a diferenciação entre patógenos, tarefa impossível para os soros policlonais, em função da reatividade cruzada causada por antígenos comuns dominantes. O uso de padrões conhecidos possibilita a quantificação, importante no caso da dosagem de hormônios e marcadores celulares, cuja

frequência delimita o estado patológico, por exemplo, câncer.

Estado da Arte

Na década de 80, vislumbrou-se o potencial de ferramenta única dos anticorpos monoclonais como imunobiológicos (reagentes que interferem no sistema imune) para uso terapêutico. Logo após, o FDA aprovou o MAb OKT3 (anti-CD3) para reversão de rejeição de transplante³, tendo o seu uso, ao longo do tempo, comprovado a eficácia do produto. A aprovação do OKT3 deu início a uma grande expectativa para o uso clínico de MAb. Com potencial de utilização *in vivo* - mapeamento de tumores, tratamento de câncer, doenças infecciosas, doenças auto-imunes, inflamação, “overdose” de medicamentos, vacinas, seguiu-se o modelo dos MAb murinos para os testes clínicos iniciais, infelizmente com resultados não aceitáveis. Alguns anos se passaram sem que nenhum outro MAb fosse aprovado para uso clínico. Durante esses anos, paralelamente, houve avanço no desenvolvimento de tecnologias para cultivo de hibridomas em larga escala *in vitro* e do processamento “downstream” com finalidade de purificação dos MAb.

A restrição ao sucesso de MAb terapêuticos foi causada pelo fenômeno da imunogenicidade. O método clássico de geração de hibridomas em camundongos pode levar à temida resposta HAMA (human anti-mouse antibodies). O anti-CD3, usado para reversão da rejeição de enxerto, permaneceu, durante vários anos, isoladamente como um MAb de sucesso. O fato é que, por ser utilizado por poucos dias, o suficiente para permitir a aceitação do transplante, não chega a dar tempo para o sistema imune montar uma resposta que neutralize o MAb. Mesmo com o

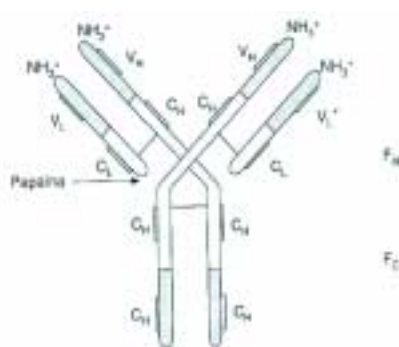


Fig 1. Representação da estrutura da molécula da imunoglobulina G.

V = região variável contendo 3 seqüências CDR,
C = região constante,
L = cadeia leve,
H = cadeia pesada.
Na região Fc encontram-se os sítios para glicosilação

fracasso dos MAb que se seguiram ao OKT3, a capacidade efetora do uso desses reagentes já estava demonstrada. A solução foi fazer MAb “mais humanos”.

As tentativas iniciais de gerar MAb completamente humanos por imortalização de linfócitos B fracassaram, por várias razões. Até hoje não existe uma célula parceira humana para fusão com os linfócitos, B, o mais próximo a que se chegou são heteromielomas murino-humanos. Para resolver o problema de imortalização dos linfócitos seguiu-se um grande volume de trabalho com a infecção por vírus EBV, porém a esperada estabilidade dos clones não foi alcançada. Outro obstáculo é a limitação da imunização em humanos. Podem ser utilizadas metodologias bastante sofisticadas para a obtenção de melhores MAb, como a identificação de peptídeos que se ligam ao MHC II, mas a injeção do antígeno é necessária.

Atualmente é possível obter MAb humanos utilizando a metodologia clássica de geração de hibridomas por imunização de camundongos transgênicos, nos quais os genes das imunoglobulinas originais foram depletados e substituídos pelos correspondentes humanos ou ainda pela utilização de camundongos SCID (severe combined immunodeficiency)^{4,5}.

Existem bibliotecas de seqüências gênicas para anticorpos humanos que podem ser ensaiadas contra qualquer antígeno. Em conjunto com a tecnologia de “anticorpos exibidos sobre superfície de fagos filamentosos” (Phage Antibody Display) é possível gerar fragmentos de anticorpos humanos (ScFv) a partir do repertório natural dos anticorpos, sem imunização⁶. O potencial de utilização desses fragmentos na clínica é pequeno, já que mantêm somente a propriedade de se ligarem ao epítipo, mas são instáveis, não existe ação imune efetora sem região Fc, nem sítios disponíveis para glicosilação. Essa tecnologia pode gerar anticorpos com altíssima afinidade, podendo ser utilizadas, por exemplo, como sondas radioativas para delimitação de tumores, quando marcados com elemento radioativo. Outro uso seria a ligação em resinas, criando assim colunas de imunoafinidade para purificação cromatográfica dos respectivos ligantes. Nesse caso, uma afinidade muito alta tem o inconveniente de exigir condições drásticas para a eluição, podendo danificar o ligante.

Uma alternativa válida para a gera-

ção de MAb com boa especificidade para uso clínico e passível de produção em larga escala foi obtida através da tecnologia de DNA recombinante, gerando anticorpos humanizados^{7,8}. Através dessa metodologia, o DNA de anticorpos, originalmente murinos gerados pela tecnologia de hibridomas, é reconstruído geneticamente pela substituição das regiões constantes e do arcabouço dos sítios CDR por correspondentes de origem humana. Somente os sítios CDR (complementary determining region), responsáveis pela ligação são



Fig 2. Biorreator de fibras ocas: acima, com todos os acessórios; abaixo, destacando os cartuchos de fibras ocas (esquerda) e de trocas gasosas (direita), após um mês de cultivo. Note a massa celular ao redor das fibras

mantidos na sua origem murina, selecionados pela sua especificidade de ligação com determinado epítipo. Bactérias não podem ser veículo de produção de MAb humanizados, pela complexidade da estrutura de imunoglobulinas (Fig. 1) e pela incapacidade de promover as modificações secundárias apropriadamente executadas pelas células de mamíferos.

Vacas e cabras como modelos de animais transgênicos oferecem, para a produção de MAb recombinantes, a vantagem da síntese, no leite, de proteínas com as funções apropriadas. O leite é um material biológico complexo, que contém gordura, lactose, anticorpos do animal de origem, contaminantes como

células somáticas, bactérias e vírus, uma variedade de outras proteínas, vitaminas e minerais, complicando o processamento *downstream*, bem como sua validação, essencial para a aprovação de um produto biológico para uso clínico. Existe ainda muita cautela na aprovação de produtos de animais transgênicos, ainda que o leite seja isento de príons.

Plantas transgênicas apareceram como outra promessa de produção de MAb terapêuticos⁹. Plantas como soja e milho oferecem a vantagem de grande concentração de proteína na semente, geralmente estável, em condições ambientais, por longos períodos. Conquanto imunoglobulinas produzidas em plantas sejam indistinguíveis eletroforeticamente das produzidas em cultivo de células de mamíferos, o padrão de glicosilação é diverso. A adição de glicanas entre as modificações secundárias limita o uso terapêutico desses produtos, podendo induzir imunogenicidade. Por enquanto, um exemplo de potencial sucesso para MAb produzido em planta de tabaco é a inclusão, em dentífrico, de um MAb contra *S. mutans*, o mais importante agente da cárie dentária. Não sendo injetado, não há risco. Contudo, o assunto de plantas transgênicas é bastante controverso, por motivos ambientais.

Por todas essas razões, a metodologia com maior chance de sucesso clínico em vários aspectos continua sendo a transfecção de anticorpos humanizados em células de mamíferos como CHO (chinese hamster ovary) ou o próprio mieloma utilizado para a geração de hibridomas. Existem 179 MAb em várias fases de testes clínicos nos EUA¹⁰; a grande maioria contra câncer. Recentemente foram aprovados seis novos MAb para uso clínico, nenhum produzido fora do sistema de cultivo de células. Um deles, para o tratamento de linfoma não-Hodgkins é do tipo quimérico, região constante humana e região variável murina. Existem ainda vários MAb murinos em fase III de ensaio clínico.

Transplante de Órgãos

Nosso intento é produzir MABs com demanda clínica, estabelecida ou potencial. Os disponíveis são anti-CD3, anti-CD18 e anti-CD4.

O MAb murino anti-CD3 permanece um produto de especial importância, devido à demanda clínica e a seu estabelecido efeito terapêutico na reversão

da rejeição aguda de transplantes. O anti-CD3 liga-se ao receptor CD3 de linfócitos T, células responsáveis pela rejeição celular aguda de transplantes. Como consequência, os linfócitos T CD3⁺ são retirados de circulação pelo período de administração da droga, permitindo a aceitação do enxerto. Seu uso é extremamente eficiente, permitindo salvar transplantes e vidas. A importância imune do anti-CD3 levou a várias construções de monoclonais biespecíficos utilizando anti-CD3 em um dos Fab e um anti-marcador tumoral no outro. O anticorpo resultante pode atuar como ativador da resposta imune para citotoxicidade dirigida às células tumorais¹¹.

O MAb anti-CD18 apresenta amplo espectro de atuação na inibição da adesão entre células e todos os processos inflamatórios decorrentes. A molécula CD18 é uma subunidade comum a três importantes integrinas leucocitárias (LFA-1, Mac-1 e p150.95) presentes em vários tipos de leucócitos. Os ligantes são ICAM-1 (CD54), ICAM-2, ICAM-3, C3bi, fator X, fibrinogênio. O ICAM-1 é o mais estudado, sendo expresso de forma basal em monócitos e células endoteliais e induzida em linfócitos T e B, timócitos, células dendríticas, fibroblastos, queratinócitos, condrócitos e células epiteliais. O bloqueio do CD18 pelo seu MAb tem influência direta na mediação de respostas imunes e inflamatórias. Existe uma vasta literatura sobre o potencial uso em processos de reversão de rejeição de transplantes e vários aspectos da inflamação.

O MAb anti-CD4 também tem uso potencial no controle da rejeição de transplantes. Apesar da utilização ser ainda incipiente, merece atenção o potencial do anti-CD4 em induzir tolerância, evitando a dependência dos pacientes transplantados a drogas imunossupressoras por toda a vida, além da aplicação em doenças auto-imunes.

Upstream e Downstream

O escalonamento de produção de proteínas terapêuticas requer métodos eficientes de bioprocessamento. A produção de MAb para uso clínico envolve vários aspectos como sistemas biológicos de produção, procedimentos de purificação, controle de qualidade e adesão às boas práticas de manufatura (cGMP). O desafio é integrar interfaces como otimização biológica e de bioengenharia. Alguns clones são muito mais



Fig 3. Dorna do biorreator “airlift” com configuração de leito empacotado. Cultivo em meio livre de soro aos 30 dias

produtivos que outros, por razões desconhecidas, fazendo com que o mesmo processo de cultivo não possa ser generalizado. Uma metodologia mais simplificada e atraente como fed-batch (batelada alimentada) pode ser utilizada com sucesso em um caso e interferir na qualidade do produto em outro. A aná-



Fig 4. Coluna industrial com resina de troca iônica para o processamento de anticorpos monoclonais. Atrás, a torre de comando

lise das moléculas de anticorpo coletadas durante um cultivo em fed-batch mostra variabilidade na composição glicosídica¹², fato importante na função imune efetora. A depleção de nutrientes acelera o fenômeno de apoptose, diminuindo o rendimento, além de aumentar o conteúdo de DNA residual¹³.

Buscando homogeneidade, nós investimos em processos de cultivo com perfusão contínua do meio de cultura. Os cultivos são de longa duração, até três meses, realizados em dois tipos de biorreatores “airlift” com configuração de leito empacotado e de fibras ocas, sempre em alta densidade. Através da perfusão contínua, um certo volume do meio de cultura fresco é adicionado ao biorreator e o mesmo volume de meio metabolizado é retirado. Mantém-se, dessa forma, um microambiente sempre renovado em relação aos nutrientes, caracterizando homogeneidade. A velocidade de perfusão é programada pelo controle do consumo de glicose e glutamina e pela produção de catabólitos como lactato e amônia, variáveis medidas externamente por reações bioquímicas de amostras retiradas diariamente. Parâmetros como pH, oxigênio dissolvido e temperatura são monitorados em linha por sensores acoplados ao sistema. Uma série de bombas permite controlar as taxas de perfusão e adição de componentes ou gases, como gás carbônico ou mistura oxigênio/nitrogênio.

No biorreator tipo “airlift” (Fig.2) a dorna de 3 litros é preenchida com pequenos cilindros ocas de vidros¹⁴, de forma que aumente a área de deposição dos hibridomas e permita alta densidade celular. O meio metabolizado, contendo os anticorpos monoclonais e contaminantes derivados do metabolismo celular e, principalmente, do soro fetal adicionado ao meio de cultura, acumula-se em grandes volumes, 2 a 3 vezes o volume da dorna/dia.

No biorreator de fibras ocas (Fig.3), o anticorpo produzido é concentrado durante a produção. Nesse sistema, há dois espaços bem definidos, divididos por uma membrana ultrafiltrante que mantém as células e as moléculas de anticorpo separadas do meio circulante. Um cassete contendo numerosas fibras ocas mimetiza um tecido com as células densamente empacotadas no espaço extracapilar, banhadas continuamente pelo meio de cultura ultrafiltrado e provido de oxigênio dissolvido, à seme-



Fig 5. Coluna de afinidade com proteína A para purificação de anticorpos monoclonais

lança dos capilares do sangue. Como resultado, o anticorpo produzido encontra-se concentrado num pequeno volume. Essa diferença básica diferencia o processamento “downstream”.

No caso de cultivo em biorreator “airlift”, o anticorpo encontra-se diluído em grandes volumes, necessitando de uma etapa de concentração, para a qual utilizamos uma coluna industrial com resina de troca catiônica (Fig.4) antes de ser submetido à purificação por cromatografia de afinidade em proteína-A (Fig.5). O sobrenadante do biorreator de fibras ocas pode ser cromatografado diretamente por afinidade. Os diversos clones de anticorpos monoclonais têm características diferentes quanto à taxa de secreção de anticorpos e dependência de soro fetal bovino. Essas características, mais o isotipo e o ponto isoelétrico do anticorpo sintetizado requerem o desenvolvimento praticamente individual de cada etapa do processamento, pelas diferenças no conteúdo de outras proteínas contaminantes e pelo diferente grau de ligação com as resinas utilizadas para purificação.

Experiência Brasileira

Adquirimos competência em produzir monoclonais em condições de

boas práticas de manufatura (cGMP). Após o inóculo, o cultivo é acompanhado no metabolismo celular por meio de testes bioquímicos, além da dosagem do anticorpo produzido, por ELISA. Uma das tendências referentes à segurança de produtos biológicos é a redução ou eliminação de componentes de origem animal em qualquer etapa da fabricação. Quando cultivados em meio de cultura com soro fetal bovino (FCS), reduzimos o seu teor paulatinamente, dependendo da linha do hibridoma. O MAb anti-CD3 é cultivado em meio livre de soro, e derivamos um clone estável nessas condições¹⁴.

Para o controle de qualidade, seguimos as normas preconizadas pelas autoridades competentes. O grau de pureza é avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida (reduzido e não reduzido), com coloração por prata e isoeletrofocalização, seguido de análise densitométrica. Os produtos são também analisados por filtração em gel em HPLC, para verificação de contaminantes e polímeros. São realizados ensaios de especificidade e potência em citometria de fluxo contra células humanas (Lab. Imunologia de Transplantes, INCOR, SP). A presença de DNA residual nos produtos é verificada pelo uso de sondas construídas com regiões do DNA total do hibridoma. A ausência de vírus adventícios, eventualmente contaminantes das células, é assegurada por testes *in vitro*, através do efeito citopático em células marcadoras. Testes *in vivo* em cobaias e camundongos são realizados para avaliar toxicidade.

O Prof. Marcelo Brígido, Universidade de Brasília, é colaborador responsável pela humanização dos MAb anti-CD3 e anti-CD18¹⁵. O Prof. Jorge Kalil, INCOR, SP, é nosso parceiro nos testes clínicos. Vários lotes de anti-CD3 produzidos foram testados clinicamente, com eficácia, na reversão e profilaxia de rejeição de transplantes de órgãos.

Referências

1. Köhler G & C Milstein (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 256:495-497.
2. Bernard A et al (1984). **Leukocyte Typing**, Springer-Verlag, Berlin, pp.1-814.
3. Cosimi AB et al (1981). Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Trans-**

plantation, 32: 535-539.

4. Mendez MJ et al (1997). Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. **Nat. Genet.**, 15: 146-156.

5. Little M et al (2000). Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology Today**, 21: 364-370.

6. Soderlind E et al (2001). The immune diversity in a test tube-non-immunised antibody libraries and functional variability in defined protein scaffolds. **Comb.Chem.High Throughput Screen**, 4: 409-416.

7. Co MS & C Queen (1991). Humanized antibodies for therapy. **Nature**, 351: 501-502.

8. Hooliger P & H Hoogenboom (1998). Antibodies come back from the brink. **Nature Biotechnol.**, 16: 1015-1016.

9. Larrick JW et al (1998). Production of antibodies in transgenic plants. **Res. Immunol.**, 149: 603-608.

10. <http://clinicaltrials.gov>

11. Davico-Bonino L; DeMonte LB, Spagnoli GC, Vola R, Mariani M, Barone D, Moro AM, Riva P, Nicotra MR, Natali PG & Malavasi F (1995). Bispecific monoclonal antibody anti-CD3 x anti-tenascin: an immunotherapeutic agent for human glioma. **Int. J. Cancer**, 61:1-7.

12. Bibila TA & DK Robinson (1995). In pursuit of the optimal fed-batch process for monoclonal antibody production. **Biotechnol Prog.**, 11:1-13.

13. Rodrigues MTA, Raw I & Moro AM (1996). Residual DNA content of hybridoma cultures: occurrence of apoptosis? In: Carrondo MTJ, Griffiths JB and Moreira JL (eds.) **Animal Cell Technology: From vaccines to genetic medicine**. Kluwer Academic Press, The Netherlands, ISBN 0-7923-4321-2: 467-472.

14. Moro AM, Rodrigues MTA, Gouveia MN, Silvestri MLS, Kalil JE & Raw I (1994). Multiparametric analyses of hybridoma growth on glass cylinders in a packed-bed bioreactor with internal aeration. Serum-supplemented and serum-free media comparison for MAb production. **J. Immunol. Meth.**, 176:67-77

15. Caldas CA, Coelho VPCV, Ridgen DJ, Neschich G, Moro AM & Brígido MM. (2000). Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single chain Fv against the CD18 surface antigen. **Protein Engineering**, 13:353-360.