



ANTICORPOS HUMANIZADOS

Andréa Queiroz Maranhão
Profª. Dra. em Biologia Molecular-UnB

Marcelo de Macedo Brígido
Prof. Dr. em Bioquímica – UnB
brigido@umb.br

Fotos cedidas pelos autores

Humanização de anticorpos de interesse clínico

O sistema imune dos vertebrados é especializado no reconhecimento de substâncias e organismos estranhos e na sua posterior eliminação. Desse processo participam diversos tipos celulares e moléculas, e, dentre essas últimas, destacam-se os anticorpos ou imunoglobulinas, principais protagonistas da resposta imune humoral. A formação de imunoglobulinas em resposta a um patógeno ou a uma toxina culmina com a produção de moléculas de alta afinidade, com grande capacidade de distinção entre espécies moleculares semelhantes. Essa característica das imunoglobulinas e a possibilidade de se produzirem anticorpos específicos contra antígenos humanos em animais imunizados, levou à proposição de que essas moléculas poderiam ser utilizadas como fármacos, ou ainda para dirigir fármacos a locais específicos do corpo de pacientes.

Tal proposição ganhou força com a descoberta de Milstein e Köhler acerca do processo de produção de anticorpos monoclonais¹, o que gerou uma grande expectativa por parte da comunidade científica e da mídia. Esse processo envolve a imortalização de células produtoras de anticorpos (oriundas do animal imunizado) por fusão com células tumorais. Com essa tecnologia, que data de 26 anos, partiu-se para uma idéia de que os anticorpos monoclonais poderiam funcionar como balas mágicas, devido à sua especificidade por um dado antígeno, podendo alcançar específica e eficientemente um único tecido ou tipo celular. Esperava-se que, em pouco tempo, os anticorpos monoclonais chegassem à clínica médica como solução para diversos males, expectativa essa que foi exacerbada em 1982, quando um anticorpo anti-idióti-

po mostrou-se eficiente no tratamento de certo tipo de linfoma². Esse período foi marcado por um investimento maciço por parte de empresas farmacêuticas. Esse entusiasmo inicial deu espaço a uma fase de ceticismo, quando nenhum outro anticorpo testado apresentava resultados clínicos significativos. Ao contrário, observava-se que alguns anticorpos podiam ser muito tóxicos, colocando em cheque a sua viabilidade clínica. Até o ano de 1994, apenas três anticorpos haviam sido aprovados para uso clínico, o Orthoclón, o Panorex e o ReoPro. Foi também na primeira metade da década de 90 que o quadro voltou a ser favorável aos anticorpos monoclonais. Dois fatores foram fun-

damentais nessa mudança de rumo: primeiro, foram obtidos resultados clínicos consistentes para diversos anticorpos monoclonais; o segundo fator foi o aparecimento dos anticorpos recombinantes humanizados³, que prometiam, com a chancela da engenharia genética, revolucionar o cenário de aplicação dos anticorpos monoclonais com uma nova especialidade de pesquisa em Biologia Molecular, a Engenharia de Anticorpos. A flexibilidade na manipulação genética de seu arcabouço peptídico e o acúmulo de informações sobre sua estrutura e função, fez das imunoglobulinas um produto de alto valor econômico e com grandes perspectivas biotecnológicas.

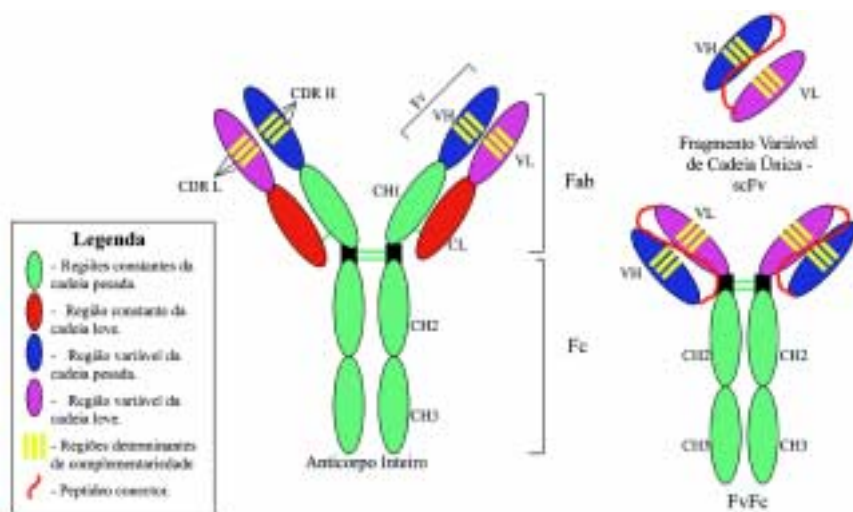


Figura 1.- Representação esquemática da molécula de anticorpo e seus principais fragmentos. Os fragmentos Fab e o Fc derivados da molécula inteira de imunoglobulina podem ser obtidos por clivagem proteolítica. Os fragmentos recombinantes scFv e o FvFc apresentam um peptídeo conector flexível (linha vermelha) unido o carboxi-terminal da cadeia variável pesada com o amino-terminal da cadeia variável leve e são obtidos por manipulação genética dos genes de imunoglobulinas. Ressalta-se o caráter dimérico do fragmento FvFc, apresentando dois sítios de reconhecimento antigênico, como na molécula inteira

Aspectos Estruturais dos Anticorpos

Os anticorpos são proteínas de elevada massa molecular encontrados em abundância no soro de animais vertebrados. A molécula de imunoglobulina (figura 1) é de natureza tetramérica e pode ser caracteristicamente separada em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Essas moléculas são responsáveis pelo reconhecimento de determinantes antigênicos das substâncias/invasores exógenos e também pela ativação de sistemas efetores celulares, que, em última instância, os eliminam. Devido às funções que desempenham, essas moléculas apresentam uma ambigüidade estrutural: por um lado, sua extremidade N-terminal (Fab – fração ligante ao antígeno) apresenta uma variabilidade superficial capaz de interagir com moléculas dos mais variados tipos, enquanto que a porção carboxi-terminal (Fc-fração cristalizável) deve ser reconhecida por células efetoras do sistema imune, o que pressupõe uma certa constância estrutural⁴. É essa região (Fc) que se liga aos receptores de membrana citoplasmática de macrófagos, linfócitos e outras células efetoras, invocando a resposta imune a partir do reconhecimento do antígeno, o “corpo estranho”. A contribuição de cada uma das cadeias nessas funções é desigual, pois, enquanto a porção ligante ao antígeno (Fv – região formada pelos domínios variáveis de ambas as cadeias) é formada pelo domínio amino-terminal de ambas as cadeias, o Fc é formado unicamente pela cadeia pesada.

As imunoglobulinas são, provavelmente, as moléculas mais bem estudadas em nível de estrutura tridimensional.⁵ O acúmulo de informação estrutural facilita a compreensão do funcionamento da molécula e permite estabelecer critérios para manipulação racional. Modelos tridimensionais explicam, por exemplo, como a variabilidade encontrada no amino-terminal da imunoglobulina, co-existe com uma estrutura espacial bastante conservada em todas as Fv que foram estudadas por difração de raios-X. O domínio variável apresenta uma estrutura estendida alternada com alças (“loops”). Seis dessas alças (três em cada cadeia) projetam-se para o solvente e participam com quase a totalidade dos pontos de

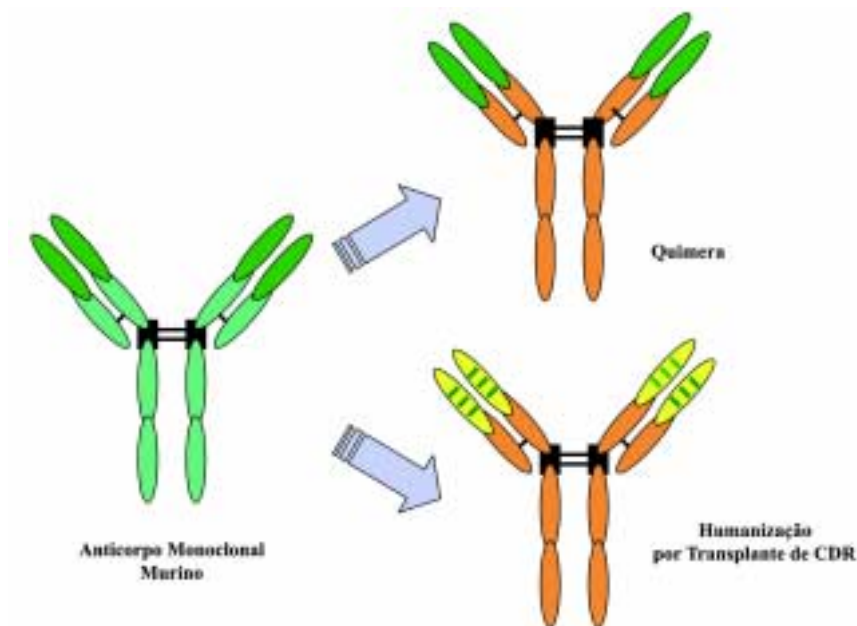


Figura 2 – Esquemática de processos de humanização de imunoglobulinas. Um anticorpo monoclonal murino (em verde) apresenta limitações quanto ao seu uso repetitivo como fármaco, devido à resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*). As primeiras tentativas de minimizar este potencial imunogênico foram feitas por meio da fusão das cadeias variáveis leve e pesada do anticorpo de camundongo (em verde escuro), com as cadeias constantes humanas (em laranja), formando moléculas quimeras. Estas moléculas eram ainda imunogênicas, assim os protocolos mais modernos de humanização preconizam o transplante das CDR murinas (linhas verdes) para cadeias variáveis humanas (em amarelo). Esta molécula teria ainda as cadeias constantes de imunoglobulinas humanas como na quimera e se apresenta de forma suficientemente invisível para o sistema imune

contato, com o antígeno. Essas alças co-localizam-se com as regiões determinantes de complementariedade (CDR), onde está concentrada a diversidade entre as moléculas de imunoglobulinas⁶. É nessa região que está localizado o paratopo, região complementar ao determinante antigênico (epitopo), responsável pela formação do complexo antígeno-anticorpo.

Os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de um único clone de linfócito B imortalizado. Durante a resposta imune humoral, cada clone de linfócito B produz um único tipo de molécula reativa a uma única estrutura química. Devido a isso, cada anticorpo apresenta uma única especificidade, ou seja, reage com um único tipo de molécula (antígeno). Por outro lado, durante a evolução da resposta imune, são selecionados clones cada vez mais afins por seu antígeno; dessa forma, anticorpos obtidos de animais hiperimunizados são ditos de alta afinidade, ligando-se fortemente ao antígeno e

difícilmente soltando-o. Isso permite que um anticorpo reconheça e reaja com o antígeno mesmo que esse se encontre diluído em uma mistura complexa. São essas as características que tornam o anticorpo um reagente de escolha para detecção de quantidades ínfimas de antígeno dentro de um organismo.

Imunoglobulinas como Medicamentos

O interesse biotecnológico pelas imunoglobulinas é secular. A utilização de anticorpos para neutralizar toxinas, proposto por Behringer, gerou uma grande revolução no pensamento científico no final do século XIX. No Brasil, o pioneiro na utilização de soros foi Vital Brasil. Com ele surgiram fazendas para produção de soro anti-ofídico e contra outros venenos de animais peçonhentos, o que fez do Brasil uma referência nessa área. A segunda geração de anticorpos veio com o advento

dos anticorpos monoclonais, em 1975, o que gerou uma grande perspectiva na comunidade científica devido à possibilidade de criação de reagentes específicos, reativos a diferentes antígenos e com possibilidade, portanto, de resolver problemas, antes de difícil solução, como o ataque a células cancerígenas, a minimização da rejeição a enxertos, entre outros. Diferentemente do soro imune, o anticorpo monoclonal consiste em uma preparação homogênea, mono-específica, que pode reconhecer um único e específico alvo dentro do organismo do paciente. Os anticorpos monoclonais são hoje uma realidade sendo utilizados para diversos fins: como moduladores da rejeição em pacientes transplantados, para o mapeamento de tumores, desintoxicação por drogas ou mesmo na imunização preventiva.

Apesar do amplo potencial de aplicação dos anticorpos monoclonais, a utilização extensiva é limitada pela sua alta toxicidade. Os anticorpos monoclonais são proteínas normalmente produzidas em laboratório a partir de células de camundongos ou ratos, e quando injetados em pacientes humanos acaba gerando uma resposta imune contra a proteína estranha ao organismo. Os anticorpos são reconhecidos como corpos estranhos e podem gerar uma forte reação imune adversa. Esse problema inviabiliza a utilização dos anticorpos de uma forma repetitiva. A produção de anticorpos pelo paciente contra a preparação de anticorpos monoclonais, conhecida como resposta HAMA (do inglês *human anti-murine antibodies*), normalmente provoca a neutralização da ação do anticorpo, fazendo com que o paciente fique resistente ao medicamento⁷. Em casos mais severos, a administração desses anticorpos pode resultar em febre, urticárias e, em uma forma extrema, pode redundar em comprometimento renal, devido a uma deposição glomerular de imuno-complexos. Esse efeito é bem conhecido, pois também representa um entrave à utilização repetitiva de soro contra peçonhas, como o anti-ofídico. O soro imune pode ser utilizado com segurança no primeiro acidente, mas pode provocar febre e outras seqüelas mais profundas a partir da segunda utilização. Essa resposta do indivíduo contra a administração de proteína heteróloga acaba por limitar o uso desses medicamentos e vem impedindo a sua popularização na terapia.

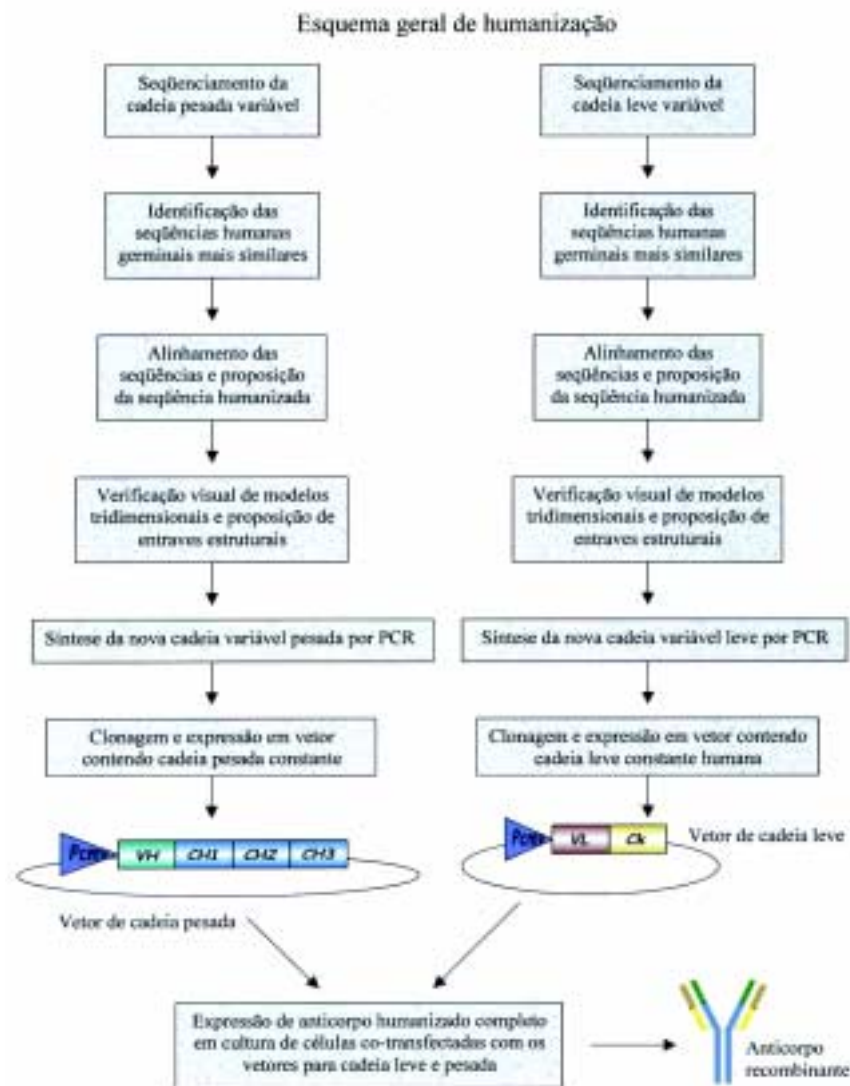


Figura 3 - Esquema geral para humanização de anticorpos.

As seqüências codificadoras das cadeias leve e pesada do anticorpo, são obtidas a partir de um clone produtor do anticorpo monoclonal de interesse. Essas seqüências são comparadas com seqüências germinais a partir de um banco de genes germinais humanos utilizando-se do programa FASTA. As seqüências são comparadas e uma seqüência humanizada é proposta. Utilizando-se de um modelo tridimensional, a seqüência proposta é verificada. Esta seqüência proposta é retro-traduzida para seqüência nucleotídica e sintetizada a partir de oligonucleotídeos sintéticos e PCR. O novo gene é clonado em vetor de expressão apropriado e expresso em células de mamíferos em cultura

larização na terapia.

A melhor maneira de ampliar a utilização dos anticorpos monoclonais na clínica médica é fazer uso de anticorpos humanos em substituição aos derivados de roedores. Em princípio, anticorpos humanos não devem induzir resposta imune significativa por serem reconhecidos pelo sistema imune

como uma proteína própria do organismo humano. O grande inconveniente é que a produção de anticorpos monoclonais a partir de células humanas é metodologicamente mais complexa que a produção a partir de roedores. Além de mais laboriosa, a imortalização de células humanas produtoras de imunoglobulinas, normalmente implica numa

manipulação com vírus, o que dificulta e até inviabiliza a utilização do produto na clínica médica. Outro problema refere-se à baixa afinidade dos anticorpos gerados, além de as linhagens celulares produtoras serem muito instáveis geneticamente. Portanto, foi só a partir da década de 90, com o progresso da pesquisa em engenharia genética, que se tornou possível a síntese de anticorpos por meio de recombinação gênica *in vitro*. Isso permitiu a modificação proposital de suas características imunológicas. Através da manipulação dos genes codificadores para cada uma das cadeias do anticorpo, é possível alterar a estrutura e a função, e, inclusive, incluir um caráter humano no anticorpo murino. A última geração de fármacos inclui moléculas de anticorpos recombinantes¹. Uma grande variedade de moléculas pode ser obtida por esse processo, que permite atender a diferentes funções. Fragmentos reduzidos, contendo apenas a porção da molécula responsável pelo reconhecimento ao antígeno, têm sido utilizados principalmente para o mapeamento de tumores ou para a desintoxicação de fármacos, quando se desejam moléculas menores, com um melhor desempenho farmacodinâmico. Esse procedimento permite ainda que anticorpos de interesse terapêutico, obtidos normalmente de camundongos, tornem-se menos imunogênicos em humanos. O processo consiste em manipulação genética para tornar a estrutura de aminoácidos mais próxima da estrutura encontrada em anticorpos humanos, reduzindo a possibilidade de reações adversas no paciente, ao mesmo tempo em que mantém a especificidade do anticorpo murino original³.

A manipulação resolve outro grande problema com os anticorpos monoclonais murinos: a atividade efetora necessária à atividade biológica do anticorpo. Essa atividade efetora é exercida pela porção constante da molécula, e depende do seu isotipo, ou seja, do tipo de cadeia pesada que se associa à região ligante ao antígeno. Alguns anticorpos de camundongo exercem atividade efetora em humanos, mas, em muitos casos, a atividade pretendida depende de cadeias constantes humanas específicas (Fc), como a cadeia $\gamma 1$, para induzir a lise da célula alvo, ou $\gamma 4$, para bloquear ou reduzir uma resposta imune exacerbada ou alérgica¹. Portanto, torna-se importante a possibilidade

de redefinição da Fc de um anticorpo, a fim de torná-lo atraente para sua utilização clínica. Além disso, é possível alterar deliberadamente a atividade efetora como, por exemplo, pela alteração de resíduos no Fc responsáveis pela reciclagem ("turn-over") da molécula. Essa mudança não natural permite que o anticorpo mutante tenha uma maior permanência no sangue aumentando a eficácia do tratamento.

Tornando Humanos os Anticorpos de Camundongos

Existem dois tipos básicos de modificações introduzidas em anticorpos recombinantes para que estes assumam um caráter humano. A primeira delas é a fusão gênica da porção Fv do anticorpo original (de camundongo) à porção constante de uma imunoglobulina humana, formando uma quimera (figura 2). Apesar da introdução de uma porção Fc humana, esse tipo de construção ainda mostra uma grande imunogenicidade devido à preservação da região Fv de camundongo. Para a construção de um anticorpo totalmente humanizado uma porção constante é fusionada a uma Fv desenhada de forma que sua seqüência seja a mais próxima possível de uma Fv de anticorpo humano. Nesse caso, as cadeias leve e pesada variáveis são redesenhadas baseando-se em regiões variáveis leve e pesada de imunoglobulina humana homóloga à imunoglobulina de camundongo. Uma Fv humanizada, com atividade preservada, é conseguida pelo transplante das CDR do anticorpo murino para o anticorpo humano (demais regiões da Fv e regiões constantes), obtendo-se assim uma molécula humanizada (figura 2) que preserva a capacidade de interação com o antígeno. Nessa abordagem, é possível obter um anticorpo bem próximo àquela "molécula invisível" ao sistema imune do paciente que o receberá. O limite desse processo é obter uma molécula o mais humana possível sem perder a sua atividade biológica original. Esse limite decorre do fato de que a manipulação dos resíduos de aminoácidos das CDR pode levar a uma desestabilização das alças de contato. Essas alças estão envolvidas em um grande número de interações intramoleculares que não necessariamente estarão preservadas quando da introdução de uma nova CDR. Detectar estas interações e saná-

las no sentido de se obter uma afinidade pelo antígeno, a mais próxima possível daquela do anticorpo original, é o desafio desta metodologia^{1,3,8}.

Além da preocupação com a manutenção da afinidade original e com a eliminação da imunogenicidade da molécula em si, outro aspecto relevante é a otimização da produção do anticorpo humanizado. Os vetores utilizados para tal propósito servem para dirigir a síntese da cadeia protéica do anticorpo recombinante em um sistema heterólogo (bactérias, leveduras ou mesmo células de mamíferos). Esses vetores são normalmente plasmídios, contendo um cassete de expressão, compatíveis com o tipo celular utilizado como hospedeiro. Para vetores em células de mamíferos, o promotor imediato de Citomegalovírus é o mais popularmente utilizado⁹. Esses vetores são montados contendo os genes que codificam as cadeias constantes leve e pesada humanas, flanqueadas por sítios de restrição que facilitam a introdução dos domínios variáveis recombinantes humanizados gerados. Esses vetores possibilitam também a manipulação da atividade efetora através da clonagem de cadeias constantes de isotipos específicos. A escolha do isotipo e manipulações pontuais para aumentar a meia vida desses produtos na circulação sanguínea são exemplos de modificações trabalhadas diretamente no vetor. Pela manipulação do vetor, o autor pode escolher *a priori* a função da molécula a ser sintetizada.

Além da indicação de uma resposta efetora específica através da escolha do isotipo de cadeia pesada, durante esse processo é possível manipular a molécula de imunoglobulina para que essa se apresente na forma de fragmentos (Figura 1). A utilização de porções menores da molécula, normalmente Fab ou Fv (este último, em geral, na forma de scFv - de cadeia única, apresentando um peptídeo conector flexível unindo as cadeias variáveis leve e pesada) é a visada, quando se pretende que a molécula tenha alta penetrabilidade, como, por exemplo, na utilização para diagnósticos de marcadores tumorais. Esse tipo de mini-molécula apresenta maior capacidade de penetração; no entanto, tem meia vida reduzida no soro do paciente. Quando se busca um maior tempo de circulação na corrente sanguínea, a opção, normalmente, é fazer a molécula inteira e expressá-la em sistemas eucarióticos,

para que se consiga a montagem correta da estrutura tetramérica (com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas) no retículo endoplasmático das células utilizadas para a expressão. Formas intermediárias, como o FvFc (Figura 2), entre o fragmento variável de cadeia única e o anticorpo inteiro, têm sido propostas mais recentemente¹⁰.

A Experiência Brasileira

No Brasil, o Instituto Butantan de São Paulo foi pioneiro na produção de anticorpos monoclonais com qualidade para utilização clínica. A utilização clínica desses anticorpos já é uma realidade no Brasil. No Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan os anticorpos murinos anti-CD3 e anti-CD18 são produzidos pelo cultivo dos hibridomas em bioreatores de alta capacidade. As normas utilizadas para o processamento dos anticorpos permitem a obtenção de produtos com qualidade para uso injetável humano. O anticorpo anti-CD3 foi testado clinicamente, com êxito, na reversão da rejeição de transplante de rim, fígado e coração e vem sendo utilizado regularmente pelo Instituto do Coração - INCOR. Esse anticorpo já vem sendo distribuído pelo Instituto Butantan e compete hoje com o produto Orthoclone®, um anti-CD3 produzido pela Ortho Biotech. O anticorpo anti-CD18 está ainda em fase de testes clínicos, e tem uso potencial em transplante de órgãos, meningite bacteriana¹¹, choque séptico¹² e na recuperação de pacientes infartados.

O transplante de órgãos representa uma solução clínica para uma série de doenças e diversos órgãos podem ser aproveitados para transplante. Esse procedimento, apesar de eficiente, apresenta dois problemas básicos que são a falta de doadores e a incompatibilidade entre doador e receptor. O primeiro problema deve ser reduzido com a nova lei brasileira de doação presumida de órgãos. O segundo problema depende, cada vez mais, de novos fármacos que consigam modular a resposta imune, de modo que torne o paciente tolerante ao órgão transplantado. Atualmente o tratamento é feito continuamente com corticóides e, de uma forma intermitente, com imunoglobulinas policlonais anti-timócito (ATG) ou monoclonais anti-CD3. Ambas as preparações resultam em uma depleção acentuada das células T e, conse-

qüentemente, da resposta imune celular adversa ao enxerto. As duas preparações de anticorpos utilizadas são heterólogas e, portanto, não podem ser utilizadas de uma forma rotineira devido à perda de atividade da droga e à hipersensibilidade causada pela sua administração contínua. Ambos os efeitos são originados de uma resposta imune ao fármaco, que é visto pelo organismo como proteína estranha contra o qual são gerados anticorpos. Com o tempo esses anticorpos gerados pelo paciente acabam por diminuir o efeito do imunossupressor.

Além do anti-CD3, primeiro anticorpo monoclonal introduzido na clínica médica, anticorpos alternativos contra outros marcadores celulares são

um papel de destaque como adjuvante no tratamento de transplantados, o anticorpo anti-CD18 ainda se encontra em fase de testes clínicos. Suas aplicações são bastante amplas e incluem a redução do processo inflamatório em doenças infecciosas como a meningite. Nesse caso, a administração do anticorpo monoclonal resulta na prevenção das seqüelas neurológicas criada pelo grande afluxo de leucócitos que atravessam a membrana hemato-encefálica, que causam a resposta inflamatória, grande responsável pelos graves sintomas e mortalidade da doença.

Em 1997, o grupo de Imunologia Molecular da UnB¹⁴ juntou-se ao Instituto Butantan e ao INCOR para desenvolver produtos humanizados para a

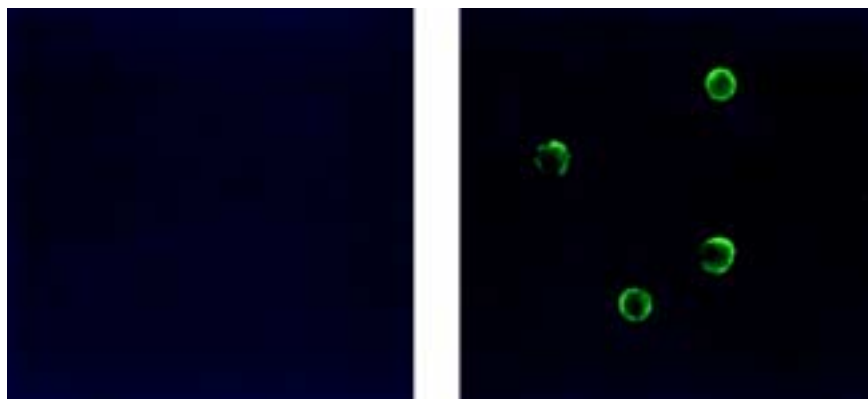


Figura 4 - Reconhecimento de linfócitos humanos por fragmentos de anticorpos humanizados. O anticorpo humanizado contra o marcador de superfície de linfócitos, CD18, foi utilizado para corar linfócitos humanos fixados em lamina de microscópio e visualizado com anticorpo anti-Fc humana conjugado a fluoresceína. A imunofluorescência foi observada em microscópio de fluorescência (Ruggiero et al., em preparação). À direita os linfócitos foram corados com anticorpo anti-CD18 e à esquerda com um anticorpo irrelevante

também propostos como imunossupressores, entre eles o anti-CD18 e o anti-CD4. Diferentemente do marcador CD3, o CD18 é parte de um complexo protéico de adesão (LFA1) envolvido em processos de migração e infiltração linfocitária. Anticorpos anti-CD18 não necessariamente precisam depletar os linfócitos para atuar, sendo capazes de inibir processos inflamatórios em geral, processo este caracterizado por uma arregimentação de linfócitos T, que deixam a corrente sanguínea e migram através do endotélio vascular para o local do processo inflamatório. Anticorpos anti-CD18 foram testados com sucesso na inibição de diversos tipos de processos inflamatórios¹³. Ao contrário do anticorpo anti-CD3, que já tem

substituição dos anticorpos produzidos no I. Butantan. Na época, a idéia era criar competência nessa nova tecnologia e, ao mesmo tempo, tentar sanar problemas pontuais, que já estavam sendo alvo de pesquisa clínica no Brasil. Nesse intuito, foi montado um esquema de produção, onde se trabalha independentemente a porção variável e a cadeia constante do anticorpo. Por um lado, trabalhou-se em vetores para a produção dos anticorpos recombinantes que já continham a cadeia constante. Inicialmente foi escolhido o isotipo IgG1 humano, isotipo que tem características de fixação de complemento e arregimentação do sistema efetor (macrófagos e linfócitos T). Os vetores, plasmídeos contendo um cas-

sete de expressão heteróloga prevêm a fusão gênica da Fv diretamente à região constante $\gamma 1$, para a cadeia pesada, e κ , para a cadeia leve. Os vetores estão sendo construídos para permitir a produção de anticorpos recombinantes completos e fragmentos de anticorpos que preservem a sua capacidade ligante. Estão sendo testados dois hospedeiros para a expressão heteróloga: a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, que vem sendo utilizada com sucesso para a expressão, em grande escala, de proteínas animais; e células de mamífero em cultura, que é uma tecnologia já dominada no Brasil e que permite uma grande produtividade, principalmente para moléculas grandes, como o caso do anticorpo completo (4 cadeias), que tem massa molecular de cerca de 150 kDa.

Para o desenvolvimento da Fv, foi criado um protocolo diferente daquele utilizado por outros grupos no exterior (figura 3), onde se enfatiza a comparação entre os genes variáveis murinos (genes que codificam a Fv e que são selecionados durante a resposta a um dado antígeno) utilizados no anticorpo original, com uma biblioteca de genes variáveis germinais humanos (genes que não sofreram rearranjo, nem hipermutação). A utilização de genes variáveis (V genes) germinais (*germline*) tem sido proposta na literatura como uma alternativa à estratégia "best-fit", onde o gene variável humano escolhido é aquele que possui a maior identidade com o gene murino, independente do nível de mutação acumulado em sua região codante. Thomlison e colaboradores^{15,16} definiram uma biblioteca de seqüências germinais de VH (cadeia variável pesada) e VL (cadeia variável leve), e vários autores vêm testando essa estratégia. No nosso laboratório, estamos desenvolvendo uma estratégia própria, que maximiza o conteúdo de resíduos humanos nas seqüências propostas. Nessa abordagem, procura-se a seqüência germinal mais próxima e inserem-se as seqüências correspondentes às CDR 1, 2 e 3 de ambas as cadeias. Através de modelagem molecular são acompanhados e revistos os possíveis impedimentos estruturais. Em um trabalho desenvolvido em nosso grupo¹⁷, mostramos que é possível saturar a região variável pesada com resíduos humanos e manter atividade ligante compatível à do anticorpo original. Atualmente já se encontra disponível

uma versão totalmente humanizada do anticorpo anti-CD18. Esse anticorpo, produzido em cultura de células animais, reconhece o antígeno especificamente e com as mesmas características de seletividade e afinidade que o anticorpo original obtido de hibridomas (Figura 4).

Conclusão

A utilização de fármacos à base de anticorpos recombinantes vem-se tornando uma realidade. O mercado mundial para anticorpos terapêuticos é de cerca de US\$ 500 milhões. Os produtos humanizados também já ganham volume no mercado. Nos EUA vários anticorpos humanizados já foram liberados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) ou outras organizações equivalentes de outros países (5 quiméricos e 3 humanizados) e um grande número se encontra em fase de testes clínicos (a grande maioria humanizados)². Nos próximos dez 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. Essa tecnologia tem sido utilizada, inclusive, com vistas ao tratamento de doenças como o câncer, a AIDS, e na prevenção de infecções bacterianas¹⁸. A manipulação de anticorpos já utilizados atualmente na medicina, em sua forma murina, que vem sendo realizada por grupos nacionais, permitirá a formação de competência necessária para o domínio dessa tecnologia no país, a partir das experiências bem sucedidas; outros anticorpos de interesse clínico deverão surgir como candidatos à humanização.

Bibliografia

1-Winter, G. & Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. **Nature** 349: 293-299.
 2-Gleennie, M.J. & Johnson, P.W.M. (2000). Clinical Trials of Antibody Therapy. **Immunol. Today** 21: 403-410.
 3-Co, M.S. & Queen C. (1991) Humanized Antibodies for Therapy. **Nature** 351: 501-502.
 4-Goldsby, R.A.; Kindt, T.J. & Osborne, B.A. (2000). *Em: Kuby Immunology*. pp: 83-149. 4ª Edição. W. H.

Freeman and Company, New York, NY, USA.
 5-Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the Antibody Molecule. **Molecular Immunol.** 31: 169-218.
 6-Branden, C. & Tooze, J. (1991). *Em: Introduction to Protein Structure*. Garland Ed., NY, EUA.
 7-McCann, M.C. & Boyd, J.E. (1992) *Em: Plasma and Recombinant Blood Products in Medical Therapy*. Editor: CV Prowse., John Wiley & Sons Ltd ed., NY, EUA
 8-Homes, M.A. & Foote, J. (1997) Structural consequences of Humanizing an Antibody. **J. Immunol.** 158: 2192-201.
 9-Trill, J.J.; Shatzman, A.R. & Ganguly, S. (1995). Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. **Current Opinion in Biotechnology**, 6:553-560.
 10-Andrade, E.V.; Albuquerque, F.C.; Moraes, L.M.P.; Brígido, M.M.; Santos-Silva, M.A. (2000) Single-Chain Fv with Fc fragment of the Human IgG1 Tag: Construction, *Pichia pastoris* Expression and Antigen Binding Characterization. **J. Biochem.** 128, 891-895.
 11-Tuomanen, E. (1993). Breaching the blood-brain barrier. **Sci Am.** 268:80-84.
 12-Thomas, J.R.; Harlan, J.M.; Rice, C.L. & Winn, R.K. (1992). Role of leukocyte CD11/CD18 complex in endotoxic and septic shock in rabbits. **J. Appl. Physiol.** 73: 1510-1516.
 13-Stambury et al. (1995) *Em: Inborn Errors of Metabolism*. McGraw Hill ed., NY, EUA
 14-www.unb/ib/cel/imol.
 15-Tomlinson, I.M, Walter, G.; Marks, J.D., Llewelin, M.B; Winter, G. (1992) The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. **J. Molec. Biol.** 215: 175-182.
 16-Tomlinson, I.M.; Cox, J.P.L.; Gherardi, E.; Lesk, M.; Chothia, C. (1995) The Repertoire of the humans Vk domain. **EMBO J.** 14:4628-4638.
 17-Caldas, C.A., Coelho, V. P. C. V., Rigden, D.J., Neschich G., Moro A. M. and Brígido, M. M.. (2000). Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single chain Fv against the CD18 surface antigen, **Protein Engineering**, 13:353-360.
 18-Beninatti et al. (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. **Nat Biotechnol.** 18: 1060-1064.