

FLÁVIA SERPIERI

**GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS CHO
TRANSFECTADAS COM VETORES PARA EXPRESSÃO DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANIZADOS ANTI-
DETERMINANTES LEUCOCITÁRIOS: ANTI-CD3 E ANTI-CD18**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Imunologia Aplicada.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Moro

São Paulo

2009

RESUMO

SERPIERI, F. **Geração de Linhagens de Células CHO Transfectadas com Vetores para Expressão de Anticorpos Monoclonais Humanizados Anti-Determinantes Leucocitários: anti-CD3 e anti-CD18.** Tese de Doutorado (Biotecnologia) - Instituto Butantan, São Paulo, 2009.

Os anticorpos monoclonais (AcMos) murinos possuem ação terapêutica limitada devido à sua natureza heteróloga, originando respostas imunogênicas e conseqüente perda da atividade. A transformação dos AcMos em moléculas “mais humanas” é realizada através de técnicas de engenharia genética. Este processo é conhecido como humanização de anticorpos. O projeto de obtenção de huAcMos (Anticorpos Monoclonais Humanizados) foi iniciado por colaboração entre a Dra. Ana Maria Moro (IBU) e o Dr. Marcelo Brígido (UnB), sendo que AcMos murinos produzidos no IBU e com potencial terapêutico tiveram suas sequências gênicas humanizadas na UnB, as quais, introduzidas em vetores de clonagem, foram transferidas ao IBU para transfecção e expressão em células CHO (*Chinese Hamster Ovary*). O recebimento dos vetores de expressão do huAcMo anti-CD18 deram início a este projeto. Neste trabalho utilizamos o método de lipofecção para inserção do DNA exógeno; testamos diversas construções de vetores, marcas de seleção, condições de transfecção, amplificação pelo sistema Dihidrofolato redutase (DHFR), modificamos os vetores de expressão clonando os genes das duas cadeias no mesmo vetor e verificamos as sequências gênicas, mas os fracos resultados obtidos nos levaram à conclusão de que eram necessárias maiores modificações nos vetores de expressão. Nessa época havia sido terminado pelo grupo parceiro da UnB o processo de humanização do AcMo anti-CD3, nossa primeira escolha. Este vetor possuía elementos otimizados na construção de um fragmento FvFc humanizado, este caracterizado pela ausência das regiões constantes C_H1 e C_k da imunoglobulina G. As células CHO transfectadas com o gene codificador deste fragmento foram selecionadas por Geneticina e clonadas pelo equipamento ClonePix FL (Genetix Ltd., New Milton, Hampshire, Reino Unido). Foram selecionados sete clones e estes foram caracterizados por ELISA, SDS-PAGE e Western Blotting. A afinidade deste fragmento ao seu alvo presente em linfócitos T CD3⁺ foi analisada por ensaios de Citometria de Fluxo (Guava, GE Healthcare) com células mononucleares isoladas de sangue periférico humano. Os resultados obtidos evidenciaram manutenção de sua atividade biológica, quando comparada com a molécula murina original. Para a expressão da molécula inteira do huAcMo anti-CD3 utilizamos o sistema de recombinação homóloga Flp-In (Invitrogen). A população policlonal produtora do huAcMo anti-CD3 foi clonada pelo equipamento ClonePix FL. Os clones selecionados foram analisados por ELISA, SDS-PAGE e Western Blotting. A utilização da técnica de Citometria de Fluxo competitiva demonstrou que a versão humanizada não pôde deslocar a versão murina do anticorpo anti-CD3. Os resultados obtidos neste projeto demonstraram que obtivemos sucesso na expressão das construções humanizadas do anticorpo anti-CD3. As diferenças nas propriedades de ligação são freqüentemente encontradas após processos de humanização de sequências codificadoras de anticorpos; dependendo da função efetora esperada para determinado anticorpo esta diminuição de afinidade não é obrigatoriamente caracterizada como negativa para o seu clínico.

Palavras-chave: Células CHO. Anticorpos humanizados. Anti-CD18. Anti-CD3. Expressão de proteínas recombinantes. Clonagem celular.

ABSTRACT

SERPIERI, F. **Generation of CHO Cell Lines Expressing Humanized Monoclonal Antibodies Anti-Leukocytary Determinants: anti-CD3 and anti-CD18.** Ph.D. Thesis (Biotechnology) – Butantan Institute, São Paulo, 2009.

Murine monoclonal antibodies (mAb) present limited therapeutic applications because of their heterologous nature, which can generate immunogenic responses and consequent loss of activity. The developments achieved in molecular biology and genetics in the last years allowed the process of antibodies humanization, in which the constant regions and framework of murine antibodies are substituted for human sequences. The most used humanization process is through CDR graft, aiming to reduced immunogenicity while maintain affinity to the target. A few years ago a partnership was initiated between Dra. Ana Maria Moro (Butantan Institute) and Dr. Marcelo Brígido (Brasilia University); two murine mAbs with therapeutic potential (anti-CD3 e anti-CD18), already produced at the Butantan Institute, had their genetic sequences humanized at Brasilia University followed by cloning into expression vectors. The sequences were transferred to Butantan Institute for the transfection and expression in CHO (Chinese Hamster Ovary) cells. At the time this PhD project started the anti-CD18 humanization process was more advanced so it was chosen even if the anti-CD3 has greater clinical potential. The lipofection method was used for the DNA insertion; we tested different constructs, selection markers, transfection conditions, gene amplification by Dihydrofolate reductase (DHFR), modifications by the cloning of both antibody's genes into the same vector and sequences analysis. All the results led to the conclusion that major modifications were needed. At that time Brígido's group had concluded the humanization process of an anti-CD3 fragment (FvFc) with optimized vector elements. The FvFc fragment is characterized by the lack of C_H1 and C_k constant regions, the V_L and V_H sequences are linked resulting in a dimerous molecule of equal sequences. CHO cells were transfected with this vector, selected by Geneticin and cloned with the ClonePix FL robot. (Genetix Ltd., New Milton, Hampshire, UK). Seven clones were selected and characterized by ELISA, SDS-PAGE and Western Blotting. The binding to the antigen was analyzed by Flow Cytometry (Guava, GE Healthcare) against T CD3+ lymphocytes from human peripheral blood. For the expression of the whole anti-CD3 antibody it was used a homologous recombination system (Invitrogen). The stable transfected pool was cloned with the ClonePix and the clones were analyzed as previously detailed. The flow cytometry analyses confirmed binding to human lymphocytes. The competition assays showed that the murine anti-CD3 dislodges the humanized version but not otherwise. Overall results showed success in the expression of the humanized anti-CD3 formats. Often humanization leads to a lower affinity compared to the original murine, not necessarily a negative finding, depending on the clinical application of the antibody.

Keywords: CHO Cells. Humanized Antibodies. Anti-CD18. Anti-CD3. Recombinant protein expression. Cell cloning.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Imunologia

A primeira menção à Imunologia, segundo historiadores, data do século cinco A.C., quando Tucídides citou a palavra imunidade para se referir a um processo infeccioso. No entanto, indícios como o do costume chinês de utilizar a inoculação de pó obtido a partir lesões cutâneas infectadas com o vírus da varíola sugere que a noção de aquisição de imunidade seja anterior ao citado pelos estudiosos (ABBAS, 2008).

Os estudos iniciais deste campo surgiram como um ramo da Medicina, tendo como intenção principal a prevenção das doenças e não somente sua cura.

Um dos primeiros marcos no campo da Imunologia ocorreu com os estudos de Edward Jenner (1749 – 1823), pela realização de experimentos com crianças contaminadas pelo vírus da varíola; Jenner observou que as vacas apresentavam quadros de varíola mais brandos que os humanos e utilizou a secreção das lesões como inóculo em crianças e adultos; suas observações mostraram que as pessoas tratadas adquiriam imunidade à doença, surgindo neste momento o princípio da vacinação.

A participação dos microorganismos em processos inflamatórios foi descoberta no final do século XIX por Louis Pasteur. Seus estudos sobre a varíola possibilitaram a descoberta do processo de atenuação dos microorganismos. A somatória de suas descobertas aos estudos de imunização de Edward Jenner gerou conhecimentos para a produção atual de vacinas com microorganismos atenuados.

Outra importante descoberta foi realizada em 1888 por Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato (Von BEHRING e KITASATO, 1991), quando identificaram substâncias neutralizantes no soro de animais imunizados contra o tétano e a difteria, as quais denominaram de anticorpos. Eles demonstraram que a proteção contra as doenças citadas acima poderia ser transferida passivamente de um animal doente para um saudável, pela realização da transferência do soro hiper-imune contendo os

anticorpos. Em 1891, Emil Von Behring utilizou suas descobertas para o primeiro tratamento terapêutico com ferramentas imunológicas, utilizando o soro contra difteria (“antitoxina”) para imunização de seres humanos. Pelo reconhecimento de seus estudos von Behring foi laureado com o primeiro Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1901 (NOBEL LECTURES, 1967).

1.2 Anticorpos

Os anticorpos (Ac), também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas presentes em líquidos biológicos do organismo e também na superfície de alguns tipos celulares.

Sua síntese é restrita aos linfócitos B, que se desenvolvem a partir de células tronco progenitoras presentes na medula óssea e que nesta fase não apresentam produção ou secreção de anticorpos. A capacidade de produzir anticorpos se inicia por um processo de maturação das células tronco na medula óssea; estas se desenvolvem tornando-se produtoras de cadeia pesada citoplasmática e IgM de membrana (Célula Pré-B e Célula B Imatura, respectivamente). O amadurecimento dessas células ocorre com sua migração para o baço, onde tem início a produção dos isotipos IgM e IgD de membrana; e posterior migração das células B maduras para os órgãos linfóides periféricos, onde serão capazes de reconhecer e secretar anticorpos específicos aos antígenos que lhes serão apresentados (Figura 1). Durante sua vida, cada célula B será capaz de produzir isotipos de imunoglobulinas diferentes, mas de especificidade única.

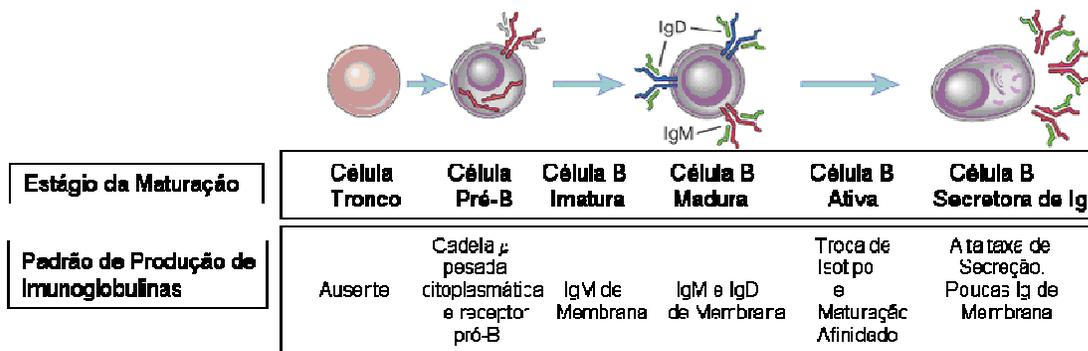


Figura 1 - Processo de maturação das células B. Descrição das etapas de transformação das células tronco de medula em células de linfócitos B produtores de anticorpos.

FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

Os anticorpos apresentam como principais funções: ligar-se especificamente a antígenos (Ag) e recrutar células e/ou moléculas capazes de destruir o patógeno ao qual foi apresentado.

Cada molécula de anticorpo possui uma sequência única, o que permite sua ligação a um antígeno e epitopo específicos. As diferentes moléculas de imunoglobulinas presentes no organismo, que se ligam única e especificamente a um epitopo, são conhecidas como repertório de anticorpos; em humanos é estimado que este número de moléculas chegue a 10^{11} (JANEWAY, 2001).

Tamanha diversidade é formada por um número limitado de sequências gênicas de regiões variáveis que se alteram durante a vida dos linfócitos B; isto foi demonstrado por clonagens dos genes da imunoglobulina, o que evidenciou a ocorrência de rearranjos do DNA durante o desenvolvimento das células B. Outro fator responsável pela alta variabilidade, mas não totalmente esclarecido, é o processo de hipermutação somática, onde os genes responsáveis pela síntese das cadeias variáveis da molécula do anticorpo nas células B maduras e ativas são sujeitos a mutações freqüentes (TONEGAWA, 1988a, 1988b; KLEIN, 1990; JANEWAY, 2001).

1.2.1 Estrutura dos Anticorpos

As moléculas de anticorpos possuem uma estrutura básica comum (Figura 2), porém apresentam grandes variações nas regiões responsáveis pela especificidade de ligação ao antígeno.

O peso molecular de uma molécula de imunoglobulina é de aproximadamente 150 kDa (referente a uma IgG, varia conforme o isotipo), distribuídos em duas cadeias polipeptídicas leves idênticas (25 kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (50 kDa). Ambas possuem uma região aminoterminal variável (V_H , do inglês, *Variable Heavy* e V_L , do inglês, *Variable Light*) de reconhecimento e ligação ao antígeno e regiões carboxiterminais constantes (C_H , do inglês, *Constant Heavy* e C_L , do inglês, *Constant Light*). A região constante é responsável pelas funções efetoras da molécula.

As cadeias pesadas e leves são unidas entre si por pontes dissulfeto formadas entre resíduos cisteína no terminal carboxila da cadeia leve e o domínio C_{H2} da cadeia pesada. Além disso, apresentam sequências similares de 110 aminoácidos, sendo que cada uma delas corresponde a um domínio protéico. As cadeias leves possuem dois desses domínios (V_L e C_L) enquanto as cadeias pesadas contem quatro (V_H , C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}).

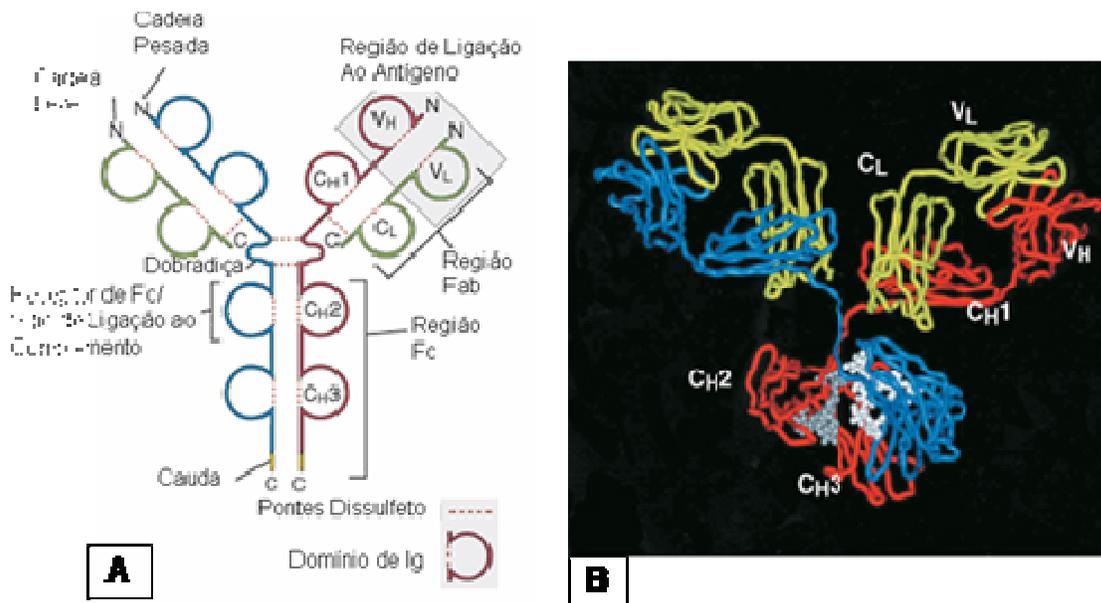


Figura 2 - Estrutura da Imunoglobulina. A) diagrama esquemático de uma IgG secretada; B) cristalografia de raios X, cadeias pesadas em azul e vermelho, cadeias leves em verde; os carboidratos em cinza.

FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

As regiões variáveis pesadas e leves possuem três segmentos de alta variabilidade, chamadas regiões hipervariáveis. Entre elas estão presentes regiões com sequências mais conservadas chamadas de arcabouço ou FR (do inglês, *Framework Regions*).

Para formar sua estrutura tridimensional, as três regiões hipervariáveis dos domínios V_L e V_H (Fv, do inglês *Variable Fragment*) se aproximam para formar o ponto de contato da ligação ao antígeno.

Existem dois tipos de cadeias leves: lambda (λ) e kappa (κ); não sendo possível a coexistência dos dois tipos em uma mesma molécula de anticorpo. Nenhuma diferença funcional foi encontrada em anticorpos contendo os diferentes tipos de cadeias leves, mas existe uma taxa de frequência espécie-específica para ambas, por exemplo, em ratos a média é de 20(κ): 1(λ), já em humanos é de 2(κ):1(λ) (Janeway, 2001).

As classes ou isotipos de imunoglobulinas são determinadas pelo tipo de cadeia pesada presente. São encontrados cinco tipos de cadeias pesadas: imunoglobulina M

(IgM - μ), imunoglobulina D (IgD - δ), imunoglobulina G (IgG - γ), imunoglobulina A (IgA - α) e imunoglobulina E (IgE - ϵ) (Figura 4). Em humanos, o isotipo mais freqüente é a IgG, este por sua vez é subdividido em várias subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4) (Figura 3).

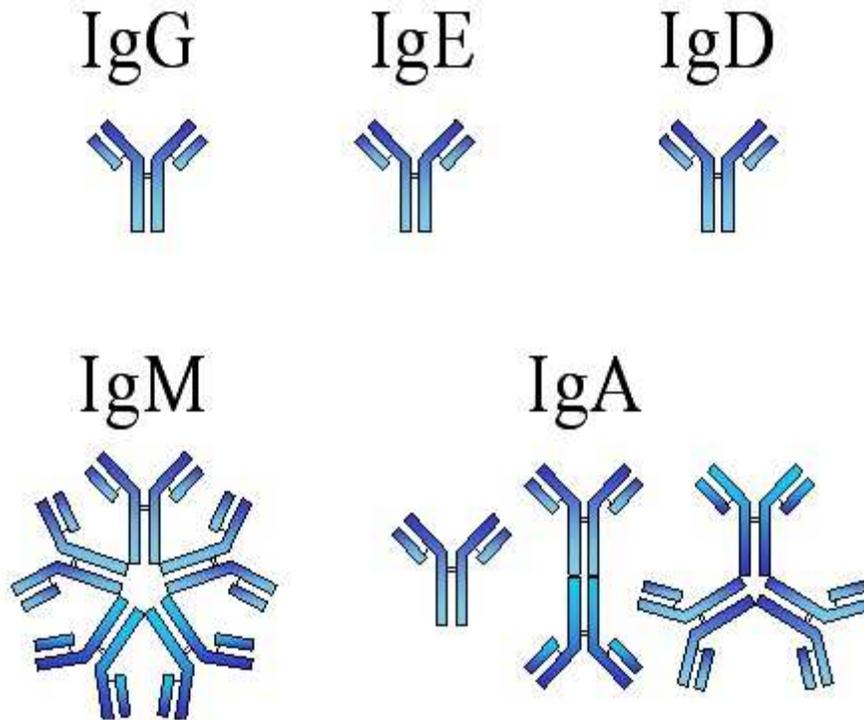


Figura 3 - Isotipos de imunoglobulinas. IgG, IgE e IgD, apresentam a mesma conformação estrutural, diferindo apenas no tipo de cadeia pesada da molécula. IgM, conformação pentamérica. IgA, estrutura monomérica no soro, dimérica nas secreções ou associada a outras proteínas.

FONTE: <http://www.karstenfaehnrich.de/Immunosensors/immunosensors.htm>.

1.2.2 Funções

A proposta de que a especificidade dos anticorpos fosse dada pela natureza dos aminoácidos presentes nos segmentos hipervariáveis ou nas Regiões Determinantes

de Complementariedade (CDRs, do inglês, *Complementary Determinant Regions*) como também são conhecidos, foi feita em 1970 por Elvin Kabat (Figura 3).

Cada cadeia apresenta três CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3), como é possível visualizar na figura 3, a CDR3 é que apresenta maior variabilidade e por isso é tida como a mais importante na determinação da especificidade (ABBAS, 2008).

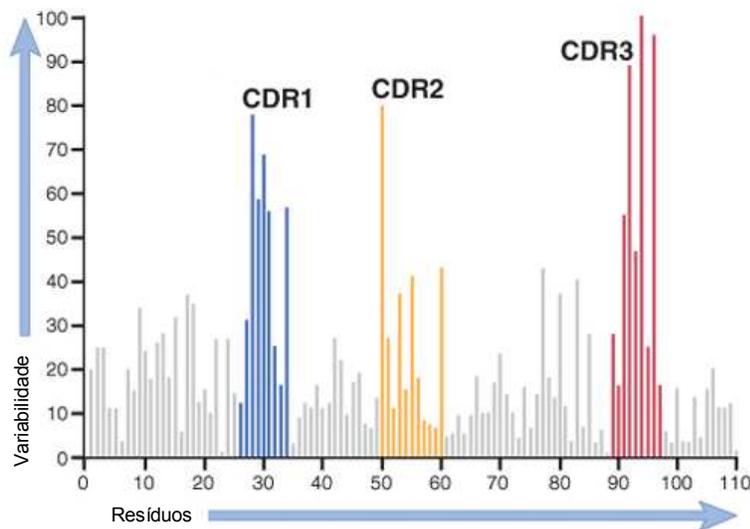
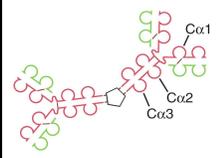
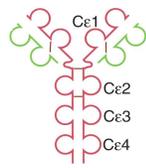
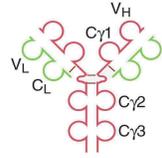
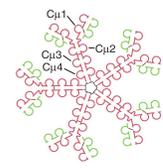


Figura 4 - Gráfico de Kabat-Wu. Apresenta a variabilidade de aminoácidos na molécula de Imunoglobulina. A extensão da variabilidade é dada como o número de diferenças em cada aminoácido na molécula de anticorpo seqüenciada de forma independente em relação ao número do aminoácido medido a partir da porção aminoterminal.
FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

Assim como as classes de imunoglobulinas, suas funções efetoras também são determinadas pelo tipo de cadeia pesada presente na molécula. A maioria das funções efetoras dos anticorpos são mediadas pela interação de sua região carboxiterminal (região Fc, do inglês, *Constant Fragment*) com moléculas presentes das superfícies de outros tipos celulares (fagócitos; células NK, do inglês, *Natural Killer*; mastócitos) que atuam como receptores de Fc (FcR, do inglês, *Fc Receptor*) e proteínas citoplasmáticas do sistema complemento. A interação da região Fc da imunoglobulina com seus receptores FcR, desencadeará mecanismos ativos de defesa do organismo, caracterizado pela função efetora distinta de cada isotipo da molécula (Tabela 1).

Tabela 1 - Os vários isotipos de Imunoglobulinas, suas formas secretadas e funções efetoras.

Isotipo de Anticorpo	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Forma Secretada	IgA (dímero) Monômero, dímero, trímero 	Nenhuma	IgE Monômero 	IgG1 Monômero 	IgM Pentâmeros, hexâmeros 
Funções Efetoras	Imunidade de mucosa	célula B imatura	Defesa contra parasitas helmínticos, hipersensibilidade imediata	Opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo, imunidade neonatal, inibição por feedback das células B.	Receptor de antígeno em células B imaturas, ativação do sistema complemento

FONTE: Abbas *et al.*, 2008

1.2.3 Fragmentos de Anticorpos

Em 1972, Rodney Porter submeteu moléculas de IgG de coelho ao tratamento com enzimas proteolíticas, o que resultou na clivagem da mesma em fragmentos com estruturas e funções diferentes.

Quando submetidas à ação da enzima papaína, em condições de proteólise limitada, foram originados três fragmentos, tendo a enzima atuado sobre a região de dobradiça. Dois desses fragmentos eram idênticos, formados pela cadeia leve completa (V_L e C_L) associada a um fragmento V_H - C_H1 da cadeia pesada; estes foram chamados de Fab (do inglês, *Fragment, antigen binding*) e apresentaram como característica a manutenção da capacidade de ligação ao antígeno por conterem os domínios V_L e V_H pareados. O terceiro fragmento resultante da clivagem pela papaína era formado pelos domínios C_H2 e C_H3 da molécula de IgG, ligados entre si por pontes dissulfeto. Como característica esse fragmento foi capaz de se auto-associar e cristalizar e por isso foi chamado de Fc (do inglês, *Fragment, crystallizable*) (Figura 5A).

Quando Porter realizou o mesmo experimento, mas desta vez com a enzima pepsina, resultou somente um fragmento; a clivagem ocorreu na região distal à dobradiça, e gerou um fragmento denominado de $F(ab)_2$, o qual continha a região de

ligação ao antígeno com a dobradiça e pontes dissulfeto intercaladas e intactas, sendo o restante da molécula degradada (ABBAS, 2008) (Figura 5B).

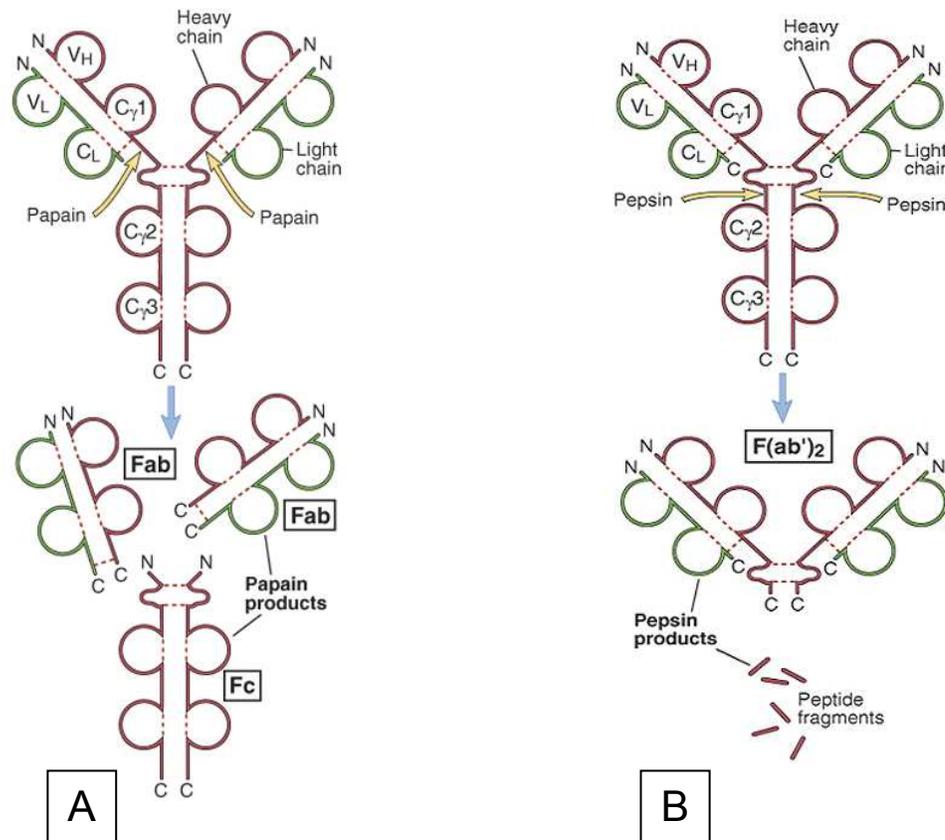


Figura 5 - Resultados das digestões enzimáticas de moléculas de anticorpos. **A)** Fragmentos proteolíticos de uma molécula de IgG submetida ao tratamento com papaína. Resultado da clivagem: dois fragmentos Fab (V_L , C_L , V_H e C_H1) e um fragmento Fc (C_H2 e C_H3). **B)** Pepsina, resultado da clivagem: um fragmento $F(ab')_2$ (V_H , C_H1 e V_L , C_L com região de dobradiça).
 FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

Os experimentos de Porter demonstraram que as funções de reconhecimento de antígenos e funções efetoras eram espacialmente segregadas na molécula de imunoglobulina; estes estudos lhe renderam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina no ano de 1972 (JANEWAY, 2001).

Atualmente, com o uso de técnicas de engenharia genética, é possível a obtenção de fragmentos alternativos de anticorpos que apresentam de 12 kDa a mais de 150 kDa (Figura 6); estes podem apresentar propriedades diferenciadas quanto à

penetração em tecidos, meia-vida e alcance dos alvos, quando comparados à moléculas inteiras de anticorpos.

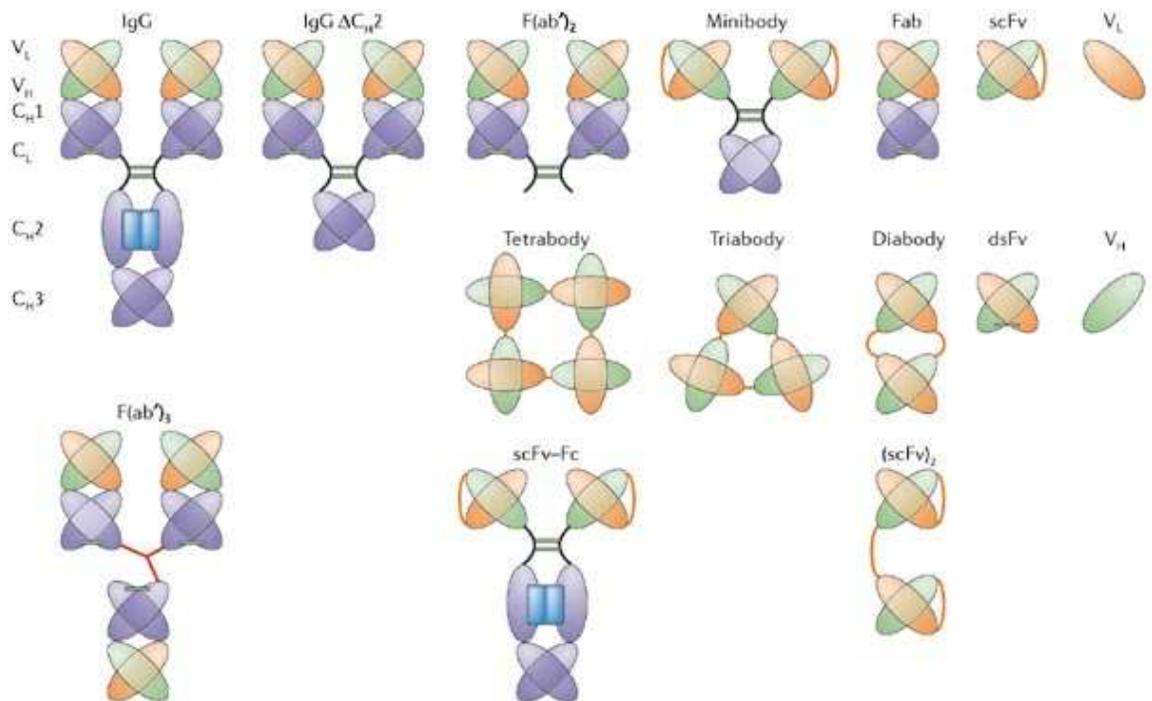


Figura 6 - Fragmentos alternativos de anticorpos. Variabilidade de fragmentos de anticorpos gerados por técnicas de engenharia genética.

FONTE: Carter P.J., 2006.

1.2.4 Anticorpos Monoclonais

Em 1975, Milstein e Köhler desenvolveram metodologia para obtenção de anticorpos idênticos e de especificidade conhecida, os chamados anticorpos monoclonais (AcMos); esta lhes rendeu no ano de 1984 o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina (KOHLER E MILSTEIN, 1975).

A técnica é baseada na utilização de um camundongo ou rato imunizado com o antígeno de interesse e posterior isolamento das células B do baço ou linfonodos do

animal; essas células foram fundidas com células de mielomas, originando híbridos produtores do AcMo de interesse (Figura 7).

A metodologia desenvolvida por Milstein e Köhler não teve impacto imediato na comunidade científica e nunca foi patenteada; por este motivo é utilizada freqüentemente para a obtenção de anticorpos específicos aos mais diversos antígenos (MILSTEIN, 1999).

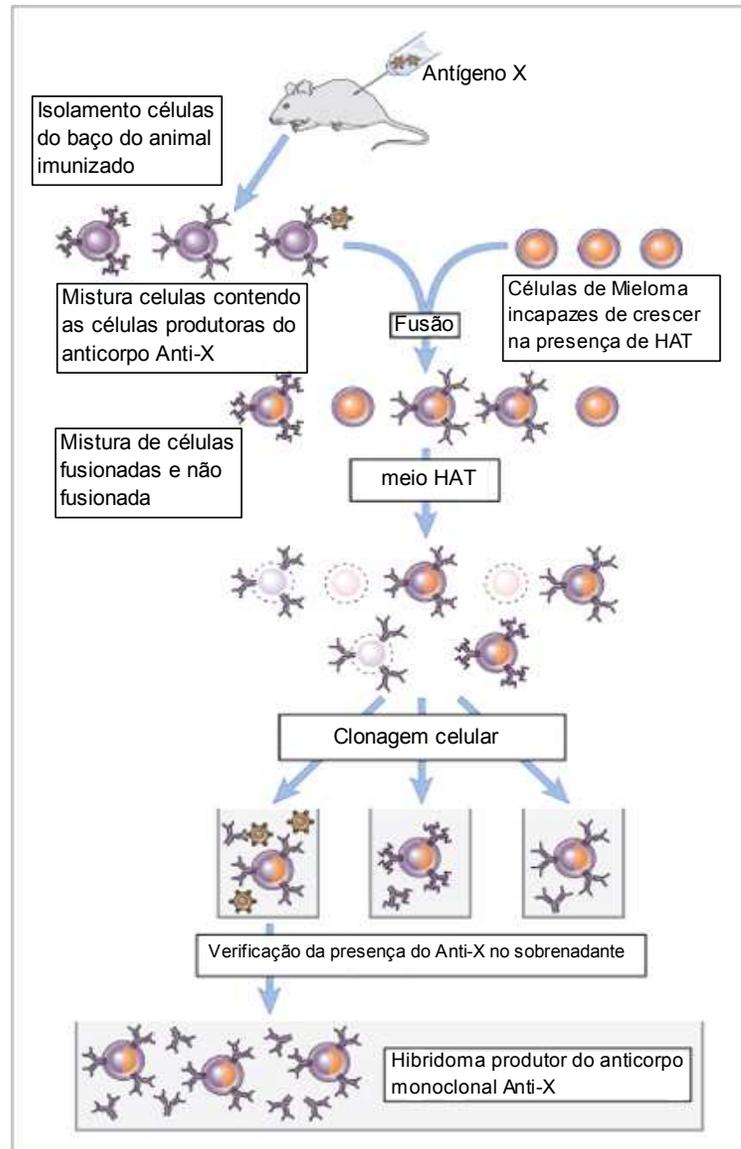


Figura 7 - Detalhamento da técnica desenvolvida por Milstein e Köhler para obtenção de AcMos. O animal imunizado com o antígeno de interesse irá produzir no baço anticorpos policlonais específicos. As células do baço são retiradas e fusionadas as células de mieloma. Através do cultivo em meio seletivo contendo HAT são selecionadas somente as células capazes de se dividir e produzir os anticorpos de interesse.

FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

Aproximadamente dez anos após o desenvolvimento da metodologia, os AcMos alcançaram pela primeira vez a fase de estudos clínicos, no início da década de oitenta, com o desenvolvimento do anticorpo murino Muromab-CD3 (Orthoclone-OKT3, Johnson & Johnson) (JAFFERS, FULLER *et al.*, 1986), bastante conhecido por sua aplicação na prevenção e controle da rejeição aguda a transplantes.

Liderados pelo sucesso alcançado pelo OKT3, outros AcMos foram desenvolvidos com grande promessa para a medicina, estudos continuam avançando na direção de novas descobertas de aplicações, incluindo a ligação a receptores com o intuito de regular sua ativação, prevenção da dimerização, internalização, bloqueio da proliferação, indução de apoptose, ligação e neutralização de citocinas ou fatores de crescimento, direcionamento de químicos, proteínas ou toxinas radioativas para células-alvo (ZIEGELBAUER, 2008).

1.2.5 Mercado Biotecnológico do AcMos

Estima-se que os investimentos atuais das indústrias biotecnológicas no desenvolvimento e produção de AcMos ultrapassem os vinte bilhões de dólares.

Este mercado é dominado (aproximadamente 80%) por apenas cinco dessas moléculas terapêuticas, divididas em duas classes terapêuticas: oncológicos - Avastin (Bevacizumab, Genentech), Herceptin (Trastuzumab, Genentech), Rituxan (Rituximab, Genentech) e imunológicos - Humira (Adalimumab, Abbott), Remicade (Infliximab, Centocor).

Há previsões de que as aplicações na área oncológica serão responsáveis pelo aumento deste mercado para trinta bilhões de dólares dentro de três a seis anos (BAKER, DAS *et al.*, 2005; WILES, HANAGE *et al.*, 2006).

No ano de 2007, mais de cinquenta AcMos e produtos relacionados foram recebidos para análise como novas drogas pelo FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), número que demonstra o crescimento gradativo da participação dos AcMos no mercado biotecnológico (SWANN, TOLNAY *et al.*, 2008) (Figura 8).

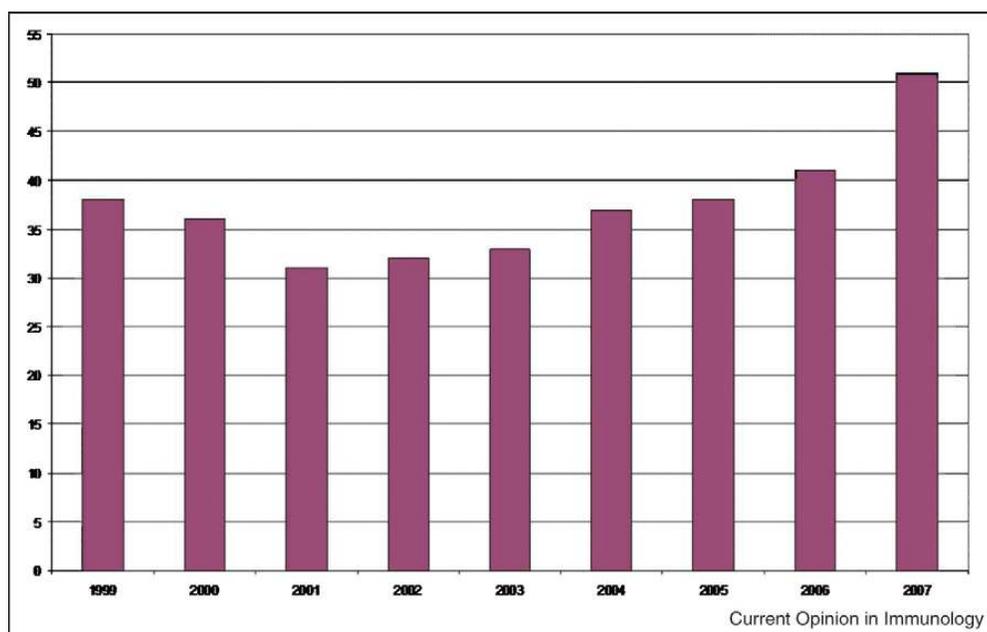


Figura 8 - Aplicações para análise de novas drogas de AcMos e produtos relacionados recebidos pelo FDA ao longo dos últimos anos.

FONTE: Swan *et al.*, 2008.

Cinco grandes desafios são fontes de empecilhos para o maior crescimento deste mercado: alvos restritos, limitação de biodistribuição, rotas de administração, altas dosagens e diferenças espécies-específicas.

As pontes dissulfeto presentes na molécula do Ac são necessárias para a manutenção de sua forma dimérica e de sua potência de ligação ao antígeno; no ambiente redutor do citosol essas pontes dissulfeto são rompidas, limitando assim a ação dos AcMos a alvos extracelulares.

O alto peso molecular da molécula de imunoglobulina dificulta sua penetração nos tecidos do organismo. Há previsões de que no futuro, o formato natural dos AcMos possa ser substituído por fragmentos alternativos para o tratamento de determinadas doenças (vide figura 6).

Quatro dos cinco anticorpos mais comercializados são administrados por infusão intravenosa. Por serem partes de tratamentos de longa duração, a auto-administração e o fácil uso pelos pacientes é um objetivo a ser alcançado (MASCELLI, ZHOU *et al.*, 2007; ZIEGELBAUER, 2008).

Dos desafios citados acima, o maior deles são as diferenças espécie-específicas. Na sua natureza murina original, os AcMos são percebidos pelo organismo como uma proteína heteróloga, gerando sua rápida eliminação pela produção de anticorpos humanos contra os anticorpos murinos, este mecanismo de defesa gera uma resposta imunológica chamada HAMA (do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*) (MIRICK, BRADT *et al.*, 2004).

Um desafio que não se refere à molécula de anticorpo, mas que se mostra importante para o futuro do mercado é o suprimento das altas e constantes doses usadas nos tratamentos terapêuticos; levando-se em consideração a capacidade de cultivo celular mundial por ano (500.000 litros) estima-se que a demanda de AcMos não conseguirá ser suprida. Este é o motivo pelo qual a área de P&D (Pesquisa & Desenvolvimento) investe seus esforços no desenvolvimento de linhagens celulares com crescimento e produtividade aprimoradas (BUTLER, 2005).

1.2.6 Engenharia de Anticorpos

O potencial terapêutico dos AcMos é incontestável, mas sua aplicação com origem murina é insatisfatória devido aos efeitos colaterais.

Estudos foram direcionados para aumentar a eficiência e diminuir a imonogenicidade causada pelos AcMos murinos; inicialmente foram produzidos AcMos quiméricos, onde foi realizada a troca da região Fc murina por uma sequência de Fc humana correspondente (MORRISON, JOHNSON *et al.*, 1984), gerando uma molécula com 66% da sua sequência humana e 34% murina (Figura 9).

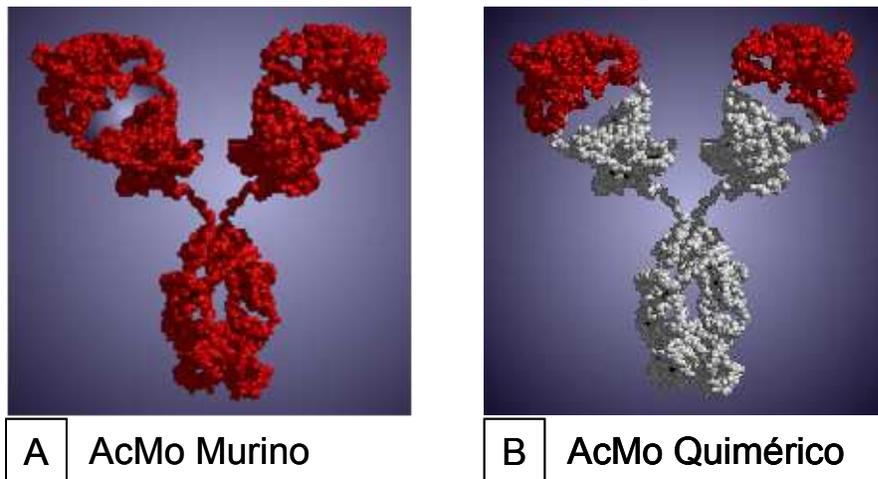


Figura 9 – Quimerização de anticorpos. A) Anticorpo Murino, B) Anticorpo Quimérico: a sequência da região Fc murina é trocada pela região Fc humana, restando assim 34% de sequências murinas.

FONTE: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/2006-241s2_6.ppt#429,24, Evolution of Monoclonal Antibodies.

Apesar de sua maior parte ser considerada humana, as sequências murinas ainda presentes podem causar respostas imunogênicas no organismo, com a geração de anticorpos humanos contra os anticorpos quiméricos, esta resposta é conhecida como HACA (do inglês, *Human Anti-Chimeric Antibody*) (ADAIR, 1992; MIRICK, BRADT *et al.*, 2004).

Com o advento de técnicas sofisticadas de engenharia genética, tornou-se possível a manipulação dos genes codificadores das cadeias do anticorpo gerando alterações na sua estrutura, mas mantendo a especificidade original advinda do anticorpo murino, neste processo são formados os AcMos humanizados (huAcMos) (Figura 10).

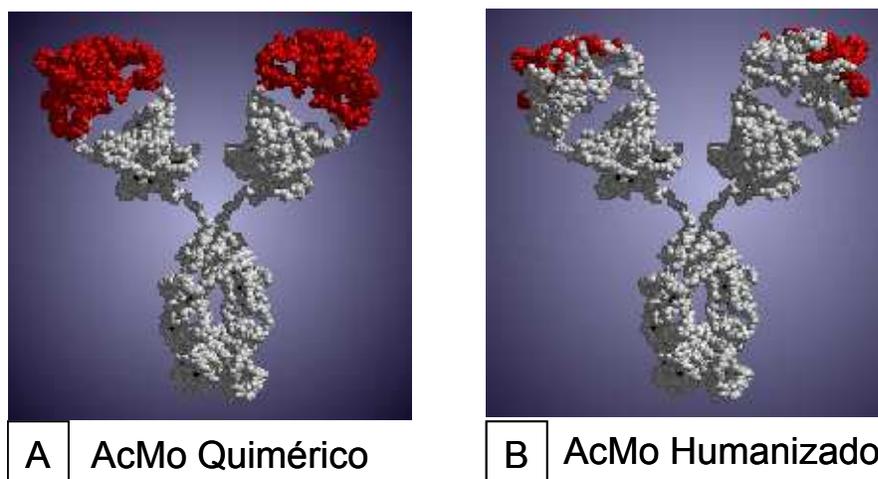


Figura 10 – Humanização de anticorpos. A) Anticorpo Murino, B) Anticorpo Humanizado: os CDRs do anticorpo murino são transplantados para as regiões variáveis humanas, tendo cerca de 97% de sequências humanas.

FONTE: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/slides/2006-41s2_6.ppt#429,24, Evolution of Monoclonal Antibodies.

Apesar da baixa imunogenicidade alcançada pelos huAcMos, não são considerados invisíveis pelo sistema imune, podendo acarretar imunogenicidade residual, tendo como possíveis causas: presença de polimorfismos na população, respostas contra determinantes da porção constante; resíduos de aminoácidos resultantes da manipulação genética (ROUTLEDGE, LLOYD *et al.*, 1991) e respostas contra o idiotipo (HAHA, do inglês, *Human Anti-Human Antibody*) (STEPHENS, EMTAGE *et al.*, 1995; MIRICK, BRADT *et al.*, 2004). As reações de sensibilização ao huAcMo não são observadas quando a administração terapêutica é associada a drogas imunossupressoras convencionais (MAINI, BREEDVELD *et al.*, 1998).

Por possuírem apenas 3% de sua sequência sendo de origem murina, os huAcMos apresentam menor imunogenicidade quando comparados com os anticorpos murinos e quiméricos (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise das taxas de imunogenicidade dos AcMos murinos, quiméricos, humanizados e humanos aprovados.

Imunogenicidade de anticorpos monoclonais licenciados		
Tipo de Anticorpo	Total	% de pacientes com HAMA, HACA ou HAHA ^a
Murinos	4	AcMos inteiros, <3% a >80%
	2	Fragmentos Fab ou Fab': <1% a 19%
Quiméricos	5 ^d	<1% a 13%
Humanizados	11 ^e	<1% a 10% (12% para produtos obtidos por phage display)
Humanos	2	<1-4% para produtos obtidos por Xenomouse

a: HAMA - anticorpos humanos anti-murinos, HACA - anticorpos humanos anti-quiméricos, HAHA - anticorpos humanos anti-humanos.

b: <3% dos pacientes desenvolveram resposta HAHA pelo anticorpo Zevalin (após 90 dias de tratamento). Todos os outros AcMos induziram resposta HAMA em 55 a 80% dos pacientes.

c: 4 deles são AcMos inteiros e 1 é um fragmento Fab

d: 1 deles são AcMos inteiros e 1 é um fragmento Fab

e: Quando usados como monoterapia, 12% dos pacientes responderam com HAHA contra o Humira. Em conjunto com o uso de metotrexato, <1% dos pacientes desenvolveram HAHA.

FONTE: Swann et al., 2008.

Atualmente, 132 produtos estão em desenvolvimento e 21 já possuem a aprovação dos órgãos competentes nos Estados Unidos e União Européia (Tabela 3), sendo que os huAcMos perfazem 42% dos produtos em desenvolvimento e 52% dos produtos aprovados para uso (SWANN, TOLNAY *et al.*, 2008).

Tabela 3: Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados pelos órgãos competentes dos Estados Unidos e União Européia.

* Voluntariamente retirado do mercado em abril de 2009.

Marca / Nome genérico	Antígeno	Tipo	Categoria Terapêutica	Ano de Aprovação
Orthoclone OKT3 (MuronomabCD3)	CD3	Murino	Rejeição a transplantes	1986
ReoPro T (Abciximab)	gpIIb/IIIa	Quimérico	Prevenção da coagulação sanguínea	1994
Rituxan (Rituximab)	CD20	Quimérico	Linfoma Non-Hoodgkins	1997
Zenapax (Daclizumab)	IL-2 Receptor	Humanizado	Rejeição a transplantes	1998
Simulect (Basiliximab)	IL-2 Receptor	Quimérico	Rejeição a transplantes	1998
Synagis (Palivizumab)	RSV	Humanizado	Anti-respiratory syncytial virus	1998
Remicade (Infliximab)	TNF- α	Quimérico	Artrite	1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her-2	Humanizado	Câncer de mama	1998
Mylotarg (Gemtuzumab)	CD33	Humanizado	Leucemia	2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia	2001
Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	CD20	Murino	Linfoma Non-Hoodgkins	2002
Xolair (Omalizumab)	IgE-Fc	Humanizado	Asma alérgica	2002
Humira (Adalimumab)	TNF- α	Humano	Artrite	2003
Bexxar (Tositomomab-I131)	CD20	Murino	Linfoma Non-Hoodgkins	2003
Raptiva (Efalizumab) *	CD11a	Humanizado	Psoríase	2003
Erbix (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer	2004
Avastin (Bevacizumab)	VEFG	Quimérico	Câncer colorretal	2004
Tysabri (Natalizumab)	TNF- α	Humanizado	Esclerose Múltipla	2004
Lucentis (Ranibizumab)	VEFG	Humanizado	Degradação Macular	2005
Lymphacide (Epratuzumab)	CD22	Humanizado	Linfoma Non-Hoodgkins	2005
Antegren (Natalizumab)	SAM	Humanizado	Esclerose Múltipla	2005
HuMax-IL-15	IL-15	Humano	Inflamação e Artrite	2007
ABT-874	IL-12	Humano	Psoríase	2007
CAT-213	Protein eatoxin 1	Humano	Alergia	2008
HuMaxCD4	CD4	Humano	Linfoma	2008

FONTE: Adaptado de Nelson e Reichert, 2009.

Além dos AcMos citados acima, três fragmentos Fab (vide figura 5A) de anticorpos possuem aprovação do FDA para o uso terapêutico (Tabela 4) e cinquenta e quatro candidatos com conformações diversas já estão em fase de testes clínicos (NELSON E REICHERT, 2009).

Tabela 4 - Fragmentos de anticorpos aprovados até o momento pelo FDA.

Nome Oficial	Nome Genérico	Empresa	Descrição	Categoria Terapêutica	Aprovação
ReoPro	Abciximab	Centocor/Eli Lilly	Anti-GPIIb/IIIa, Fab quimérico, IgG-κ	Cardiovascular	1994
Lucentis	Ranibizumab	Genentech	Anti-VEGF-A, Fab humanizado, IgG-κ	Oftalmológico	2006
Cimzia	Certolizumab pegol	UCB	Anti-TNF-α, PEGylated, Fab humanizado	Imunológico	2008

FONTE: Nelson e Reichert, 2009.

Como característica comum aos fragmentos de anticorpos que atualmente estão em fase de testes clínicos está a ausência de região Fc, o que lhes confere a ausência de função efetora, e atuam como bloqueadores de ação de moléculas biológicas. Vinte e quatro desses fragmentos são conjugados com moléculas funcionais, como radioisótopos ou citotoxinas.

Assim como os AcMos completos, as principais aplicações terapêuticas dos fragmentos de anticorpos em desenvolvimento são imunológicas e oncológicas, mas outras áreas de atuação estão sendo exploradas como as aplicações nas doenças cardiovasculares/hematopoiéticas, infecciosas e oftálmicas (NELSON e REICHERT, 2009).

Em desenvolvimento encontram-se também fragmentos de anticorpos com manutenção de suas funções efetoras pela manutenção de sua região Fc, sendo que esta pode ser geneticamente alterada (por exemplo, retirada de um dos domínios da cadeia constante), de forma a reduzir as respostas imunológicas conseqüentes dos tratamentos terapêuticos com AcMos. A escolha do perfil da função efetora de um

anticorpo terapêutico pode ser definida pela análise prévia do alvo, estratégia terapêutica e uso clínico (CARTER, 2006).

O OKT3 murino, ainda que tenha resposta clínica comprovada na reversão da rejeição de transplantes (ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP, 1985), elicita a síndrome de liberação de citocinas na primeira dose, na maioria dos casos. Esse efeito decorre principalmente da função efetora decorrente do isotipo IgG_{2a} murino. Estudos *in vitro* também mostraram atividade mitogênica do anticorpo (Van WAUNE, et al., 1980). Como parte da estratégia da humanização de anticorpos anti-CD3, variantes de isotipos foram construídos e testados *in vitro*, demonstrando manutenção da ligação ao antígeno e diminuição das respostas efetoras tipo ativação do sistema complemento e de liberação de citocinas. Alterações na região Fc do OKT3 com o uso de isotipos diferentes de IgG ou a retirada de fragmentos da região constante da molécula resultaram na diminuição de sua ação mitogênica (XU, ALEGRE *et al.*, 2000; BELMAR *et al.*, 2009).

1.2.7 Humanização de Anticorpos

Diferentes metodologias foram desenvolvidas objetivando a obtenção de anticorpos humanizados. As metodologias baseiam-se no rearranjo e uso da sequência codificadora humana similar ao anticorpo murino como arcabouço para os CDRs murinos, esta técnica é conhecida com “best fit” ou do “melhor encaixe” ((RIECHMANN et al, 1988, CO e QUEEN, 1991)

O método atualmente mais utilizado para obtenção de anticorpos humanizados é realizado pela união da região constante de uma imunoglobulina humana a uma região variável desenhada de forma que sua sequência seja a mais próxima possível de uma Fv de anticorpo humano. As cadeias pesada e leve variáveis são redesenhadas baseando-se em regiões variáveis leve e pesada da imunoglobulina humana homóloga à imunoglobulina murina. Uma fração variável, com atividade preservada, é conseguida pelo transplante das CDRs do anticorpo murino para o anticorpo humano (MARANHÃO

E BRÍGIDO, 2001) (Figura 11). Um dos desafios dessa técnica é a preservação da ligação com o antígeno.

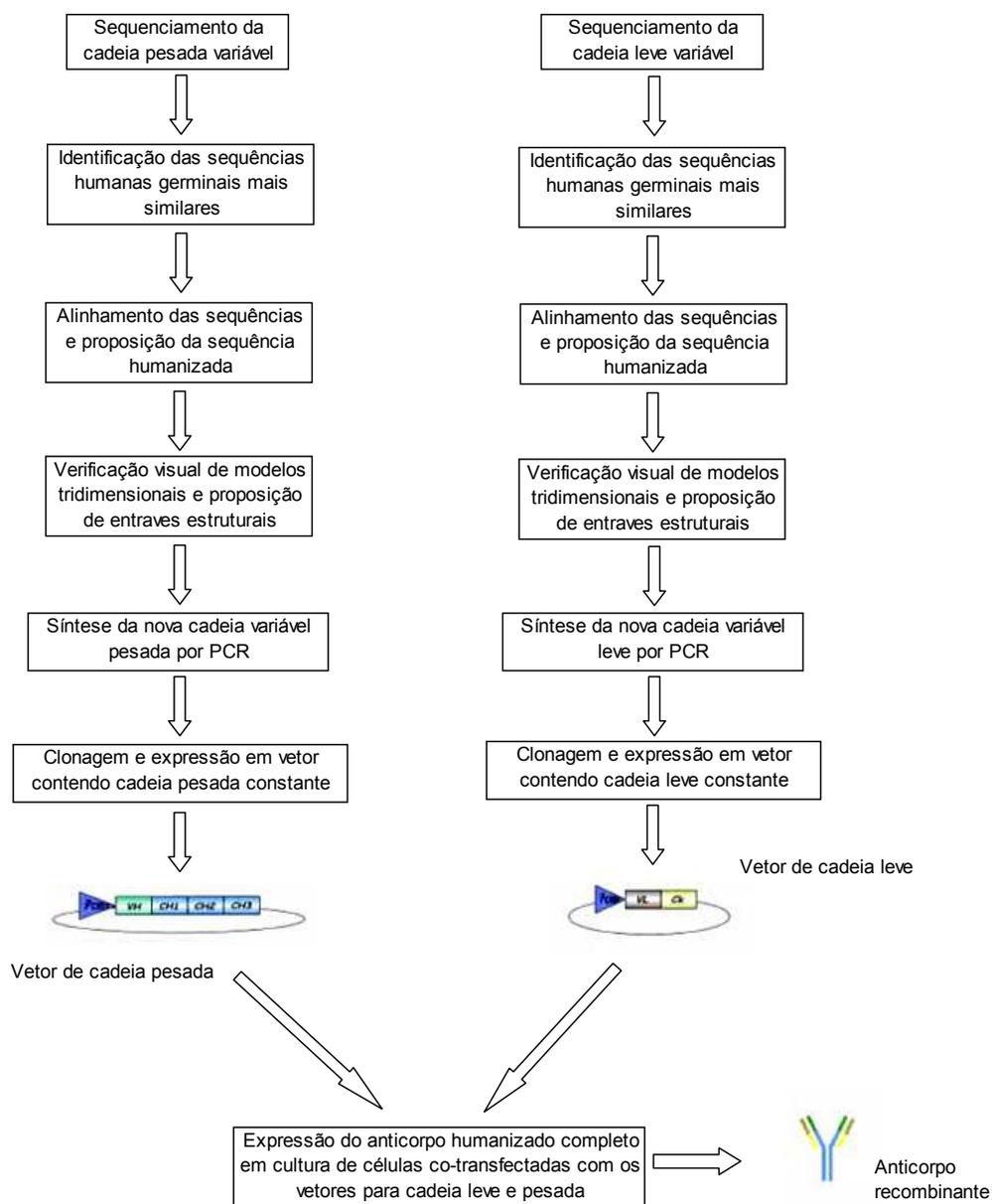


Figura 11 - Esquema geral de humanização de anticorpos.
FONTE: www.unb.br/.../anticorpos_humanizados.html.

O projeto de obtenção de huAcMos foi iniciado por colaboração entre a Dra. Ana Maria Moro (Instituto Butantan, IBU) e o Dr. Marcelo M. Brígido (Universidade de Brasília, UnB), sendo que os AcMos anti-CD18 e anti-CD3 murinos, já produzidos no IBU, tiveram suas sequências gênicas humanizadas na UnB.

O processo utilizado para a humanização dos anticorpos utilizou o transplante dos CDRs murinos para o arcabouço de uma IgG humana. Para a humanização dos anticorpos anti-CD18 e anti-CD3 foram utilizados os hibridomas produtores dos mesmos como doadores dos CDRs, 6.7 (DAVID, LECA *et al.*, 1991) e OKT-3 (CRL 8001), respectivamente.

Nos dois casos a humanização foi iniciada pelo seqüenciamento da cadeia pesada variável (V_H) dos AcMos. Utilizando pesquisas em bancos de dados (Swissprot, GenBank) foram encontradas as sequências germinativas humanas mais similares às cadeias pesadas do AcMo murino. Com o alinhamento das sequências, a cadeia pesada foi totalmente sintetizada por PCR e clonada no vetor que continha o scFv (do inglês, *single chain variable fraction*), substituindo a cadeia pesada variável murina. Desta forma, cada cadeia variável era analisada para verificação da manutenção da especificidade pela expressão deste fragmento hemi-humanizado em *Pichia pastoris*.

Uma vez verificada a especificidade da cadeia pesada, o mesmo procedimento era realizado para a cadeia leve do anticorpo.

Para a obtenção da molécula inteira dos huAcMos, as regiões variáveis humanizadas foram clonadas nas regiões constantes de uma IgG1 humana amplificada de biblioteca de baço humano comercial (CALDAS, COELHO *et al.*, 2000; RUGGIERO, 2002; CALDAS, COELHO *et al.*, 2003).

Durante os processos de humanização dos AcMos anti-CD18 e anti-CD3 foram originados fragmentos de anticorpos chamados FvFc (Fv de cadeia única fusionada a região Fc de IgG1) (Figura 12). Esses fragmentos foram inicialmente expressos em *Pichia pastoris* e utilizados para caracterização das atividades de ligação.

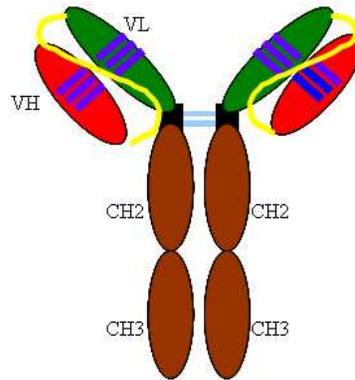


Figura 12 - Estrutura do fragmento FvFc, a fração variável (Fv) de cadeia única é fusionada a fração constante (Fc) de uma IgG1.
 FONTE: Prof. Marcelo Brígido.

1.3 Marcador de Superfície CD18

O marcador de superfície CD18 está presente em leucócitos do sangue periférico, sendo parte de um complexo protéico de adesão (LFA-1), essencial nas respostas imunes dependentes de contato célula-célula. É membro da subfamília de receptores de integrinas (heterodímeros de superfície celular constituídos por cadeias α e β ligadas não covalentemente) que possuem como função interagir com uma extensa variedade de ligantes e assim integrar o ambiente extracelular com o citoesqueleto da célula. A família $\beta 2$ integrinas, também conhecidas por leuointegrinas, é formada por três heterodímeros que usam a cadeia β , denominada CD18, associada não covalentemente a três diferentes cadeias α (α CD11a, α CD11b e α CD11c), formando três diferentes integrinas : LFA-1, MAC-1 e p150,95. As leuointegrinas são diferencialmente expressas em diferentes leucócitos e regulam a interação dessas células com outros leucócitos e células endoteliais (HSIAO, BAJORATH *et al.*, 1994).

1.3.1 Mecanismos de Ação do AcMo anti-CD18

O LFA-1 apresenta uma variedade de funções como adesão leucocitária, estimulação da célula T *helper*, mediação da destruição de células-alvo e adesão a vasos do endotélio (ABBAS, 2008).

Em locais de inflamação, onde os vasos estão dilatados, o fluxo lento de sangue permite que os leucócitos se movam para fora e interajam com o endotélio vascular; este processo é conhecido por extravasamento. LFA-1 e MAC-1 normalmente aderem fracamente a proteoglicanos da superfície celular endotelial, mas IL-8 ou outras quimiocinas interagem juntamente com os proteoglicanos provocando mudanças conformacionais nas moléculas LFA-1 e MAC-1 presentes nos leucócitos, aumentando suas propriedades adesivas. Além disso, atuam quando ocorre o extravasamento de leucócitos ou quando os mesmos quebram a barreira endotelial (Figura 13).

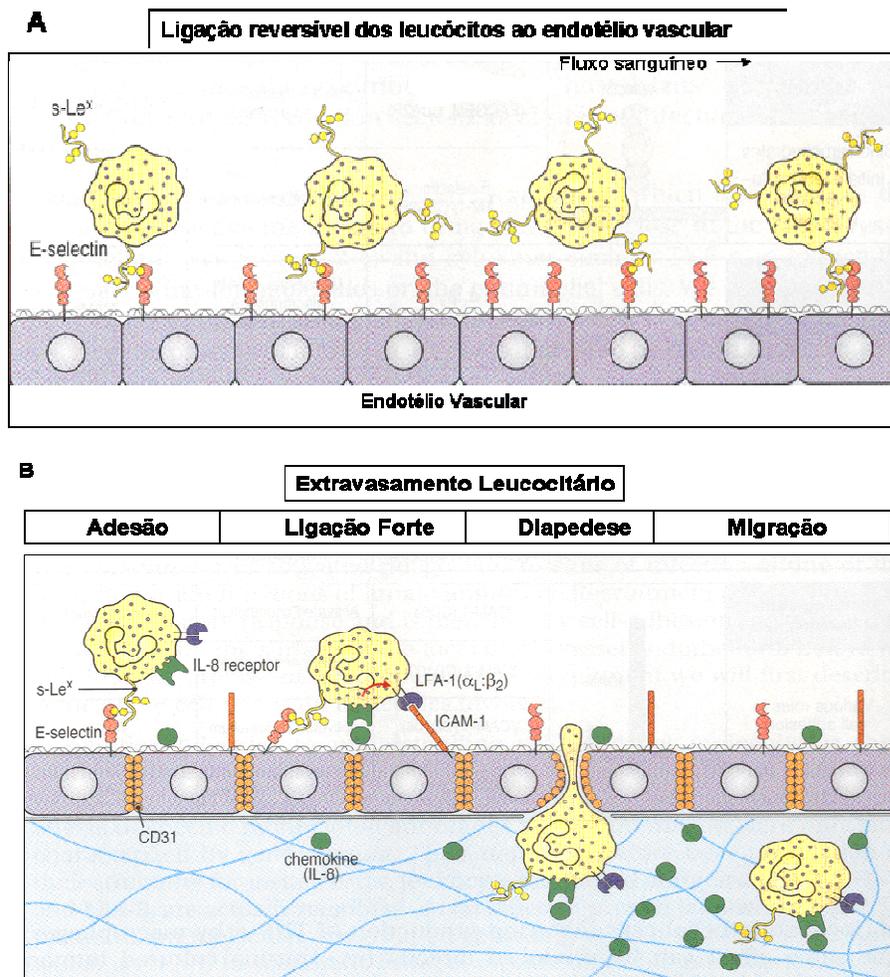


Figura 13 – Mecanismo de ação do anti-CD18. A) Em condições normais, os leucócitos do sangue periférico estão presentes em pequenos vasos, onde o fluxo sanguíneo é rápido e se ligam fracamente aos receptores de membrana. B) Em processos inflamatórios, onde os vasos sanguíneos estão dilatados, o fluxo mais lento de sangue permite a interação com o endotélio vascular e o extravasamento dos leucócitos para fora dos vasos sanguíneos.

FONTE: Janeway *et al.*, 2001.

A ligação do anticorpo anti-CD18 ao seu antígeno, presente no complexo LFA-1, inibe processos inflamatórios em geral devido à sua atuação como bloqueador do seu receptor; reduzindo a infiltração linfocitária em tecidos inflamados, a capacidade de migração de macrófagos e a interferência na arregimentação dos linfócitos que deixam a corrente sanguínea e penetram no local do processo inflamatório.

Dois conceitos demonstram a participação das $\beta 2$ integrinas nas respostas inflamatórias de injúrias tissulares: a) níveis elevados de MAC-1 de leucócitos na circulação e tecidos, e de ICAM-1 em modelos de tecidos inflamatórios; b) efeito anti-inflamatório potente dos anticorpos monoclonais dirigidos ao CD11/CD18 ou seus ligantes em modelos animais de inflamação (JANEWAY, 2001).

1.3.2 Aplicações Terapêuticas do AcMo anti-CD18

Quando testado em modelos animais, o AcMo murino anti-CD18, apresentou sucesso na redução de:

- Inflamações cutâneas, com a diminuição da migração de polimorfonucleares (PMN) e da permeabilidade vascular (GAHMBERG, NORTAMO *et al.*, 1992);
- Edemas (LINDBOM, LUNDBERG *et al.*, 1990);
- Inflamações pulmonares, reduzindo a migração de PMN para o tecido pulmonar e a permeabilidade vascular, inibindo assim a migração de neutrófilos (CHINGNARD, 1996);
- Queimaduras (BUCKY, VEDDER *et al.*, 1994);
- Disseminação de células cancerígenas (JOHNSON, STADE *et al.*, 1989);
- Seqüelas neurológicas da meningite bacteriana, evitando danos ao Sistema Nervoso Central (SNC) e reduzindo a mortalidade (TUOMANEN, 1993);
- Rejeição a enxertos (VEDDER, WINN *et al.*, 1990).

1.4 O Complexo Protéico CD3

Os receptores de antígenos das células T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*) são complexos multiprotéicos formados por cadeias variáveis de ligação ao antígeno (TCR α e TCR β) que se associam a outras proteínas funcionais.

Essas cadeias possuem papel importante no transporte dos receptores na superfície celular e na iniciação da sinalização quando os antígenos lhes são apresentados.

A sinalização para o reconhecimento de antígenos depende da presença de sequências de aminoácidos presentes nas cadeias α e β chamadas de Motivos de Ativação de Imunorreceptor Baseados em Tirosina (ITAMs, do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Inicialmente foram descobertas nas caudas citoplasmáticas das cadeias variáveis, mas agora se sabe que estão presentes nas cadeias acessórias que fazem parte do complexo TCR e também nos receptores Fc dos macrófagos, monócitos e células NK, que se ligam às regiões constantes dos anticorpos. Os ITAMs são compostos por dois resíduos de Tirosina separados por 9 a 12 aminoácidos.

Além das cadeias TCR α e TCR β , estão presentes cadeias protéicas acessórias chamadas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ que possuem um domínio de imunoglobulina extracelular e um ITAM cada em suas caudas citoplasmáticas; são codificadas em genes adjacentes e necessárias para a expressão dos heterodímeros α e β na superfície da célula T (ABBAS, 2008) (Figura 14).

A cadeia protéica chamada CD3 ξ está presente como homodímero longo e intracitoplasmático, e é utilizada para a obtenção do maior nível de expressão do TCR e para máxima sinalização do receptor. Ela se distingue das demais por possuir um curto domínio extracelular e 3 ITAMs no domínio citoplasmático (JANEWAY, 2001).

As proteínas do complexo CD3 estão associadas de forma não-covalente ao heterodímero TCR e quando este reconhece o antígeno, essas proteínas transduzem os sinais que levam à ativação funcional das células T por processos bioquímicos (ABBAS, 2008).

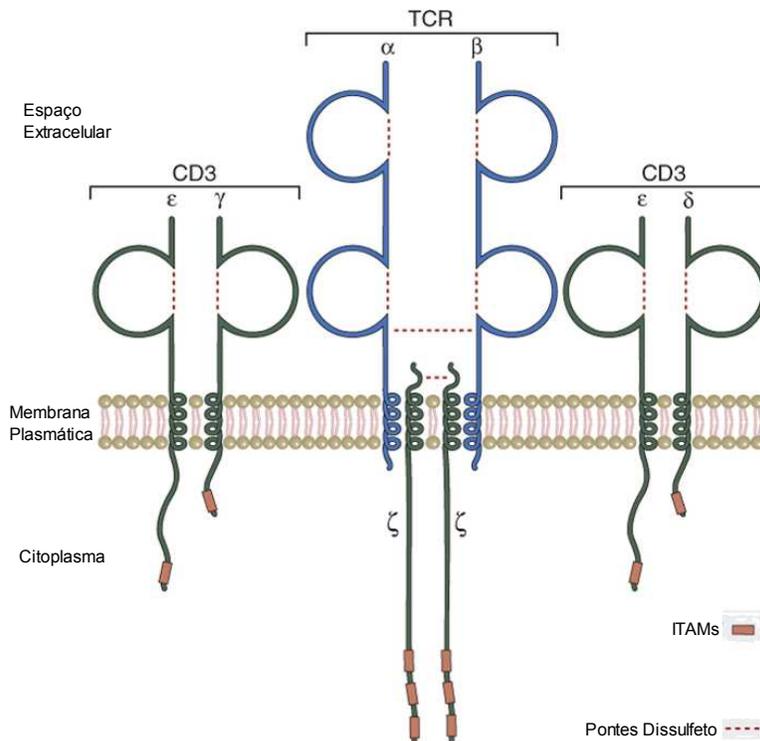


Figura 14 – Complexo proteico CD3. O heterodímero $\alpha:\beta$ receptor de células T (TCR) está associado com o complexo de quatro cadeias (duas ϵ , uma δ e uma γ) que formam o complexo CD3 e é responsável pela expressão das cadeias de ligação ao antígeno e sinalização.

FONTE: Elsevier. Abbas et al. <www.studentconsult.com>.

1.4.1 Mecanismo de Ação do anticorpo anti-CD3

Anticorpos monoclonais terapêuticos específicos para células T podem atuar por quatro mecanismos distintos: revestimento celular, depleção das células T, regulação negativa do TCR e alteração na sinalização (Figura 15). O desencadeamento de determinado modo de ação dependerá da especificidade do anticorpo e também do seu isotipo.

Estudos de cristalografia estrutural demonstraram que a ligação do OKT3 ao seu antígeno ocorre de forma oblíqua à cadeia CD3 ϵ (KJER-NIELSEN, DUNSTONE *et al.*, 2004) e altera os sinais de transdução das células T, tornando-as incapazes de reconhecer o antígeno a que está sendo apresentada.

Modelos animais demonstraram que o anti-CD3 ao se ligar ao FcR induz uma depleção parcial (40-50%) dos linfócitos T presentes no sangue periférico, pela sua função efetora, que é capaz de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (Figura 15b).

Apesar dos mecanismos de revestimento e depleção poderem ser desencadeados pelos anticorpos CD3-específicos, os modos de ação mais comumente associados à ação desses anticorpos são a regulação negativa do TCR e a alteração na sinalização celular.

A regulação negativa do TCR é observada em células CD3+ que não são depletadas, mas perdem a expressão do TCR e das cadeias protéicas CD3. Isto ocorre como resultado de internalização do complexo protéico TCR-CD3 mediada por anticorpos anti-CD3 específicos, o que não afeta a expressão de outras moléculas da superfície celular, mas torna as células imunoincompetentes (Figura 15c).

A sinalização celular é dependente da região variável da região de ligação ao antígeno da molécula de imunoglobulina, e ocorre com a ligação simultânea do anti-CD3 a uma célula alvo e uma célula T citotóxica, gerando uma transdução de sinal direta para a indução da apoptose celular (Figura 13d). A sinalização celular também pode levar a um estado de anergia clonal, ou seja, incapacidade do organismo de reagir a um determinado patógeno (CHATENOUD e BLUESTONE, 2007).

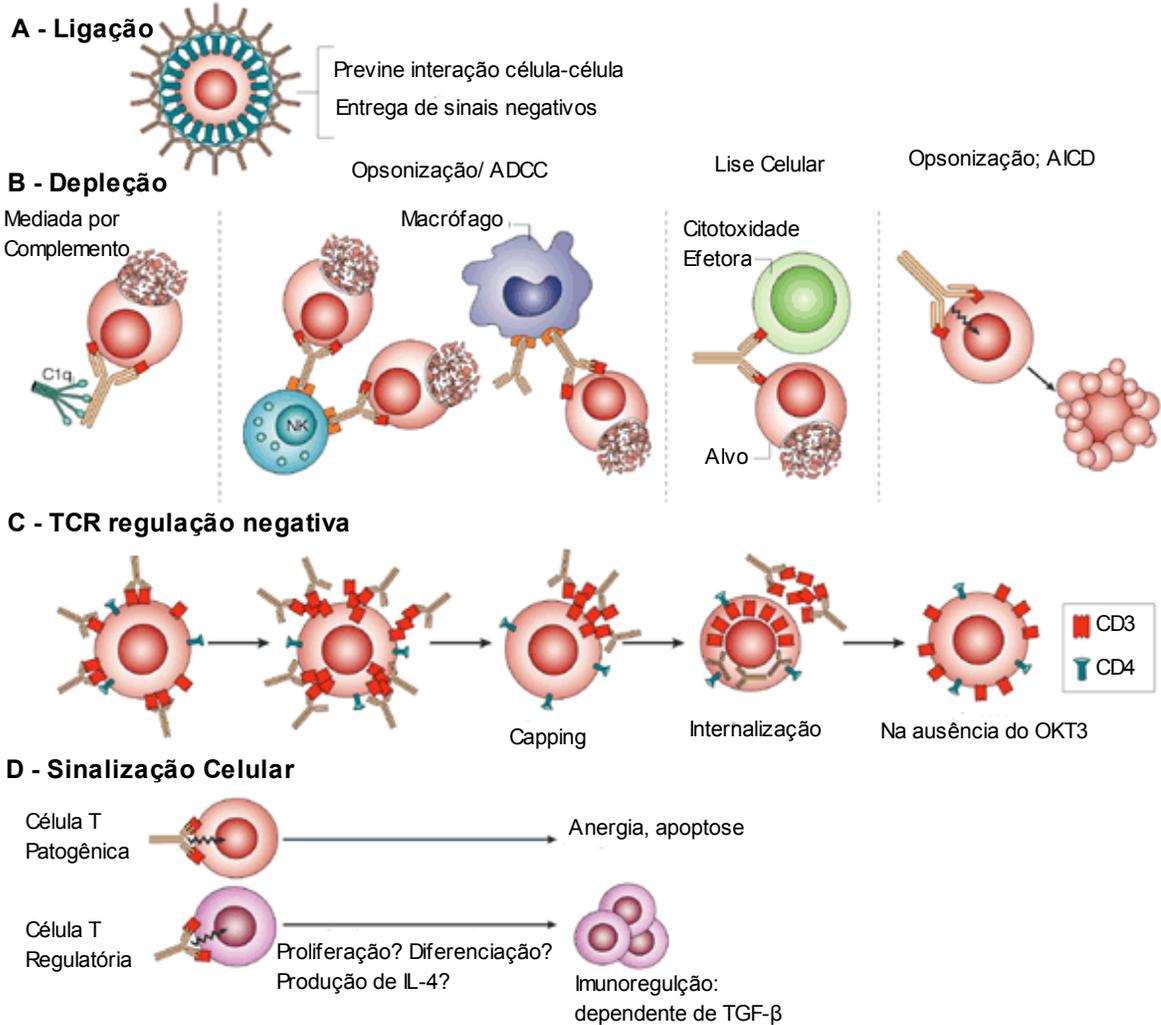


Figura 15 – Propostas de Mecanismos de ação de AcMos terapêuticos para células T. **A)** Revestimento: principal modo de ação dos anticorpos monoclonais específicos para o marcador CD4, **B)** Depleção: para anticorpos CD3-específicos ocorre pelo ADCC, **C)** Regulação Negativa: internalização do complexo antígeno-anticorpo, o que gera imunoincompetência celular, **D)** Ligação simultânea do anticorpo a uma célula alvo e uma célula T citotóxica, o que gera indução da apoptose celular.

FONTE: Chatenoud, L., 2003.

1.4.2 Aplicações Terapêuticas AcMo anti-CD3

O anticorpo murino OKT3 foi o primeiro a ter seu uso clínico aprovado para aplicação na rejeição a transplantes. O estudo inicial da utilização do OKT3 mostrou que a reversão da rejeição ocorreu mais rapidamente, com maior frequência da taxa de melhora após um ano da sobrevivência do rim transplantado. (ORTHO MULTICENTER TRANSPLANT STUDY GROUP, 1985). Pouco tempo após o início do uso clínico, tendo sido avaliados os resultados de eficiência terapêutica, modo de ação e efeitos colaterais, surgiram novas perspectivas de aplicações para anticorpos anti-CD3 e extensão do seu uso (CHATENOUD E BACH, 1992). O OKT3 continua a ser utilizado, evidenciando que a baixa incidência de rejeição no grupo tratado com OKT3 é relevante e valida o uso da terapia com anticorpo em períodos logo após a cirurgia, mesmo na era de imunossupressão de base mais sofisticada (HENRY *et al.*, 2001).

No Instituto Butantan (grupo coordenado pela Dra. Ana Maria Moro) um anticorpo monoclonal anti-CD3 (CRL 8001) está sendo produzido desde a década de 90, com utilização em estudos clínicos tanto na reversão da rejeição como de forma profilática em transplantados renais. Os hibridomas são cultivados em biorreatores, purificados e analisados pelas técnicas pertinentes de controle de qualidade. Atendendo às normas internacionais das agências regulatórias, o hibridoma foi adaptado para crescimento em meio livre de soro (MORO, RODRIGUES *et al.*, 1994). Os resultados clínicos do uso do anti-CD3 Butantan, obtidos sob a coordenação do Prof. Jorge Kalil (InCor/SP), foram publicados recentemente, com seguimento de 10 anos após o uso em pacientes de transplante renal (LEMOS, MORO *et al.*, 2003).

A possibilidade de extensão do uso de anticorpos anti-CD3 requer que esses anticorpos sejam humanizados porque, diferente do quadro agudo de rejeição celular de transplantes, quando o seu uso é limitado em poucos dias para reversão do quadro, outras aplicações podem requerer usos mais prolongados e talvez repetidos, aumentando as chances de geração de imunogenicidade. Diversas patologias estão sendo tratadas com diferentes anti-CD3, apresentando sucesso nos testes pré-clínicos e clínicos (Tabela 5).

Tabela 5 - Principais aplicações terapêuticas do OKT3.

Aplicação Terapêutica	Fase de Estudo	Referências
Doença de Crohn	Testes Clínicos – Fase I	(D'HAENS e DAPERNO, 2002)
Encefalomiocardite autoimune	Testes pré-clínicos	(TRAN, CARTER <i>et al.</i> , 2001; KOHM, WILLIAMS <i>et al.</i> , 2005; OCHI, ABRAHAM <i>et al.</i> , 2006)
Artrite Psoríaca	Testes Clínicos – Fase I/II	(UTSET, AUGER <i>et al.</i> , 2002)
Transplante renal	Testes Clínicos – Fase I	(NORMAN, VINCENTI <i>et al.</i> , 2000)
Tranplante de ilhota pancreática	Testes pré-clínicos	(HARLAN e Von HERRATH, 2005)
GVHD	Testes Clínicos – Fase I	(CARPENTER, APPELBAUM <i>et al.</i> , 2002; CARPENTER, LOWDER <i>et al.</i> , 2005)
Diabetes Tipo I	Testes Clínicos – Fases II/III	(HARLAN e Von HERRATH, 2005) (AKIRAV, KUSHNER <i>et al.</i> , 2008)
Lupus Eritomatoso	Testes pré-clínicos	(BIJL, HORST <i>et al.</i> , 2001)

1.5 Expressão Heteróloga de Anticorpos

Para a expressão das seqüências humanizadas das cadeias pesada e leve de anticorpos é necessária uma célula hospedeira que seja capaz de expressar estas seqüências e sintetizar a molécula.

Uma série de fatores deve ser levada em consideração na escolha do melhor sistema de expressão para moléculas complexas como os anticorpos. As principais características a serem ponderadas são: estrutura da molécula, importância dos

carboidratos, facilidade de expressão, produtividade, métodos de purificação e custo total do processo (CHADD e CHAMOW, 2001).

Para as moléculas inteiras de anticorpos, a manutenção da função efetora e a farmacocinética são características que devem ser priorizadas na escolha do sistema de expressão. Para que sejam ativos *in vivo*, os anticorpos necessitam de modificações pós-traducionais, sendo a principal delas a glicosilação, ou seja, adição de açúcares à sua estrutura.

As regiões Fc, responsáveis pela função efetora da molécula, são compostas por regiões de arcabouço intercadeias intercaladas por pontes dissulfeto no domínio C_H2, onde se encontra o principal ponto de glicosilação da molécula, na sua região N-terminal, e onde ocorre a adição da Asparagina 297 (Asn297) e a partir da qual serão adicionados resíduos de açúcares até a interface dos domínios C_H2/C_H3 (Figura 16).

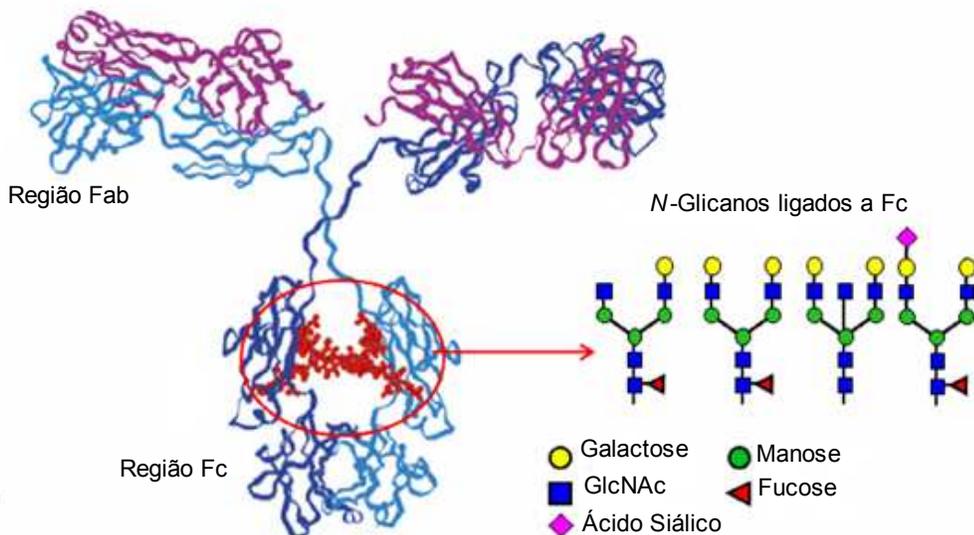


Figura 16 - N-glicanos típicos da região Fc de imunoglobulina que são ligados à Asn297.
FONTE: <http://www.virdante.com/images/pic2.jpg>.

A estrutura glicídica mais comumente observada em uma isoforma de IgG é a de octossacarídeo, tendo fucose no resíduo N-acetilglicosamina (GlcNac) primário. A possibilidade de adição de galactose e do ácido siálico, contribuem para a geração de glicofomas múltiplas de IgG (mais de quarenta estão presentes no soro humano).

A glicosilação da região Fc contribui para a estabilidade e atividade biológica das moléculas de anticorpo e as reações efetoras mediadas pela sua ligação ao FcR se mostram extremamente comprometidas para isoformas de IgG aglicosiladas ou deglicosiladas.

1.5.1 Fermentação Bacteriana

A fermentação bacteriana é limitada a fragmentos de anticorpos sem função efetora ou com atividade farmacocinética limitada por não possuírem o maquinário celular necessário para glicosilar proteínas.

Apesar do custo do processo ser baixo, o nível de expressão alcançado nos sistemas bacterianos pode ser alto (CHADD e CHAMOW, 2001).

1.5.2 Animais e plantas transgênicos

Os camundongos transgênicos (XenoMouse, HuMAb-Mouse) foram geneticamente modificados e tiveram seus genes produtores de anticorpos inativados e trocados por genes humanos. Quando estes animais são imunizados com o antígeno de interesse, gera anticorpos “quase totalmente humanos” com altos níveis de afinidade e especificidade; o obstáculo desta metodologia continua sendo a glicosilação murina (Figura 17) (BERGER, SHANKAR *et al.*, 2002).

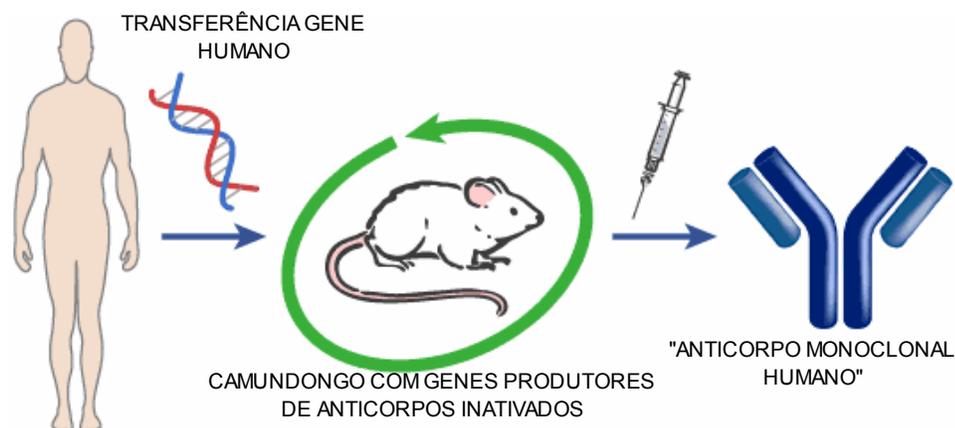


Figura 17 - Metodologia de obtenção de anticorpos por meio de animais transgênicos. Apesar dos genes serem totalmente humanos as modificações pós-traducionais continuam sendo murinas, o que pode acarretar respostas imunológicas HAMA.
 FONTE: <http://www.medarex.com/Development/UltiMAb.htm>.

As plantas transgênicas apresentam altos níveis de expressão, baixo custo de processo produtivo e não apresentam patógenos humanos, mas apresentam limitações de aplicabilidade por possuírem padrões de glicosilação diferentes dos mamíferos, acrescentando glicanas potencialmente imunogênicas ao homem. Anticorpos recombinantes produzidos por plantas podem induzir respostas imunológicas indesejáveis (CHARGELEGUE, VINE *et al.*, 2000; HOOD, WOODARD *et al.*, 2002) e até o momento nenhum anticorpo produzido em plantas foi aprovado para uso clínico pelo órgãos competentes.

1.5.3 Células de Mamíferos

As diferenças com relação à glicosilação acarretam a perda da estabilidade e rápido *clearance* das moléculas recombinantes (WURM, 2004).

As células de mamíferos, mais utilizadas para expressão de proteínas heterólogas, possuem padrões de modificações pós-traducionais aceitos para uso humano. Esta característica lhes permite a manutenção da fidelidade molecular,

característica importante para a estabilidade da proteína recombinante e também para sua ligação ao antígeno.

A escolha de linhagens celulares de mamíferos, para a expressão de proteínas recombinantes, deve ser baseada em características e necessidades específicas de cada linhagem:

- Expressão eficiente de genes exógenos (processamento transcricional e pós-transcricional, síntese protéica, secreção);
- Modificações pós-traducionais (glicosilação, fosforilação);
- Cultivo celular (soro, fatores de crescimento);
- Comportamento no cultivo em larga-escala (crescimento em alta densidade, processos de aeração, produção de compostos tóxicos);
- Crescimento celular (crescimento rápido em baixa densidade e crescimento lento em alta densidade).

Existem duas formas de expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos: transiente e estável.

Na forma transiente, o DNA exógeno é mantido no citoplasma celular e apresenta grande vantagem na obtenção rápida (dois a sete dias) de massa protéica para análise prévia. As células mais freqüentemente utilizadas neste processo são COS (do inglês, *Kidney Cells of African Green Monkey*) e HEK293 (do inglês, *Human Embryonic Kidney*), apresentam altas taxas de transfecção com métodos simples, facilidade de adaptação ao cultivo em suspensão na ausência de soro e escalonamento com custo baixo (BALDI, HACKER *et al.*, 2007). Esta metodologia é amplamente utilizada para a expressão de diversos huAcMos, até mesmo para fases de testes clínicos (GIRARD, DEROUAZI *et al.*, 2002; LINDELL, GIRARD *et al.*, 2004).

O processo de obtenção de linhagens estáveis de expressão demanda períodos longos de tempo e é bastante laborioso, mas a possibilidade de integrar o DNA de interesse de forma estável, ou seja, no genoma celular, garante a produção por longos períodos, a reprodutibilidade do processo e a expressão gênica definida.

As linhagens que apresentam maiores sucessos nesta forma de expressão são as NS0 (célula de mieloma murino) e CHO (do inglês, *Chinese Hamster Ovary Cells*). Apresentam plataformas tecnológicas bem caracterizadas e permitem a transfecção, amplificação e seleção de clones altamente produtores (BUTLER, 2005).

Para a obtenção de clones estáveis e altamente produtores de moléculas complexas como os anticorpos, são necessários investimentos em tecnologias “estado da arte” como o desenvolvimento de vetores de expressão, marcas eficientes de seleção e amplificação, integração sítio-dirigida do DNA exógeno no genoma celular e metodologias “*high-throughput*” de clonagem celular.

1.5.4 Vetores de Expressão

Após a integração do DNA no genoma celular, o nível e o tempo de expressão do gene de interesse dependerão do promotor utilizado no vetor. Para a expressão constitutiva, os promotores mais utilizados são os de CMV (citomegalovirus) e SV40 (do inglês, *Simian Virus 40*).

Visando a obtenção de altos níveis de expressão, elementos reguladores podem ser usados (introns, antirepressores, etc.). Apesar de não serem exigidos para expressão eucariótica, a adição de introns genéricos no cDNA de interesse pode aumentar dramaticamente a expressão do gene, aumentando também a eficiência do transporte citoplasmático e a tradução do RNAm durante o *splicing* (LE HIR, NOTT *et al.*, 2003).

No caso dos anticorpos, o fato da cadeia pesada ser incapaz de ser secretada para fora do Retículo Endoplasmático (RE) deve ser levado em consideração. A liberação da cadeia pesada só ocorre quando está associada à cadeia leve; mas esta por sua vez, pode ser secretada como monômero. Como consequência, a superexpressão da cadeia pesada pode acarretar citotoxicidade celular, tornando importante existir uma equimolaridade entre a expressão das cadeias do anticorpo para

a montagem da molécula. A utilização de vetores separados para a expressão das cadeias do anticorpo torna-se por este motivo menos eficiente (WURM, 2004).

A utilização do IRES (do inglês, *Internal Ribosome Entry Sites*) trouxe avanços para os problemas de equimolaridade das cadeias de IgG, permitindo a co-expressão dos genes das cadeias pesada e leve do anticorpo a partir do mesmo mRNA. Seu uso não está restrito à utilização com os genes de interesse, pode ser utilizado também para que seja transcrito no mesmo RNAm um gene de resistência para a seleção das células de interesse.

1.5.5 Sítios de Integração

A integração do DNA exógeno no genoma celular ocorre de forma randômica o que altera significativamente a variabilidade clonal com relação ao nível e a estabilidade da expressão (HUANG, LI *et al.*, 2007). A integração em locais inativos de heterocromatina resulta em expressão baixa ou nula da proteína de interesse, mas quando este é integrado em regiões ativas de eucromatina a expressão é alcançada apesar de não garantir a sua estabilidade por períodos longos.

A expressão pode ser rapidamente silenciada, devido aos efeitos de posicionamento. Dentre os motivos mais comuns para o silenciamento gênico estão: hipoacetilação das histonas, metilação da lisina 9 da histona H3 e aumento na metilação de CpG na região promotora do transgene (RICHARDS e ELGIN, 2002; MUTSKOV e FELSENFELD, 2004). Elementos antirepressores capazes de evitar as modificações epigenéticas da cromatina (STARS, do inglês, *Stabilising and Antirepressor*) podem ser usados para flanquear os transgenes, de forma a afetar a extensão da metilação e os padrões de deacetilação das histonas (KWAKS, BARNETT *et al.*, 2003).

Uma alternativa para minimizar os efeitos de posicionamento é direcionar a integração dos genes de interesse para locais que suportem os padrões de expressão desejados. Para isso, é utilizada a integração sítio-dirigida que ocorre pela

recombinação homóloga entre o vetor contendo os genes de interesse e o sítio conhecido como de alta transcrição do genoma celular; esta recombinação é realizada entre sequências específicas de DNA presentes no genoma celular e na região 5' do gene de interesse que são reconhecidas por enzimas específicas capazes de cortar e religar as regiões, direcionando assim os genes de interesse para locais específicos do genoma celular. Essas enzimas são conhecidas como recombinases (Cre recombinase, fago lambda integrase, Flipase recombinase).

Para a obtenção de um sistema de recombinação homóloga, primeiramente é necessário integrar em um sítio ativo, estável e de alta transcrição uma sequência alvo de recombinação. A medida de expressão de um gene repórter é usada para a seleção da célula candidata. Em um vetor de expressão é inserida a outra sequência alvo que participará da recombinação, juntamente com o gene de interesse. A célula selecionada é então cotransfectada com o vetor de recombinação e um vetor contendo a enzima recombinase. A ação enzimática se responsabilizará pela recombinação sítio-específica das sequências alvo, integrando assim o gene de interesse no local pré-selecionado.

1.5.6 Marcas de Seleção

Para selecionar à partir de uma população celular transfectada apenas as células que tiveram os genes de interesse integrados no genoma, é necessário que concomitantemente seja integrado um gene que confira a essas células resistência a determinada substância (marca de seleção). Desta forma, na presença do agente seletivo, as células que não incorporaram os genes de interesse serão eliminadas, sobrevivendo apenas as células capazes de expressar a proteína.

Os agentes seletivos mais utilizados para seleção de células de mamíferos são: Neomicina, Higromicina e Puromicina (antibióticos) e Glutamina Sintetase (GS) e Dihidrofolato Redutase (DHFR) (enzimas).

O uso do DHFR proporciona o aumento do número de cópias do gene de interesse, desde que este esteja integrado *in tandem* com o mesmo. A seleção e

amplificação dos genes é realizada pela adição do Metotrexato (MTX) ao meio de cultura e é influenciada por concentrações crescentes do agente seletivo; o escopo da metodologia baseia-se no aumento do número de cópias integradas e conseqüentemente no aumento da expressão gênica (BROWNE e AL-RUBEAI, 2007).

Como ônus, o uso do MTX acarreta grandes mutações genéticas nas células submetidas à pressão seletiva. Sua não integração no genoma celular é frequente, ocorrendo a formação de elementos extracromossomais (por exemplo, *double minute chromosome*) que estão intrinsecamente associados à geração de instabilidade e perda de expressão na ausência da pressão seletiva (KAUFMAN, BROWN *et al.*, 1979).

1.5.7 Clonagem celular

Uma das exigências para a produção de proteínas terapêuticas a partir de células recombinantes é a clonalidade da linhagem. Isto é alcançado pelo isolamento de uma célula produtora e ampliação de seu cultivo, formando uma população homogênea que possui teoricamente características genéticas e fenotípicas idênticas.

A maior dificuldade do procedimento está em encontrar, dentro de uma população heterogênea, o clone produtor que apresenta características desejadas como crescimento e robustez. Com o objetivo de obter as linhagens com características de expressão e crescimento desejadas se fazem necessários métodos *high throughput*, de simples execução, confiáveis e de baixo custo.

1.5.7.1 Diluição Limitante

O método mais comumente utilizado para clonagem celular é a Diluição Limitante (LDC, do inglês, *Limiting Dilution Cloning*). Trata-se de uma técnica randômica, laboriosa, de baixa eficiência e que demanda longos períodos de cultivo.

Baseia-se no isolamento de uma única célula a partir de uma população transfectada pela diluição em baixa densidade.

Seu uso é justificado devido ao baixo custo; como principais desvantagens estão: a grande manipulação celular (aumento do risco de contaminação), o tempo necessário de processamento entre a linhagem policlonal e a análise de expressão dos clones isolados que pode chegar a oito meses e as chances de perda de clones altamente produtores devido ao baixo número de células analisadas (BROWNE e AL-RUBEAI, 2007).

Com o desenvolvimento de tecnologias de ponta na área de análise e robótica, surgiram equipamentos automatizados capazes de substituir o método tradicional de LDC.

1.5.7.2 FACS

O FACS (do inglês, *Fluorescent Activated Cell Sorter*) foi inicialmente utilizado para a identificação de antígenos presentes nas membranas celulares. Com o desenvolvimento de anticorpos e alvos conjugados a fluorocromos foi possível sua utilização para o isolamento de clones pela detecção da proteína de interesse na superfície celular.

Alternativas surgiram para a utilização do FACS na detecção de proteínas que são secretadas para o exterior das células. A primeira delas baseia-se na utilização de genes repórteres fluorescentes (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein* e MTX fluorescente, conjugado com FITC, do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate*) (Figura 18).

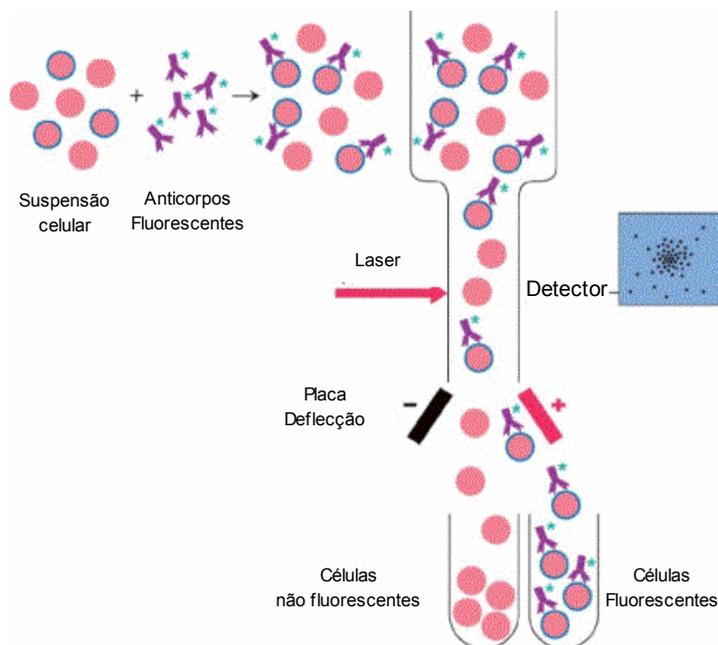


Figura 18 – Descrição metodologia FACS. Os agentes seletivos fluorescentes e conjugados com fluorocromos serão expressos pelas células e gerarão fluorescência intrínseca que será detectada pelo laser do equipamento. As células que apresentarem fluorescência serão isoladas das demais, gerando assim uma população monoclonal.
 FONTE: <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/images/figuree2.jpg>.

No caso dos AcMos, uma otimização metodológica vantajosa é a utilização de dois genes repórteres, cada um co-expresso com uma das cadeias do anticorpo. A integração dos genes das cadeias normalmente ocorre em diferentes cromossomos e a perda de uma delas implica na não funcionalidade da molécula.

Utilizando o FACS para seleção das células que expressam os dois genes repórteres, somente serão isoladas aquelas que expressam a molécula inteira do anticorpo. Yoshikawa *et al.* (YOSHIKAWA, NAKANISHI *et al.*, 2001) aproveitou a permeabilidade do MTX fluorescente para sua ligação quantitativa à enzima DHFR para selecionar e amplificar seus genes de interesse; desta forma correlacionou o número de cópias por meio da maior intensidade de fluorescência com a produtividade de cada célula isolada.

A desvantagem da alternativa citada acima é a utilização para seleção de fluorescência intrínseca, ou seja, não é detectada a molécula do anticorpo propriamente dita e sim a expressão dos genes repórteres.

O fato da molécula de anticorpo ser secretada pela célula impossibilitava o uso do FACS para a seleção clonal. Foi então que surgiu a segunda alternativa com a utilização de metodologias que impedem a difusão da proteína secretada no meio de cultura, retendo-a ao redor da célula secretora.

Este impedimento pode ser feito pelo do encapsulamento (GMT, do inglês, *Gel Microdrop Technology*) ou imobilização em matrix artificial (AMSC, do inglês, *Affinity Matrix Surface Capture*).

O método de encapsulamento requer a utilização de agarose biotinilada que é misturada à cultura transfectada em baixa densidade, a agarose é então emulsificada para a formação de pequenas gotas. Um anticorpo de captura, conjugado com avidina, específico para a proteína de interesse irá se ligar à matriz biotinilada. A proteína secretada será capturada e então detectada por um anticorpo ou antígeno conjugado com fluorescência (Figura 19). A seleção dos melhores clones é feita pelos maiores níveis de intensidade de fluorescência (AKSELBAND, MOEN *et al.*, 2003).

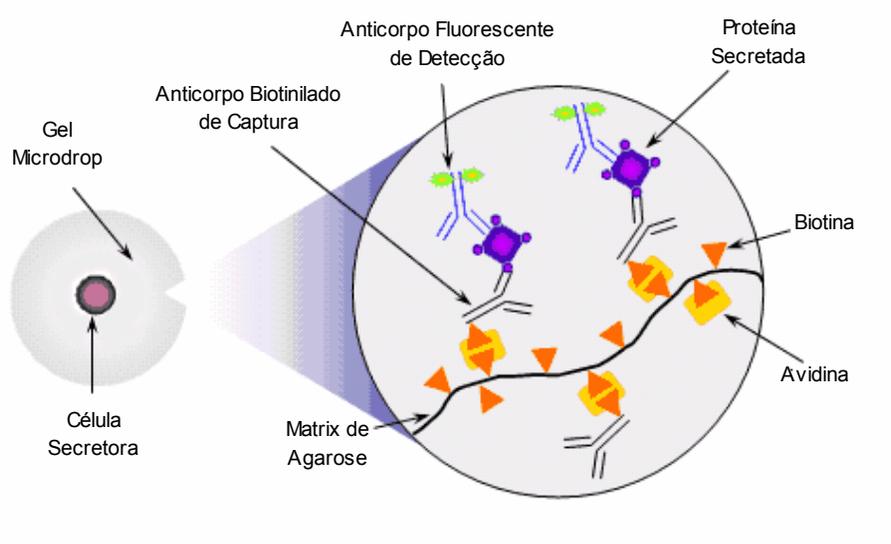


Figura 19 - Tecnologia de encapsulamento células e retenção da proteína de interesse secretada para seleção dos melhores clones levando em conta os níveis de intensidade de fluorescência. FONTE: <http://www.oncecell.com>.

A imobilização em matriz de afinidade baseia-se no mesmo princípio de captura do encapsulamento, exceto pela ausência da agarose. A marcação com biotina é realizada diretamente na membrana celular e objetiva a captura da proteína logo após a sua secreção; para isso, é utilizado um meio altamente viscoso, o que impede sua difusão. A detecção, assim como no encapsulamento é feita por um fluorocromo conjugado ao anticorpo de detecção (Figura 20).

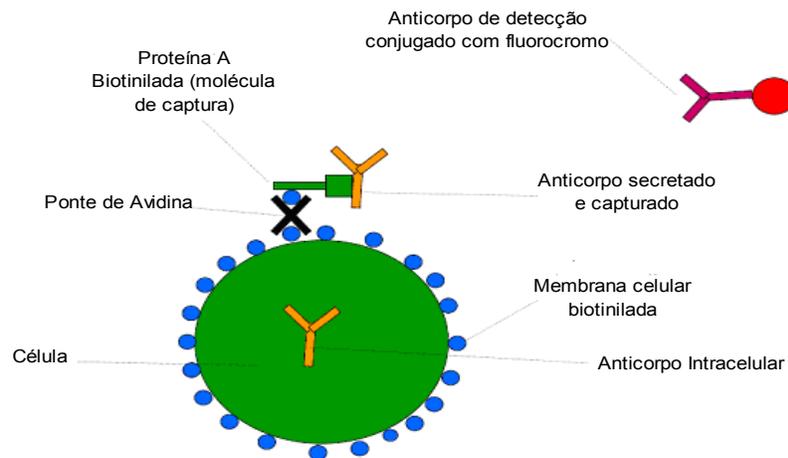


Figura 19 - Técnica de imobilização em matriz de afinidade. As células são cultivadas em meio altamente viscoso o que impede a difusão do anticorpo secretado e permite a sua captura por um anticorpo conjugado com fluorocromo.
 FONTE: <http://www.lonza.com/group/en/company/news/speeches.html>.

1.5.7.3 Sistemas Automatizados

Atualmente, os equipamentos automatizados de clonagem celular fazem parte do "estado da arte" por serem capazes de analisar e isolar um número muito maior de células de forma rápida, aumentando assim as chances de encontrar o clone com as características desejadas para obtenção de um cultivo de alta produtividade.

Até o presente momento, três sistemas destacam-se na área de clonagem automatizada: LEAP (do inglês, *Laser-Enable Analysis and Processing* – Cytellect Inc. San Diego, CA, USA), ClonePix (Genetix Ltd., New Milton, Hampshire, Reino Unido) e Cello System (TAP, do inglês, *Automation Partnership*, Royston, Hertfordshire, UK).

Os sistemas LEAP e ClonePix, baseiam-se no plaqueamento das células em meio semi-sólido que impede a difusão da proteína de interesse. A detecção é feita com a utilização de um anticorpo conjugado com FITC que se liga à proteína secretada.

O isolamento dos clones difere nos dois sistemas; o LEAP oferece um sistema de seleção negativa, ou seja, com o uso de um laser pulsante, as células não produtoras são eliminadas, permitindo somente o crescimento das células de interesse (BROWNE e AL-RUBEAI, 2007).

O ClonePix, por sua vez realizada a análise de cada colônia por meio de um software que captura imagens em campo branco e também sob luz UV, fornecendo um mapa bidimensional das colônias. Além disso, define quais as colônias mais produtoras levando em consideração a intensidade de fluorescência, podendo ainda excluir colônias fluorescentes que estão próximas às colônias não-fluorescentes e/ou colônias não produtoras, prevenindo a contaminação cruzada. As colônias com as melhores características de tamanho, formato e fluorescência são retiradas da placa de cultivo por um braço robótico com oito pinos independentes e transportadas para placas de noventa e seis poços, em ordem decrescente de fluorescência. O equipamento é capaz de isolar duzentos clones por hora.

O sistema Cello é o mais completo no mercado, sendo capaz de realizar o plaqueamento automático das células transfectadas de forma clonal. Um microscópio integrado verifica a clonalidade das células e um software se responsabiliza pela expansão do cultivo, repique das células, coleta de amostras celulares ou sobrenadantes e subclonagem por diluição das linhagens com melhores características e trocas de meios (BROWNE e AL-RUBEAI, 2007).

Na tabela 6, análise das principais vantagens e desvantagens dos sistemas automatizados de clonagem celular.

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de seleção.

MÉTODO	Vantagens	Desvantagens
Diluição Limitante	Simple, baixo custo	Demanda de tempo, clonalidade não garantida, baixo rendimento
Proteínas Fluorescentes	Alto rendimento, não requer anticorpos complementares.	Possível toxicidade, limitado a células com determinadas características.
Baseados em matrix	Rápido, secreção medida em nível celular, alto rendimento	De difícil seleção, requer otimização para diferentes linhagens.
Gel microdrop	Altos níveis de saturação, restrição da difusão	Baixo nível de encapsulamento, requer treinamento especializado.
LEAP	Automatizado, aumento da eficiência de clonagem	Alto custo, possível dano as células.
ClonePix	Automatizado, sistema fechado (estéril)	Alto custo, necessita tempo para crescimento das colônias.
Cello (TAP)	Automatizado, sistema fechado (estéril)	Custo muito alto, falta de análise de expressão dos clones, possível isolamento de células não produtoras.

FONTE: Browne e Al-Rubeai, 2007.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Por mais de duas décadas, o setor biotecnológico tem sido caracterizado por extensas pesquisas no desenvolvimento de biofármacos baseados em anticorpos, o que teve início com a aprovação do primeiro anticorpo monoclonal, o OKT3 de origem murina. Devido à possibilidade de reações adversas pela administração de moléculas não-humanas, houve um intenso desenvolvimento para a obtenção de anticorpos quiméricos e, logo a seguir, AcMos humanizados e humanos. Outro fator importante para o crescimento do mercado de anticorpos é que podem ser utilizados para uma extensa variedade de doenças, especialmente nas áreas oncológicas e imunológicas.

Em consonância com a tendência biotecnológica foi criado o projeto de humanização dos AcMos murinos anti-CD18 e anti-CD3, já produzidos no Instituto Butantan na sua forma murina.

O huAcMo anti-CD18 foi o primeiro a ter sua sequência humanizada por Marcelo Brígido, nosso parceiro na UnB, e foi o ponto de partida para este projeto. Apesar dos pobres resultados obtidos, sua utilização foi importante para a padronização e a otimização das metodologias. Os obstáculos que surgiram durante sua utilização nos fizeram perceber que para conseguirmos expressar um anticorpo humanizado de forma estável e ativa, seria necessária a construção de outros vetores de expressão para obtenção das linhagens celulares. Ainda em relação ao anti-CD18, durante a realização dos nossos trabalhos com o huAcMo anti-CD18, ficou evidente uma alteração no foco de diversas empresas biotecnológicas devido a diversas falhas sofridas em seus estudos clínicos com anticorpos dirigidos ao mesmo alvo. Portanto, com a disponibilização das sequências humanizadas do huAcMo anti-CD3, inserido em novo vetor de expressão pelo grupo da UnB, primeiramente no formato FvFc, resolvemos voltar nossos esforços para a expressão desta molécula, conhecida pelo seu vasto potencial de aplicação em doenças auto-imunes, além de potencial como agente tolerogênico no transplante de órgãos.

Nossos resultados com o fragmento humanizado FvFc anti-CD3 demonstraram que com a utilização de sequências codificadoras e métodos de transfecção e

clonagem celular otimizados foi possível obtermos clones estáveis e produtores da proteína recombinante de interesse.

No caso do anticorpo humanizado anti-CD3, o vetor de expressão continha as duas cadeias no mesmo vetor, separados pelo elemento IRES e sem marca de seleção. Para a expressão da molécula inteira do anticorpo humanizado anti-CD3, optamos pela utilização de um sistema comercial de recombinação homóloga. Este provou ser extremamente eficaz no que diz respeito à homogeneidade da população originada e na facilidade de obtenção de clones produtores. Observamos que a produtividade alcançada pelo sistema comercial é semelhante àquela alcançada pelos clones produtores do fragmento FvFc anti-CD3, obtidos a partir da integração do DNA de interesse de forma randômica no genoma celular. Nos dois casos a expressão é considerada regular e precisaria ser otimizada para o escalonamento de cultivo.

Os ensaios de ligação dos dois formatos, FvFc e anticorpo inteiro, ao antígeno CD3 demonstraram uma escala decrescente de afinidade pelo alvo presente na superfície dos linfócitos T CD3+, com porcentagens de células positivas de, 82,57%, 76,87% e 60,42% para o anti-CD3 murino, o FvFc anti-CD3 e o huAcMo anti-CD3, respectivamente.

Pelas análises de ligação ao antígeno, pudemos concluir que as isoformas humanizadas possuem afinidade ligeiramente menor pelo alvo do que a molécula murina original. Este fato pode ser justificado pelo processo de humanização do anticorpo que teve alguns resíduos murinos, importantes para a manutenção da afinidade, substituídos por aminoácidos não conservados.

Estes dados corroboram o fato de que as versões humanizadas de anticorpos apresentam, de forma geral, menor afinidade pelo alvo do que o anticorpo murino, o que é justificado pelo processo de humanização e também pela não otimização da região de *framework*.

Entre os formatos humanizados FvFc e anticorpo inteiro anti-CD3 foi encontrada pequena diferença na ligação com os sítios-alvo. Ainda que a sequência das regiões variáveis das cadeias leve e pesada seja exatamente a mesma, no FvFc as duas estão ligadas artificialmente enquanto o huAcMo anti-CD3 apresenta a conformação estrutural típica, em duas cadeias, de um Fab das imunoglobulinas. Outra observação pertinente

refere-se à estrutura tridimensional do formato FvFc, não conhecida em relação à distância entre os dímeros que compõem a molécula, pela ausência de um domínio constante. Apesar do gene codificador da região da dobradiça estar presente, não se sabe se esta construção desprovida de C_H1/C_k apresenta a forma típica em Y de uma IgG ou se as duas regiões “Fab” do formato FvFc adquirem posições de hastes mais paralelas, o que poderia influenciar na ligação com o antígeno.

Em relação aos ensaios de competição, foram tomados os cuidados na quantificação das formas em comparação para evitar diferenças na quantidade de ligantes, mantendo uma relação equimolar. Ficou claro que nenhuma das formas humanizadas desloca o anticorpo murino, enquanto este é capaz de deslocar parcialmente as formas humanizadas. Ensaios de competição auxiliam a compreender e caracterizar os anticorpos humanizados e não representam significância clínica.

A expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos é um processo laborioso e que demanda tempo. Em se tratando de moléculas complexas como os anticorpos, diversos reveses surgem durante este desenvolvimento, o que não foi diferente durante a realização deste projeto. Esperamos que os dados aqui apresentados sirvam como exemplo para a expressão em células de mamíferos de novas proteínas recombinantes de aplicação terapêutica.

A expressão de anticorpos recombinantes em células de mamíferos é tarefa difícil e pouquíssimo explorada em nosso meio. Acreditamos ser a primeira vez, no Brasil, que um anticorpo monoclonal é humanizado, expresso e caracterizado, ainda que parcialmente. A avaliação da afinidade aqui apresentada é de grande utilidade para a continuação do projeto. Podemos considerar que, pelos resultados encontrados, a humanização das regiões variáveis por Marcelo Brígido atingiu seus objetivos. Após o término da parte experimental desta tese, recebemos um vetor com o clone inteiro do anti-CD3 contendo marca de seleção, que ainda será avaliado quanto à possibilidade de selecionar clones com melhor nível de expressão. Os genes relativos ao anticorpo são os mesmos utilizados neste trabalho e, portanto a caracterização poderá ser transferida. A caracterização dos clones anti-CD3 FvFc e huAcMo apresentados neste trabalho será ampliada a seguir em ensaios *in vitro*, pela Dra. Verônica Coelho (InCor/SP) visando avaliar potencial de tolerogenicidade.

Outro grande desafio, de avaliar a imunogenicidade, só virá quando o anticorpo humanizado anti-CD3 tiver seu cultivo escalonado para produção em condições de BPF (Boas Práticas de Fabricação) e for utilizado em protocolos de ensaio clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABBAS, A. *et al.* **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008.
- ADAIR J. R. Engineering antibodies for therapy. **Immunol. Rev.**, v.10, n.1p.5, 1992.
- AKIRAV, E. *et al.* Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? **Diabetes**, v.57, n.11, p.2883-8, nov., 2008.
- AKSELBAND Y. *et al.* Isolation of rare isotype switch variants in hybridoma cell lines using an agarose gel microdrop-based protein secretion assay. **Assay Drug. Dev. Technol.**, v.1, n.5, p.619-26, nov., 2003.
- BAKER, M. *et al.* Treatment of stiff person syndrome with rituximab. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.**, v.76, n.7, p.999-1001, jul., 2005.
- BALDI, L. *et al.* Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. **Biotechnol. Lett.**, v.29, n.5, p.677-84, maio, 2007.
- BERDOZ, J. *et al.* In vitro comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.96, n.6, p.3029-34, mar., 1999.
- BERGER, M. *et al.* Therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Am. J. Med. Sci.**, v.324, n.1, p.14-30, jul., 2002.
- BELMAR, N. *et al.* Dissociation of efficacy and cytokine release mediated by an Fc- modified anti-CD3 mAb in a chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model. **J. Neuroimmuno.**, v.212, n.1, p.65-73, 2009
- BIJL, M. *et al.* Anti-CD3-induced and anti-Fas-induced apoptosis in systemic lupus erythematosus (SLE). **Clin. Exp. Immunol.**, v.123, n.1, p.127-32, jan., 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem**, v.72, p.248-54, 1976.
- BROWNE, S. M.; AL-RUBEAI, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. **Trends Biotechnol.**, v.25, n.9, p.425-32, set., 2007.
- BUCKY, L. P. *et al.* Reduction of burn injury by inhibiting CD18-mediated leukocyte adherence in rabbits. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.93, n.7, p.1473-80, jun., 1994.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.68, n.3, p.283-91, ago., 2005.
- CALDAS, C. *et al.* Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. **Mol. Immunol.**, v.39, n.15, p.941-52, maio, 2003.
- CALDAS, C. *et al.* Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. **Protein Eng.**, v.13, n.5, p.353-60, maio, 2000.
- CARPENTER, P. A. *et al.* A humanized non-FcR-binding anti-CD3 antibody, visilizumab, for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. **Blood**, v.99, n.8, p.2712-9, abr., 2002.
- CARPENTER, P. A. *et al.* A phase II multicenter study of visilizumab, humanized anti-CD3 antibody, to treat steroid-refractory acute graft-versus-host disease. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v.11, n.6, p.465-71, jun., 2005.
- CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, n.5, p.343-57, maio, 2006.
- CHADD, H. E.; CHAMOW, S. M. Therapeutic antibody expression technology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.12, n.2, p.188-94, abr., 2001.
- CHARGELEGUE, D. *et al.* A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. **Transgenic Res.**, v.9, n.3, p.187-94, jun., 2000.
- CHATENOUD, L. CD3 antibody treatment stimulates the functional capability of regulatory T cells. **Novartis Found. Symp.**, v.252, p. 279-8, 2003. Discussion 286-90.
- CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J.A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, n.8, p.622-32, ago., 2007.
- CHINGNARD, M. E. A. **Cytokines and adhesion moleculars in lung inflammation.** New York: Academic Science, 1996.
- CLARK, M. Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? **Immunol. Today**, v.21, n.8, p.397-402, ago., 2000.
- COSIMI, A.B. *et al.* Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. **Transplantation**. v.32, p.535-539, 1981.
- D'HAENS, G.; Daperno, M.. Advances in medical therapy for Crohn's disease. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, v.4, n.6, p.506-12, dez., 2002.
- DAVID, V. *et al.* Proliferation of resting lymphocytes is induced by triggering T cells through an epitope common to the three CD18/CD11 leukocyte adhesion molecules. **Cell Immunol.**, v.136, n.2, p.519-24, set., 1991.
- GAHMBERG, C. G. *et al.* Leukocyte cell adhesion proteins: from molecular dissection to clinical applications. **Ann. Med.**, v.24, n.5, p.329-35, out., 1992.

GIRARD, P. *et al.* 100-liter transient transfection. **Cytotechnology**, v.38, n.1-3, p.15-21, jan., 2002.

GRAHAM, F. L. *et al.* Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J. Gen. Virol.**, v.36, n.1, p.59-74, jul., 1977.

GRILLARI, J. *et al.* Analysis of alterations in gene expression after amplification of recombinant genes in CHO cells. **J. Biotechnol.**, v.87, n.1, p.59-65, abr., 2001.

HANAHAH, D.; MESELSON, M. Plasmid screening at high colony density. **Methods Enzymol.**, v.100, p.333-42. 1983.

HARLAN, D. M.; VON HERRATH, M. Immune intervention with anti-CD3 in diabetes. **Nat. Med.**, v.11, n.7, Jul, p.716-8, jul., 2005.

HOOD, E. E. *et al.* Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants--myths and realities. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.13, n.6, p.630-5, dez., 2002.

HSIAO, K. C. *et al.* Humanization of 60.3, an anti-CD18 antibody; importance of the L2 loop. **Protein Eng.**, v.7, n.6, p.815-22, jun., 1994.

HUANG, W.; FLINT, S. J. The tripartite leader sequence of subgroup C adenovirus major late mRNAs can increase the efficiency of mRNA export. **J. Virol.**, v.72, n.1, p.225-35, jan., 1998.

HUANG, Y. *et al.* An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. **J. Immunol. Methods**, v.322, n.1-2, p.28-39, abr., 2007.

JAFFERS, G. J. *et al.* Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression. **Transplantation**, v.41, n.5, p.572-8, maio, 1986.

JANEWAY, C. *et al.* **The immune system in health and disease. Immunobiology.** New York: Garland Publishing, 2001.

JOHNSON, J. P. *et al.* De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.86, n.2, p.641-4, jan., 1989.

KAMIYA, H. *et al.* Size and topology of exogenous DNA as determinant factors of transgene transcription in mammalian cells. **Gene Ther.**, v.9, n.22, p.1500-7, nov., 2002.

KAO, F. T.; Puck, T. T. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.60, n.4, p.1275-81, ago., 1968.

KAUFMAN, R. J. *et al.* Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.76, n.11, p.5669-73, nov., 1979.

KAUFMAN, R. J. *et al.* Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. **Nucleic Acids Res.**, v.19, n.16, p.4485-90, ago., 1991.

KIM, N. S. *et al.* Key determinants in the occurrence of clonal variation in humanized antibody expression of cho cells during dihydrofolate reductase mediated gene amplification. **Biotechnol. Prog.**, v.17, n.1, p.69-75, jan., 2001.

KJER-NIELSEN, L. *et al.* Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.101, n.20, p.7675-80, maio, 2004.

KLEIN, J. **Immunology**. Boston: Blackwell Scientific Publication, 1990.

KOHLER, G. e MILSTEIN, G. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.7, n.256, p. 495-7, ago., 1975.

KOHM, A. P. *et al.* Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v.174, n.8, p.4525-34, abr., 2005.

KWAKS, T. H. *et al.* Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v.21, n.5, p.553-8, maio, 2003.

LE HIR, H. *et al.* How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. **Trends Biochem. Sci.**, v.28, n.4, p.215-20, abr., 2003.

LINDBOM, L. *et al.* Rabbit leukocyte adhesion molecules CD11/CD18 and their participation in acute and delayed inflammatory responses and leukocyte distribution in vivo. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.57, n.1, p.105-19, out., 1990.

LINDELL, J. *et al.* Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1676, n.2, p.155-61, jan., 2004.

MAINI, R. N. *et al.* Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.41, n.9, p.1552-63, set., 1998.

MARANHÃO, A.Q e BRIGIDO, M.M. Artícorpos Humanizados. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**. v.23, p. 38-43. 2001.

MASCELLI, M. A. *et al.* Molecular, biologic, and pharmacokinetic properties of monoclonal antibodies: impact of these parameters on early clinical development. **J. Clin. Pharmacol.**, v.47, n.5, p.553-65, maio, 2007.

MILSTEIN, C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. **Bioessays**, v.21, n.11, p.966-73, nov., 1999.

MIRICK, G. R. *et al.* A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v.48, n.4, p.251-7, dez., 2004.

- MORRISON, S. L. *et al.* Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.81, n.21, p. 6851-5, nov., 1984.
- MUTSKOV, V.; Felsenfeld, G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. **Embo J.**, v.23, n.1, p.138-49, jan., 2004.
- NELSON, A. L.; Reichert, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. **Nat. Biotechnol.**, v.27, n.4, p.331-7, abr., 2009.
- NORMAN, D. J. *et al.* Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors. **Transplantation**, v.70, n.12, p.1707-12, dez., 2000.
- OCHI, H. *et al.* Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. **Nat. Med.**, v.12, n.6, p.627-35, jun., 2006.
- PACE, C.N. *et al.* How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Prot. Sci.**, v.4, n.11, p.2411-23, 1995.
- RICHARDS, E. J.; ELGIN, S. C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. **Cell**, v.108, n.4, p.489-500, fev., 2002.
- RIECHMANN, L. *et al.* Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**, v.332, n.6162, p.323-7, mar., 1988.
- RODRIGUES, M. T. A. **Produção e Controle de Qualidade do Anticorpo Monoclonal Anti-CD3 Para Uso Terapêutico**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo, 1996.
- ROMJN, H. J. *et al.* Towards an improved serum-free, chemically defined medium for long-term culturing of cerebral cortex tissue. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.8, n.3, p.301-34, fev., 1984.
- ROUTLEDGE, E. G. *et al.* A humanized monovalent CD3 antibody which can activate homologous complement. **Eur. J. Immunol.**, v.21, n.11, p.2717-25, nov., 1991.
- RUGGIERO, L. A. **Clonagem de anticorpos recombinantes e expressão em Cultura de Células de Ovário de Hamster Chinês (CHO)**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2002.
- SAMBROOK, J. R. *et al.* **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
- SCHNEIDER, R. J. *et al.* Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus-infected cells. **Cell**, v.37, n.1, p.291-8, maio, 1984.
- SHAPIRO, A. L. *et al.* Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.28, n.5, p.815-20, set., 1967.
- STEPHENS, S. *et al.* Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. **Immunology**, v.85, n.4, p.668-74, ago., 1995.

SWANN, P. G. *et al.* Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. **Curr. Opin. Immunol.**, v.20, n.4, p.493-9, ago., 2008.

TONEGAWA, S. Nobel lecture in physiology or medicine--1987. Somatic generation of immune diversity. **In Vitro Cell Dev. Biol.**, v.24, n.4, p.253-65, abr., 1988a.

_____. Somatic generation of immune diversity. **Biosci. Rep.**, v.8, n.1, p.3-26, fev., 1988b.

TRAN, G. T. *et al.* Reversal of experimental allergic encephalomyelitis with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 mAb therapy with a preferential effect on T(h)1 cells that is augmented by IL-4. **Int. Immunol.**, v.13, n.9, p.1109-20, set., 2001.

TUOMANEN, E. Breaching the blood-brain barrier. **Sci. Am.**, v.268, n.2, p.80-4, fev., 1993.

URLAUB, G.; Chasin, L. A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.77, n.7, p.4216-20, jul., 1980.

UTSET, T. O. *et al.* Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. **J. Rheumatol.**, v.29, n.9, p.1907-13, set., 2002.

VEDDER, N. B. *et al.* Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.87, n.7, p.2643-6, abr., 1990.

VAN WAUNE, J.P., DE MEY, J.R. e GOOSSENS, J.G. OKT3: a monoclonal anti-human T-lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. **J. Immunol.**, v. 124, p. 2708-13, 1980.

VON BEHRING, E.; KITASATO, S. The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890. **Mol. Immunol.**, v.28, n.12, p.1317, 1319-20, dez., 1991.

WILES, S. *et al.* Modelling infectious disease - time to think outside the box? **Nat. Rev. Microbiol.**, v.4, n.4, p.307-12, abr., 2006.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v.22, n.11, p.1393-8, nov., 2004.

XU, D. *et al.* In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. **Cell Immunol.**, v.200, n.1, p.16-26, fev., 2000.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Flow cytometry: an improved method for the selection of highly productive gene-amplified CHO cells using flow cytometry. **Biotechnol. Bioeng.**, v.74, n.5, p.435-42, set., 2001.

ZIEGELBAUER, K. A. Monoclonal antibody therapeutics: Leading companies to maximise sales and market share. **J. Com. Biotechnol.**, v.12, p.65-72, nov., 2008.