

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**ESTRATÉGIAS E INOVAÇÕES APLICADAS AO DESENVOLVIMENTO DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS**

Maria Juliana Pantaleão Borges de Macedo

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo.

Orientador:
Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo

2018

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. IMUNOGLOBULINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO	4
1.2. O REARRANJO GÊNICO E A DIVERSIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS	6
1.3. ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. HISTÓRICO DE DESENVOLVIMENTO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS	13
4.2. A TECNOLOGIA DE EXPRESSÃO EM FAGOS APLICADA À OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	19
4.2.1. <i>PHAGE DISPLAY</i> : METODOLOGIA E CONCEITOS.....	19
4.2.2. <i>PHAGE DISPLAY</i> DE ANTICORPOS.....	23
4.3. NOVAS ABORDAGENS NO DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS	29
4.3.1. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS	30
4.3.2. ANTICORPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS	35
4.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS: APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E O MERCADO DE BIOFÁRMACOS	39
5. CONCLUSÃO	43
6. BIBLIOGRAFIA.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Anticorpo conjugado a fármaco
BiTE	<i>Bispecif T cell engager</i>
CCDA	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CDC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
CDR	Regiões determinantes de complementariedade
Células NK	Célula <i>Natural Killer</i>
C _H	Região constante da cadeia pesada
C _L	Região constante da cadeia leve
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EpCAM	Molécula de adesão celular epitelial
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
FcRn	Receptor Fc neonatal
FDA	Food and Drug Administration
FR	Região de framework
Fv	Domínio fragmento variável
HAMA	Human Anti-Mouse Antibody
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HGPRT	Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferase
Ig	Imunoglobulina
Meio HAT	Meio de cultura composto de Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
mRNA	RNA mensageiro
Pb	Pares de base

PEG	Polietilenoglicol
RAG	Recombination-activating genes
Região V	Região variável
Região C	Região constante
RSS	Sequências Sinais de Recombinação
ScFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
TdT	Terminal deoxinucleotidil transferase
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
V _H	Região variável da cadeia pesada
V _L	Região variável da cadeia leve

RESUMO

MACEDO, M.J.P.B. **Estratégias e Inovações Aplicadas ao Desenvolvimento de Anticorpos Monoclonais.** 2018. 50p. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

INTRODUÇÃO: Anticorpos são glicoproteínas heterodiméricas produzidas pelos linfócitos B e desempenham papel central na imunidade humoral. O uso de anticorpos na terapêutica teve início em 1890 com os soros policlonais, entretanto, a descoberta dos anticorpos monoclonais, na década de 1970, permitiu pela primeira vez a produção dessas moléculas com estrutura definida e especificidade conhecida. Resultado dos constantes avanços das estratégias empregadas, de modo geral, as novas gerações de anticorpos monoclonais se destacam por sua alta especificidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades farmacocinéticas. Devido ao seu alto potencial terapêutico e possibilidade de utilização nos mais variados tipos de doenças, o interesse pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais expandiu-se rapidamente, concretizando-se em um importante alvo da indústria farmacêutica. **OBJETIVO:** Contextualizar, revisar e discutir as principais estratégias (com ênfase no *phage display*) e inovações encontradas na pesquisa e desenvolvimento de anticorpos monoclonais, bem como seu impacto na terapêutica e no mercado de biofármacos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Levantamento bibliográfico, empregando palavras chaves como *monoclonal antibody*, *phage display*, *bispecific antibody*, *antibody drug conjugate* e *biopharmaceutical Market* em publicações realizadas no período de 2000 a 2018 e indexadas nas bases de dados eletrônicas científicas. **RESULTADOS:** A primeira geração de anticorpos, gerados por híbridomas, foi marcada pela sua inerente imunogenicidade e baixa função efetora, por serem de origem murina. O avanço da engenharia genética e biologia molecular possibilitou a obtenção de anticorpos cada vez mais próximos dos humanos, tendo como resultado a redução da imunogenicidade apresentada e aumento da eficácia terapêutica. O *phage display* permitiu pela primeira vez a geração de anticorpos completamente humanos *in vitro* e sem a necessidade de imunização, possibilitando a expressão de milhões de fragmentos distintos na superfície de fagócitos e a seleção de anticorpos recombinantes altamente específicos para alvos biológicos relevantes. Mais recentemente, o desenvolvimento de anticorpos biespecíficos ou conjugados a fármacos trouxe novas perspectivas para a área, ampliando ainda mais as oportunidades terapêuticas dos anticorpos, seja no direcionamento de fármacos altamente tóxicos ou na atuação em diferentes alvos e vias biológicas. Os anticorpos monoclonais representam, atualmente, uma das mais promissoras classes de medicamentos, representando mais da metade das vendas totais de biomoléculas e se consolidando entre os fármacos mais vendidos. Com a expiração da patente de diversos anticorpos monoclonais em uso na clínica, o interesse por seus biossimilares tem fomentando a indústria e traz possibilidades de diminuição dos custos e alternativas de tratamento. **CONCLUSÃO:** O avanço das estratégias empregadas reflete-se no aumento do índice de aprovação e vendas, extensão de suas aplicações e no sucesso terapêutico dos anticorpos monoclonais. Apesar das dificuldades ainda enfrentadas pelas atuais gerações de anticorpos monoclonais, a área se mantém extremamente promissora e com grandes chances de expansão com a introdução de novos formatos de anticorpos e descobertas de novos alvos biológicos.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais, *Phage Display* e Biofármacos.

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMUNOGLOBULINAS: ESTRUTURA E FUNÇÃO

Os anticorpos, ou imunoglobulinas (Ig), são moléculas produzidas pelos linfócitos B e desempenham papel central na imunidade humoral, onde sua capacidade de ligar-se a抗ígenos externos com alta afinidade e especificidade é fundamental para o desempenho de suas funções (TILLER e TESSIER, 2015). Os papéis desempenhados por essas moléculas no sistema imunológico contemplam, dentre outros, a neutralização de microrganismos e toxinas por meio da ligação antígeno-anticorpo, opsonização de patógenos favorecendo a fagocitose e ativação do sistema complemento.

Quanto a sua constituição, tratam-se de glicoproteínas heterodiméricas compostas por dois diferentes tipos de cadeias polipeptídicas denominadas cadeia leve (L) e cadeia pesada (H), que possuem aproximadamente 25kDa e 50kDa, respectivamente. Dois tipos de cadeia leve podem ser encontrados entre os anticorpos: cadeia lambda (λ) e cadeia capa (κ). Considerando como base a molécula de IgG tipo G (IgG), cada imunoglobulina é formada por duas cadeias leves e duas pesadas idênticas (Fig. 1), ligadas entre si através de pontes dissulfeto em uma configuração que confere à molécula dois sítios idênticos de ligação ao antígeno e, portanto, permite que uma única imunoglobulina seja capaz de ligar-se a duas moléculas desse, aumentando a força total de interação (MURPHY, 2014).

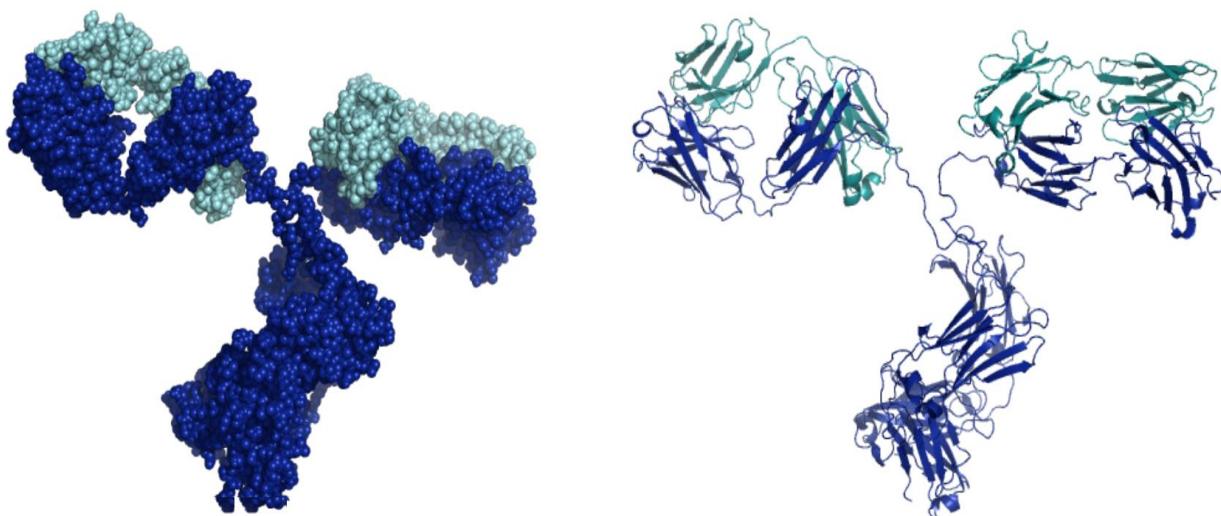


Figura 1. Estrutura de uma molécula de anticorpo. A imunoglobulina do tipo G é composta por duas cadeias leves e duas pesadas, representadas respectivamente em verde e azul. (Fonte: PyMOL)

Tanto as cadeias leves quanto as pesadas são constituídas por um domínio variável aminoterminal, entretanto, diferem entre si quanto ao número de domínios constantes: 1 para cadeia leve (C_L) e 3 para a pesada (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) (Fig.2). A digestão da molécula de anticorpo com o emprego de papaína, permitiu a identificação de 3 fragmentos que compõem as imunoglobulinas: 2 fragmentos idênticos Fab e 1 fragmento Fc. O fragmento Fab fora assim denominado por conter o sítio de ligação ao antígeno. Já o outro fragmento, por ser facilmente cristalizado, recebeu a denominação de Fc e é constituído pelo conjunto de domínios constantes C_{H2} e C_{H3} , correspondendo a parte do anticorpo que interage com as moléculas e células efetoras (GOMES, 2013).

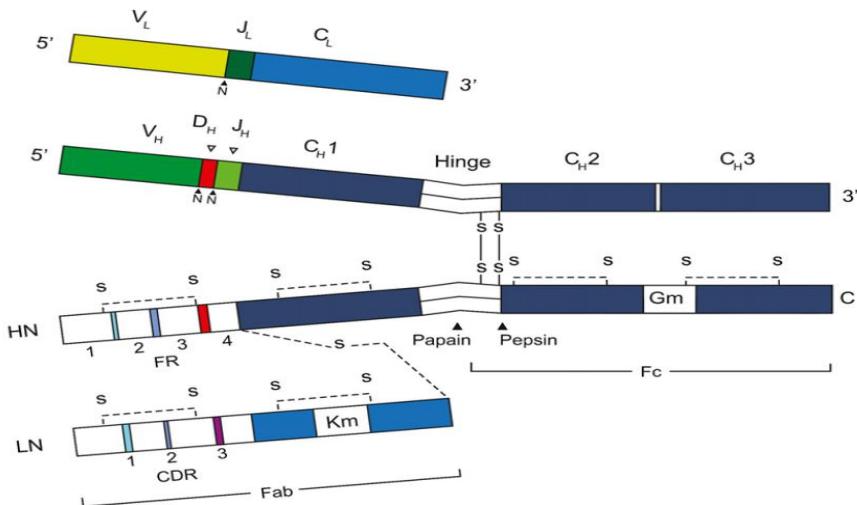


Figura 2. Representação esquemática da molécula de anticorpo. A estrutura do anticorpo pode ser dividida nas porções Fab e Fc, a primeira contém o sítio de ligação ao antígeno, enquanto a segunda interage com células efetoras através da sua ligação a receptores Fc. O domínio variável de cada uma das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) é constituído por três regiões de CDR, intercaladas por quatro regiões menos variáveis denominadas regiões de framework (FR). A sobreposição entre as CDRs das cadeias pesada e leve forma o sítio de ligação ao antígeno. (Fonte: Schroeder e Cavacini, 2010)

A estrutura da molécula de anticorpo, portanto, pode ser separada funcionalmente em duas regiões distintas: região variável (região V) e região constante (região C) formadas, respectivamente, pelos domínios variáveis (V_L e V_H) e constantes (C_L e C_H) das cadeias leves e pesadas. A região variável é responsável pelo reconhecimento, ou seja, pela ligação específica ao antígeno e por este motivo possui uma grande variabilidade entre as imunoglobulinas, permitindo a geração de um repertório suficientemente grande a fim de assegurar o reconhecimento de diversas estruturas. Diferentemente, a região constante não apresenta tal variabilidade, mas possui cinco classes principais que definem

os isotipos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, cada uma especializada na ativação de mecanismos efetores distintos (SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

Dentre as principais funções efetoras desempenhadas pelas regiões constantes (Fc) encontra-se: interação com receptores Fc presentes na superfície de células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, facilitando a fagocitose de patógenos recobertos por esses anticorpos ou, então, permitindo a liberação de mediadores inflamatórios através da interação com os receptores presentes nos mastócitos, basófilos e eosinófilos; ligação e ativação da cascata do complemento; liberação de anticorpos em determinados compartimentos do organismo (secreções mucosas, lágrimas e leite) através da ligação a receptores específicos e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (MURPHY, 2014).

A região variável, no entanto, não apresenta variabilidade por toda sua extensão, sendo os domínios V_H e V_L compostos por 3 regiões hipervariáveis, denominadas Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR), que se encontram intercaladas a 4 regiões menos variáveis, as regiões framework (FR). A combinação destas regiões hipervariáveis e variáveis das cadeias leves e pesadas determinam a especificidade antigênica final. Com o pareamento dos domínios V_H e V_L ocorre a justaposição das três CDRs das duas cadeias, levando a formação de um único sítio hipervariável no braço da molécula de anticorpo, dando origem ao sítio de ligação ao antígeno (SCHROEDER e CAVACINI, 2010). A terceira região determinante (CDR3) corresponde a região de maior variabilidade do anticorpo e, portanto, a mais importante para a especificidade pelo antígeno (GOMES, 2013).

1.2. O REARRANJO GÊNICO E A DIVERSIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS

É estimado que os linfócitos são capazes de gerar em torno de 10^{15} regiões variáveis de anticorpos, entretanto, a diversidade deste repertório é originada por menos de 400 genes (DELVES; ROITT, 2000). Tal fato torna-se possível principalmente através de um processo de recombinação, onde um grupo relativamente pequeno de segmentos gênicos são rearranjados durante a maturação dos linfócitos B.

A região variável de uma cadeia leve é codificada por dois segmentos de DNA separados, o segmento gênico V (variável) e o segmento gênico J (junção), enquanto que

a cadeia pesada é codificada por três segmentos, onde além dos segmentos V e J, e localizado entre eles, encontra-se o segmento gênico de diversidade (segmento gênico D). O processo pelo qual tais segmentos são rearranjados recebe o nome de recombinação V(D)J ou recombinação somática (do grego, soma = corpo) (Fig. 3).

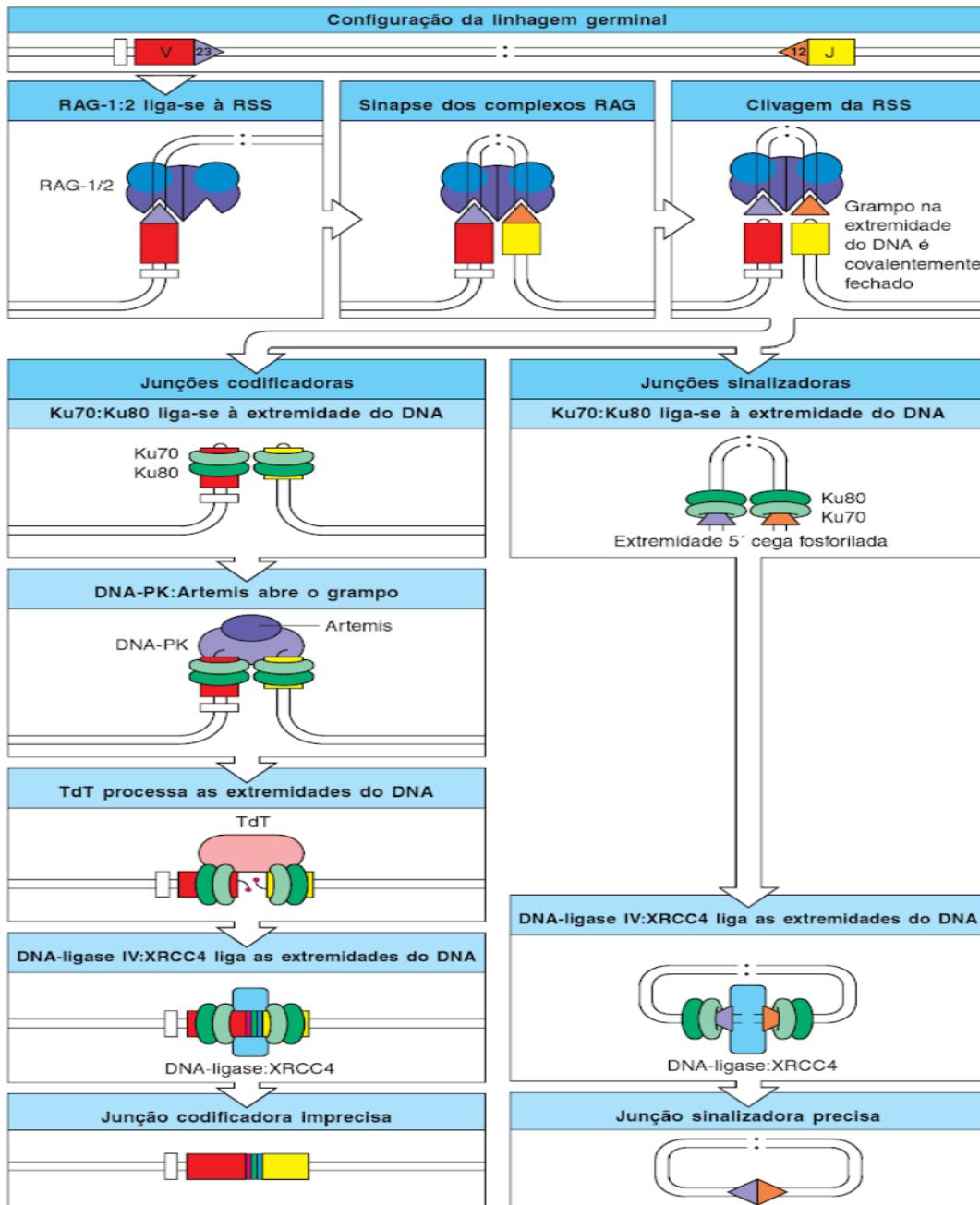


Figura 3. O rearranjo V(D)J das imunoglobulinas. A recombinação dos segmentos gênicos da região variável das imunoglobulinas tem início com o pareamento das RSSs mediado pelo complexo formado pelas enzimas RAG 1 e 2. Posteriormente, etapas de clivagem e junção ocorrem, sendo intermediadas por diversas enzimas. Durante o processo de junção, a adição de nucleotídeos pela enzima TdT contribui significativamente para a geração de diversidade. (Fonte: Murphy, 2014)

O rearranjo gênico das imunoglobulinas é capaz de gerar diversidade por dois mecanismos: (1) combinação entre os diferentes segmentos gênicos (diversidade combinatória), uma vez que cada segmento possui múltiplas cópias distintas que podem ser combinadas entre si; (2) adição e deleção de nucleotídeos nas junções entre os segmentos gênicos (diversidade juncional) (NOIA; NEUBERGER, 2007).

O rearranjo correto dos segmentos é guiado por sequências de DNA não codificadoras conservadas e adjacentes aos locais onde ocorre a recombinação. Essas sequências são denominadas sequências sinais de recombinação (RSSs) e consistem em uma sequência conservada de 7 nucleotídeos (heptâmero 5'CACAGTG3'), separada de um segundo bloco de nucleotídeos (nonâmero 5'ACAAAAACC3') por uma região não conservada denominada espaçador, que possui 12 ou 23 pares de base (pb) de comprimento. A recombinação segue a regra 12/23, segundo a qual um segmento gênico flanqueado por um espaçador RSS de 12pb poderá unir-se apenas a um gene flanqueado por um espaçador RSS de 23pb (SCHATZ; SWANSON, 2011).

A recombinação somática requer um complexo de enzimas denominado recombinase V(D)J. Deste complexo fazem partes duas enzimas específicas de linfócitos, RAG-1 e RAG-2, codificadas por dois genes ativadores de recombinação (RAGs, do inglês recombination-activating genes) expressos em linfócitos em desenvolvimento. O processo de recombinação tem início com o reconhecimento e alinhamento da sequência 12-RSS com a sequência 23-RSS pelo complexo formado pelas enzimas RAG-1 e RAG-2 com a posterior clivagem da região 5', liberando o grupo 3'-OH da extremidade de cada seguimento codificador. O grupo 3'-OH ataca a ligação fosfodiéster da fita oposta de DNA, formando um grampo e deixando uma cadeia dupla de extremidade cega no final da RSS que são unidas por um complexo de DNA-ligase IV e XRCCA para formar a junção sinalizadora. Já a formação da junção codificadora acontece através da união das extremidades de DNA contendo os grampos pela enzima Ku que recruta a subunidade da DNA-PKcs. A nucleasse Artemis é ativada pela fosforilação de DNA-PK e é responsável pela abertura do grampo através da clivagem em apenas uma das fitas, podendo ocorrer em vários pontos ao longo do grampo de DNA. As enzimas de reparo do DNA modificam os grampos abertos removendo nucleotídeos, enquanto que, ao mesmo tempo, a enzima linfoide-específica TdT (terminal deoxinucleotidil transferase) adiciona nucleotídeos ao acaso às extremidades de fita simples. Por fim, a DNA-ligase IV e XRCCA liga as

extremidades processadas, reconstituindo o cromossomo que possui os genes rearranjados (MURPHY, 2014; SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

Ao contrário das CDR1 e CDR2 que são codificadas dentro do segmento gênico V, a CDR3 encontra-se na região de junção entre os segmentos V e J e, na cadeia pesada, é codificada em partes pelo segmento D, o que proporciona um significativo aumento da diversidade das CDR3 durante o processo de adição e deleção dos nucleotídeos na etapa de junção entre os segmentos. Desta forma, recombinação dos segmentos gênicos da cadeia leve e pesada juntamente com a ação da enzima TdT contribuem para geração de um repertório diverso de anticorpos. Uma outra fonte de diversidade, além do rearranjo V(D)J, resulta das diferentes combinações entre as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas.

A recombinação somática, no entanto, gera anticorpos com baixa afinidade, sendo que após a exposição ao antígeno, os linfócitos ativados são submetidos ao processo de hipermutação somática, onde mutações pontuais em altas taxas são feitas ao longo do exón da região V das cadeias leves e pesadas previamente rearranjadas, permitindo a geração de anticorpos com alta afinidade pelo antígeno e conduzindo ao processo de maturação da afinidade onde as células B produtoras de tais anticorpos são selecionadas (NOIA; NEUBERGER, 2007).

1.3. ANTICORPOS MONOCLONIAIS

Os anticorpos gerados por uma resposta imune, natural ou induzida por imunização, constituem uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades, uma vez que um único antígeno é capaz de induzir a produção de diferentes imunoglobulinas para epítopos distintos deste mesmo antígeno. Desta forma, em uma resposta imunológica são gerados diferentes clones de linfócitos B e os anticorpos resultantes são caracterizados como anticorpos policlonais.

O uso de anticorpos na terapia e tratamento de doenças teve seu início em 1890 a partir dos estudos realizados por Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato e a descoberta da soroterapia contra o tétano e difteria, onde evidenciou-se que o soro proveniente de pacientes humanos ou de animais que haviam se recuperado de uma doença infecciosa

poderia ser utilizado para tratar a mesma doença em outras pessoas ou animais (YAMADA, 2011).

Os anticorpos policlonais usados clinicamente são obtidos através do soro de animais imunizados contra o antígeno de interesse, tendo aplicações no tratamento de intoxicações causadas por animais venenosos, como é o caso do soro antiofídico, toxinas ou infecções virais. Entretanto, apesar das suas diversas finalidades biológicas e importância terapêutica ainda atual, os antissoros apresentam certas desvantagens em relação à heterogeneidade de anticorpos que os compõem. Entre as principais desvantagens envolvendo a obtenção de anticorpos policlonais está a dificuldade em se estabelecer um padrão da composição dos soros obtidos, em termos de variedade e quantidade de cada imunoglobulina presente, tornando, assim, um antissoro diferente do outro, mesmo quando se utiliza animais geneticamente idênticos, a mesma preparação de antígeno e protocolo de imunização padronizado, resultando na obtenção de volumes pequenos de um único soro (MURPHY, 2014). Tal heterogeneidade também implica na variação dos lotes produzidos, o que na clínica pode resultar em alteração da eficácia terapêutica e efeitos indesejados.

A fim de contornar os problemas descritos anteriormente, foi necessário o desenvolvimento de métodos que permitissem a produção, em escala industrial, de maiores quantidades dessas moléculas, com estrutura homogênea e especificidade conhecida. Tal objetivo foi obtido através da produção de anticorpos monoclonais.

Os anticorpos monoclonais recebem este nome por serem provenientes, originalmente, de um único clone de linfócito B, sendo específicos para um determinado epítopo. Essas moléculas com finalidade terapêutica foram introduzidas na clínica no início da década de 80 e, desde então, seu uso e aplicabilidade têm crescido e se expandido para o tratamento de uma grande variedade de doenças, dentre as quais podemos citar: asma, esclerose múltipla, artrite, retinopatia, infecções bacterianas e câncer (KENNEDY et al., 2017). Além da sua aplicação terapêutica, também demonstram sua importância na área diagnóstica, contribuindo tanto para as análises bioquímicas e testes de imunoensaios, quanto para exames de imagem por meio da imunocintilografia, auxiliando no diagnóstico de doenças.

Os anticorpos monoclonais terapêuticos atuam principalmente através dos seguintes mecanismos: (1) neutralização; (2) bloqueio da interação ligante-receptor através da ligação do anticorpo ao ligante (citocinas, fatores de crescimento, demais moléculas

solúveis) ou ao respectivo receptor; (3) influenciando a sinalização celular através da interferência direta no crescimento celular ou desencadeando processos de morte celular atuando diretamente como agonistas ou por *crosslinking*; (4) funções efetoras mediadas pela porção Fc, como citotoxicidade dependente do complemento (CDC); citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) e fagocitose celular dependente de anticorpo (BREKKE; SANDLIE, 2003).

Desde que o primeiro método para a produção de anticorpos monoclonais foi descrito na década de 70, diversas outras tecnologias surgiram, permitindo a otimização constante dessas moléculas, aumentando sua eficácia terapêutica e segurança. Com os avanços da engenharia genética e biologia molecular, ao passar dos anos, desenvolveu-se estratégias capazes de produzir anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados e, por fim, completamente humanos. No que tange esta última categoria de anticorpos monoclonais, a técnica de expressão em fagos (*Phage Display*) tem significativa contribuição, sendo amplamente utilizada e bem estabelecida. Tais avanços permitiram também o desenvolvimento de anticorpos recombinantes nos mais variados formatos, assim como possibilitou explorar o potencial destas moléculas para além de suas características naturais, através de sua conjugação a fármacos e da geração dos anticorpos biespecíficos.

De maneira geral, as novas gerações de anticorpos monoclonais possuem excelentes propriedades farmacocinéticas, apresentando prolongados tempos de meia-vida, baixa toxicidade e imunogenicidade, alta estabilidade e solubilidade (TILLER; TESSIER, 2015). Em comparação com outros tipos de biofármacos, os anticorpos monoclonais se destacam devido a sua alta especificidade e por serem bem tolerados, minimizando o risco de reações adversas indesejadas, o que permite seu avanço pelos estudos clínicos (WALSH, 2005). Desta forma, o número de anticorpos monoclonais aprovados continua a crescer rapidamente e o sucesso clínico se reflete na contínua busca de novas moléculas pela indústria biofarmacêutica (CYMER, 2011).

Portanto, considerando o grande interesse por fármacos cada vez mais específicos e seguros, bem como o avanço e contribuição dos anticorpos para terapias fármaco-dirigidas, a descoberta de anticorpos monoclonais que possam ser empregados terapeuticamente torna-se uma peça fundamental para a área farmacêutica. Em vista disso, busca-se compreender e evidenciar as estratégias e inovações encontradas na

pesquisa e desenvolvimento desses biofármacos, discutindo o cenário passado e atual, assim como as perspectivas futuras para esse campo de produtos biotecnológicos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe uma revisão sobre as estratégias aplicadas no desenvolvimento e obtenção de anticorpos monoclonais viáveis e com fins terapêuticos, discutindo o cenário passado e atual, bem como as perspectivas futuras para este campo de produtos farmacêuticos. Desta forma, pretende-se contextualizar sobre o histórico de obtenção dos anticorpos monoclonais, contemplando as principais técnicas utilizadas e estratégias desenvolvidas ao longo dos anos, evidenciando suas vantagens e desvantagens. Considerando a importância da metodologia de *phage display* na descoberta de anticorpos monoclonais, essa revisão também busca elucidar e descrever de modo sucinto a metodologia em questão, considerando os princípios e conceitos básicos da técnica e sua aplicação voltada para anticorpos. Por fim, busca-se discutir o cenário de pesquisa e desenvolvimento dessas moléculas, suas finalidades terapêuticas e o mercado de biofármacos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com base no levantamento bibliográfico nas bases de dados eletrônicas como *Pubmed/MEDLINE* e *ISI Web of Knowledge/Web of Science*, utilizando palavras-chaves como *monoclonal antibody*, *phage display*, *bispecific antibody*, *antibody drug conjugate* e *biopharmaceutical market*. Foram selecionados artigos publicados entre os anos de 2000 e 2018, sendo que publicações anteriores ao período estipulado foram aceitas mediante avaliação da sua relevância ao tema. Para fins de inclusão também foram aceitos teses e dissertações pertinentes ao assunto, previamente avaliadas em relação ao seu conteúdo, assim como livros conceituados na área de imunologia e biotecnologia e consulta ao *WebSite* das agências regulatórias internacionais, como *Food and Drug Administration (FDA)*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. HISTÓRICO DE DESENVOLVIMENTO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIOS

A primeira técnica utilizada para a produção de anticorpos monoclonais foi desenvolvida por Köhler & Milstein em 1975 e consistia na fusão de células esplênicas de um camundongo, previamente imunizado, com células de mieloma, dando origem a células híbridas capazes de secretar anticorpos (KOHLER; MILSTEIN, 1975). A técnica foi nomeada de Hibridoma (Fig. 4) e sua descoberta permitiu pela primeira vez a produção de uma população homogênea de anticorpos com especificidade conhecida.

A obtenção dos hibridomas envolve primeiramente a imunização do animal contra um antígeno específico a fim de se obter linfócitos B produtores de anticorpos contra a estrutura de interesse. Como os linfócitos B não podem crescer indefinidamente *in vitro*, essas células retiradas do baço do animal imunizado são fusionadas a uma linhagem de células imortais de mieloma não produtoras de anticorpos e deficientes da enzima Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferase (HGPRT). As células esplênicas proporcionam a capacidade de produzir anticorpos específicos, enquanto que as células de mieloma têm a capacidade de se reproduzir indefinidamente em cultura e, ao serem fusionadas, secretar imunoglobulinas de maneira contínua. Desta forma, são geradas células híbridas, os hibridomas, que reúnem características de ambas as células que as deram origem, sendo capazes de se proliferarem indefinidamente e secretarem anticorpos contra o antígeno utilizado para imunizar o animal (LIU, 2014).

Após a fusão celular, três populações de células permanecem em cultura: linfócitos, células de mieloma e as células híbridas. A seleção dos hibridomas é feita em meio HAT, constituído de hipoxantina, aminopterina e timidina. A aminopterina inibe a enzima diidrofolato-redutase, responsável pela produção de tetrahidrofolato, bloqueando a rota de biossíntese de nucleotídeos pela *via de novo*. As células tornam-se, então, dependentes das vias de salvação que utilizam hipoxantina e timidina para produção de nucleotídeos e síntese de DNA e, portanto, necessitando da enzima HGPRT para a síntese de purinas. Como as células esplênicas são incapazes de proliferar indefinidamente em meio de cultura e as células de mieloma são deficientes da enzima HGPRT, apenas as células híbridas que herdaram a enzima HGPRT provenientes do linfócito B sobrevivem, ou seja, os hibridomas.

A cultura inicial de hibridomas contém uma mistura de células produzindo os anticorpos derivados dos diferentes clones primários de linfócitos B. Para isolar clones que produzem os anticorpos com a especificidade desejada é feita uma subcultura por diluição em placa de 96-poços, de forma que cada poço receba uma única célula de hibridoma. Os sobrenadantes dos poços que apresentam a reatividade desejada são expandidos e utilizados para produção do anticorpo monoclonal. Como cada hibridoma é resultado da fusão com uma única célula B, todos as moléculas de anticorpos produzidas são idênticas em estrutura e específicas contra o mesmo antígeno e epítopo.

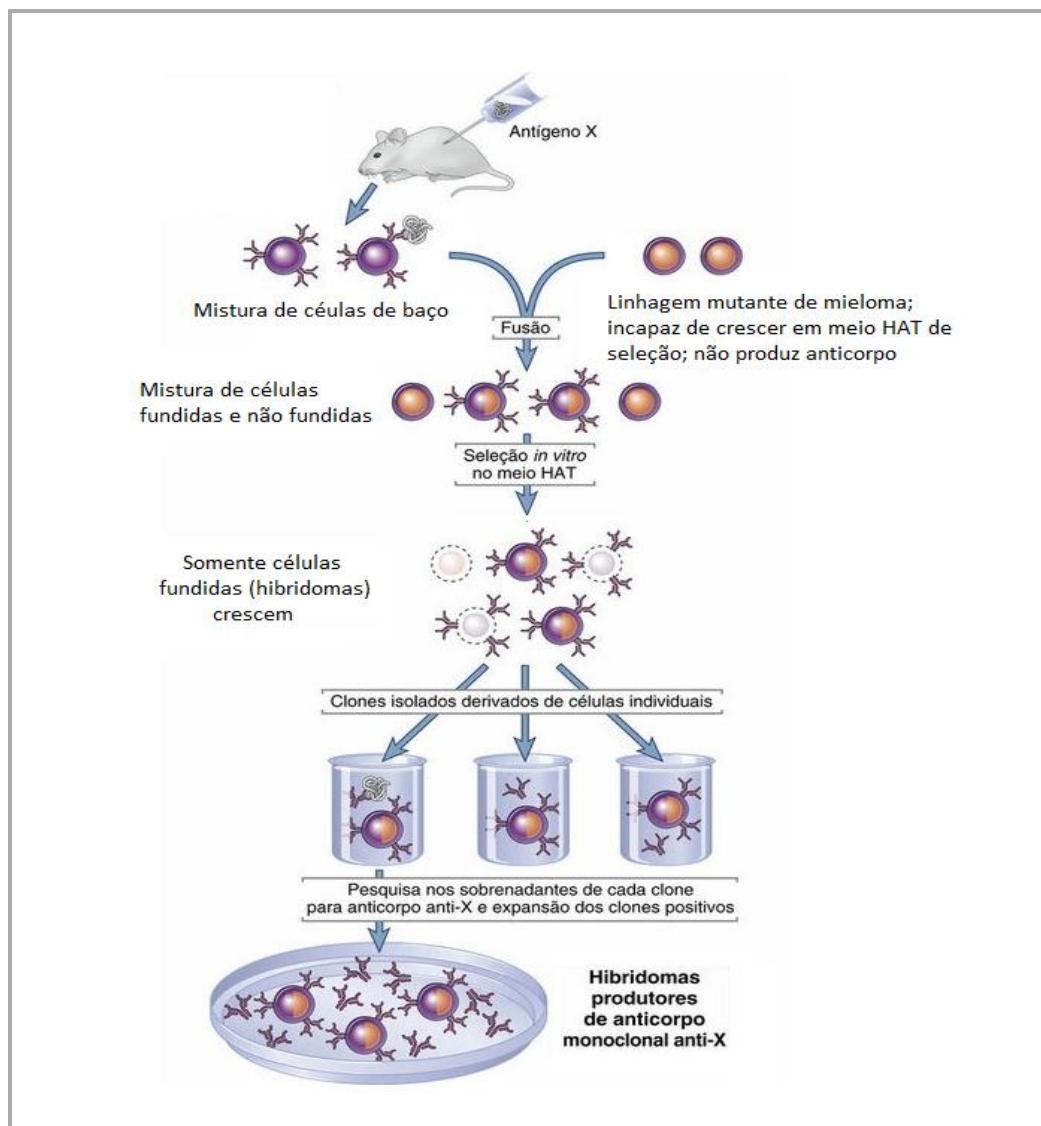


Figura 4. Tecnologia de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais. O animal é primeiramente imunizado com o antígeno de interesse. Em um período posterior, as células esplênicas são retiradas do animal e fusionadas a células pertencentes a uma linhagem de mieloma incapaz de crescer em meio HAT de seleção. Apenas as células híbridas (hibridomas) são capazes de proliferar em tal meio. Os hibridomas produtores do antígeno de interesse são identificados e clonados. (Adaptado de Abbas et al, 2012)

Diante do grande impacto e relevância da descoberta e desenvolvimento dos princípios de produção de anticorpos monoclonais por hibridomas, em 1984 Georges Köhler e César Milstein, juntamente com o imunologista Niels Kaj Jerne, foram condecorados com o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. E em 1986, onze anos após a elucidação desta tecnologia, foi aprovado pelo FDA o primeiro anticorpo monoclonal para uso clínico, o Muromonabe CD3 (Orthoclone®-OKT3), um anticorpo completamente murino anti-CD3 produzido por hibridomas e utilizado contra a rejeição de tecidos transplantados (YAMADA, 2011).

Apesar do significativo avanço para época que a técnica de hibridomas significou e das promessas geradas a cerca desta descoberta, grande parte dos anticorpos monoclonais murinos desenvolvidos não obtiveram o sucesso desejado durante os testes clínicos, tendo seu uso terapêutico limitado devido ao baixo tempo de meia-vida, ativação insuficiente das funções efetoras e o desencadeamento de reações imunológicas, pois induziam o sistema imunológico do paciente a produzir anticorpos contra a própria imunoglobulina administrada. Os anticorpos gerados pela resposta contra os anticorpos murinos foram denominados HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) (LITTLE et al, 2000).

A imunogenicidade tem impactos tanto na farmacocinética quanto na segurança do anticorpo monoclonal administrado, pois resulta em um maior *clearance* dessas moléculas, restringe sua aplicação, compromete a eficácia do tratamento (HARDING et al, 2010) e gera riscos ao paciente. Na tentativa de superar as limitações encontradas para os anticorpos monoclonais murinos em relação a sua inerente imunogenicidade e função efetora reduzida, buscou-se por metodologias que permitissem a obtenção de anticorpos cada vez mais próximos dos humanos.

Ainda nos anos de 1980, anticorpos monoclonais completamente humanos puderam ser produzidos através de hibridomas derivados de linfócitos humanos e células de mieloma, ou por meio da imortalização de linfócitos humanos pelo vírus Epstein-Barr. Porém, tais métodos apresentaram limitações e se demonstraram inviáveis, uma vez que a quantidade produzida era insuficiente e envolviam questões éticas, visto que os linfócitos eram obtidos de pacientes, o que impossibilitava a imunização com antígenos experimentais de interesse (NELSON et al, 2010). Além de não ser aconselhável a produção de biomedicamentos utilizando-se células infectadas com patógenos humanos (p. ex., vírus Epstein-Barr).

Com o advento da engenharia genética, desenvolveu-se em 1984 a técnica de quimerização, dando origem aos anticorpos monoclonais quiméricos (RIBATTI, 2014). Essas moléculas são constituídas pelo domínio variável de origem murina, enquanto que os domínios constantes são humanos, resultando em um anticorpo aproximadamente 65% humano (BUSS et al, 2012). Tais moléculas demonstraram ser superiores aos anticorpos monoclonais totalmente murinos, apresentando melhora na eficácia, aumento no tempo de meia-vida e redução na imunogenicidade, embora não a eliminassem por completo (REICHERT et al, 2005), visto que ainda possuem uma significativa porção não-humana. O cetuximabe (Erbitux®), rituximabe (Mabthera®), e infliximabe (Remicade®) são exemplos de anticorpos monoclonais quiméricos aprovados para uso.

À medida que as técnicas de biologia molecular e engenharia genética progrediram, em 1986, tornou-se possível diminuir ainda mais a porção murina presente no anticorpo. Através da humanização das moléculas de imunoglobulinas, os diferentes *loops* de CDR, principalmente o CDR3, são transferidos do anticorpo murino para a região de *framework* de um anticorpo humano (BREKKE; SANDLIE, 2003), resultando em anticorpos com sequências até aproximadamente 95% humanas (BUSS et al, 2012), que apresentam imunogenicidade muito baixa e um alto potencial para uso terapêutico. O daclizumabe (Zenapax®), foi o primeiro anticorpo monoclonal humanizado aprovado para uso, em 1997. Dentre outros representantes desta categoria, temos o trastuzumabe (Herceptin®), bevacizumabe (Avastin®) e o palivizumabe (Synagis®). Contudo, a técnica de humanização trata-se de um processo complexo e trabalhoso, onde frequentemente a transposição da região variável pode resultar em redução da afinidade pelo antígeno ou produção de anticorpos não funcionais (DUVALL et al, 2011).

Na década de 90, novas tecnologias como a metodologia *in vitro* de expressão em fagos (*Phage Display*) e a produção em camundongos transgênicos deram um novo rumo a área, tornando possível a obtenção direta de anticorpos monoclonais completamente humanos, não sendo necessário humanizar o anticorpo murino. No entanto, disputas por patentes dificultaram o amplo uso dessas técnicas e contribuíram para a escassez destes candidatos a pesquisa clínica nessa década, sendo que os anticorpos quiméricos e humanizados representaram a maioria dos candidatos aos estudos clínicos durante os anos de 1990, dominando a primeira década de aprovação de anticorpos monoclonais terapêuticos (NELSON et al, 2010).

Diferentemente da metodologia de produção de anticorpos por animais transgênicos, a tecnologia de expressão em fagos, que fora desenvolvida em 1990, permitiu pela primeira vez a geração de anticorpos monoclonais completamente humanos *in vitro* e sem a necessidade de imunização, sobretudo permitindo um maior controle sobre os processos que ocorrem *in vivo* (FRENZEL et al, 2018). Além da expressão em fagos, diversas outras tecnologias de *display* têm sido empregadas satisfatoriamente para a produção de anticorpos recombinantes, entre elas pode-se citar principalmente a metodologia de *display* em ribossomos e de *display* em leveduras. No entanto, mesmo com o surgimento dessas novas abordagens, o *phage display* permanece como padrão ouro para a produção de anticorpos recombinantes (BAHARA et al, 2013) e será discutida separadamente adiante. Em 2002, o primeiro anticorpo monoclonal completamente humano recebeu aprovação para uso terapêutico: o adalimumabe (Humira®), um anticorpo IgG1 específico contra TNF- α , aprovado para o tratamento de artrite reumatoide e obtido por *phage display* (HARDING et al, 2010).

O desenvolvimento de camundongos transgênicos capazes de produzir anticorpos humanos em detrimento de anticorpos murinos envolveu duas grandes manipulações do genoma murino: a inativação dos genes de imunoglobulinas do camundongo e a introdução do *loci* de imunoglobulinas humanas (LONBERG et al, 1994). Mais especificamente, houve a inativação dos genes das cadeias pesada e leve capa (κ) do animal e introdução de longos seguimentos gênicos não rearranjados das cadeias pesada e leve capa (κ) humanas. Os genes humanos de imunoglobulinas mostraram-se funcionais nos camundongos para a recombinação e expressão, além de sofrerem mudança de isotipo e maturação da afinidade de forma eficiente, levando os linfócitos B do camundongo a produzirem níveis significantes de um repertório diverso de anticorpos completamente humanos. Os camundongos transgênicos resultantes desta modificação tornam-se, então, capazes de gerar anticorpos humanos antígeno-específicos, cuja diversidade é criada pela recombinação VDJ e hipermutação somática (JAKOBOWITS, 1995; LONBERG, 2008).

Nesta abordagem, camundongos transgênicos podem ser imunizados contra o antígeno de interesse (incluindo proteínas humanas) e produzir anticorpos humanos com alta afinidade de forma bastante similar ao hibridoma (SILVA et al, 2008), não sendo necessário as diversas etapas que envolvem, por exemplo, o processo de humanização. Entretanto, a variedade de anticorpos que o animal produz limita-se a aos抗ígenos que o

sistema imune deste é capaz de reconhecer (DUVALL et al, 2011). O primeiro anticorpo monoclonal obtido por esse método, panitumumabe (Vectibix®), recebeu aprovação nos Estados Unidos em 2006 (HARDING et al, 2010).

A Figura 5 representa as três principais tecnologias desenvolvidas para a produção de anticorpos monoclonais: hibridoma, *phage display* e camundongos transgênicos.

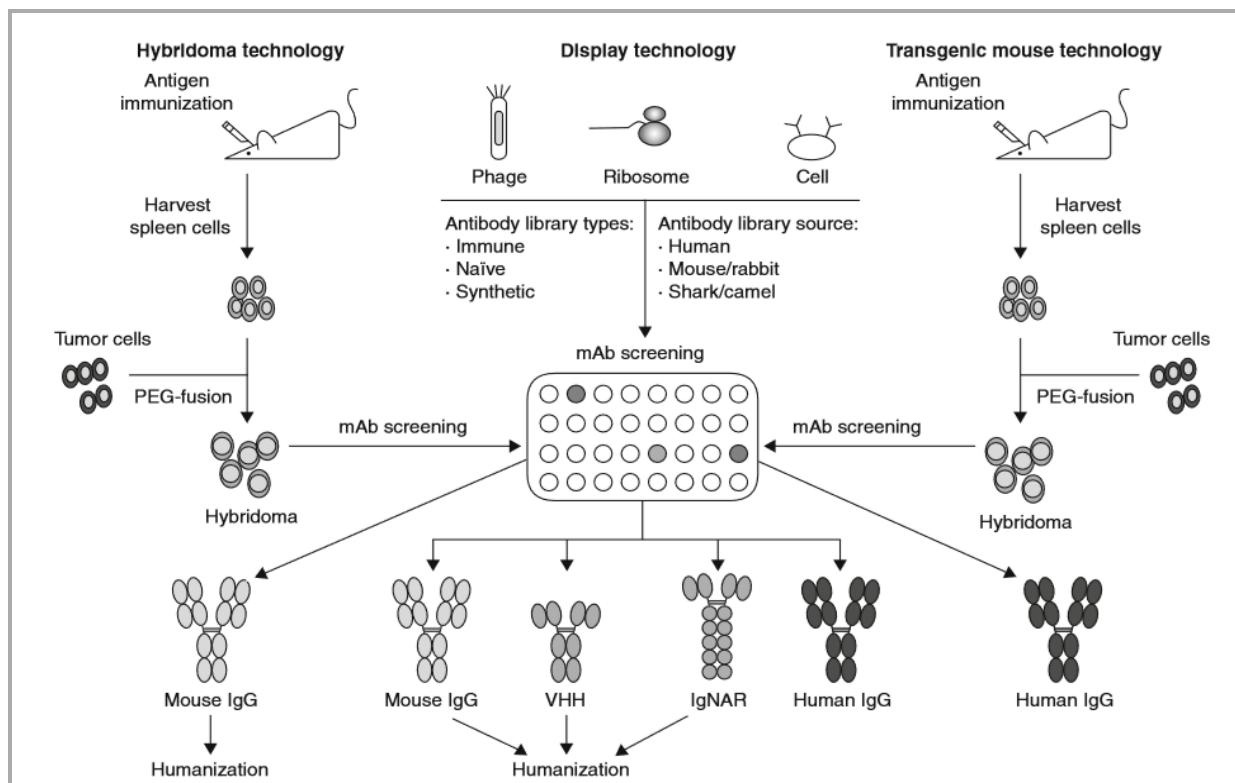


Figura 5. Diferentes abordagens para a produção de anticorpos monoclonais. Do lado esquerdo encontra-se representada a tecnologia convencional de produção de anticorpos por hibridomas. No centro encontram-se os três principais métodos de *display* para obtenção de anticorpos. A produção de anticorpos monoclonais através de camundongos transgênicos está representada do lado direito. (Fonte: Silva et. al, 2008)

De maneira geral, a eliminação das sequências murinas diminuiu a frequência de desenvolvimento de reações imunológicas e de hipersensibilidade (Fig. 6). De acordo com Harding e colaboradores (2010), cerca de 40% dos anticorpos quiméricos eram capazes de estimular a produção pelo paciente de autoanticorpos neutralizantes, enquanto que para os monoclonais humanizados essa porcentagem cai para 9%. Conforme revisto por Nelson e colaboradores (2010), apenas 1% dos pacientes tratados com o anticorpo monoclonal humano panitumumabe apresentaram resultados positivos para a presença de

autoanticorpos neutralizantes. Em contraste, a presença de autoanticorpos contra o anticorpo monoclonal quimérico cetuximabe, em aproximadamente 22% dos pacientes, foi significativamente associado com a hipersensibilidade apresentada. Entretanto, a imunogenicidade de um anticorpo não pode ser prevista apenas com base na quantidade de sequências não-humanas na molécula, uma vez que outros fatores também podem influenciar, tais como a doença a ser tratada, o estado clínico do paciente, o uso concomitante de imunossupressores, modificações pós-traducionais presentes nas moléculas, além do método de análise empregado nos diferentes estudos comparados (HARDING et al, 2010; HWANG; FOOTE, 2005).

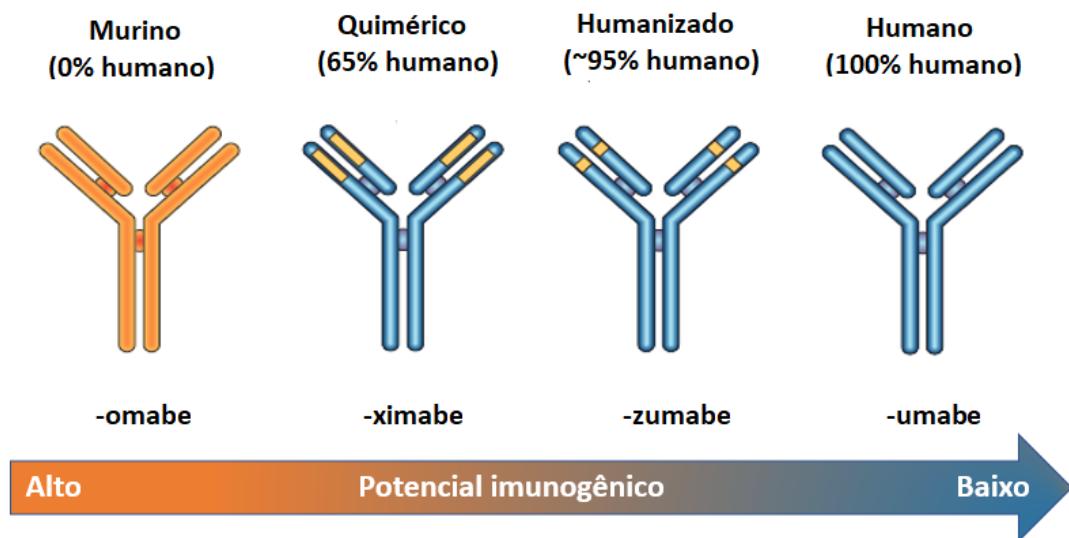


Figura 6. Evolução dos anticorpos monoclonais, nomenclatura e relação com o potencial imunogênico. De modo geral, a redução das porções proteicas murinas (em laranja) em substituição por sequências humanas (em azul) resultaram na diminuição do potencial imunogênico dos anticorpos monoclonais. Os anticorpos murinos, químéricos, humanizados e humanos, são denominados, respectivamente, com os sufixos -omabe, -ximabe, -zumabe e -umabe. (Fonte: Adaptado de Breker e Sandlie, 2003)

4.2. A TECNOLOGIA DE EXPRESSÃO EM FAGOS APLICADA À OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONALAS

4.2.1. PHAGE DISPLAY: METODOLOGIA E CONCEITOS

A técnica de expressão em fagos foi inicialmente descrita por George Smith em 1985, ao ser demonstrado que a inserção de fragmentos de DNA no genoma de bacteriófagos filamentosos permitia a expressão de componentes proteicos exógenos em fusão com proteínas da superfície de partículas virais viáveis. Desta forma, fagos puderam

ser utilizados para expressar peptídeos de interesse como parte de suas proteínas do capsídeo e, então, serem empregados para varrer uma variedade de alvos, de moléculas biológicas a materiais e substâncias inorgânicas, e com base na interação ligante-receptor selecionar proteínas com afinidade para o alvo desejado (SMITH, 1985).

Para que se possa selecionar proteínas por tal metodologia, primeiramente torna-se necessário a criação de uma biblioteca de *phage display*, que consiste em um conjunto de bilhões de fagos que possuem, cada um, uma sequência de DNA exógeno distinta e, portanto, que expressam na superfície de seu capsídeo proteínas ou peptídeos distintos (MAGALHÃES et al., 2016). O processo de seleção é baseado no enriquecimento dos clones através da ligação a molécula alvo, por um processo conhecido como *biopanning* (Fig. 7) e que envolve, basicamente, as seguintes etapas: (1) imobilização da molécula alvo; (2) incubação da biblioteca de fagos com o alvo; (3) remoção por lavagem dos fagos não ligados; (4) eluição dos fagos ligantes; (5) cultivo dos fagos ligantes em bactérias, (6) amplificações em meio líquido de crescimento e submissão a novos ciclos de amplificação.

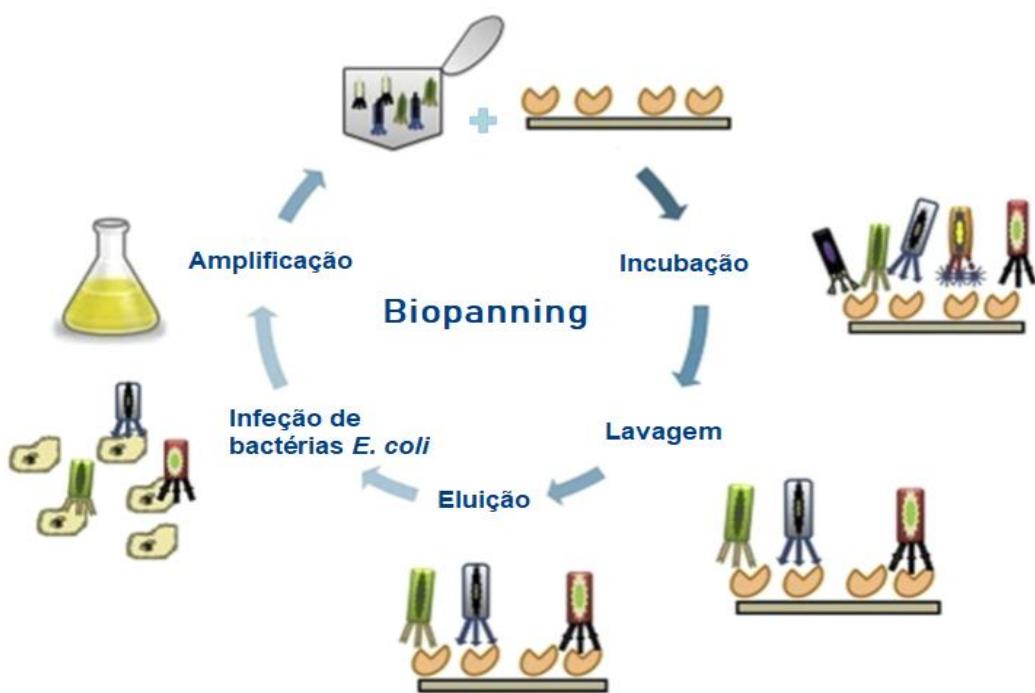


Figura 7. Seleção através do processo de *biopanning*. A molécula-alvo é imobilizada em uma superfície inerte e incubada com a biblioteca de fagos. Após determinado tempo são realizadas diversas lavagens a fim de remover os fagos que não se ligaram ao alvo. Em seguida, os fagos ligantes são eluídos e amplificados para que cada partícula viral se reproduza em milhares de novas cópias, podendo então se realizar repetidos ciclos de seleção (Fonte: Bahara et al., 2013).

O *phage display* permite, portanto, estabelecer uma ligação física direta entre o gene (genótipo) e a proteína ou peptídico expresso (fenótipo), possibilitando a seleção, identificação e recuperação dos genes que codificam a molécula com a propriedade de ligação desejada (ELGUNDI et al, 2017).

Os bacteriófagos filamentosos utilizados nesta técnica correspondem a um grupo de fagos não líticos e de DNA simples fita capazes de infectar bactérias gram-negativas, como por exemplo, *Escherichia coli*. Entre os fagos com utilidade para emprego no *phage display* encontram-se os pertencentes a família Ff, compreendendo o M13, fd e f1. O M13 é o fago mais frequentemente utilizado (RAMI et al., 2017).

As partículas virais dos fagos Ff consistem em um cilindro proteico de aproximadamente 6nm de diâmetro e 900nm de comprimento. O genoma desses bacteriófagos codifica 3 grupos de proteínas: (1) proteínas de capsídeo (III, VI, VII, VIII e IX); (2) proteínas envolvidas na replicação (II, V e X) e (3) proteínas envolvidas na montagem da partícula viral (I, IV e XI). Dentre as proteínas do capsídeo, a proteína VIII corresponde a proteína de superfície mais abundante, presente em diversas cópias que recobrem a extensão do fago, sendo que no fago M13 encontra-se representada por aproximadamente 2700 cópias. Por outro lado, em uma das extremidades do fago encontram-se apenas 5 cópias das proteínas III e VI, e cerca de 3 a 5 cópias das proteínas VII e IX na extremidade oposta (MIVEHROUD et al, 2013).

O processo de infecção da célula bacteriana inicia-se através da ligação da proteína pIII do bacteriófago ao *pilus F* bacteriano, com consequente infecção da bactéria e inserção do conteúdo genético no interior da célula. A célula bacteriana, então, atua fornecendo a maquinaria necessária para a produção de novas partículas virais (Fig. 8) (MAGALHÃES et al., 2016). Como a infecção por estes bacteriófagos não ocasionam a lise celular, uma grande quantidade de partículas virais pode ser obtida.

Os bacteriófagos filamentosos possuem uma série de vantagens para uso como vetores de clonagem e expressão das estruturas codificadas: o seu genoma é capaz de tolerar inserções de grandes fragmentos de DNA em regiões não essenciais sem interferir no empacotamento do fago; o genoma pode ser isolado para clonagem e construção das bibliotecas, as proteínas de superfície podem ser modificadas sem que haja perda de infectividade, o fago é estável sob diversas condições de pH e temperatura e podem se acumular em grandes quantidades dentro da bactéria (PANDE et al, 2010).

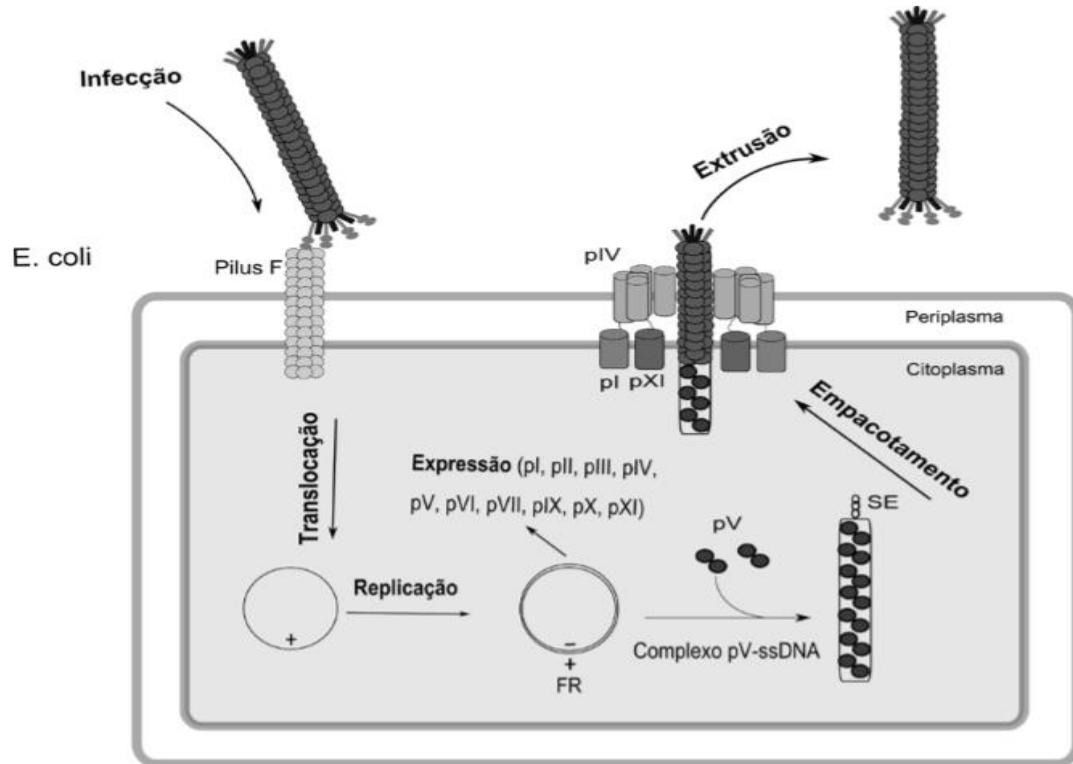


Figura 8. Ciclo de vida dos fagos filamentosos. O processo de infecção tem início através da interação do *pilus F* com *pIII* do fago e translocação do DNA simples fita (fita positiva, +) para o citoplasma. A fita complementar (fita negativa -) é sintetizada por enzimas bacterianas dando origem ao DNA de fita dupla, forma replicativa (FR), utilizado como molde para replicação do genoma e síntese das proteínas envolvidas na replicação e montagem do capsídeo viral. A proteína *pV* interage com as fitas simples de DNA recém-sintetizadas, impedindo a sua conversão a FR, e a estrutura em grampo do sinal de empacotamento (SE) o direciona para o complexo formado na membrana pelas proteínas I, IV e XI. A partícula viral é montada à medida que é secretada da célula e a terminação envolve a incorporação das moléculas de *pIII* e *pVI* (Fonte: Magalhães et al, 2016).

A expressão dos peptídeos de interesse na superfície dos bacteriófagos é possível por meio da manipulação genética dos genes que codificam as proteínas de superfície dos fagos filamentosos (p. ex., o gene III). O DNA exógeno é inserido dentro do genoma do fago e o peptídeo exógeno é codificado e expresso como uma proteína fusionada a proteína de superfície do capsídeo, sem que a capacidade de infecção seja perdida. Em relação a proteína III, na maioria dos casos, o fragmento exógeno é inserido entre a sequência sinal e o começo do domínio N1 (BARBAS et al, 2001).

Entretanto, o tamanho dos peptídeos exógenos em cada cópia da proteína do capsídeo pode se tornar um fator limitante, visto que moléculas grandes podem interferir durante o empacotamento viral e na infecção à bactéria. Todavia, essa limitação pode ser superada através da produção de vírus híbridos, no qual o gene que codifica o peptídeo exógeno é carregado em um *phagemid*, um plasmídeo que também possui a origem de

replicação e o sinal de empacotamento do fago (Fig.9a), enquanto que a proteína de capsídeo selvagem e os demais genes necessários para a produção viral são fornecidos por um fago auxiliar (*helper phage*) que não possui o sinal de empacotamento. A co-infecção da bactéria com o *phagemid* e o fago auxiliar resulta na produção de vírus híbridos, que contém tanto cópias da proteína pIII selvagem quanto cópias do peptídeo exógeno fusionado à proteína do capsídeo, esta última em menor quantidade, e carregam o genoma do *phagemid* (Fig. 9b) (PANDE et al, 2010). Essa abordagem possui como principal vantagem a possibilidade de apresentação de peptídeos ou proteínas recombinantes sem limite de tamanho (MAGALHÃES et al., 2016) e é utilizada, por exemplo, para a expressão de fragmentos de anticorpos na superfície dos fagos. O gene marcador de seleção, como o de resistência a antibióticos permite, posteriormente, a seleção das bactérias infectadas pelos fagos que possuem o *phagemid*.

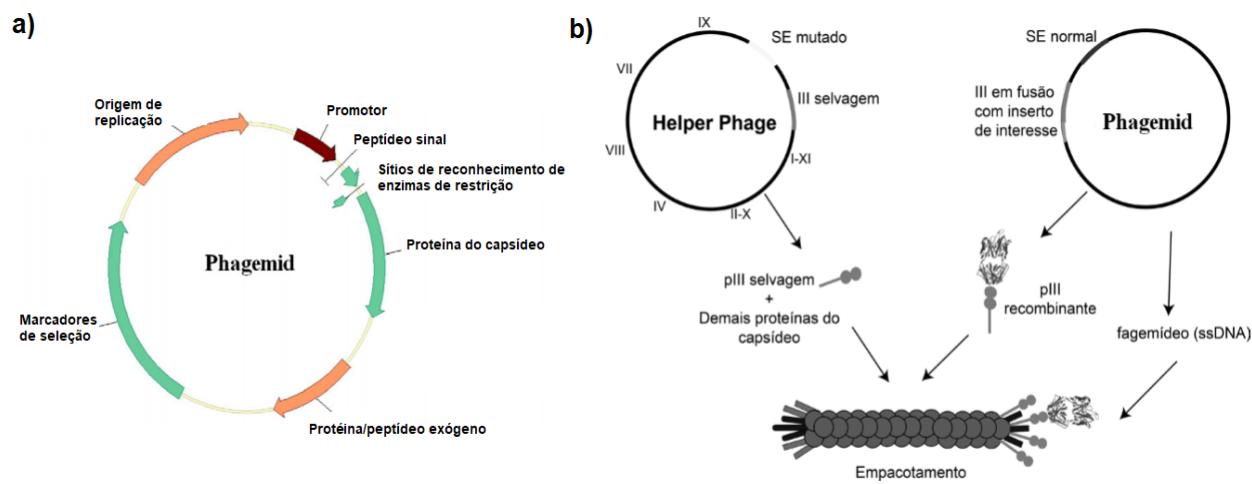


Figura 9. Sistema de *display* com emprego do *phagemid*. a) Estrutura do vetor *phagemid*. b) Esquema do sistema de expressão *phagemid/helper phage*. A obtenção de vírus híbridos permite a expressão de proteínas e peptídeos exógenos na superfície do fago em menores quantidades, não impactando no processo de empacotamento e infecção. (Adaptado de Qi et al, 2011 e Magalhães et al, 2016)

4.2.2. PHAGE DISPLAY DE ANTICORPOS

Em 1990, a aplicação do *phage display* para anticorpos foi demonstrada pela primeira vez por McCafferty e colaboradores, quando evidenciaram que os domínios

completos da região variável das imunoglobulinas podiam ser apresentados na superfície dos bacteriófagos fd, sem que houvesse perda de funcionalidade e especificidade pelo antígeno, com possibilidade de posterior isolamento do fago por cromatografia de afinidade. Nesta abordagem, genes da região variável das imunoglobulinas originados de hibridomas ou células B foram amplificados e clonados dentro dos vetores de expressão e os fagos que carregavam tais genes puderam ser selecionados diretamente contra o antígeno (McCAFFERTY et al, 1990).

Embora tenha sido demonstrado que as proteínas de capsídeo VII e IX podem ser utilizadas para a expressão de fragmentos de anticorpos, as proteínas mais comumente empregadas são a III e VIII. A proteína III, apesar de permitir a apresentação de apenas cerca de 5 moléculas por partícula viral, possibilita um melhor empacotamento, em relação as demais proteínas de capsídeo, quando fusionada a moléculas exógenas grandes (BARBAS et al, 2001).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais por *phage display* introduziu uma grande variedade de formatos de anticorpos recombinantes (Fig. 10), permitindo a superação de determinadas limitações do método relacionadas ao tamanho da proteína e o processo de empacotamento discutidas anteriormente. Por razões como essas, fragmentos pequenos como o fragmento de cadeia única Fv (scFv) e o Fab têm sido as principais estruturas produzidas e utilizadas por *phage display* (BAHARA et al, 2013), uma vez que é muito difícil para uma bactéria produzir toda uma molécula de anticorpo.

O fragmento de cadeia única Fv (ScFv), anticorpo *single chain*, trata-se de um componente obtido por engenharia e consiste na conexão dos domínios variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) por um espaçador peptídico rico em glicina e serina, com cerca de 10 a 25 aminoácidos (MIVEHROUD et al, 2013). Já os anticorpos Fab são constituídos por uma porção Fv formada pelos domínios variáveis das cadeias leve e pesada (V_L e V_H) e por uma porção constante composta pelas regiões C_H1 e C_L .

Para construção das bibliotecas de anticorpos é importante definir o tipo de fragmento, Fab ou scFv, com o qual pretende-se trabalhar. As moléculas scFv apresentam como vantagem a possibilidade de serem construídas em formas multivalentes, aumentando a avidez contra o alvo, além de sua amplificação por PCR ser mais fácil, reduzindo o número de etapas para a construção da biblioteca. Já os fragmentos Fab tendem a ser mais estáveis com relação a aspectos cinéticos e termodinâmicos, porém

apresentam baixa expressão em *E. coli*, quando comparado as moléculas pequenas scFv (MIVEHROUD et al, 2013).

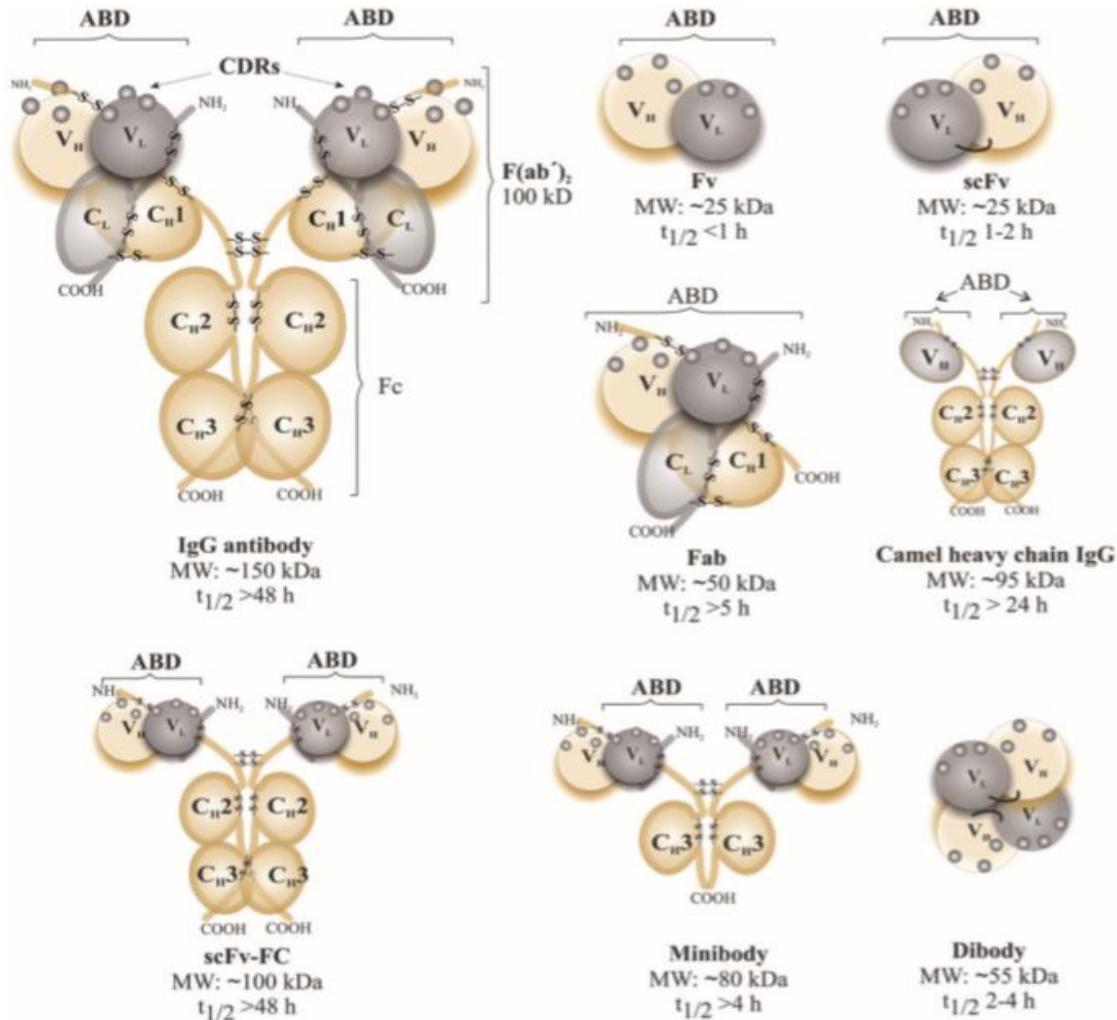


Figura 10. Estrutura de uma molécula de anticorpo e suas variações produzidas por engenharia genética. A esquerda no canto superior encontra-se a representação de uma molécula de anticorpo completa (IgG), as demais estruturas representam as variações obtidas por engenharia genética. Duas construções de ScFv expressas simultaneamente associam-se para formar um anticorpo bivalente com duas especificidades (*diabody*). ABD: antigen binding domain. (Fonte: Zhao et al, 2016)

A biblioteca de anticorpos corresponde a uma coleção de diferentes genes das regiões variáveis dos anticorpos clonados em fusão com os genes responsáveis pela expressão da proteína do capsídeo. Dependendo do tipo de biblioteca gerada, seu repertório pode variar em torno de 10^6 a 10^8 moléculas distintas (BAHARA et al, 2013). As bibliotecas podem ser classificadas em duas categorias principais, de acordo com a fonte

dos genes das regiões variáveis utilizadas para sua construção: bibliotecas naturais derivadas de doadores imunizados e não imunizados, ambos em relação ao antígeno de interesse, e bibliotecas sintéticas contendo genes construídos completamente ou parcialmente *in vitro* (ZHAO et al, 2016).

Os métodos utilizados para a geração das bibliotecas de anticorpos geralmente precisam mimetizar três fenômenos biológicos principais que ocorrem durante a produção de uma imunoglobulina *in vivo*. O primeiro corresponde ao rearranjo gênico V(D)J das regiões V_H e V_L . No *phage display* de anticorpos, o processo de criação de diversidade combinatória é realizado pelo emparelhamento aleatório dos segmentos de genes V_H e V_L que são obtidos por meio das fontes naturais ou sintéticas. Em segundo lugar, o processo pelo qual os linfócitos B são ativados pelo antígeno e ocorre a expansão clonal é simulado *in vitro* por meio do *panning* da biblioteca contra o antígeno de interesse e posterior amplificação dos fagos selecionados em *E. coli*. Em terceiro, o processo de maturação da afinidade, que ocorre *in vivo* e resulta na produção de anticorpos com maior afinidade, pode ser mimetizado por estratégias que permitem mutagênese sítio dirigida e alterações da cadeia leve/pesada a fim de criar bibliotecas otimizadas (ZHAO et al, 2016).

As bibliotecas imunes são derivadas do mRNA de IgG de linfócitos B provenientes, por exemplo, de animais imunizados ou de doadores humanos que já tiveram contato com o antígeno. Este tipo de biblioteca resulta em anticorpos com alta afinidade e especificidade, visto que os genes da região variável já passaram pelo processo de maturação da afinidade, permitindo a obtenção de anticorpos com afinidade comparável aqueles gerados em uma resposta imunológica secundária. Assim, a diversidade gerada pelas bibliotecas imunes tende a ser pequena e tem sido utilizada, por exemplo, para a seleção de anticorpos específicos contra agentes virais, toxinas bacterianas e抗原s presentes na superfície de células tumorais. Entretanto, possui como principal desvantagem a necessidade de imunização, tanto pelo tempo dispendido quanto pela imprevisibilidade da resposta imunológica, podendo resultar, em alguns casos, na não produção de anticorpos contra determinados抗原s. Além disto, possui limitações quanto ao antígeno utilizado na imunização, visto que抗原s tóxicos, imunossupressores e mortais não podem ser empregados por questões éticas. O isolamento de anticorpos contra抗原s próprios também não é possível devido ao desenvolvimento de tolerância imunológica pelo sistema imune. Outra desvantagem relaciona-se a necessidade de geração de uma nova imunização e uma nova biblioteca

para cada antígeno desejado. Devido a aspectos éticos, bibliotecas imunes humanas apenas podem ser geradas por linfócitos B obtidos de pacientes já acometidos pela doença (BAHARA et al, 2013).

Já as bibliotecas não-imunes, ou bibliotecas *naïve*, são derivadas de doadores que não foram expostos ao antígeno e utilizam o mRNA de células B periféricas ou provenientes de órgãos hematopoiéticos. O reportório oriundo de IgM é usualmente o escolhido ao invés do IgG, pois não foi submetido ao mecanismo de tolerância e seleção clonal e, portanto, possui maior diversidade. Quando comparadas as bibliotecas imunes, possuem diversas vantagens: (1) anticorpos específicos podem ser produzidos sem a necessidade de contato prévio com o antígeno, desta forma, anticorpos contra抗igenos próprios, não-imunogênicos ou tóxicos podem ser obtidos; (2) aspectos éticos envolvendo a imunização de doadores humanos é evitada; (3) a biblioteca é suficientemente grande e diversa e pode ser utilizada para uma grande variedade de抗igenos, não sendo preciso imunização para cada antígeno de interesse. A maior desvantagem da biblioteca não-imune é que os anticorpos obtidos geralmente possuem afinidade comparável a de anticorpos gerados durante a resposta imunológica primária. Assim, torna-se necessário a construção de bibliotecas grandes e com alta diversidade para que se consiga realizar a seleção de anticorpos com alta afinidade ou, então, otimizar a afinidade por processos *in vitro* (SILVA et al, 2008; ZHAO et al, 2016).

Ao contrário das bibliotecas de origem animal ou humana e que representam a diversidade do repertório de anticorpos destes organismos, nas bibliotecas sintéticas, a diversidade da região variável é obtida artificialmente através da reconstrução dos genes desta região por meio da randomização das regiões de CDRs, permitindo a obtenção de anticorpos contra uma enorme variedade de抗igenos. A randomização de CDRs é frequentemente realizada na CDR3 da cadeia pesada, pois corresponde ao *loop* mais diverso em termos de tamanho e sequência, além de sua grande contribuição para a ligação ao antígeno. Diante da relevância da CDR-H3, a randomização isolada desta região pode interferir na funcionalidade das demais 5 regiões de CDR. Com o objetivo de expandir a diversidade da biblioteca, pode-se realizar também a randomização da CDR3 da cadeia leve. De modo semelhante as bibliotecas não-imunes, permite a produção de anticorpos contra抗igenos não-imunogênicos, toxinas e抗igenos-próprios (BAHARA et al, 2013; ZHAO et al, 2016).

O processo de criação de bibliotecas permite a combinação entre cadeias leves e pesadas que normalmente não seriam possíveis na natureza e se por um lado possibilita o desenvolvimento de anticorpos que dificilmente seriam obtidos *in vivo*, por outro lado também podem resultar em anticorpos não funcionais e inviáveis (HAMMERS; STANLEY, 2013). Outro desafio encontra-se na união dos fragmentos selecionados ao restante da molécula de anticorpo, que pode resultar na diminuição da afinidade, tornando necessário processos posteriores de otimização da molécula.

O primeiro anticorpo humano isolado por *phage display*, Humira®, foi primeiramente selecionado como um fragmento scFv expressado na superfície do fago e posteriormente construído no formato da IgG1 humana, fornecendo maior validação para a técnica (ELGUNDI et al, 2017). Dentre outros anticorpos produzidos por expressão em fagos estão o raxibacumabe (AEthrax®, aprovado em 2012) e belimumabe (Benlysta®, aprovado em 2011), utilizados respectivamente para profilaxia e tratamento de antrax e lúpus eritematoso sistêmico. O raxibacumabe é um exemplo que ilustra a importância e utilidade de metodologias *in vitro* no desenvolvimento de anticorpos contra antígenos letais *in vivo* (NIXON et al, 2014).

O *phage display* de anticorpos possui diversas vantagens, tais como o tempo relativamente curto para geração dos anticorpos, por ser um método *in vitro* independe de qualquer regulação pelo sistema imunológico e torna possível controlar e manipular as condições de seleção (BAHARA et al, 2013). O controle sobre os processos biológicos e bioquímicos permite a obtenção de anticorpos que não poderiam ser gerados através da imunização clássica, tais como anticorpos contra moléculas muito pequenas ou não-imunogênicas. Além disso, possibilita que a especificidade do anticorpo seja moldada desde o início do processo, uma vez que uma série de condições podem ser simuladas a fim de selecionar o anticorpo desejado. Por exemplo, ao ser adicionado um competidor solúvel durante a fase de seleção para o antígeno imobilizado, um reação-cruzada indesejada pode ser eliminada e um anticorpo específico para uma estrutura particular do antígeno pode ser selecionado (FRENZEL et al, 2018).

Quando comparada a tecnologia convencional de hibridomas, a metodologia de expressão em fagos possibilitou avanços significativos para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, tornando viável a produção de imunoglobulinas contra toxinas e estruturas conservadas, um controle preciso sobre o desenvolvimento dos anticorpos produzidos e a não necessidade de imunização (BAHARA et al, 2013). Além disso,

demonstra ser uma plataforma versátil, permitindo a expressão de milhões de fragmentos distintos e a seleção rápida de anticorpos recombinantes altamente específicos para alvos biológicos relevantes. Desta forma, esta tecnologia tornou-se atrativa e amplamente explorada pela indústria farmacêutica, destacando-se entre as demais metodologias *in vitro* e facilitando a descoberta e desenvolvimento de anticorpos monoclonais com valores terapêuticos.

4.3. NOVAS ABORDAGENS NO DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS

Apesar do grande avanço encontrado no desenvolvimento de anticorpos monoclonais, representado pelas moléculas humanizadas e completamente humanas obtidas pelos métodos discutidos anteriormente, diversas melhorias foram e ainda são necessárias para que o pleno potencial terapêutico desses compostos seja atingido. Assim, a necessidade e o interesse pela otimização de suas demais propriedades conduziram ao desenvolvimento de estratégias adicionais que envolvem alterações na molécula, visando o aperfeiçoamento de características farmacocinéticas e farmacotécnicas, bem como que possibilitem a expansão e potencialização de seus atributos.

Neste sentido, várias estratégias têm sido desenvolvidas buscando modificações na molécula que resultem em: (a) aumento da especificidade e afinidade pelo antígeno, (b) diminuição da imunogenicidade, (c) aumento da função efetora, (d) melhoria da formulação em termos de estabilidade e solubilidade final do produto, (e) regime de tratamento e vias de administração e (f) simplificação do processo produtivo. Como exemplos, em relação a otimização da afinidade e especificidade pelo antígeno, as técnicas que envolvem o aperfeiçoamento das CDRs apresentam grande destaque, conforme mencionado anteriormente. Já a potencialização da função efetora tem sido realizada através de modificações na sequência de aminoácidos e/ou no perfil de glicosilação da porção Fc, visando aumentar a afinidade pelos receptores Fc γ (TILLER; TESSIER, 2015; ELGUNDI et al, 2017).

Ainda neste cenário, as estratégias que possibilitam a obtenção de anticorpos com novas propriedades, além das já mencionadas (reconhecimento do antígeno e função efetora), trouxeram novas oportunidades para a área, permitindo expandir e explorar ainda mais o potencial terapêutico das imunoglobulinas. Essas novas moléculas são tidas como

a futura geração de anticorpos monoclonais e estão representadas pelos anticorpos biespecíficos e conjugados a fármacos, ambos discutidos a seguir.

4.3.1. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

Os anticorpos biespecíficos correspondem a uma classe de moléculas construídas artificialmente e capazes de ligar-se simultaneamente a dois alvos distintos, uma vez que reúnem em uma única molécula dois sítios diferentes de ligação ao antígeno (FOURNIER; SCHIRRMACHER, 2013).

O desenvolvimento de moléculas biespecíficas abriu novas perspectivas para a área de anticorpos terapêuticos, ampliando o leque de alvos biológicos para uma única molécula de imunoglobulina, o que se torna vantajoso, visto que diversas doenças são multifatoriais e envolvem diferentes vias de sinalização. A biespecificidade também possibilitou o recrutamento de células específicas do sistema imunológico com atuação essencial na fisiopatologia da doença, contribuindo para seu direcionamento até o alvo desejado (FAN et al, 2015). Dentre outras vantagens, há o direcionamento das moléculas de anticorpos para órgãos específicos através da ligação, por exemplo, a proteínas de transportes, enquanto o outro sítio liga-se ao antígeno, bem como pode proporcionar o aumento da especificidade por células patogênicas através da ligação a dois抗ígenos distintos na superfície da célula-alvo ao invés de apenas um (TILLER; TESSIER; 2015).

Os anticorpos biespecíficos podem ser produzidos basicamente através de três metodologias: (1) conjugação química cruzada de dois anticorpos; (2) tecnologia de quadromas baseada na fusão de duas linhagens diferentes de hibridomas e (3) abordagens genéticas que empregam a tecnologia de DNA recombinante (FAN et al, 2015). Quanto a esta última abordagem, atualmente há mais de 50 diferentes formatos de anticorpos biespecíficos em desenvolvimento, sendo possível trabalhar parâmetros como tamanho, tempo de meia-vida, flexibilidade, orientação e valência a fim de conseguir atingir o resultado terapêutico desejado (Fig. 11) (ELGUNDI et al, 2017).

De modo geral, são divididos em duas grandes categorias, os que possuem a região Fc (*IgG-like*) e aqueles que não a possuem, sendo estes últimos, moléculas menores em relação a molécula de IgG. Quando essas duas classes são comparadas, tem-se que a presença da região Fc facilita a purificação e favorece o aumento da

solubilidade e estabilidade da molécula, além de contribuir para mediação de funções efetoras terapeuticamente desejadas, tais como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e fixação do complemento, assim como contribui para aspectos farmacocinéticos como o aumento do tempo de meia-vida, tanto pelo tamanho maior que confere à molécula quanto ao processo de reciclagem mediado por FcRn. Por outro lado, as moléculas de anticorpos isentas da região Fc têm sua atividade terapêutica baseada inteiramente na capacidade de ligação ao antígeno e, por serem moléculas menores, possuem penetração em tecidos aumentada. No entanto, o tamanho menor destas moléculas acarreta em maior *clearance* renal e, portanto, no aumento do número de doses necessárias e diminuição dos intervalos entre as administrações. Alternativas como a conjugação a moléculas de polietilenoglicol (PEG), fusão a peptídeos PEG-miméticos ou a albumina têm sido consideradas para aumentar o tempo de meia-vida das estruturas não IgG-like (KONTERMANN; BRINKMANN, 2015).

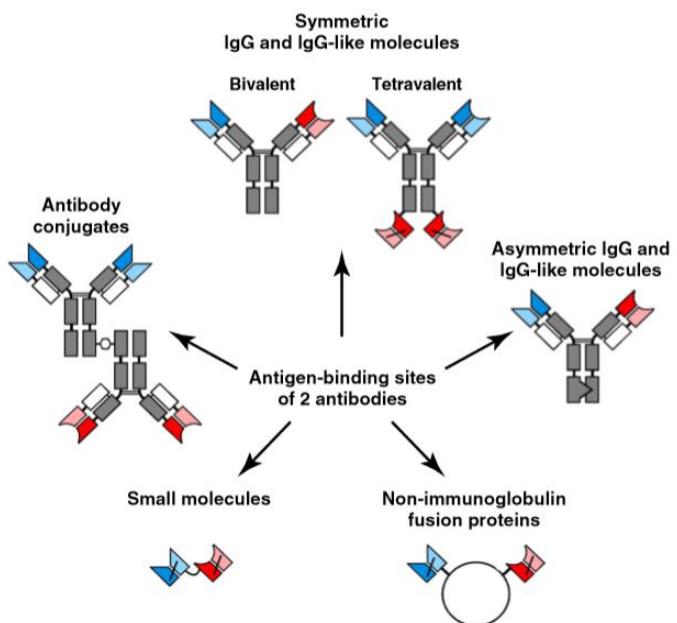


Figura 11. Diferentes estratégias utilizadas para o desenvolvimento de anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos podem se apresentar tanto no formato da molécula de IgG, simétricas ou assimétricas, quanto na forma de fragmentos isentos da porção Fc. (Fonte: Kontermann e Brinkmann, 2015)

Devido as vantagens proporcionadas pela porção Fc, o desenvolvimento de anticorpos biespecíficos tem tido como foco as moléculas do tipo IgG. Dentre os principais obstáculos encontrados durante a obtenção destas moléculas encontra-se a dificuldade no

pareamento correto entre as cadeias pesadas provenientes de cada anticorpo, assim como entre as cadeias leves e suas respectivas cadeias pesadas. As principais estratégias que visam a superação desse desafio são (Fig. 12): (a) fusão de hibridomas provenientes de espécies distintas, visto que as cadeias leves tendem a se combinar com as cadeias pesadas da mesma espécie, enquanto que para a combinação entre cadeias pesadas essa tendência é menor (*Quadroma Triomab*); (b) manipulação do domínio C_H3 de um dos anticorpos a fim de formar uma protuberância, tipicamente através da exposição de um resíduo de aminoácido, enquanto que o domínio C_H3 do outro anticorpo é manipulado a fim de conter um “buraco”, geralmente devido a substituição de resíduos de aminoácidos maiores por menores, permitindo o encaixe desejado entre as cadeias pesadas (*Knobs into holes*); (c) dissociação entre as cadeias pesadas, sem dissociá-las das cadeias leves, e posterior ligação alternada *in vitro*; (d) permutação entre as regiões C_H1 e C_L entre as cadeias leves e pesadas do mesmo anticorpo, resultando uma cadeia leve modificada que tenderá a se combinar com a respectiva cadeia pesada também modificada (*CrossMAb*) e (e) adição de domínios variáveis provenientes de um anticorpo as regiões N-terminais dos domínios V_H e V_L do segundo anticorpo (*dual-variable domains*) ou ligação à porção constante das cadeias leves ou pesadas (IgG-scFv) (TILLER; TESSIER, 2015; FAN et al, 2015).

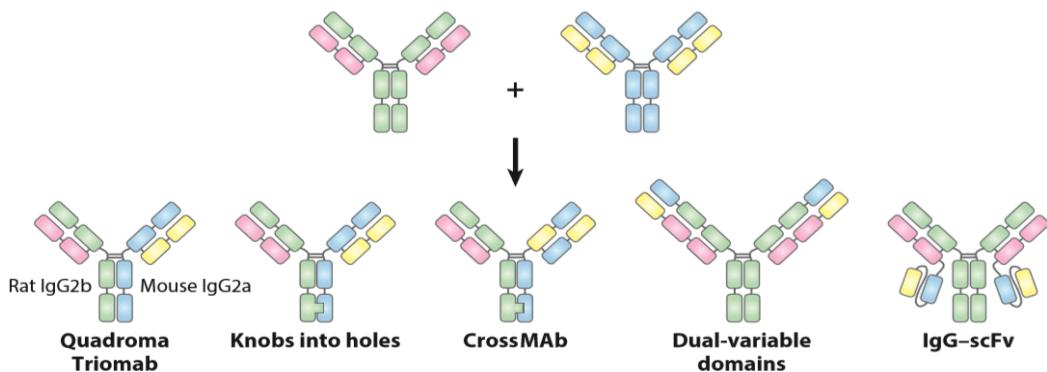


Figura 12. Diferentes estruturas resultantes das estratégias empregadas para obtenção anticorpos biespecíficos do tipo IgG. A fim de permitir o correto emparelhamento das cadeias leves e pesadas que compõem os anticorpos biespecíficos IgG-like, diversas estratégias surgiram resultando em variados formatos de anticorpos. (Fonte: Tiller e Tessier, 2015)

Em relação as terapias contra o câncer, os anticorpos biespecíficos têm demonstrado ser importantes agentes terapêuticos e, geralmente, a estratégia utilizada consiste no reconhecimento do antígeno presente na célula tumoral por um dos sítios de ligação,

enquanto o segundo sítio reconhece o antígeno presente na célula efetora, como por exemplo, os marcadores CD3, CD16 ou CD64 expressos respectivamente em linfócitos T, células *Natural Killer* (NK) e células mononucleares. Tal abordagem promove, portanto, a proximidade entre as células efetoras e células tumorais, aumentando as chances de combate e morte das células tumorais pelo próprio sistema imune. Um aspecto importante desta estratégia é que os linfócitos T citotóxicos não possuem o receptor Fc γ e com o emprego dos anticorpos biespecíficos, o redirecionamento dessas células até a respectiva célula-alvo tornou-se possível (FOURNIER; SCHIRRMACHER, 2013).

Em 2009, foi aprovado pela *European Medicines Agency* (EMA) o primeiro anticorpo biespecífico para uso terapêutico: o catumaxomabe (Removab®), um anticorpo trifuncional anti-EpCAM e anti-CD3, originado através da tecnologia de quadromas e constituído por uma IgG2a de camundongo e uma IgG2b de rato. O catumaxomabe permite a ligação simultânea a células T e células tumorais, respectivamente, via interação com CD3 e com a molécula de adesão celular epitelial (EpCAM), esta última expressa em grandes quantidades em carcinomas (LINKE et al, 2010). A porção Fc confere a molécula um terceiro sítio de ligação e proporciona duas funções cruciais: (1) aumento da capacidade de morte da célula tumoral através do recrutamento de macrófagos e células NK; (2) eficiente co-estimulação das células T através do contato direto com as células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas ou através da secreção de citocinas (Fig. 13) (CHAMES; BATY, 2009).

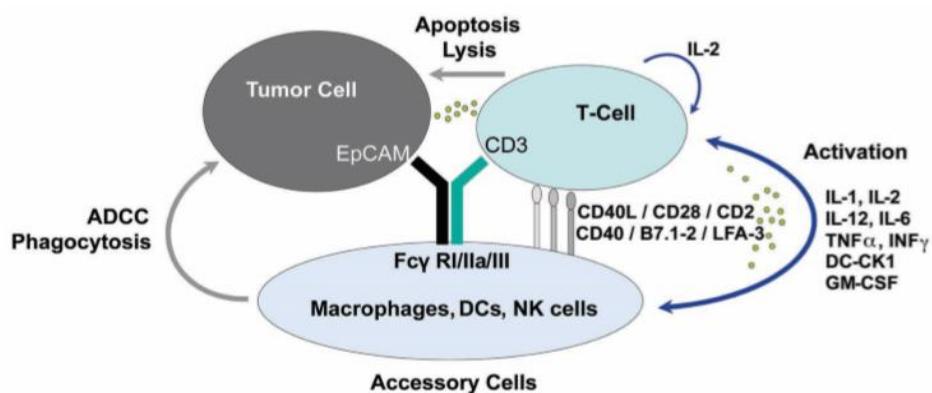


Figura 13. Mecanismo de ação do catumaxomabe. O catumaxomabe é um anticorpo biespecífico trifuncional que se liga simultaneamente as células tumorais, as células T e as células imunes acessórias. A proximidade entre tais componentes acelera o reconhecimento das células tumorais pelas células do sistema imune, desencadeando uma série de mecanismos de ação: ativação das células T e lise da célula tumoral, citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) e a fagocitose. (Fonte: Linke et al, 2010).

O blinatumomabe (Blinacyto®), anti-CD19 e anti-CD3, é o primeiro BiTE (da sigla em inglês *bispecif T cell engager*) aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2014 para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda. Os BiTEs correspondem a moléculas pequenas, com aproximadamente 55 kDa e formadas apenas por dois fragmentos scFv distintos conectados por um espaçador peptídico flexível. Enquanto um dos fragmentos scFv liga-se ao antígeno na superfície do tumor, o outro fragmento interage com a célula T através da ligação ao CD3 (Fig. 14). O blinatomomabe é um potente agente citotóxico tumoral, mesmo em baixas concentrações, agindo através do redirecionamento de células T. No entanto, possui meia-vida menor que 2 horas, necessitando, portanto, de infusões intravenosas contínuas, e ilustrando os desafios encontrados para os anticorpos isentos da porção Fc. Além disso, alguns pacientes tratados com essa molécula apresentam neurotoxicidade e síndrome de liberação de citocinas. Apesar dos desafios, os BiTEs continuam a ser estudados para outros alvos (p. ex. EpCAM) (FAN et al, 2015; ELGUNDI et al, 2017).

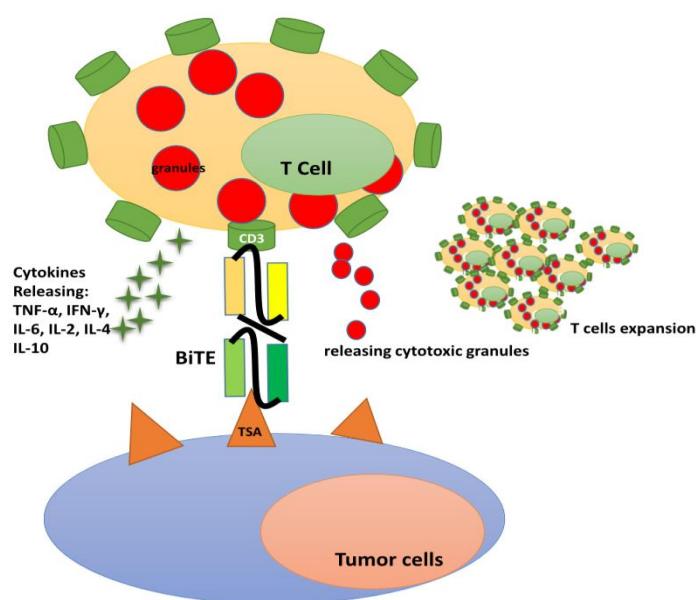


Figura 14. Mecanismo de ação dos BiTEs. Os BiTEs são constituídos por dois fragmentos scFv conectados por um espaçador peptídico, um deles se liga ao linfócito T via interação com CD3 enquanto o outro interage com o antígeno presente na célula tumoral. Tal estratégia permite o redirecionamento das células T até as células tumorais. (Fonte: Fan et al, 2015)

Além das abordagens exemplificadas pelos dois anticorpos biespecíficos já aprovados para uso e que representam uma grande parcela das estratégias empregadas para as moléculas em estudo clínico, há também abordagens em estudo que visam, por exemplo, o bloqueio de dois receptores, duas citocinas pró-inflamatórias ou inativação de dois ligantes.

4.3.2. ANTICORPOS CONJUGADOS A FÁRMACOS

Os anticorpos conjugados a fármacos (ADC na sigla em inglês) surgiram como uma alternativa em oncologia para o direcionamento de fármacos citotóxicos até as células tumorais e se tornaram uma promissora classe de biofármacos contra o câncer (SCHUMACHER et al, 2016). Considerando que os agentes citotóxicos não são específicos e, portanto, podem exercer sua toxicidade em diversos tipos celulares, a conjugação destes fármacos a moléculas de anticorpos monoclonais permitiu combinar a potência das moléculas citotóxicas com a especificidade conferida pelos anticorpos a fim de induzir a atividade antitumoral, enquanto minimiza os efeitos de toxicidade sistêmica do fármaco livre (BAKHTIAR, 2016).

Os ADCs são constituídos por três componentes principais: um anticorpo monoclonal, o fármaco e um espaçador sintético responsável por conectá-lo ao anticorpo (Fig. 15).

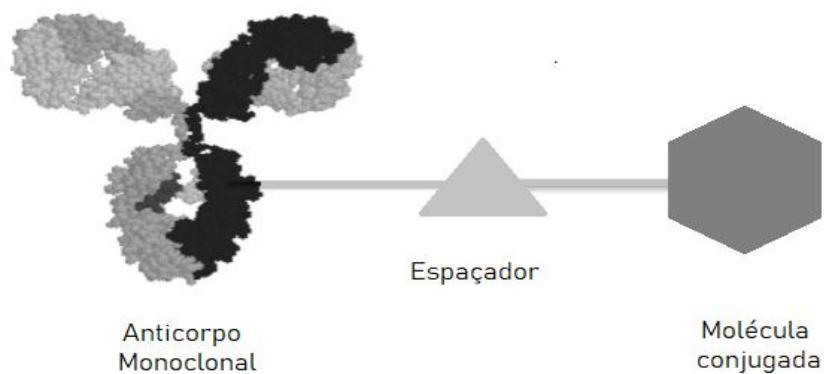


Figura 15. Estrutura dos anticorpos conjugados a fármacos. Os ADCs são contíuidos por três componentes: anticorpo monoclonal, um espaçador e a molécula a ser conjugada. (Adaptado de Bakhtiar, 2016)

O processo de desenvolvimentos destes compostos é complexo e enfrenta diversos desafios, tanto em termos bioquímicos e de caracterização analítica, quanto de formulação (BAKHTIAR, 2016). Além disto, cada um dos três componentes mencionados acima precisar atender a critérios determinados para que seja possível, no final do processo, a obtenção de um ADC potente, eficaz e seguro para uso terapêutico.

A maioria dos anticorpos conjugados a fármacos em estudo clínico são baseados em duas classes principais de agentes anti-mitóticos, auristatinas e maitansinóides, ambas inibidoras da polimerização da tubulina (ELGERSMA et al, 2015), e apresentam o mecanismo de ação ilustrado na figura 16. Tal fato reflete as dificuldades em se encontrar moléculas que atendam aos diversos critérios necessários para que a conjugação ao anticorpo seja bem-sucedida como, por exemplo, suscetibilidade a modificações na molécula que permitam sua ligação ao espaçador e a respectiva imunoglobulina, manutenção da sua potência após conjugação, não provocar a agregação entre as moléculas de anticorpo, possuir um nível de solubilidade adequada e permanecer estável em solução (BECK et al, 2017).

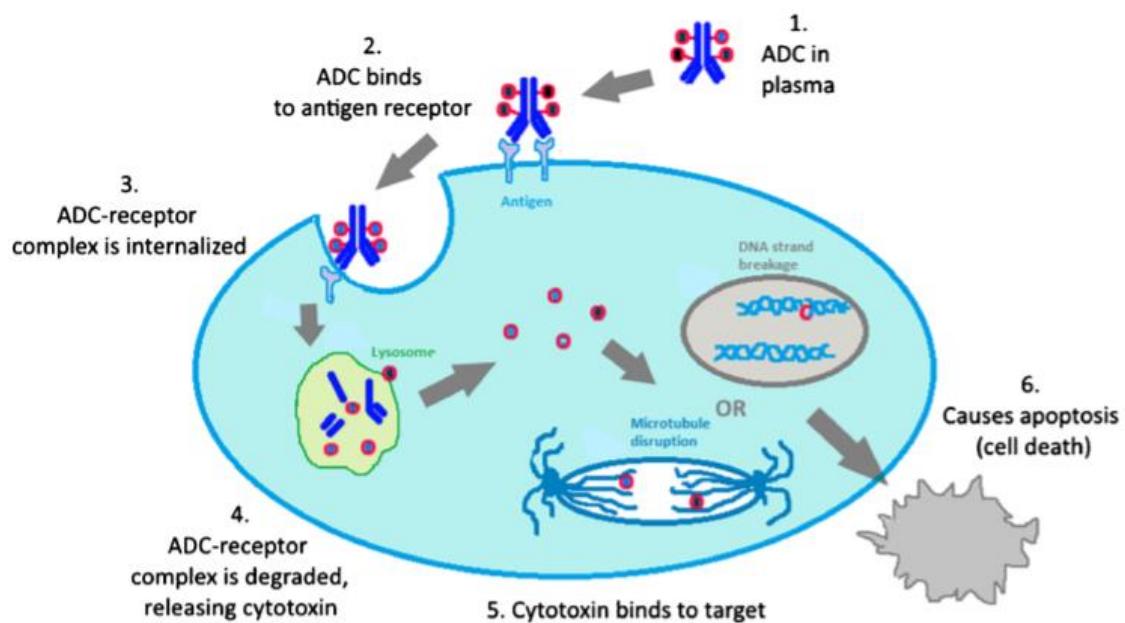


Figura 16. Mecanismo de ação dos ADCs. O anticorpo monoclonal é responsável pelo direcionamento até a célula-alvo através da interação com o antígeno e, então, o ADC é internalizado. Após internalização, o fármaco é liberado e pode atuar em seu respectivo alvo. (Fonte: Jain et al, 2015)

Outro ponto a ser considerado é a otimização dos espaçadores, pois ao mesmo tempo que precisam ser estáveis durante a circulação do ADC pelo organismo, necessitam promover a liberação do fármaco ao atingir o respectivo alvo, uma vez que a liberação prematura pode acarretar em toxicidade e redução da eficácia terapêutica (BECK et al, 2017). Os espaçadores são divididos em duas categorias: cliváveis e não cliváveis. Os cliváveis utilizam as seguintes estratégias para liberação do fármaco: (1) degradação por proteases presentes no interior da célula-alvo, (2) sensibilidade a variações de pH entre o citosol e o interior do endossomo e lisossomo e (3) sensibilidade a glutationa (presente no meio intracelular) por intermédio da redução de pontes dissulfeto presentes no espaçador. Quanto aos espaçadores não cliváveis, a liberação da molécula conjugada ocorre através da degradação do anticorpo após sua internalização (JAIN et al, 2015).

Com relação à molécula de anticorpo, para que essa possa direcionar corretamente o fármaco ao seu respectivo alvo, é desejável que interaja com um antígeno altamente expresso na superfície da célula-alvo, pouco expresso em tecidos normais e passível de internalização via interação com receptores mediadores da endocitose (JACKSON; STOVER, 2015). Tal abordagem aumenta tanto o direcionamento para os tecidos afetados, quanto permite a liberação e acúmulo do fármaco no interior da célula-alvo, contribuindo para uma baixa toxicidade e aumento da eficácia terapêutica. Portanto, a afinidade e especificidade do anticorpo pelo antígeno, bem como a escolha do antígeno-alvo, tornam-se aspectos chaves para que o direcionamento do fármaco ocorra de forma correta. Adicionalmente, é importante garantir que a conjugação ao fármaco não afete a estabilidade do anticorpo, a sua internalização pela célula ou ligação ao antígeno e demais aspectos farmacocinéticos (BAKHTIAR, 2016). Embora a maioria dos ADCs em estudo visem a internalização do conjugado, novas abordagens buscam a interação com antígenos presentes na neovasculatura do tumor e a liberação do fármaco na corrente sanguínea (CASI; NERI, 2012)

Dentre os desafios enfrentados, o maior deles corresponde a obtenção de moléculas de IgG que permitam a conjugação em posições definidas na molécula de imunoglobulina, que sejam tanto propícias para a conjugação do fármaco, quanto possibilitem a produção de estruturas finais homogêneas. As metodologias convencionais, empregadas para diversos ADCs em estudo, promovem a conjugação do fármaco de maneira não-seletiva a resíduos expostos de cisteína ou lisina presentes na superfície do anticorpo. Entretanto, conferem um controle estequiométrico limitado devido ao grande

número de ligações dissulfeto e resíduos de lisina presentes nas imunoglobulinas e implica em uma distribuição não uniforme das moléculas do fármaco, que variam, em termos de quantidade e posição, de um anticorpo para outro. A heterogeneidade apresentada acarreta em uma mistura de ADCs com possíveis diferenças de afinidade, estabilidade, farmacocinética, eficácia e perfil de segurança (AXUP et al, 2012), provocando variações entre lotes produzidos com impacto tanto no processo produtivo quanto na aplicação clínica (SOCHAJ et al, 2015).

O Kadcyla® (ado-trastuzumabe emtansina), aprovado em 2013 pelo FDA para o tratamento de câncer de mama Her2 positivo, corresponde a um ADC cuja conjugação ocorre nos resíduos de lisina do Trastuzumabe IgG, sendo que o anticorpo monoclonal em questão possui um total de 88 lisinas, das quais 70 mostraram-se capazes de se ligarem ao fármaco emtansina (SCHUMACHER et al, 2016).

Diferentemente da ligação a lisina que ocorre através do grupo amina, a conjugação à cisteína ocorre após redução de quatro pontes dissulfeto inter-cadeias, disponibilizando oito grupos tióis para ligação. Embora esta última estratégia também gere ADCs heterogêneos, o número de espécies é significativamente menor em comparação com a conjugação a resíduos de lisina. O Adcetris® (brentuximabe vedotin), aprovado em 2011 para o tratamento de Linfoma Hodgkin, é um exemplo de ADC obtido por conjugação a cisteína (SOCHAJ et al, 2015). O Kadcyla® e Adcetris® são os dois únicos ADCs aprovados atualmente para uso terapêutico, entretanto, mais de quarenta ADCs estão em estudo clínico e muitos outros em estudos pré-clínicos (ELGUNDI et al, 2017).

A importância de considerar os diversos fatores supracitados pode ser ilustrada pelo Mylotarg®, descontinuado em 2010 (dez anos após sua aprovação) por falta de benefícios clínicos e possível toxicidade observada durante sua fase comercial. Similarmente ao Kadcyla®, o Mylotarg® era gerado através da conjugação a lisinas, porém 50% das moléculas permaneciam não conjugadas. Tal característica, em conjunto com a estabilidade insuficiente do espaçador, pode ter contribuído para sua falha na terapêutica (SOCHAJ et al, 2015).

A fim de produzir ADCs homogêneos, novas estratégias surgiram como alternativas aos métodos convencionais mencionados, permitindo modificações na estrutura do anticorpo que possibilitem a ligação do fármaco a sítios específicos e pré-determinados. Dentre eles pode-se citar: (a) introdução de resíduos de cisteína na molécula de anticorpo por mutação ou inserção, contornando a necessidade de se reduzir as pontes dissulfeto

inter-cadeias; (b) substituição de cisteínas inter-cadeias por serinas a fim de reduzir os sítios potenciais de ligação; (c) incorporação de aminoácidos não naturais ou raros (selenocisteína) ao anticorpo e conjugação ao fármaco através de métodos químicos que não interferem nos aminoácidos comuns e (d) métodos enzimáticos que ativam açúcares ou aminoácidos específicos (TILLER, TESSIER, 2015; SOCHAJ et al, 2015).

4.4. ANTICORPOS MONOCLONIAIS: APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS E O MERCADO DE BIOFÁRMACOS

O termo biofármacos surgiu na década de 1980 e se refere a produtos farmacêuticos produzidos por processos biotecnológicos com emprego de métodos de biologia molecular. Dentro desta categoria de produtos encontram-se, por exemplo, os produtos baseados em ácidos nucléicos, as proteínas recombinantes e os anticorpos monoclonais. Diferentemente dos fármacos sintéticos, os biofármacos, ou medicamentos biológicos, caracterizam-se por sua complexidade em termos de estrutura, tamanho molecular e mecanismo de ação (BRODACKA, 2017).

Os anticorpos monoclonais representam atualmente uma das maiores classes de biofármacos e são utilizados em terapias contra o câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares, transplantes de órgãos, infecções, doenças respiratórias e oftalmológicas (BRODACKA, 2017). No entanto, observa-se que o desenvolvimento destas moléculas tem tido como foco o tratamento do câncer e de doenças imunológicas, sendo que a maioria dos anticorpos monoclonais comercializados estão indicados para doenças que se enquadram nessas duas categorias (REICHEERT, 2008).

Contudo, é importante ressaltar aprovações recentes para outras categorias não tão usuais como, por exemplo, o evolocumabe (Repatha®) e o alirocumabe (Praluent®), ambos aprovados em 2015 para tratamento de hiperlipidemia e com alvo a PCSk9 (*Food and Drug Administration*, 2018). O interesse pelos anticorpos monoclonais também se manifesta em doenças neurodegenerativas, tal como Alzheimer, que possui representantes em estudo clínico, tendo como alvo proteínas beta-amiloides.

Um dos aspectos que tornam as moléculas de anticorpos monoclonais atrativas é a possibilidade, muitas vezes, da extensão de suas indicações para demais doenças e tratamentos através de aprovações suplementares. O Humira®, por exemplo, recebeu sua

primeira aprovação em 2002 para o tratamento de artrite reumatoide e posteriormente foi aprovado pelo FDA para: artrite psoriática (em 2005), espondilite anquilosante (em 2006), doença de Crohn's (em 2007), artrite juvenil idiopática e psoríase crônica em placas (ambas em 2008) (NELSON, et al 2010). Além disso, alguns podem inclusive receber aprovação em mais de uma categoria terapêutica, como é o caso do rituximabe aprovado para o tratamento de linfoma não Hodgkin e artrite reumatoide (REICHEERT, 2008).

Durante os anos de 1980, período marcado pelos anticorpos monoclonais murinos, as vendas e o índice de aprovação desses produtos apresentaram crescimento lento, mantendo-se assim até o final dos anos de 1990, quando o primeiro anticorpo monoclonal químérico foi aprovado. A aprovação dos anticorpos químéricos, seguida pela dos humanizados e, posteriormente, dos anticorpos completamente humanos provocou uma enorme mudança nesse cenário, com um drástico aumento do índice de aprovação e vendas (EKER et al, 2015). Enquanto que no final dos anos 80, anticorpos monoclonais representavam 11% do total de biofármacos aprovados, entre 2010 e 2014 esse número aumentou para aproximadamente 27% (Fig. 17) (WALSH, 2014).

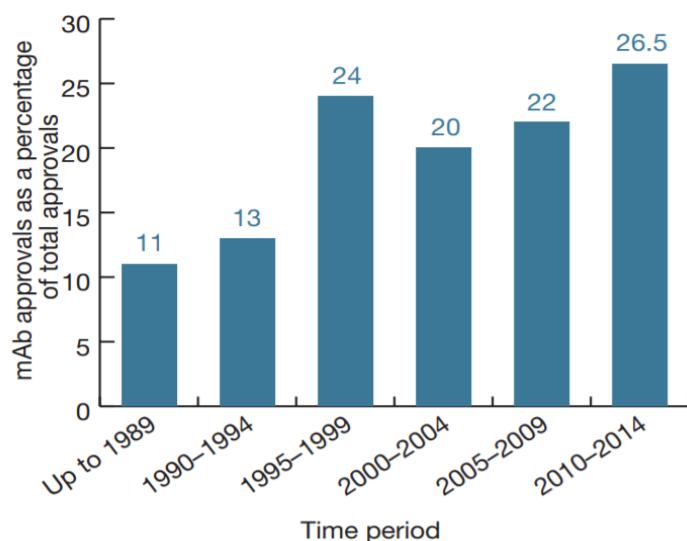


Figura 17. Aprovação dos anticorpos monoclonais em relação ao demais biofármacos. O gráfico mostra a porcentagem de anticorpos monoclonais aprovados por período em relação ao total de biofármacos aprovados entre os mesmos anos. (Fonte: Walsh, 2014)

Em 2013, as vendas globais de anticorpos monoclonais atingiram em torno de 75 bilhões de dólares, cerca de 50% do total de vendas de biofármacos, correspondendo a

classe mais lucrativa dentre os medicamentos biológicos. Neste mesmo ano, cinco anticorpos monoclonais (Humira®, Remicade®, Rituxan®, Avastin®, Herceptin®) arrecadaram em vendas, cada um, mais de 6 bilhões de dólares, com o Humira®, em especial, gerando em torno de US\$11 bilhões em vendas, sendo o produto mais lucrativo de 2013 (EKER et al, 2015). Já em 2016, as vendas atingiram US\$106,9 bilhões, representando 66% das vendas totais de biofármacos (sem incluir as vacinas). Dentre os 10 biofármacos mais vendidos (Fig. 18) estavam seis anticorpos monoclonais (Humira®, Remicade®, Rituxan®/MabThera®, Herceptin®, Avastin®, Opdivo®), onde novamente o Humira® teve destaque, acumulando US\$16,5 bilhões (BRODACKA, 2017). A posição notória de tais moléculas, no entanto, não se restringe apenas em relação aos biofármacos: dentre os 10 fármacos mais vendidos de 2017, cinco são anticorpos monoclonais.

Segundo revisto por Nelson e colaboradores (2010), a maioria dos anticorpos monoclonais completamente humanos em estudo clínico são provenientes de duas metodologias principais: camundongos transgênicos e *phage display*. A transição destes candidatos nos estudos clínicos corresponde a 89% entre as fases I e II, 51% entre a II e III e, por fim, 73% entre a fase III e aprovação.

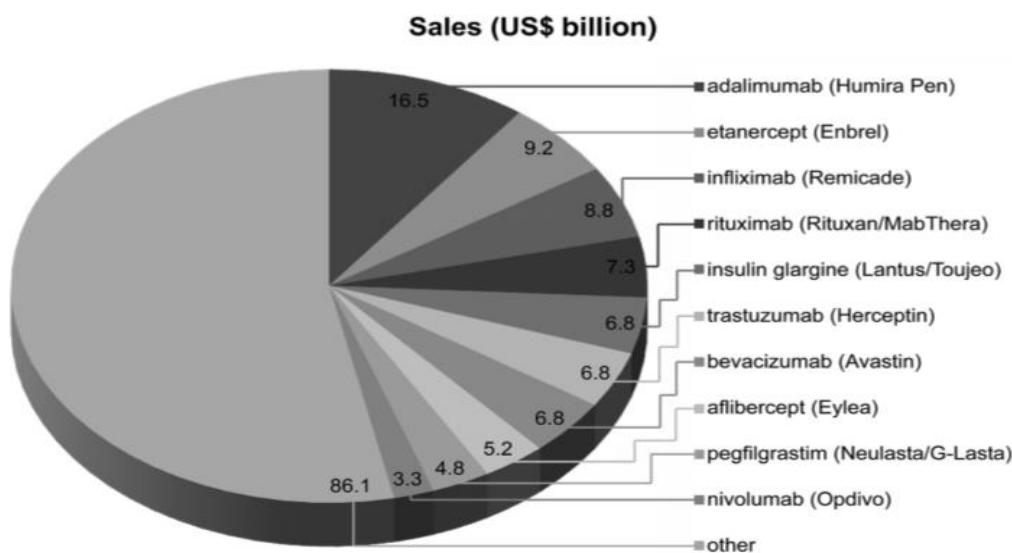


Figura 18. Vendas (em bilhões de dólares) dos 10 biofármacos mais vendidos no ano de 2016. Dentre os 10 biofármacos mais vendidos estavam seis anticorpos monoclonais (Humira®, Remicade®, Rituxan®/MabThera®, Herceptin®, Avastin®, Opdivo®). (Fonte: Brodacka, 2017)

Em 2016, havia mais de 50 anticorpos monoclonais aprovados para uso pelas agências americana e europeia, FDA e EMA, e em torno de 500 anticorpos estavam em estudo clínico (FRENZEL et al, 2016). Dentre os anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA entre o ano de 2015 e março de 2018, a maioria corresponde a anticorpos humanizados e humanos, sendo que de um total de 27 moléculas, apenas 2 são anticorpos químicos, enquanto 12 são humanizados e 13 completamente humanos, mostrando, assim, o novo cenário para essa categoria de biofármacos. Considerando o período entre os anos de 2015 e 2017, o índice de aprovação atual corresponde a, em média, cerca de 8 anticorpos monoclonais por ano, representando aproximadamente 22% do total de aprovações (incluindo os medicamentos não biológicos) no período estipulado (*Food and Drug Administration*, 2018).

Em relação aos formatos de anticorpos monoclonais aprovados para uso terapêutico, a grande parcela corresponde a anticorpos completos do tipo IgG, enquanto que os fragmentos de anticorpos ainda representam uma minoria. Como exemplos de fragmentos de anticorpos utilizados terapeuticamente, temos o abciximabe (ReoPro®), ranibizumabe (Lucentis®), certolizumabe pegol (Cimzia®), blinatumomabe (Blinacyto®). O abiximabe e ranibizumabe correspondem a fragmentos Fab, o primeiro utilizado na inibição da agregação plaquetária, tendo como alvo a proteína GPIIb/IIIa e o segundo, um anticorpo anti-VEGF, empregado para o tratamento da degeneração macular relacionada a idade. O certolizumabe pegol é um exemplo de anticorpos no formato Fab', anti-TNF- α , aprovado para doença de Chron's e artrite reumatoide (ELVIN, et al 2013).

Tendo em vista que o período de patente de diversos anticorpos monoclonais em uso na clínica expirou ou está para expirar em breve, observa-se na última década o aumento no interesse das indústrias farmacêuticas por investimentos pesados no desenvolvimento de biossimilares, a fim de competir com os anticorpos monoclonais *blockbuster* (ELGUNDI et al, 2017). Os biossimilares (em analogia aos medicamentos genéricos) são produtos semelhantes ao produto de referência/inovador, não apresentando diferenças clínicas significativas, em termos de segurança, pureza e potência. Devido ao tamanho e complexidade das moléculas biológicas, e considerando que variações no processo produtivo podem impactar algumas propriedades físico-químicas da molécula, é impossível obter uma cópia exata do produto referência (p.ex. diferenças na glicosilação). Assim, são necessários testes posteriores para comprovação da biossimilaridade, que englobam a caracterização da estrutura (sequência de aminoácidos, estrutura secundária

e terciária, perfil de modificações pós-traducionais, etc), testes *in vitro* para comprovação de interação com o alvo e testes *in vivo* para avaliação da segurança e eficácia, entre outros (CARRASCOSA et al, 2018). No entanto, apesar das dificuldades encontradas, a produção de biossimilares traz novas perspectivas e alternativas para o mercado, tornando-o mais competitivo e possibilitando a introdução de moléculas de anticorpos monoclonais e demais biofármacos a um menor custo, sendo um aspecto importante visto que são moléculas com alto valor agregado.

5. CONCLUSÃO

Apesar da tecnologia de hibridomas não ter apresentado o sucesso clínico inicial esperado, sua descoberta serviu de base e incentivo para as estratégias subsequentes e, portanto, representou um marco na história diante do progresso na terapêutica proporcionado pela introdução dos anticorpos monoclonais. Atualmente, os principais métodos de obtenção destas moléculas para fins terapêuticos estão contemplados pelas técnicas de *phage display*, camundongos transgênicos e de humanização, responsáveis pela maioria dos candidatos a entrarem em estudos clínicos e a serem aprovados para uso.

Embora as primeiras metodologias desenvolvidas tenham tido como foco a especificidade e a diminuição da imunogenicidade, esta última por meio da redução ou eliminação das porções murinas, o novo cenário de estratégias busca o aperfeiçoamento dos anticorpos obtidos pelos métodos *in vivo* e *in vitro*. Ou seja, a otimização de outros atributos, tais como função efetora e formulação, bem como conferir propriedades adicionais, por exemplo, a biespecificidade. Desta forma, o maior desafio atual encontra-se em desenvolver anticorpos que reúnam em uma única molécula os diversos atributos desejáveis para o sucesso terapêutico: alta especificidade e afinidade pelo antígeno, funções efetoras otimizadas, toxicidade baixa, solubilidade e estabilidade adequadas. Entretanto, considerando que as imunoglobulinas são moléculas de natureza complexa e alterações em sua estrutura a fim de otimizar ou agregar novas propriedades podem levar ao detimento de outras, as modificações realizadas devem ser cuidadosamente estudadas e planejadas.

Por tudo isso, estamos entrando em uma nova fase dos anticorpos monoclonais como medicamentos. As recentes aprovações de anticorpos biespecíficos ou conjugados à

fármacos, em conjunto com os significativos avanços na área de engenharia de anticorpos, renovam as expectativas e estimulam o interesse acerca do desenvolvimento destas categorias de biomoléculas. Essa nova geração abre outras possibilidades para o uso de anticorpos terapeuticamente, indo além da sua função neutralizante. Os anticorpos bispecíficos são capazes de redirecionar as células do sistema imunológico, estimulando e integrando um novo tipo de resposta terapêutica. Já os anticorpos conjugados a fármacos possibilitam o sistema de *drug-delivery*, permitindo que moléculas tóxicas demais para serem administradas na sua forma livre possam ser utilizadas de forma segura nos pacientes quando conjugadas com os anticorpos.

Em paralelo, a contínua expansão das tecnologias de DNA recombinante possibilita a geração de diversos formatos de fragmentos de anticorpos que, apesar de ainda representarem uma parcela pequena do mercado, futuramente poderão se tornar moléculas de destaque e com grande potencial terapêutico. Entretanto, para isso, torna-se necessário que suas propriedades farmacocinéticas sejam otimizadas, principalmente, o tempo de meia-vida. Se devidamente contornadas estas limitações, os fragmentos de anticorpos poderão revolucionar o atual cenário dos biofármacos, por permitirem uma nova gama de funções, por exemplo: a possibilidade de estruturas multiméricas que vão além dos biespecíficos, ou moléculas com maior alcance e penetração tecidual, além da simplificação e redução dos custos de produção.

Em resumo, a grande versatilidade e possibilidade de exploração da estrutura e função das imunoglobulinas, associada ao progresso dos estudos e compreensão de diversas doenças a nível molecular, torna os anticorpos monoclonais uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de novas terapias, alcançando os mais variados alvos e vias biológicas e anunciando o futuro da terapêutica com tratamentos cada vez mais sofisticados, seguros e específicos.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. ; PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012.
- AXUP, J. Y. et al. Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** Vol. 109. p. 16101-16106, 2012.
- BAHARA, N. H. H.; TYE, G. J.; CHOONG, Y. S.; ONG, E. B. B.; ISMAIL, A.; LIM, T. S. Phage display antibodies for diagnostic applications. **Biologicals**. Vol. 41. P. 209-216, 2013.
- BAKHTIAR, R. Antibody drug conjugates. **Biotechnol Lett**. Vol. 39; p. 1655-1664, 2016.
- BARBAS, C. F. III.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage Display: A laboratory manual. CSHL Press. 2001.
- BECK, A.; GOETSCH, L.; DUMONTET, C.; CORVAIA, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. **Nature**. Vol. 16. p. 315 – 321, 2017.
- BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. **Nature**. Vol. 2. p. 52-62, 2003.
- BRODACKA, M. K. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. P. 1-17. 2017.
- BUSS, N. A. P. S.; HERNDERSON, S. J.; McFARLANE, M.; SHENTON, J. M.; HAAN, L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**. Vol. 12. p. 615-622, 2012.
- CARRASCOSA, J. M.; HACOBS, I.; PETERSEL, D.; STROHAL, R. Biosimilar drugs for psoriasis: Principles, presente and Near Future. **Dermatology and Therapy**. 2018.
- CASI, G.; NERI, D. Antibody-drug conjugates: Basic concepts, examples and future perspectives. **Journal of Controlled Release**. Vol 161, p. 422-428, 2012.
- CHAMES, P.; BATY, D. Biespecific antibodies for cancer therapy: The light at the end of tunnel? **mAbs**. Vol. 1:6. p. 539-547, 2009.
- CYMER, F.; BECK, H.; ROHDE, A.; REUSCH, D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation – Structure, function and therapeutic potential. **Biologicals**. p. 1045 – 1956, 2017.
- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The immune system. **The New England Journal of Medicine**. Vol. 343, p. 37-49, 2000.
- DUVALL, M.; BRADLEY, N.; FIORINI, R. N. A novel platform to produce human monoclonal antibodies: The next generation of therapeutic human monoclonal antibodies discovery. **mAbs**. Vol 3. p. 203-208, 2011.
- ECKER, D.; M. JONES, D. N. LEVINE, H. L. The therapeutic antibody market. **mAbs**. p. 9-10, 2015.
- ELGERSMA, R. C. et al. Design, Synthesis, and Rvaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985. **Molecular Pharmaceutics**. Vol. 12. p. 1813-1835, 2015.

- ELGUNDI, Z. RESLAN, M.; CRUZ, E. SIFNIOTIS, V.; KAYSER, V. The state-of-play and future of antibody therapeutics. **Advanced Drug Delivery reviews**. Vol 122. p. 2-19, 2017.
- ELVIN, J. G.; COUSTON, R. G.; WALLE. C. F. V. D.; Therapeutic antibodies: Marked considerations, disease targets and bioprocessing. **International Journal of Pharmaceutics**. p. 83-98. Vol. 440, 2013.
- FAN, G.; WANG, Z.; HAO, M.; LI, J. Biespecific antibodies and their applications. **Journal of Hematology & Oncology**. 2015.
- FDA. Food and Drug Administration. New Drugs at FDA: CDER's New Molecular Entities and New Therapeutic Biological Products. Disponível em: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/default.htm>. Acessado em 14.Abril.2018.
- FOURNIER, P.; SCHIRRMACHER, V. Biespecific antibodies and trispecific immunocytokines for targeting the immune system against cancer: Preparing for the future. **BioDrugs**. Vol. 27. p. 35-53, 2013.
- FRENZEL, A.; KUGLER, J.; HELMSING, S.; MEIER, D.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. DUBEL, S. Designing Human Antibodies by Phage Display. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**. Vol. 44. P. 312-318, 2017.
- FRENZEL, A. SHIRRMANN, T.; HUST. M. Phage Display-derived human antibodies in clinical development and therapy. **mAbs**. Vol.8. p. 1177-1194, 2016.
- GOMES, C. H. R. Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular (VEGF). 2013. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- HAMMERS, C. H.; STANLEY, J. Antibody Phage Display: Technique and applications. **Journal of Investigative Dermatology**. Vol 134. p. 1-5, 2013.
- HARDING, F. A.; STICKELER, M. M.; RAZO, J. DUBRIDGE, R. B. The immunogenicity resides in the CDR regions. **MAbs**. p. 256-265, 2010.
- HWANG, W. Y. K.; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**. Vol. 36. p. 3–10, 2005.
- JACKSON, D.; STOVER, D. Using the lessons learned from the clinic to improve the preclinical development of antibody drug conjugates. **Pharm Res**. Vol. 32. p. 3458-3469, 2015.
- JAIN, N.; SMITH, S. W.; GHONE, B. T. Current ADC linker chemistry. **Pharmaceutical Research**. Vol 32. p. 3526-3540, 2015.
- JAKOBIVITS, A. Production of fully antibodies by transgenic mice. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol.6. p. 561-566, 1995.
- KENNEDY, P. J.; OLIVEIRA, C.; GRANJA, P. L.; SARMENTO, B. Monoclonal antibodies: Technologies for early Discovery and engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**. Vol 37. p. 1-15, 2017.
- KOHLER G., MILSTEIN C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**. Vol 256. p. 495-497, 1975.

- KONTERMANN, R.; BRINKMANN, U. Biespecific antibodies. **Drug Discovery Today**. Vol. 20. p. 838-847, 2015.
- LINKE, R; KLEIN, A.; SEIMETZ; D. Catumaxomab: Clinical development and future directions. **mAbs**. Vol.2:2. P. 129-136, 2010.
- LITTLE, M.; KIPRIYANOV, S. M.; GALL, F. L.; MOLDENHAUER, G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunology Today**. Vol 21. p. 364-370, 2000.
- LIU, J. K. H. The history of monoclonal antibody developmente – Progress, remaining, challenges and future innovations. **Annals of Medicine and Surgery**. Vol 3. p.113-116, 2014.
- LONBERG, N. et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four genetic modifications. **Nature**. Vol. 368. p. 856-859, 1994.
- LONBERG, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platform, **Current Opinion in Immunology**. Vol.20. p.450-459, 2008.
- MAGALHÃES, L. S.; TEIXEIRA, A. A. R.; CARNEIRO, J. L. V.; NUNES, D. N.; NETO, E. D.; GIORDANO, R. J. Phage Display: Aspectos básicos e perspectivas atuais. RESENDE, R. R. Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e aplicações. 1ed. Blucher, 2016. p. 149-184.
- McCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G.; CHISWELL, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**. Vol. 348. P. 552-554, 1990.
- MIVEHROUD, M. H.; ALIZADEH, A. A.; MORRIS, M. B.; CHURCH, W. B.; DASTMALCHI, S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. **Drug Discovery Today**. Vol. 18. p. 1144-1157, 2013.
- MURPHY, K. Imunobiologia de Janeway. 8ed. Porto Alegre: Artimed, 2014. p. 128-131.
- NELSON A. L.; DHIMOSEA, E.; REICHERT, J. M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature Review Drug Discovery**. Vol 9. p. 767-774, 2010.
- NIXON, A. E.; SEXTON, D. J.; LADNER, R. C. Drugs derived from phage display: From candidate indentification to clinical practice. **mAbs**. Vol. 6. p. 75-83, 2014.
- NOIA, J. M. D.; NEUBERGER, M. S. Molecular Mechanisms of antibody somatic hypermutation. **Annual Review of Biochemistry**. Vol. 76. p. 1-22, 2007.
- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**. Vol. 28. P. 849-858, 2010.
- QI, H.; LU, H.; QIU, H. J.; PETRENKO, V., LIU, A. Phagemid vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. **Journal of Molecular Biology**. Vol 417, p. 129-143, 2012.
- RAMI, A.; BEHDAMI, M.; YARDEHNAVI, N.; HABIBI-ANBOUHI, M.; KAZEMI-LOMEDAS, F. An overview on application of phage display technique in immunological studies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol. 7. P. 599-602, 2017.
- REICHERT J. M.; ROSENSWEIG C. J.; FADEN L. B.; DEWITS M. C. Monoclonal antibody successes in the clinic. **Nature Biotechnology**. Vol 23, p. 1073-1078, 2005.

- REICHERT J. M. Monoclonal antibodies as innovative therapeutics. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. p. 423-430. Vol 9, 2008.
- RIBATTI, D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. **Immunology Letters**. Vol 161. p. 96-99, 2014.
- SCHARTZ, D. G.; SWANSON, P. C. V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. **Annual Review of Genetics**. Vol. 45.p. 167–202, 2011.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy in Clinical Immunology**. Fev, 2010.
- SILVA, F. A.; REAL, S. C.; GONÇALVES, J. Recombinant antibodies as therapeutic agents: Pathways for modeling new biodrugs. **Biodrugs**. p. 301-314, 2008.
- SCHUMACHER, D.; HACKENBERGER, C. P. R. LEONHARDT, H.; HELMA, J. Current status: site-specific antibody drug conjugates. **J Clin Immunol**. Vol. 36. p. 100=107, 2016)
- SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. Vol, 228. p. 1315-1316, 1985.
- SOCHAJ, A. M.; SWIDERSKA, K. W.; OTLEWSKI, J. Current methods for the synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates. **Biotechnology Advances**. Vol. 3. p. 775-784, 2015.
- STANFIELD, R. L.; WILSON, I. A. Antibody Structure. **Microbiology Spectrum**. V. 2, 2014.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- TILLER, K. E.; TESSIER, P. M. Advances in Antibody Design. **Annual Review of Biomedical Engineering**. Vol.17, p. 191-216, 2015.
- WALSH, G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. **Trends in Biotechnology**. Vol. **23**, p.553-558, 2005.
- WALSH, G. Biophatmaceutical benchmarks, 2014. **Nature Biotechnology**. p. 992-1000. Vol. 32, 2014.
- YAMADA, T. Therapeutic Monoclonal Antibodies. **The Keio Journal of Medicine**. Vol. 60, p. 37-46, 2011.
- ZHAO, A. et al. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. **Critical Reviews in Biotechnology**. Vol. 36. p. 276-289, 2016.

Handwritten signatures and dates for thesis submission:

maria juliana P. B. da maia 23/4/18

Data e assinatura da aluna 25/04/2018 Data e assinatura do orientador 23/4/18