

BR9024743

ISSN 0101-3084



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

ANTICORPOS MONOCLONAIS RADIOMARCADOS: UMA REVISÃO

Iracélia Torres de Toledo e SOUZA, Helena OKADA

IPEN-PUB - 306

PUBLICAÇÃO IPEN 306

MAIO/1990

SÃO PAULO

ANTICORPOS MONOCLONAIS RADIOMARCADOS: UMA REVISÃO

Iracélia Torres de Toledo e SOUZA, Helena OKADA

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO – BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13.30

**MONOCLONAL ANTIBODIES
LABELLING
REVIEWS**

IPEN - Doc - 3602

Aprovado para publicação em 30/03/90.

Note: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

ANTICORPOS MONOCLONAIS RADIOMARCADOS: UMA REVISÃO

Iracélia Torres de Toledo e SOUZA, Helena OKADA

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL**

RESUMO

Desde a descrição por Köhler e Milstein em 1975 da Tecnologia de Híbrido e a subsequente disponibilidade de anticorpos monoclonais contra um único determinante antigênico, estas técnicas tornaram-se um suporte para a maioria dos laboratórios que utilizam procedimentos imunológicos em pesquisas básicas, aplicadas ou clínicas.

Paradoxalmente, o grande sucesso dos anticorpos monoclonais gerou uma literatura vasta e dispersa dificultando o alcance de uma perspectiva.

Esta concisa revisão reproduz registros de algumas publicações concernentes a produção e uso de anticorpos monoclonais como radiofármacos.

Nestes últimos anos conseguiu-se avanços significativos com a combinação do desenvolvimento de antígeno específico associado a tumor e anticorpos monoclonais. De fato, anticorpos monoclonais contra alguns antígenos associados a tumor, bem definidos, conduzem à possibilidade prática de produção de anticorpos radiomarcados altamente específicos a serem usados como radiofármacos no diagnóstico e terapia de tumores humanos. A principal exigência desta metodologia é a disponibilidade de preparações que, após a marcação e injeção *in vivo*, retenham a sua integridade molecular e a capacidade de interação específica com o antígeno definido. Tratando-se de injetáveis, devem ser preenchidas todas as especificações radiofarmacêuticas como esterilidade, apirogenicidade e ausência de toxicidade.

RADIOLABELLED MONOCLONAL ANTIBODIES: A REVIEW

Iracélia Torres de Toledo e SOUZA, Helena OKADA

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL**

ABSTRACT

Since the description by Köhler and Milstein 1975 of their technique for producing monoclonal antibodies of predefined specificity, it has become a mainstay in most laboratories that utilize immunochemical techniques to study problems in basic, applied or clinical research.

Paradoxically, the very success of monoclonal antibodies has generated a literature which is now so vast and scattered that it has become difficult to obtain a perspective.

This brief review represents the distillation of many publications relating to the production and use of monoclonal antibodies as radiopharmaceuticals.

Significant advances were made possible in the last few years by combined developments in the fields of tumor-associated antigens and of monoclonal antibodies. In fact monoclonal antibodies against some well defined tumor-associated antigens, has led to significantly greater practical possibilities for producing highly specific radiolabeled antibodies as radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy of human tumors. One of the main requirements of this methodology is the availability of stable radiopharmaceutical reagents which after labeling *in vivo* injection retain the capacity of specific interaction with the defined antigen and their molecular integrity. Since injection into human is the objective of this kind of study all the specifications of radiopharmaceutical have to be fulfilled e.g. sterility, apirogenicity and absence of toxicity.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS. CONCEITOS BÁSICOS.

A produção de anticorpos é apenas um dos aspectos da resposta imunológica a agentes estranhos. As substâncias capazes de desencadear a reação do sistema imunológico são denominadas antígenos. A resposta do organismo ao reconhecer um antígeno é produzir uma proteína chamada anticorpo.

Os mecanismos celulares que levam a produção de anticorpos como resposta a um determinado antígeno são complexos, porém, como não são importantes para o entendimento da técnica de produção de anticorpos não serão aqui descritos. Analisa-se apenas como são vistos os antígenos pelos anticorpos.

ANTÍGENOS

Antígenos são substâncias que atuam sobre um número limitado de linfócitos, interagindo especificamente com receptores destas células induzindo resposta imune específica. Aparentemente o único requisito para que uma substância seja antigênica é ter um tamanho mínimo, de preferência uma macromolécula de peso molecular superior a 10.000 daltons. As macromoléculas apresentam sequência de aminoácidos (ou outras sequências orgânicas) que serão reconhecidas como não próprias ao organismo. Esta região da molécula, denominada determinante antigênico ou epitopo, cabe no sítio combinatório de receptores do linfócito provocando a resposta imune. Cada determinante antigênico ativará os clones cujo receptor lhe seja complementar. O antígeno possui duas propriedades: imunogenicidade, capacidade de induzir uma resposta imune específica e antigenicidade, capacidade de interagir com os anticorpos. Todas as substâncias imunogênicas são também antigênicas, porém o inverso não é verdadeiro. Existem substâncias denominadas haptenos, geralmente de peso molecular baixo (menores que 4.000 daltons) que somente quando ligadas a uma molécula maior (molécula carreadora) induzem a resposta imune, mas são capazes, por si só, de interagir com anticorpo.

FATORES QUE INFLUEM NA IMUNOGENICIDADE

O anticorpo é produzido injetando-se o antígeno em animal de outra espécie repetidas vezes até que haja a formação de anticorpos capazes de reagirem com o antígeno formador. Vários fatores contribuem para a imunogenicidade de uma substância:

1. Tamanho e natureza química da molécula do antígeno;
2. Adjuvante e dose total do imunógeno;
3. Escolha da espécie animal e vias de administração;
4. Intervalo de tempo das injeções e tempo de sangria.

1. Tamanho e natureza química da molécula do antígeno.

Quanto maior a complexidade molecular maior a imunogenicidade. Os anticorpos são relativamente bem produzidos contra qualquer proteína de peso molecular superior a 10.000 daltons. Quanto maior for a molécula antigênica, maior será o número de epitopos aumentando assim a probabilidade de interação com os receptores. Existem algumas substâncias de baixo peso molecular que apresentam considerável imunogenicidade como por exemplo: hormônio pancreático glucagon (3.600 daltons), insulina (6.000 daltons), angiotensina (1.031 daltons). Não está esclarecido ainda se todas estas moléculas de peso molecular baixo são por si só imunogênicas, ou se, ao serem inoculadas combinam a proteínas do receptor que atuam como proteínas carreadoras destas moléculas pequenas.

Peptídeos pequenos e substâncias não imunogênicas tais como hormônios da tireóide, esteróides, drogas, etc necessitam ser conjugados a moléculas maiores como albumina, tireoglobulina, etc para que haja estímulo do sistema imunológico.

2. Adjuvante e dose total do imunógeno.

a) ADJUVANTE

Adjuvantes são substâncias utilizadas para intensificar a resposta imune. O método geral para induzir a formação de anticorpos é injetar certo número de animais com antígeno misturado com adjuvante sendo o mais empregado o de Freund (óleo mineral acrescido de lanolina ou arlacel, emulsificadores). O adjuvante de Freund (adjuvante de Freund acrescido de *Mycobacterium tuberculosis*, que produz um estímulo não específico no sistema imunológico) é usado nas injeções iniciais. Nas reimunizações booster usa-se o adjuvante de Freund incompleto. O adjuvante aumenta a formação e persistência de anticorpos quando administrados junto com o antígeno fornecendo imunogenicidade sem interferir na especificidade da resposta imune. Aumentam a produção de anticorpos por induzirem a uma reação inflamatória local. Retardam a adsorção, a destruição e a eliminação do antígeno permitindo uma estimulação imunogênica mais prolongada. Mantém uma elevada concentração sérica do antígeno e evita o seu de gradamento por enzimas proteolíticas.

No caso do antígeno ser um hormônio, o adjuvante serve também para minimizar os efeitos colaterais.

Baseados no fato de impurezas poderem exercer efeito adjuvante, alguns investigadores preferem imunizar animais usando materiais relativamente impuros.

b) DOSE DE IMUNÓGENO

Em geral 0,2 a 2mg do preparado imunogênico é injetado em suspensão. Casos há em que são necessários maiores ou menores quantidades de antígeno. A resposta não depende diretamente da dose e uma vez ultrapassado um limite mínimo, é praticamente a mesma para qualquer dose.

Admite-se a existência de um valor máximo de dose, que se ultrapassado, leva a uma diminuição na produção de anticorpos, além de causar efeitos colaterais nos animais injetados como por exemplo a insulina que pode induzir a hipoglicemia e até a morte do animal. Neste caso evita-se a reação hipoglicêmica adicionando-se açúcar ao alimento e a água a serem ingeridos pelo animal nas 24 horas após a injeção.

3. Escolha da espécie animal e vias de administração.

a) SELEÇÃO DA ESPÉCIE ANIMAL

A seleção da espécie animal depende mais do volume de soro desejado do que qualquer outro fator. Coelhos e cobaias são os animais mais usados para esta finalidade pois são suficientemente grandes para sobreviverem as sangrias e suficientemente pequenos para serem facilmente manuseados e sem necessidade de um espaço muito grande para serem mantidos. Desde que animais da mesma espécie possuem capacidade variada de resposta a um dado imunógeno, a probabilidade de se conseguir um anticorpo satisfatório aumenta com o número de animais imunizados.

Geralmente imunizam-se vários animais ao mesmo tempo para aumentar a possibilidade de obtenção de anticorpos adequados, pois não se pode prever o grau de resposta do animal ao estímulo imunológico.

Não se conhece nenhuma forma para produção de anticorpos sensíveis podendo ser selecionados somente.

b) VIAS DE ADMINISTRAÇÃO

A inoculação parenteral de antígenos pode ser feita pelas vias subcutânea, intradérmica, intramuscular, endovenosa e intraperitoneal.

Porém um imunógeno misturado com adjuvante tem como via mais eficaz a intradérmica e subcutânea, podendo as vezes usar múltiplos sítios subcutâneos e intramuscular.

Um efetivo e conveniente regime de imunização utiliza co_báia ou coelho, emprega injeção subcutânea de 0,5ml de suspensão contendo aproximadamente 0,25mg do antígeno emulsificado no adjuvante de Freund completo.

4. Intervalo de tempo das injeções e tempo de sangria.

A resposta imunitária é relativamente lenta após injeção primária. Ocorre um período de latência (fase LAG) que compreende o intervalo entre a inoculação e o aparecimento de anticorpos específicos detetáveis. A seguir verifica-se um aumento exponencial da sua concentração (fase LOG) entrando depois na fase de PLATÔ ou de REPOUSO onde não há aumento nem diminuição do nível sérico. A última fase da resposta primária (fase de DECLÍNIO) inicia-se quando a velocidade da degradação prevalece sobre a velocidade de síntese resultando na diminuição pro

gressiva do nível de anticorpos. O nível de anticorpos é mantido quando degradação e síntese se igualam. Faz-se uma primeira sangria para testar a presença de anticorpos. Entre os testes disponíveis: imunoenzimático - ELISA, imunofluorescência, radioimunoensaio. A imunização é continuada somente com os animais que apresentam título crescente de anticorpo. Esses animais recebem doses de reforço. A injeção de reforço desperta a resposta secundária, que difere da primária em vários aspectos: necessita de menor dose de antígeno. A fase LAG é menor e a LOG mais acentuada, com produção rápida e abundante de anticorpos IgG de alta afinidade pelo antígeno que induziu a sua formação, a fase de PLATÔ atingida rapidamente, é longa e a de DECLÍNIO lenta e persistente (FIGURA 1). Nas respostas primárias assim como nas secundárias há produção de IgM e IgG porém a produção de IgG na resposta primária começa mais tarde que a IgM e na resposta secundária a IgG é a imunoglobulina predominante. Nas respostas primárias e secundárias a concentração de IgM sérica diminui rapidamente enquanto que a produção de IgG é mais persistente.

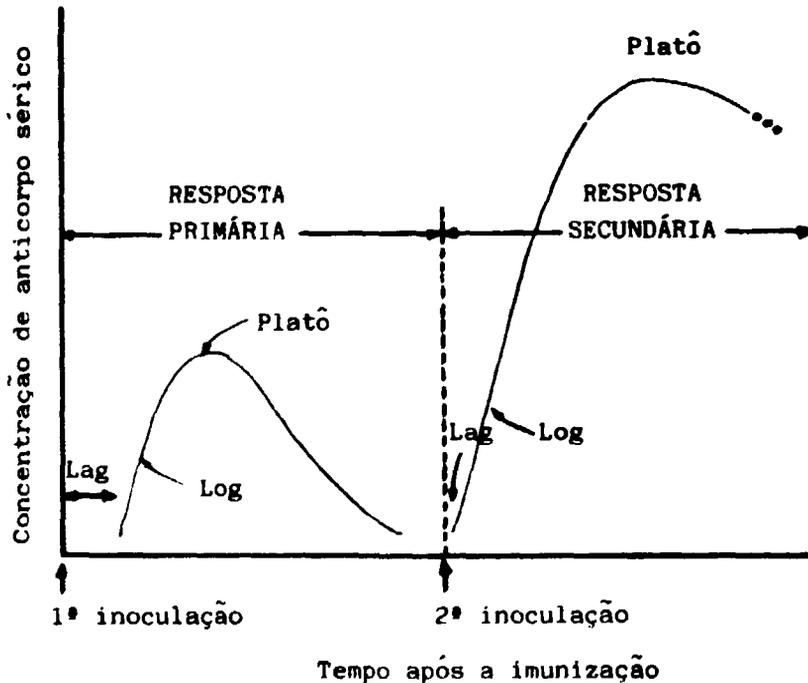


Fig.1 Produção de anticorpos durante as respostas primárias e secundárias a um antígeno.

ANTICORPOS

Anticorpos são proteínas globulares (a cadeia peptídica dobra-se várias vezes resultando em uma estrutura globular compacta) chamadas de imunoglobulinas. Já é longamente reconhecido que as imunoglobulinas são grupos de moléculas de proteína altamente heterogêneas que estão presentes nos fluidos circulantes do corpo em estado de equilíbrio dinâmico entre compartimentos intra e extra vascular. Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD cujas moléculas diferem entre si quanto a seqüência primária e o número de cadeias que as constituem. Estas proteínas além das diferenças estruturais apresentam funções distintas.

IgM: é a maior imunoglobulina sintetizada durante a exposição inicial com o antígeno.

IgG: é produzida durante a segunda e subsequente exposição com o antígeno. É a principal imunoglobulina presente na circulação dos fluidos corpóreos.

IgA: presente predominantemente nos fluidos secretores, tem papel importante na proteção do organismo contra microorganismos patogênicos.

IgE: é encontrada na circulação dos fluidos corpóreos apenas por alguns minutos porque liga-se avidamente a certas células do corpo.

IgD: é também encontrado na circulação dos fluidos corpóreos por apenas alguns minutos.

Embora estas imunoglobulinas tenham propriedades e estruturas distintas são similares nas suas proteínas básicas. Todas estas imunoglobulinas são compostas por 2 cadeias pesadas e 2 leves ligadas por ponte dissulfídica.

A resposta imune resulta na geração de grupos heterogêneos de moléculas de anticorpo tendo em comum a habilidade de reagir com o antígeno. Não direciona para a produção de IgA, IgE, IgD nas estas imunoglobulinas servem como ilustração para a natureza dinâmica da resposta imune e demonstração das variáveis associadas com o estudo da produção endógena de imunoglobulinas.

A presença de um antígeno específico desencadeia um estado de alerta em células especializadas denominadas linfócitos que têm a propriedade de reconhecer, seletiva e precisamente, as substâncias estranhas. Estão equipados e programados para produzir apenas um tipo de anticorpo específico, mesmo que nunca tenha sido exposto a este antígeno. Trata-se de uma predestinação genética de cada linfócito.

Existem 2 tipos de linfócitos, os linfócitos B e os linfócitos T com alguns subtipos; somente os linfócitos B secretam anticorpos. A principal função das células T é regular a resposta imune das células B.

Os linfócitos possuem receptores nas membranas que permitem a interação com as moléculas do antígeno.

Em um organismo existem milhões de linfócitos B distribuídos

dos pelos vários tecidos linfóides e sangue circulante. Um linfócito B expressa em sua membrana um só tipo de receptor e os descendentes deste linfócito continuam expressando o mesmo receptor formando o que se chama um clone de linfócitos e está geneticamente preparado para produzir um único tipo de anticorpo para este clone. Cada determinante antigênico ativará o clone cujo receptor lhe seja complementar. Como existem milhões de clones diferentes e multiplicidade de determinantes antigênicos no antígeno haverá formação de milhões de anticorpos diferentes, ou seja, um anticorpo policlonal.

Por várias razões é desejável, em lugar de uma mistura de anticorpos, obter um único linfócito, ou clone dele derivado, ou seja, um anticorpo monoclonal.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Em princípio a produção de anticorpos monoclonais poderia ser feita pelo isolamento e cultura de clone. Na prática, este procedimento é inviável pois os linfócitos B são células que não se mantêm em cultura por mais de alguns dias.

Em 1975 Köhler e Milstein encontraram uma forma original para contornar o problema. Em lugar de cultivar linfócitos promoveram a fusão dos linfócitos B com células neoplásicas de mieloma. As células híbridas resultantes, denominadas hibridomas, possuem as mesmas características das células parentais, sintetizam anticorpos e mantêm-se em cultura por tempo indeterminado.

Células neoplásicas de mieloma - são células linfóides tipo B que se prestam ao cultivo mas secretam grande quantidade de imunoglobulinas, ou seja, anticorpos, exatamente por serem linfócitos B. Os anticorpos produzidos são monoclonais, pois resultam da proliferação e secreção de um único clone de células. São monoclonais para os quais o linfócito que sofreu transformação neoplásica estava programado.

Recentemente conseguiu-se mutantes desses mielomas que não secretam anticorpos. São linfócitos neoplásicos não produtores. Sobrevivem em cultura e são usados na fusão celular com linfócitos não neoplásicos.

Três linhagens de mielomas, derivadas de camundongos são normalmente usadas. Essas linhagens de células mutantes já estão estabelecidas em cultura. São linfócitos neoplásicos não produtores na fusão celular com linfócitos não neoplásicos.

Linfócitos não neoplásicos - Os linfócitos imunes são obtidos através da imunização em animais de laboratório.

Para a obtenção de anticorpos com a especificidade e título desejados, imunizam-se vários animais, camundongos da linhagem isogênica BALB/c, ao mesmo tempo.

Os camundongos são injetados intraperitonealmente com o antígeno em adjuvante completo de Freund em intervalo de 3 semanas, se-

guiadas de uma injeção intravenosa 3 dias antes de realizar a fusão celular, isto porque as células em fase de crescimento logarítmico (multiplicação ativa) fornecem uma fonte de células em um estado metabólico altamente reprodutível. É necessário sincronizar a fusão com o máximo de proliferação das células formadoras de anticorpos.

Para avaliar a resposta dos animais injetados, pode-se utilizar diferentes técnicas (imunoensaio ELISA, imunofluorescência, radioimunoensaio) levando-se em conta as facilidades operacionais. De um modo geral a técnica mais usada para esta avaliação é o imunoensaio ELISA.

Selecionam-se os melhores respondedores. Alguns desses animais assim selecionados servirão à produção de anticorpo policlonal. Outros serão empregados nos experimentos de fusão celular.

Fusão celular - Em condições estéreis o animal imunizado é sacrificado, seu baço removido e dele é preparada uma suspensão de células rica em linfócitos imunes. Após misturar estas células com as de mieloma, utiliza-se polietilenoglicol (PEG) para a fusão celular. Acontece que os eventos da fusão celular são incontrolláveis. Podem fundir-se linfócitos com linfócitos, mieloma com mieloma e mieloma com linfócitos. Algumas células de linfócitos e de mieloma não se fundirão. As células híbridas de interesse, mieloma:linfócito, são selecionadas através do cultivo. As células híbridas linfócitos com linfócitos e os linfócitos que não se fundiram não crescem em cultura e são automaticamente eliminadas. Os híbridos mieloma com mieloma que não se fundiram são eliminados através de cultivo em meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Isto acontece porque a célula para se reproduzir deve sintetizar uma molécula de DNA (ácido desoxirribonuclêico). A síntese do DNA é feita por 2 vias metabólicas: via de novo e via de salvação.

Para a síntese de DNA pela via de salvação é necessário o enzima HGPRTase (hipoxantina guanina fosforribosil transferase) codificado por um gene localizado no cromossoma X. Mielomas mutantes tem mutação exatamente neste gene, de modo que não possuem o enzima e só podem sintetizar o DNA pela via de novo. Ocorre que a aminopterina, um dos componentes do meio seletivo HAT tem a propriedade de inibir a síntese do DNA pela via de novo. Sendo geneticamente incapazes de sintetizar o DNA pela via de salvação e estando a via de novo bloqueada pela aminopterina as células de mieloma desaparecem da cultura.

Como os genes do linfócito possibilitam a formação de HGPRTase normal, embora a via de novo esteja bloqueada, a síntese do DNA pode ser feita pela via de salvação assim os híbridos linfócitos:mieloma são as únicas células a sobreviverem. Desta forma na cultura restarão apenas os híbridos linfócitos:mieloma.

Muitos híbridos não produzirão anticorpos porque das fusões ao acaso pode ficar excluído do híbrido os cromossomos dos linfócitos responsáveis pela codificação dos anticorpos. Outros híbridos produzirão anticorpos das mais diversas especificidades contra quaisquer an-

tígenos a que o camundongo fornecedor de linfócitos imunes tenha sido exposto em sua vida. Apenas uma parcela de híbridos produzirá anticorpos contra o antígeno desejado. Portanto entre os milhares de híbridos é necessário separar apenas os produtores de anticorpos contra o antígeno desejado.

Para selecionar os híbridos produtores de anticorpo desejado deixa-se a suspensão de células fundidas crescerem por um certo período para que os híbridos se multipliquem aumentando a sua população. Amostras dessa suspensão são distribuídas em placas de plástico contendo 96 poços. Após o desenvolvimento das colônias nos poços testa-se o sobrenadante dos hibridomas para avaliar a presença de anticorpos de interesse. Entre os testes disponíveis: imunoenzimático ELISA, imunofluorescência e radioensaio.

Identificados os poços que contêm hibridomas positivos para a produção do anticorpo de interesse faz-se a clonagem por diluição limitante. Obtendo-se um poço com uma única célula, todas as células oriundas de sua multiplicação pertencerão a um clone. Os anticorpos que elas produzirem serão anticorpos monoclonais. Selecionam-se os melhores clones.

A quantidade de anticorpos de um poço é mínima mas pode ser ampliada *in vitro* como *in vivo*. *In vitro* basta cultivar as células híbridas excretoras em garrafas de plástico e *in vivo* inoculando-as na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos BALB/c. Esses híbridos sendo células neoplásicas se multiplicarão na cavidade como se fossem tumores, mielomas, e secretarão anticorpos para a cavidade (fluido ascítico).

Os híbridos secretores produzidos podem ser congelados em nitrogênio líquido por um longo período de tempo.

ANTICORPO CONVENCIONAL (POLICLONAL). SORO IMUNE.

Parece paradoxal ter comentários sobre anticorpo convencional após o advento dos anticorpos monoclonais. Porém há muitas razões para fazê-lo. É errado supor que os anticorpos monoclonais substituirão completamente a serologia convencional. Frequentemente o esforço exigido não se justifica. Para alguns propósitos, com maior simplicidade na sua produção, o anticorpo convencional (policlonal) pode apresentar um bom desempenho. A especificidade do soro imune depende de milhares de produtos clonais que se ligam a determinantes antigênicos cobrindo a maioria da superfície do antígeno. Assim pequenas trocas na estrutura do antígeno não trará influências na sua ligação ao anticorpo.

A produção de anticorpos monoclonais é consideravelmente trabalhosa, antes e após a fusão celular. Milhares de testes são feitos antes de se alcançar o clone imortal.

A extrema monoespecificidade dos anticorpos monoclonais, ligação para um único sítio na molécula do antígeno, pode eliminar a capacidade ligante quando este sítio é alterado. Em alguns casos uma pe-

quena modificação no anticorpo ou no antígeno pode suprimir completamente a ligação.

Se o anticorpo monoclonal for usado na detecção de proteína no soro humano, pelas técnicas de radioimunoensaio, o menor polimorfismo genético nesta proteína ou denaturação compromete a ligação antígeno-anticorpo, enquanto que com o soro imune será mínimo este efeito.

Na TABELA 1 são descritas as vantagens e desvantagens do soro imune e anticorpos monoclonais.

TABELA 1

Comparação entre soro imune (policlonal) e anticorpo monoclonal
(Strudler e Larson, 1988)

Item	Soro imune (policlonal)	Anticorpo monoclonal
Origem	Soro de animal imunizado	Células de hibridoma (linfócito:mieloma) camundongo
Quantidade	Relativamente pequena. Utiliza-se um grande número de animais de laboratório. Quantidades produzidas na ordem de miligramas.	Praticamente ilimitada. Quantidades produzidas na ordem de gramas.
Composição	Contém mistura de anticorpos com afinidade e correlação variando de animal para animal, de sangria para sangria.	Proteína homogênea monoespecífica.
Vantagens	A sua produção é relativamente fácil.	Produzido através de hibridoma. Alto grau de confiança e reprodutibilidade.
Aplicação	Radioimunoensaio	Imunohistoquímica. Imuno-detecção. Imunoterapia.

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais usados como reagentes no preparo de radioimunofármacos exigem, necessariamente, um processo de purificação.

Os anticorpos monoclonais isolados do fluido ascítico de camundongos BALB/c inoculados intraperitonealmente com células de hibridoma apresentam uma concentração de 2-20mg/ml. Em contraste, o nível de anticorpo monoclonal no sobrenadante de cultura se encontra na ordem de 5-50µg/ml. Como consequência torna-se mais fácil a purificação de anticorpos monoclonais provenientes de fluido ascítico que os de sobrenadante de cultura.

A descrição dos processos de purificação concentra-se nas IgG e IgM, as classes encontradas com mais frequência. Afortunadamente a IgG, anticorpo mais comum, é também o mais fácil de purificar.

DETERMINAÇÃO DA CLASSE DO ANTICORPO

O conhecimento da classe e subclasse do anticorpo é de grande valia para a escolha do sistema de purificação. Um modo simples para determinar a classe de anticorpo é via Análise Ouchterlony, difusão dupla radical com formação de linha de precipitação no agar. No poço central coloca-se solução contendo a imunoglobulina e nos poços periféricos classe específica de anti-soro anti-imunoglobulina (Meloy, Nordic ou outros fornecedores).

Alternativamente, a classe de anticorpo pode ser determinada por radioimunoensaio, ligação enzimática ELISA ou imunofluorescência indireta com classe específica de anticorpos fluorescentes.

MÉTODOS USADOS NA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

1. Precipitação com sulfato de amônio;
2. Precipitação com ácido caprílico;
3. Gel filtração;
4. Cromatografia de troca iônica;
5. Afinidade cromatográfica em Poteína A-Sepharose CL4B

1. Precipitação com sulfato de amônio

É um método antigo e muito usado na purificação de imunoglobulinas. Tem como base a precipitação dessas moléculas, que outras proteínas séricas, com o sulfato de amônio.

A precipitação de imunoglobulinas por sulfato de amônio, apesar de efetiva e simples, apresenta alguns pontos técnicos que podem influenciar fortemente o grau de purificação obtida. De preferência adiciona-se lentamente a solução aquosa de sulfato de amônio saturada para evitar que uma concentração local alta provoque precipitações indesejáveis de proteínas, como a albumina, diminuindo assim o grau de purificação.

O soro a ser fracionado é colocado em recipiente com agitador magnético. A agitação deve ser lenta para não denaturar a proteína. A solução de sulfato de amônio saturada é adicionada gota a gota e cada gota deve ser dispersa antes da adição da próxima. Quando a concentração

de sulfato de amônio alcança cerca de 20% de saturação o sor^o começa a se tornar leitoso. A maioria das imunoglobulinas podem ser purificadas por 35-40% de saturação ainda que ocasionalmente possa ser necessário a cima de 50%. Concentrações altas além de não aumentarem o rendimento das imunoglobulinas podem causar aumento de concentração por outras proteínas especialmente transferrina e albumina. Após agitação lenta de 15-30 minutos a suspensão é centrifugada a 2.000g. O precipitado é lavado 2 a 3 vezes com sulfato de amônio a 50% de saturação para reduzir a contaminação com proteínas não imunoglobulinas.

Observa-se que soluções de sulfato de amônio são densas e resistem a mistura. Estas soluções não podem ser estocadas em recipientes lavados com detergente. Traços de detergente podem inibir a precipitação da imunoglobulina por sulfato de amônio.

Finalmente o precipitado é dissolvido em PBS (tampão fosfato salina). Como os íons de amônio podem interferir com procedimentos subseqüentes são removidos por diálise (overnight) contra 500-1.000 volumes de PBS.

2. Precipitação pelo ácido caprílico

A adição de ácido caprílico ao sor^o pode precipitar muitas proteínas sem afetar a IgG podendo assim ser um meio eficiente para a purificação dessa molécula. A adição de ácido caprílico, gota a gota com agitação constante, ao fluido ascítico resulta na formação de um precipitado. Após centrifugação são encontrados no sobrenadante cerca de 20 a 40% de concentração proteica do material inicial. O sobrenadante é filtrado em filtro Millipore 0,45 μ m e dializado a 4°C em PBS. A recuperação de IgG determinada por radioimunoensaio é de 60 a 80%. O título do anticorpo no sobrenadante, medido por ensaio de ligação, é cerca de 2 vezes maior que no material inicial. A eletroforese em gel de poliacrilamiduodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para proteína fria e radioiodada mostram que os maiores componentes são as cadeias pesada e leve de IgG.

Os anticorpos purificados pela precipitação com ácido caprílico são estáveis por um período de 4 meses. A precipitação pelo ácido caprílico para purificar anticorpo monoclonal é rápida e simples como a precipitação com sulfato de amônio. A sua maior vantagem está na menor formação de agregados quando comparada ao método de precipitação por sulfato de amônio.

ASSOCIAÇÃO DOS 2 SISTEMAS DE PRECIPITAÇÃO

O sobrenadante obtido após precipitação com ácido caprílico é filtrado e esfriado a 4°C. Sempre a 4°C, adiciona-se, lentamente e sob agitação constante, solução de sulfato de amônio 27,7%. Após centrifugação despreza-se o sobrenadante e o precipitado é ressuspenso a proximadamente a 1/10 do volume inicial de ascite. Dializa-se overnight contra PBS.

3. Cromatografia por troca iônica

A cromatografia por troca iônica é um método de purificação de imunoglobulinas, simples e muito usado experimentalmente para a purificação de IgG. É de baixo custo, fácil e simples na sua preparação. Apesar de necessitar de equipamento especial como coletor de frações monitorado com ultravioleta e acessórios, este é um equipamento padrão que a maioria dos laboratórios bioquímicos possui.

A atração eletrostática de íons de carga opostas na superfície de um polieletrólito forma a base da cromatografia de troca iônica. O princípio básico envolve a interação eletrostática entre os íons a serem trocados e a carga normal na superfície da resina. A velocidade do movimento de um dado composto ionizável através de uma coluna é função do seu grau de ionização, da concentração de outros íons e da afinidade relativa dos vários íons presentes na solução pelos locais carregados da resina. Pelo ajuste do pH do solvente de eluição e da força iônica, os íons presos eletrostaticamente são eliminados diferencialmente, promovendo a separação desejada.

O tamanho da camada de resina será determinado pela massa de proteína a ser ligada. O modelo da coluna não é importante. Preparam-se colunas adequadas com seringas de plástico descartáveis. As imunoglobulinas são em geral suficientemente resistentes a ação de proteases e a cromatografia de troca iônica pode ser realizada a temperatura ambiente.

4. Gel filtração

É a técnica de separação de molécula de tamanhos diferentes pela passagem em coluna de gel. Gel filtração separa as proteínas de acordo com o peso molecular. As moléculas menores penetram nos poros do gel movendo-se mais lentamente através da coluna. As moléculas maiores, por exclusão, movem-se rapidamente sendo eluídas em primeiro lugar. É um procedimento simples com capacidade de boa recuperação. Entretanto, resulta numa grande diluição da amostra e um menor fator de purificação que a troca iônica ou afinidade cromatográfica. O sistema de gel filtração na purificação de IgG funciona mais como auxiliar para outros métodos quando se faz necessário um elevado grau de purificação. Entretanto tem um papel importante na purificação de IgM.

SELEÇÃO DE GEL ADEQUADO

A utilidade dos géis cresceu enormemente nos últimos anos. Os principais tipos são: dextran granulado (Sephadex), acrilamida (Bio-gel P), agarose (Sephacryl, Bio-gel A) e várias combinações desses géis. Sephacryl é uma mistura de dextran e acrilamida. Sephacryl e Ultrogel são muito mais resistentes para compressão, fáceis para o empacotamento e são fornecidos com pré-intumescimento. Sephadex é fornecido como um pó seco e precisa ser intumescido, antes do uso, em grande quanti-

dade de água.

Gel filtração de imunoglobulina pode ser feita à temperatura ambiente. A resolução em gel filtração é criticamente dependente de um bom preparo da coluna.

Géis adequados para separação de imunoglobulinas e seus fragmentos

Imunoglobulina	Peso molecular	Gel filtração
IgG	150.000	Sephacryl S-300(Pharmacia)
IgM	900.000	Sepharose 6B(Pharmacia) Sephacryl S-500(Pharmacia) Ultrogel AcA22(LKB)
Fragmento Fab	50.000	Sephadex G-100(Pharmacia)
Fragmento F(ab') ₂	100.000	Sephacryl S-200 ou S-300 (Pharmacia)

5. Afinidade cromatográfica em Proteína A-Sepharose CL4B

É um dos métodos mais usados na purificação de anticorpos monoclonais. É método de escolha para a purificação de subclasses apropriadas de IgG (IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃). Proteína A é uma proteína produzida por linhagens de *Staphylococcus aureus*. A proteína A é ligada covalentemente a Sepharose CL4B (Proteína A-Sepharose).

Condições para ligação da Proteína A-Sepharose

IgG subclasses	Espécies	Ligação	Eluição
*IgG ₁	camundongo	pH > 8,0	pH < 6,0
IgG _{2a}	camundongo	pH > 7,0	pH < 4,5
IgG _{2b}	camundongo	pH > 7,0	pH < 3,5
IgG ₃	camundongo	pH > 7,0	pH < 4,5
IgG ₁	rato	ligação fraca e variável a pH 8,0	
IgG _{2a}	rato	ligação fraca e variável a pH 8,0	
IgG _{2b}	rato	ligação muito fraca a pH 8,0	
IgG _{2c}	rato	pH > 7,0	

*Por apresentar ligação frequentemente baixa e variável, esta técnica não é recomendada para IgG₁ (camundongo). Recentemente porém, Bio-Rad produziu um novo sistema para purificação de IgG₁ (camundongo) em Proteína A-agarose. Desde que muitos anticorpos monoclonais são IgG₁, este sistema pode tornar-se bastante popular.

O fracionamento de anticorpos monoclonais por afinidade cromatográfica oferece excelente purificação mesmo que a amostra esteja muito diluída. A recuperação da proteína é independente do volume da amostra. A principal desvantagem da afinidade cromatográfica é o seu alto custo, porém, como as colunas de afinidade podem ser usadas repetidamente (40-50 vezes) sem deterioração ou mudança nas propriedades de ligação, o custo por separação diminui com o aumento do uso.

O anticorpo monoclonal individualmente possui propriedades diferentes e é improvável que as mesmas condições de ligação e eluição sejam aplicáveis a todos os casos. É importante examinar as condições de ligação e eluição para cada anticorpo individualmente.

Colunas de afinidade cromatográfica para anticorpos podem ser divididas em 4 fases importantes: pré-ciclagem, ligação, lavagem e eluição.

A concentração da IgG é determinada espectrofotometricamente pela absorvância específica da solução a 280nm usando 1% p/v ; $1\text{cm}=14$. Afinidade cromatográfica em Proteína A-Sepharose é preferida pela alta capacidade de ligação, condições de eluição e disponibilidade comercial. Entretanto existem situações nas quais o anticorpo monoclonal não se liga a Proteína A. Nestes casos usa-se outro sistema de purificação.

PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS ATIVOS DE ANTICORPOS

Todas as classes de imunoglobulinas são representadas por um modelo básico constituído de duas cadeias polipeptídicas leves L, (light) de peso molecular aproximadamente de 23.000 daltons e duas cadeias pesadas H, (Heavy) com peso molecular variáveis entre 50.000 a 75.000 daltons, dependendo da classe a que pertence o anticorpo.

Qualquer classe de imunoglobulina pode ser utilizada para o estudo da estrutura, porque em todos os casos o mecanismo básico de ligação molecular entre antígeno e anticorpo é o mesmo. IgG por sua maior concentração no soro e fácil obtenção foi a classe de imunoglobulina mais estudada.

Uma imunoglobulina da classe IgG com peso molecular \approx 150.000 daltons é constituída de 4 cadeias peptídicas ligadas entre si por pontes dissulfídicas. Das 4 cadeias, duas são maiores e por isto chamadas cadeias pesadas H (de heavy) e duas menores leves (de light). Além disso existem ainda ligações dissulfídicas intracadeias. Cada cadeia leve e cada cadeia pesada contém uma região constante na seqüência de aminoácidos, característica de cada espécie, chamada de região C. Cada cadeia tem também uma região variável chamada de região V onde a seqüência de aminoácidos parece ser diferente para cada anticorpo específico. As regiões constantes das cadeias pesadas possuem 3 domínios distintos, CH₁, CH₂, CH₃.

Cada cadeia possui uma porção aminoterminal e a oposta é

carboxiterminal. Nas porções aminoterminais de cada molécula de IgG estão os dois sítios de combinação específicos para o determinante antigênico que induziu sua síntese (FIGURA 2).

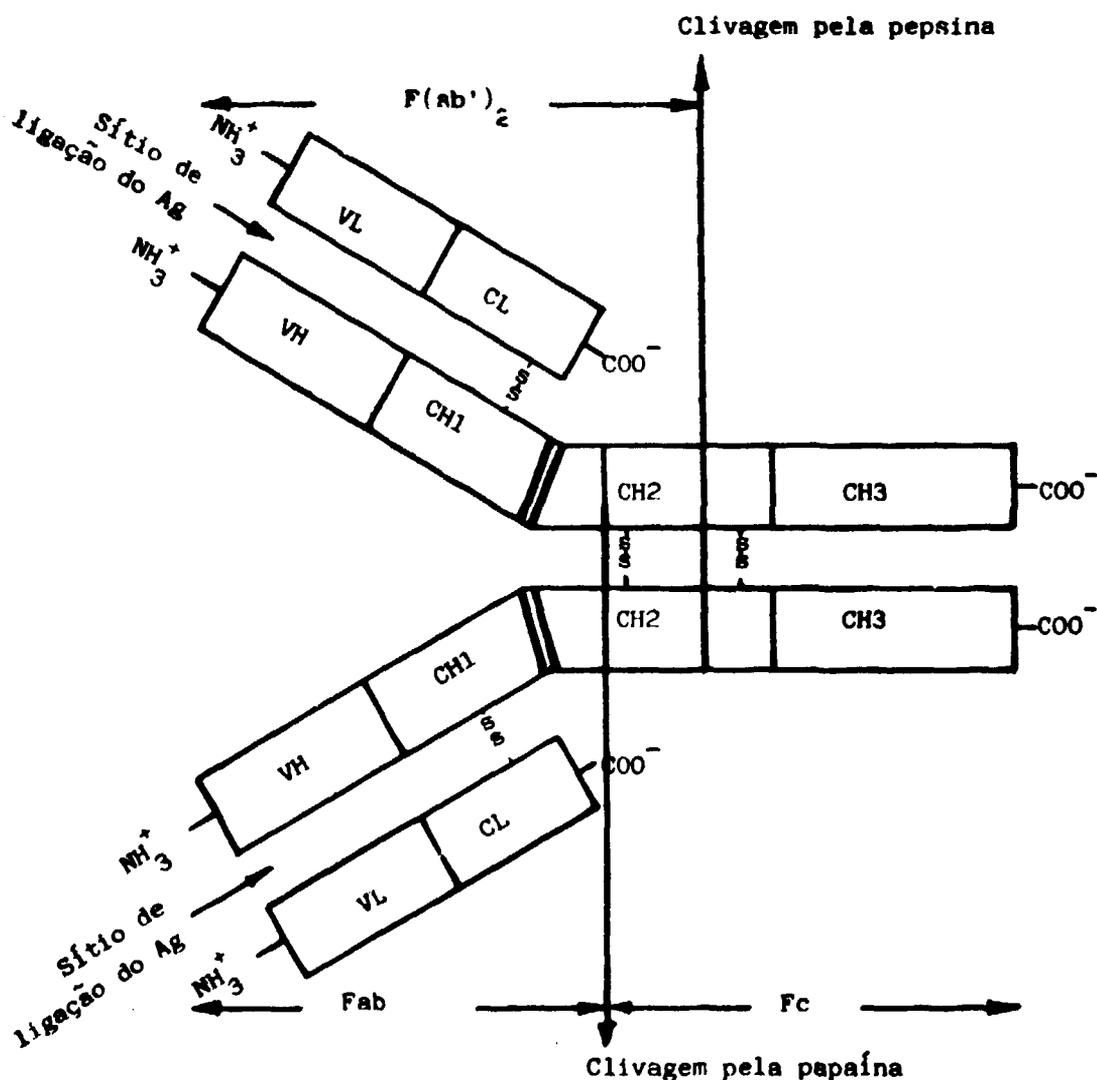


Fig.2 Esquema da estrutura e hidrólise enzimática da molécula de IgG. A digestão enzimática com pepsina remove parte da região constante da IgG para produzir um fragmento $F(ab')_2$. A digestão enzimática com papaína fraciona a molécula em 2 fragmentos Fab e 1 fragmento Fc intacto.

Os anticorpos monoclonais e subclasses de imunoglobulinas IgG são utilizados *in vitro* em uma variedade de ensaios imunológicos e *in vivo* como agentes diagnósticos e terapêuticos.

Para alguns propósitos frequentemente é vantajoso o uso

de fragmentos de anticorpo. Usando tratamento enzimático a molécula de IgG pode ser quebrada em várias partes produzindo o que se convencionou chamar fragmentos de imunoglobulinas.

A hidrólise enzimática (FIGURA 2) tem sido usada por muitos anos para análise imunoquímica de imunoglobulinas, principalmente para caracterização de subclasses de IgG. Mais recentemente, o desenvolvimento da tecnologia de hibridoma e o uso de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos de especificidade e subclasse definidas, tornou-se particularmente significantes o conhecimento detalhado desta análise. A maioria dos anticorpos monoclonais pertencem a uma das subclasses de IgG e em muitos casos a preparação dos fragmentos por clivagem proteolítica de IgG é necessária para o seu uso como reagentes imunológicos em vários contextos clínicos. Devido ao fato dos anticorpos monoclonais serem produzidos em camundongos BALB/c isogênicos, pois até o momento, embora com progressos neste sentido, não se conseguiu ainda a linhagem humana adequada aos experimentos de fusão como as linhagens de camundongos, a sua administração em pacientes pode resultar na formação de anticorpos anti-murino. Quando se injeta anticorpo de uma espécie animal em outra, esta última o reconhecerá como substância estranha, ou seja, como um antígeno e contra ele produzirá anticorpos anti-idiotípicos porque reconhecem o idiotipo (porção do anticorpo - (anticorpo 1) - que contém os sítios de ligação do antígeno) produzindo reações hipersensíveis. Estas reações, porém, não constituem fator limitante para a aplicação desses reagentes imunológicos pois as ligações inespecíficas e respostas alérgicas, via região Fc são evitadas com a remoção deste fragmento.

as condições ótimas usadas para geração de fragmentos ativos de anticorpo, Fab ou F(ab)', variam de espécie para espécie e dependem da espécie animal usada e da subclasse específica de IgG que é digerida.

PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS Fab (clivagem papaínica) (Starworth & Turner, 1978)

Papaína é uma protease tiol, isto é, possui um grupo SH necessitando assim da presença de um agente redutor para a sua ativação. O agente redutor exerce ação redutiva sobre as pontes dissulfídicas e a extensão desses efeitos depende do agente redutor e da sua concentração.

A digestão de IgG pela papaína fraciona a molécula de IgG em 3 fragmentos, 2 designados fragmentos Fab e o outro fragmento Fc. Os fragmentos Fab são possuidores da atividade específica do anticorpo. O fragmento Fc intacto não tem capacidade de se ligar a antígenos mas possui propriedades químicas que lhe permitem desempenhar importantes funções biológicas podendo ativar vários componentes do sistema imunológico.

A digestão é monitorada através da eletroforese de gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sódio SDS-PAGE para observar o material que não digeriu, o parcialmente digerido e produtos de digestão completa pois as subclasses de IgG variam quanto a suscetibilidade para a digestão.

SEPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Usualmente a separação dos fragmentos Fab de Fc e IgG intacta pode ser efetuada com facilidade. No caso de subclasses de IgG com forte afinidade para Proteína A o material digerido é aplicado à coluna de Proteína A-Sephrose. Os fragmentos Fab passam através da coluna enquanto que Fc e IgG não digerida ficam ligados (FIGURA 3).

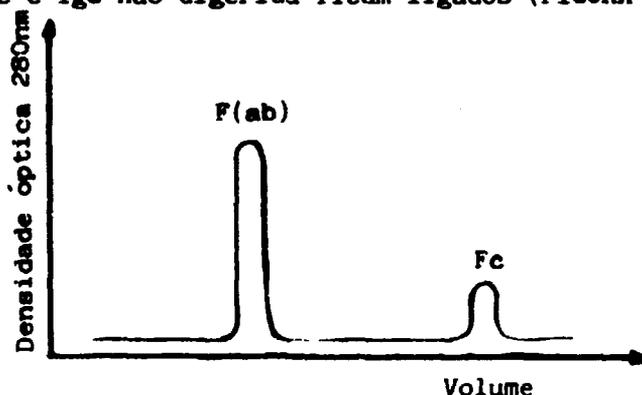


Fig.3 Separação em Proteína A. O fragmento F(ab) é gotejado através da coluna. Após o retorno à linha basal o Fc e IgG não digerida são eluídos com tampão adequado

Alternativamente, os fragmentos podem ser separados por cromatografia de troca iônica, método de escolha para as subclasses de IgG que não se ligam a Proteína A (FIGURA 4).

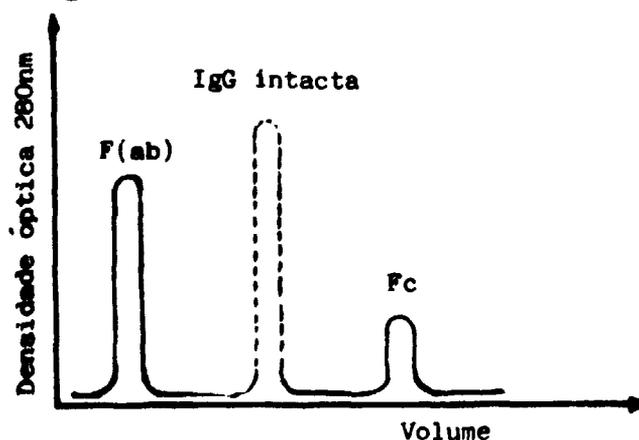


Fig.4 Separação por cromatografia de troca iônica. O material digerido é passado através da coluna de DEAE-celulose. O fragmento Fab geralmente mais básico que Fc e IgG intacta é eluído em primeiro lugar seguido pela IgG que não digeriu e finalmente Fc.

PREPARAÇÃO DE FRAGMENTOS F(ab')₂ (clivagem pepsínica) (Ky & col., 1978)

Pepsina é uma protease não específica que é ativada somente em pH ácido e é denaturada de forma irreversível a pH neutro ou alcalino. A digestão péptica de imunoglobulinas é largamente usada para a preparação de fragmentos bivalentes de anticorpos IgG porém sem a região Fc. Não há necessidade de usar redutores. A produção de fragmentos F(ab')₂ de anticorpos monoclonais é conveniente pois estes fragmentos contêm dois sítios de ligação ao antígeno.

A preparação de fragmentos F(ab')₂ varia de acordo com a subclasse de IgG.

Após a purificação da imunoglobulina, por técnicas convencionais, a hidrólise enzimática é desenvolvida em diferentes: tempo, pH, razão enzima-substrato para as diferentes subclasses de IgG. Isto enfatiza a necessidade de estudos preliminares de cada IgG que é submetida a digestão péptica.

A digestão é monitorada por SDS-PAGE para a segurança de se obter fragmentos adequados, garantia de sucesso aos experimentos subsequentes.

Os fragmentos F(ab')₂ na preparação são separados da IgG intacta e fragmentos de Fc por Proteína A-Sepharose e gel filtração.

RADIOMARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS

A radiomarcção de anticorpos envolve os mesmos princípios e procedimentos aplicados para as proteínas em geral. Para a preparação de imunoglobulinas radiomarcadas, alguns itens precisam ser considerados:

1. A atividade específica deve ser alta, porém, dentro do limite consistente com a manutenção da atividade imunológica e estabilidade da preparação.
2. A incorporação radioativa não deve conduzir a grandes modificações estruturais, a identidade molecular deve ser preservada.
3. O procedimento de marcação deve ser de fácil execução e boa reprodutibilidade.

Os anticorpos monoclonais quando ligados, adequadamente, a radioisótopos emissores gama visualizam componentes intracelulares usados como antígenos e antígenos associados a tumores (radioimunodeteção). Quando ligados a radioisótopos emissores alfa e beta e em altas doses são usados na radioimunoterapia.

A preparação de radioimunofármacos depende de um sistema de marcação que conduza a uma ligação consistente com o radionuclídeo selecionado, sem afetar significativamente a molécula do anticorpo, purificação e avaliação do composto marcado quanto as suas características que adequam aos estudos *in vivo*.

ESCOLHA DO ISÓTOPO RADIOATIVO PARA A MARCAÇÃO

Muitos fatores influenciam a escolha do radioisótopo para imunodeteção e ou imunoterapia tais como: meia vida física e biológica, natureza da radiação emitida, atividade específica, facilidade de introdução na proteína, estabilidade do produto marcado, caminho metabólico do radionuclídeo no organismo, facilidade de detecção e preço.

Uma relação de radionuclídeos usados na imagem e terapia podem ser observados na TABELA 2 e TABELA 3.

TABELA 2

Seleção de radionuclídeos para radioimunodeteção (Strudler e Larson, 1985)

Radionuclídeo	Meia Vida	Decaimento	Vantagens	Desvantagens
$^{131}\text{I}^*$	8,05d	β^- (100%); 0,608MeV (88%) γ - 364KeV (4%)	Eficácia Imagem Custo	Trajetória longa nos tecidos
^{90}Sr	64h	β^- (100%); 2,29MeV (100%)	Gerador ^{90}Sr (decaimento β^- puro)	Problemas químicos: Metabolismo in vivo?
$^{67}\text{Cu}^*$	62h	β^- (100%); γ - 91KeV (7%) γ - 93KeV (17%) γ - 184KeV (46%)	Imagem	Metabolismo in vivo?
^{212}Bi	1h	α (36%) β^- (64%) \rightarrow ^{212}Po (0,3 μs , nec. $T_{1/2}$ α = 8,78MeV)	Decaimento alto	$T_{1/2}$ curta Química desconhecida
^{211}At	7,2h	α (41%); 5,9MeV (41%) EC (59%)	Decaimento alto	$T_{1/2}$ curta; Química desconhecida
^{125}I	60,2d	EC (100%); γ - 35KeV Raio-X = 27KeV	Decaimento alto	Necessidade de entrar no núcleo para destruir o tumor

*Usado também na imagem.

TABELA 3

Seleção de radionuclídeos para radioimunoterapia
(Strudler e Larson, 1985)

Radionuclídeo	Meia Vida	Decaimento	Vantagens	Desvantagens
^{99m}Tc	6h	I^- (99%); γ -141KeV (89%)	Eficácia Energia de decaimento	$T_{1/2}$ curta Problemas químicos
^{123}I	13h	EC (100%); γ -159KeV (83%)	Energia de decaimento Química de Iodo	Eficácia Custo $T_{1/2}$ curta
^{111}In	67h	EC (100%); γ -171KeV (89%)	Energia de decaimento $T_{1/2}$ ótima Química quelante	Metabolismo in vivo
$^{131}\text{I}^*$	8,05d	β^- (100%); γ -364KeV (82%)	Eficácia Química de Iodo $T_{1/2}$ ótima	Energia de decaimento Deiodação in vivo
^{87}Ru	69h	EC (100%); γ -216KeV (89%)	Química quelante	Eficácia Metabolismo in vivo
$^{67}\text{Cu}^*$	62h	β^- (100%); γ - 91KeV (7%) γ - 93KeV (17%) γ -184KeV (47%)	-	-

*Usado também em terapia.

RADIONUCLÍDEOS COMUMENTE USADOS: VANTAGENS E DESVANTAGENS

Para a marcação de anticorpos monoclonais e ou seus fragmentos, os isótopos de Iodo e ^{111}In são os comumente usados. O ^{99m}Tc está sendo avaliado para a marcação de fragmentos. O ^{131}I (emissor γ e β , meia vida física de 8 dias, energia γ de 360KeV) apesar das desvantagens dosimétricas e instrumental tem sido o radionuclídeo de escolha pois a iodação é um método satisfatório para a marcação de proteínas. O ^{131}I é o isótopo de Iodo mais usado pelo baixo custo, eficácia comercial e meia vida de 8 dias a qual é compatível com o pico de acumulação do anticorpo no tumor 24-48h após administração e pelos procedimentos corretos da radioiodação. O ^{131}I , mesmo considerando as desvantagens inerentes a sua energia de foton alta e a emissão de partículas beta, permanece como radionuclídeo de escolha para a marcação de anticorpos monoclonais e ou seus fragmentos usados na imagem e terapia pois não existe ainda nenhuma alternativa claramente superior ao ^{131}I .

O ^{111}In com meia vida de 67 horas, energia de foton de 171-245KeV, compatível com colimadores e gama câmaras convencionais e a ausência de emissão beta mostrou-se vantajoso ao ^{131}I , porém, ao contrá:

rio do sucesso relativamente uniforme de proteínas marcadas por vários métodos de iodação, muitos investigadores não obtiveram resultados consistentes com quelatos de anticorpos marcados com ^{111}In . O seu custo é moderadamente alto. Apresentam uma resolução no mapeamento (cintilografia) melhor que o ^{131}I porém a maior desvantagem está no significativo acúmulo hepático de radioatividade que ocorre ao longo da vida biológica resultando numa dose absorvida igual a do ^{131}I . O ^{111}In é adequado somente para o uso em mapeamentos (cintilografias) de órgãos distantes do fígado. Já o ^{131}I apesar de ser concentrado no pescoço pela glândula tireóide tem esta dificuldade contornada pela administração prévia de uma droga bloqueadora da tireóide.

$^{99\text{m}}$ TECNÉCIO

É o isótopo mais largamente usado como traçador para estudos em Medicina Nuclear, com meia-vida física de 6 horas, energia de 140KeV. É preparado conveniente e localmente por eluição de uma coluna de ^{99}Mo , que possui meia-vida de 67 horas. O tecnécio decai rapidamente, sua química é pouco entendida e o método de produção resulta numa preparação bastante impura. Apesar disto é bastante usado para marcação de proteínas, porém a sua meia-vida curta torna-o inadequado quando a biodistribuição ou a ligação ao antígeno for relativamente lenta. Este isótopo é ligado ao anticorpo de modo similar do ^{111}In , isto é, por conjugação.

MÉTODOS DE MARCAÇÃO

A radioiodação é um dos métodos mais comuns para a marcação de proteínas. De baixo custo e simples no preparo conduz a preparações com atividade específica relativamente alta. A maior desvantagem é o dano que pode ocasionar à proteína. É imprevisível a suscetibilidade de proteínas individuais para deteriorar-se pela radioiodação. Muitas vezes um método de iodação pode danificar a proteína e outro não. Em outros casos, todos os métodos de iodação podem danificar a proteína. Alternativamente, quando a proteína de interesse pode ser inativada pela radioiodação, utiliza-se trítio ^3H para a marcação. Este radionuclídeo apresenta a vantagem de ser incorporado diretamente às cadeias de moléculas orgânicas, com um mínimo de rompimento na conformação da proteína. As desvantagens estão na sua meia-vida longa, emissão beta, taxa de desintegração baixa, grande concentração molar por unidade de radioatividade exigindo adições grandes de marcado em relação ao substrato resultando, como consequência, produtos marcados com atividade específica baixa. Além disso há necessidade de se utilizar cintilador líquido (com todos os problemas inerentes, quenching, tempo de preparação e custo) para a detecção.

RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPOS POR IODAÇÃO

Na radioiodação de proteínas é desejável uma substituição de aproximadamente um átomo de iodo por molécula de proteína. Mesmo a substituição de um átomo de iodo por molécula de proteína pode acarretar danos significantes à molécula protéica afetando a ligação antígeno-anticorpo com diminuição da imunorreatividade.

Entre os vários sistemas de radioiodação, os mais usados para as imunoglobulinas são: Cloramina T, lactoperoxidase e Iodogen.

CLORAMINA T (Greenwood & Hunter, 1963)

Greenwood & Hunter introduziram o método da Cloramina T (sal sódico do N-monocloro derivado do p-tolueno-sulfonamida) que em solução aquosa libera lentamente ácido hipocloroso levando a condições de oxidação obtendo-se incorporação quantitativa de iodo. Permite marcação a nível de micrograma com alta atividade específica. A reação é interrompida por redução do excesso de Cloramina T com metabissulfito de sódio.

A reação de iodação deve ser realizada no menor tempo possível, promovendo a purificação da mistura logo após a marcação. Devido à exposição da proteína a agente oxidante potente como a Cloramina T, as preparações são instáveis com formação frequente de espécies com mais de um átomo de radioiodo substituído diminuindo a imunorreatividade. Para minimizar estes danos reduz-se a quantidade do agente oxidante na proporção de 1:1 em relação ao substrato.

IODAÇÃO CONTROLADA DA CLORAMINA T (Roth e col., 1971)

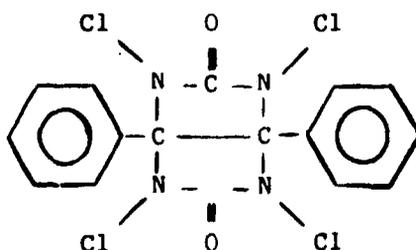
O método clássico da Cloramina T para a marcação de proteínas, quando se deseja alcançar alta atividade específica, pode conduzir a preparações marcadas com imunorreatividade e estabilidade diminuídas, presumivelmente em virtude da exposição da proteína ao excesso deletério dos agentes oxidantes (Cloramina T) e redutores (metabissulfito de sódio). Para obviar estes inconvenientes usa-se adição progressiva de Cloramina T em quantidades controladas, ou seja, nas exatas proporções das massas envolvidas na reação e não em excesso como convencionalmente. Este procedimento é realizado em condições moderadas evitando-se o excessivo contato com os reagentes e consequentemente, menor agressão à molécula protéica. Obtém-se assim radioproteínas com alta atividade específica e manutenção da estabilidade e imunorreatividade. Acompanha-se a cinética da reação através de amostragens sucessivas que permitirão avaliar o progredir do rendimento até o alcance do percentual de incorporação suficiente para a atividade específica desejada.

LACTOPEROXIDASE (Marchalonis, 1969)

A oxidação de iodo usando o enzima lactoperoxidase no lugar de oxidantes químicos, como a Cloramina T ou Iodogen, é usada na mar

cação de proteínas com atividade específica moderada. Este método não emprega agentes oxidantes ou redutores, embora faça uso de pequena quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como catalizador. A desvantagem deste procedimento está na possível contaminação das proteínas com pequenas quantidades de lactoperoxidase iodada exigindo uma purificação adicional.

IODOGEN (Fraker e Speck, 1978)



Estrutura molecular do Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicouril). Peso molecular=432,09

Entre os 3 sistemas de marcação, o mais conveniente para os anticorpos monoclonais, de um modo geral, é a radioiodação pelo método de Iodogen.

O Iodogen intervém na iodação em fase sólida (potencialmente menos destrutiva) em solução aquosa de iodeto e proteína. É preparado em solvente orgânico, distribuídos em tubos de reação e secos a $25^{\circ}C$. Forma-se um fino filme na base. Pode-se preparar previamente os tubos de reação para uma estocagem de até 12 meses a $4^{\circ}C$.

O Iodogen permanece em fase sólida durante a reação de iodação e a proteína é difundida na área em que está contido o reagente. A reação é interrompida pela simples remoção do produto marcado do tubo de reação.

A reação é feita no tubo revestido com Iodogen adicionando-se o anticorpo monoclonal e ^{131}I de acordo com a atividade específica desejada. É método de preferência da maioria dos pesquisadores para a marcação de fragmentos de anticorpos em quantidades a nível de microgramas.

EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO

Após os procedimentos da radiomarcação verifica-se a sua eficiência por determinação dos percentuais de iodo livre e incorporado

ao produto, através de um sistema de cromatografia miniaturizada utilizando papel Whatman 3MM como suporte e solução fisiológica ou ácido tricloroacético 10% ou metanol 85% como solventes.

PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO MARCADO

Apesar dos cuidados utilizados no desenvolvimento da marcação propriamente dita, a estrutura da proteína sofre agressões que se traduzem, a par da presença de moléculas de proteínas marcadas, pela de frações moleculares igualmente marcadas, porém, danificadas e iodo livre.

Para uma pureza radioquímica a preparação deve ser livre de iodo não reativo, livre de produtos de degradação da proteína e possuir máxima imunorreatividade (ligação antígeno-anticorpo). A preparação deve ser submetida a um sistema de purificação logo após a marcação. Dependendo da natureza do produto e as propriedades das proteínas/anticorpos estudadas, várias técnicas de purificação podem ser utilizadas sendo as mais comuns gel filtração e cromatografia de troca iônica.

O produto submetido a qualquer um desses sistemas de purificação tem a sua pureza avaliada por um sistema de cromatografia miniaturizada utilizando papel Whatman 3MM como suporte e solução fisiológica ou ácido tricloroacético 10% ou metanol 85% como solventes.

CONTROLE DE QUALIDADE DO RADIOIMUNOFÁRMACOS (Lindmo e col., 1984)

Como a radioiodação pode causar alterações nas propriedades biológicas e imunológicas na molécula, a preparação é submetida a procedimentos de controle de qualidade para avaliar, além da pureza radioquímica, as características de imunorreatividade. É importante que os procedimentos químicos da radioiodação não destruam a afinidade do anticorpo ao antígeno, isto é, que o anticorpo radioiodado mantenha a radioimunorreatividade. Toda preparação de anticorpo marcado precisa ter a sua imunorreatividade testada antes do uso clínico. A capacidade de ligação antígeno-anticorpo pode ser determinada *in vitro* após a incubação dos radioimunofármacos com linhagens de células relevantes, já estabelecidas em cultura, originadas do antígeno específico ou por afinidade cromatográfica de acordo com o anticorpo monoclonal.

Preparações com pureza radioquímica acima de 95% e imunorreatividade apreciável, em torno de 50%, são submetidas a testes de esterilidade (US Pharmacopoeia) e apirogenicidade (método de Limulus Amebocyte Lysate - LAL). Assim o produto final, dentro das especificações farmacêuticas, está pronto para o uso clínico.

APLICAÇÃO DOS RADIOIMUNOFÁRMACOS

A administração de anticorpos radiomarcados com propósitos diagnósticos não é um conceito novo, contudo a aplicação desses reagentes ficou prejudicada pela limitação do conhecimento de métodos imunológicos, incluindo a produção de antígenos associados a tumor, bem de finidos.

Conceitualmente a transformação maligna pode ser acompanhada por mudanças fenotípicas celulares que incluem perda de componentes normais ou ganho de outros não expressos na célula. Este componente neoexpresso, se for reconhecido pelo sistema imune como estranho, é um antígeno tumoral. Antígenos associados a tumor, são usados na produção de anticorpos específicos.

Após o sucesso obtido por Goldenberg e col. (1978) com anticorpos radiomarcados para antígeno carcinoembriônico (CEA) para localização neoplásticas em pacientes com indícios de diversos tipos de câncer, estes estudos resultam numa grande atividade de pesquisa nestes últimos anos.

A combinação do desenvolvimento de antígeno específico associado a tumor como o CEA (carcinoembryonic antigen) e do método do radioimunoensaio, associação das características de certas reações imunológicas às extremas sensibilidade e precisão das medidas físicas da radioatividade, descrito por Yalow & Berson (1960), possibilitou estudos posteriores de marcação de anticorpos contra alguns antígenos associados a tumor. Estes anticorpos, porém, por serem policlonais, localizam-se em tecidos tumorais e não tumorais, dificultando a caracterização precisa da imagem.

O advento da Tecnologia de Hibridoma (Köhler & Milstein, 1975) e a subsequente disponibilidade de anticorpos monoclonais contra um único determinante antigênico humano, podendo carregar radionuclídeos especificamente para células ou órgãos, possibilitou a produção de radioimunofármacos altamente específicos.

Radioimunodeteção

As técnicas convencionais de diagnóstico, radiologia, Raio-X, tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear e ultrassom, detectam o tumor somente pelos seus atributos físicos: tamanho, forma, posição e deslocamento de outros tecidos. As usadas em Medicina Nuclear são sensíveis mas não específicas. O uso de anticorpo monoclonal radiomarcado na identificação de antígenos específicos associados a tumor fornece base para o desenvolvimento de técnicas para detecção *in vivo* de lesões tumorais. Muitos sistemas antígeno-anticorpo foram usados para a imagem de diferentes tumores. A experiência demonstrou que, apesar da simplicidade conceitual, esses estudos são mais complexos do

que se poderia supor. Na prática clínica muitos fatores influenciam o sucesso da sua aplicação. In vitro, pelo princípio da lei da ação das massas, largamente usado no radioimunoensaio, as condições de equilíbrio entre antígeno e anticorpo (Ag-Ab) são prontamente alcançados. In vivo, pela dificuldade em estimar a concentração do antígeno com o qual o anticorpo entrará em contato, o alcance deste equilíbrio é mais complicado. O antígeno deve localizar-se na membrana da célula para ser acessível ao anticorpo-traçador circulante. É também necessário que células normais não expressem o antígeno ou no mínimo que a concentração do antígeno nas células normais sejam 100 vezes menores que nas células tumorais. Outros fatores como tamanho, sítio das lesões e fenômenos biológicos como carência da expressão do antígeno pelo tumor interferem no resultado. Apesar destas dificuldades alguns grupos obtiveram bons resultados utilizando estes procedimentos. A vantagem do anticorpo monoclonal está na sua homogeneidade e especificidade para os antígenos imunizantes. Por reagem com um único determinante antigênico e considerando que os determinantes antigênicos não são repetitivos, normalmente não formam imunocomplexos.

A detecção de tumor usando anticorpo monoclonal radiomarcado apresenta particular interesse porque nas ligações in vivo são usados como verdadeiros mísseis cujas ogivas nucleares se dirigem seletivamente a seus alvos, os tumores, sem que as demais células do organismo fiquem comprometidas pela radioatividade das substâncias transportadas.

O acúmulo do anticorpo monoclonal radiomarcado no tumor, em caso positivo, começa nos primeiros minutos após a injeção. As melhores condições para o desempenho imunocintilográfico são normalmente alcançados 6 a 24 horas após a injeção. A análise, em termos de tamanho e localização no órgão, somente 30% de lesões menores que 2cm são detectados. O grau de detecção aumenta para 86% quando se considera lesões acima de 2cm.

A distribuição restrita a tecidos de alguns desses antígenos e o alto grau de especificidade dos anticorpos monoclonais correspondentes tem estimulado o interesse na aplicação de procedimentos de radioimagem para visualizar lesões em pacientes com tumores sólidos.

Radioimunoterapia

Requer um desenvolvimento maior que a radioimunodeteção. Até o presente a radioimunoterapia é considerada como um método experimental para tratamento de tumores sólidos. Mesmo que se alcance uma regressão tumoral após doses terapêuticas do radioimunofármaco, são necessários estudos básicos ulteriores e provas clínicas para otimizar numerosos aspectos do método. Nestes estudos são incluídos somente pacientes com tumores metastáticos ou periódicos. É sabido que a radioimunoterapia não tem influência em largas massas tumorais, por esta razão são excluídos os pacientes em estado avançado. Em massas tumorais menores, o acú-

mulo relativamente alto, do reagente no tumor, apresenta maior chance de efeito terapêutico.

É necessário ser provado que o tumor produz o antígeno (biopsia de tecido metastático: método avidin-biotina imunoperoxidase). Precedendo à terapia deve-se fazer uma imunocintigrafia com o objetivo de confirmação *in vivo* do acúmulo do radioimunofármaco no tumor.

Ainda não está claro se há uma atividade específica ótima para um efeito terapêutico máximo. Para a maioria dos radioimunofármacos o sítio de injeção (intravenosa, intraperitoneal, etc.) pode ter um papel importante na distribuição do anticorpo. Antes da radioimunoterapia a dose deve ser estimada o mais próximo possível. A dose mínima que pode ser liberada em tumor sólido é de 60Gy (6.000rads), porém, provavelmente são necessárias doses maiores 160-200Gy (16.000-20.000rads).

REFERÊNCIAS

1. EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKINS, C.R.: Isolation of pure IgG, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. Immunochem. 15:429-36, 1978.
2. FRAKER, P.J.; SPECK, J.C.: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-diphenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:849-57, 1978.
3. FREYCHET, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.: Monoiodoinsulin: demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:400-8, 1971.
4. GODING, J.W.: Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press, New York & London, 1986.
5. GOLDENBERG, D.M.; KIM, E.E.; DELAND, F.H.: Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. N. Engl. J. Med. 298:1384-6, 1978.
6. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.N.; GLOVER, J.S.: The preparation by ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89:114-23, 1963.
7. KAZIKIEWICZ, J.M.; ZIMMER, A.M.; SPIES, S.M.: Rapid miniaturized chromatography procedures for iodinated monoclonal antibodies: comparison to gel exclusion chromatography. J. Nucl. Med. Technol. 15:129-32, 1987.
8. KOHLER, G.; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-7, 1975.
9. LANGONE, J.J.; VUNAKIS, H.V.: Hybridoma technology and monoclonal antibodies. In Methods in Enzymology, 121. Academic Press, New York & London, 1986.

10. LINDMO, T.; BOVEN, E.; CUTTITA, F.: Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immun. Meth. 72:77-89, 1984.
11. MARCHALONIS, Y.J.: An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. Biochem. J. 113:299-305, 1969.
12. REFERENCES: Immunocintigraphy with antimelanoma and anti-CEA monoclonal antibodies. Sorin Biomedica-SALUGGIA (VC). Italy.
13. MOREL, C.M.: **Genes and antigens of parasites**. A laboratory manual. Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, 1983.
14. STANWORTH, D.R.; TURNER, M.W.: Immunochemical analysis. In **Handbook of experimental immunology**. D.M. Weir ed. p.6-25. Blackwell, Oxford, 1978.
15. STUDLER, P.K.; LARSON, S.M.: Radiolabeled monoclonal antibodies: a **decisive** technology. J. Nucl. Med. Technol. 13:46-52, 1985.
16. YALOW, R.S.; BERSON, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39:1157-75, 1960.