

BR8920812

ISSN 0101-3084

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
RADIOMARCADOS EM MEDICINA NUCLEAR**

Iracelia Torres de Toledo e Souza e Helena Okada

PUBLICAÇÃO IPEN 234

DEZEMBRO/1988

SÃO PAULO

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
RADIOMARCADOS EM MEDICINA NUCLEAR**

Iracelia Torres de Toledo e Souza e Helena Okada

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C62.00

**CHEMICAL PREPARATION
IMMUNOLOGY
IODINATION
MONOCLONAL ANTIBODIES
NUCLEAR MEDICINE**

IPEN - Doc - 3109

Aprovado para publicação em 29/11/88.

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

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RADIOMARCADOS EM MEDICINA NUCLEAR

Tracelia Torres de Toledo e Souza e Helena Okada

RESUMO

Revisa-se os fundamentos da metodologia de produção de Anticorpos Monoclonais, alguns conceitos imunológicos importantes para o entendimento do que é um anticorpo monoclonal, a radioiodação e usos desses radiofármacos em medicina nuclear.

PRODUCTION AND RADIOIODINATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND ITS APPLICATIONS IN NUCLEAR MEDICINE

ABSTRACT

The basis of the monoclonal antibody production methodology, some immunological concepts which are important for the understanding of what is a Monoclonal Antibody, its radioiodination and acceptance as receptor-specific radiopharmaceuticals in nuclear medicine are reviewed.

INTRODUÇÃO

A idéia de usar anticorpos radiomarcados no diagnóstico e terapia do câncer surgiu em torno de 1945 com o início da Medicina Nuclear (Strudler e Larson, 1985).

Presman e col. (1953) e posteriormente Bale e col. (1955) utilizaram anticorpos radiomarcados na detecção do câncer em animais. Contudo a aplicação desses reagentes ficou prejudicada pela limitação do conhecimento de métodos imunológicos, incluindo a produção de anticorpos específicos e preparação de antígenos, associados a tumor, bem definidos.

A combinação do desenvolvimento de antígeno específico associado

a tumor CEA ("carcino-embryonic antigen") e do método de radioimunoensaio, associação das características de certas reações imunológicas às extremas sensibilidade e precisão das medidas físicas da radioatividade, descrito por Yalow e Berson (1960) possibilitou estudos posteriores de marcação de anticorpos contra alguns antígenos associados a tumores (Gol e Freedman., 1965, Primus e col. 1973, Goldenberg e col., 1978).

Estes anticorpos, porém, por serem policlonais, localizavam-se em tecidos tumorais e não tumorais, dificultando a caracterização precisa da imagem. Douillard e col. (1985).

O advento da Tecnologia de Híbridomas (Köhler e 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 radiofármacos altamente específicos.

Usando tratamento enzimático a molécula de anticorpo (IgG) pode ser quebrada em várias partes produzindo fragmentos de imunoglobulina que mantêm a especificidade eliminando a ligação inespecífica. Em Medicina Nuclear utiliza-se o fragmento em vez do anticorpo no seu todo (Larson e col, 1983 a).

A molécula do fragmento, além de melhorar a imagem, é depurada do sangue mais rapidamente (Larson, 1985). Estudos de distribuição animal atestam que fragmentos radiomarcados são facilmente removidos da circulação (Knigh e col, 1983). Para a marcação desses fragmentos pode-se utilizar uma variedade de radionuclídeos (Sfakimianakis e Deland , 1982). Fragmentos marcados com traçadores emissores gama e conjugados à cintiligrafia permitem diagnósticos funcionais e precisos. Quando marcados com traçadores emissores alfa e beta, são usados como agentes terapêuticos (Larson e col, 1983 b, Carrasquillo e col., 1984).

Uma relação de radionuclídeos usados na imagem e terapia (Stredler e Larson, 1985), podem ser observados na Tabela 1 e Tabela 2.

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. Analiza-se apenas como são vistos os antígenos pelos anticorpos.

Antígenos - 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 possuem, na sua sequência geral, pontos específicos denominados determinantes antigênicos ou epítomos.

Anticorpos - são proteínas globulares chamadas imunoglobulinas. Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD cujas moléculas diferem entre si quanto a sequência primária e o número de cadeias peptídicas que as constituem.

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 dois 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 pelos vários tecidos linfoides 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 anticorpo, puro, monoespecífico, produzido por um único linfócito, ou clone dele derivado, ou seja, um anticorpo monoclonal.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os detalhes técnicos precisos da produção de anticorpos monoclonais são descritos por Fazekas e Scheidegger (1980).

Em princípio a produção de anticorpos monoclonais poderia ser feita pelo isolamento e cultura de clone. Na prática, porém, 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 linfoides 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 usados 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 BALBc, ao mesmo tempo.

Os camundongos são injetados intraperitonealmente com o antígeno em adjuvante completo de Freund em intervalo de 3 semanas, seguidas 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 (Lopes e Alves, 1984).

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 e mieloma que não se fundiu são eliminados através de cultivo em meio seletivo HAT (hipoxantina, aminoptericina e timidina). Isto acontece porque a célula para se reproduzir deve sintetizar uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico). A síntese do DNA é feita por 2 vias metabólicas: via "de novo" e via "de salvaguarda".

Para a síntese de DNA pela via "de salvação" é necessário o enzima HGPRTase (hipoxantina guanina fosforibosil transferase) codificado por um gene localizado no cromossoma X. Mielomas mutantes tem mutações 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 antígenos 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 antígeno 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 radioimunoensaio.

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 mesmo 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 tanto "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 BALBc. 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.

PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS

Para determinados fins requer-se a avaliação da pureza dos anticorpos monoclonais. Podem ser purificados tanto os cultivados em garrafas de plástico como os obtidos em fluido ascítico.

As técnicas de purificação apropriadas são determinadas previamente de acordo com a classe de imunoglobulinas.

A maioria dos anticorpos monoclonais usados em Medicina Nuclear são da classe IgG obtidas do fluido ascítico (Larson e col., 1983., Brown e col., 1981., Khaw e col., 1986).

Os anticorpos monoclonais (isotipo IgG) são isolados do fluido ascítico por cromatografia de afinidade em sepharose proteína A de acordo com as técnicas descritas por Ey e col. (1978).

A pureza das IgG assim isoladas é verificada em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

O grau de pureza é determinado pela leitura de densidade óptica a 280 nm usando coeficiente de extinção $1\% = 14$.

FRAGMENTOS DE IMUNOGLOBULINA

IgG é a proteína imune predominante na circulação sanguínea. Mais de 80% dos anticorpos monoclonais usados em Medicina Nuclear são desta classe (Strudler e Larson, 1985). Usando tratamento enzimático a molécula de IgG pode ser quebrada em várias partes produzindo a que se convencionou denominar fragmentos de imunoglobulina.

A clivagem papaína (Starworth e Turner, 1978) é um dos melhores procedimentos para se produzir fragmentos definidos de IgG.

A papaína é uma protease tiol, isto é, possui um grupo SH tornando-se necessário a presença de um agente redutor como cisteína, mercaptoetanol ou ditioneitol para sua ativação. Esses agentes exercem ação redutiva sobre as pontes dissulfídicas e a extensão desses efeitos depende do agente redutor e sua concentração.

Para segurança máxima da atividade enzimática é de boa prática sequestrar seletivamente cations divalentes com EDTA (etilenodiaminotetraacético). A digestão é encerrada por alquilação irreversível do grupo tiol da papaína com iodoacetamida. Este procedimento é monitorado por SDS-PAGE. Separação dos fragmentos - O fragmento Fab ("Fragment anti - gen binding") pode ser separado da molécula íntacta de IgG e da porção remanescente de IgG chamada Fc (fragmento cristalizável) por coluna de sepharose proteína A e cromatografia de troca iônica (Goding, 1986).

RADIOMARCAÇÃO

Os radionuclídeos de iodo usados por muitas décadas para marcação de hormônios protéicos (Greenwood e col., 1963) no radioimunoensaio, são também utilizados na marcação de anticorpos monoclonais (Larson e col., 1983 a, 1984, Chatal e col., 1984).

Os sistemas de marcação mais usados para os hormônios protéicos no radioimunoensaio: cloramina T (Greenwood e col., 1963), lactoperoxidase (Marchalonis, 1969) e Iodogen (Fracker e Speck, 1978) se aplicam também na marcação de anticorpos monoclonais.

Entre os sistemas de marcação mais usados, o mais conveniente para os anticorpos monoclonais de um modo geral e para anticorpo monoclonal antimiosina em particular, é a radioiodação pelo método de Iodogen (Haisma e col., 1986).

O iodogen (1, 3, 4, 6 - tetracloro - 3a - 6a - difenilglicoluril - la) intervém na iodação rápida em fase sólida (potencialmente menos destrutiva) em solução aquosa de iodeto e proteína. É preparado em solvente orgânico e distribuídos em tubos de reação secos a 25°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°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.

Para a marcação de anticorpos monoclonais utiliza-se, no lugar do tubo, um frasco (20 ml) de reação. No frasco, revestido com Iodogen, preparado previamente, adicionam-se I-131 e o anticorpo monoclonal. O Iodogen permanece em fase sólida durante a reação e o anticorpo monoclonal é difundido na área em que está contido o reagente. Após 5 minutos de incubação adiciona-se ao frasco uma suspensão de resina de troca iônica (AgI - X 8) que possui alta afinidade pelo iodeto. Após 1 a 2 minutos a suspensão de resina é filtrada em membrana millipore (0,22 μ m) transferida a outro frasco (20 ml) esteril e não revestido, obtendo-se um produto final esteril apirogênico pronto para o uso.

Os percentuais de iodo livre e incorporado ao produto, antes e após a adição da resina são testados através do sistema de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC-ATSK 3000 com monitor de UV e detector de radiação), coluna de 30 cm e tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 como eluente (Haisma e col., 1986).

CONTROLE DE QUALIDADE DO FRAGMENTO FAB RADIOMARCADO

Após a marcação do fragmento Fab a preparação é submetida a procedimentos de controle de qualidade para avaliar as características de pureza radioquímica, radioimunorreatividade, esterilidade e apirogenicidade.

Pureza radioquímica: - Os níveis de iodeto livre das preparações de anticorpo radioiodados podem ser determinados por vários sistemas entre os quais cromatografia de camada delgada sílica gel ITLC-SG (Gelman scientific Ann Arbor, MI) e NaCl 0,9% (Kazikiewicz e Zimmer, 1987).

Radioimunorreatividade: - É importante que os procedimentos químicos da radioiodação não destruam a afinidade do anticorpo para o antígeno, isto é, que o anticorpo radioiodado mantenha a radioimunorreatividade. A radioimunorreatividade é medida de acordo com o método de Lindmo e col. (1984).

A ligação antígeno - anticorpo é medida após a incubação a 49C por

4h do anticorpo monoclonal radioiodado em uma concentração constante com uma série de diluições, concentrações crescentes de células originadas do antígeno específico. Após a lavagem das células, por 2 vezes utilizando-se soro albumina (B.S.A. 0,3%), determina-se a radioatividade de em Contador Gama. Os resultados são expressos como percentagem de ligação de radioatividade total.

A radioimunoreatividade de alguns anticorpos monoclonais entre eles o anticorpo monoclonal contra miosina cardíaca humana, pode ser determinada por afinidade em coluna cromatográfica. Uma alíquota do anticorpo monoclonal radioiodado é aplicada à coluna, apropriada para cada caso, e eluída com solvente adequado. A radioimunoreatividade é definida como a percentagem de anticorpos aplicados e percentagem de anticorpos retidos na coluna (Haisma e col., 1986).

Preparações com pureza radioquímica acima de 95%, isto é, livre de iodo não reativo e produtos de degradação da proteína e com afinidade ao antígeno (imunoreatividade) são submetidas a testes de esterilidade (USP) e de apirogenicidade (método de *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*).

O produto final com pureza radioquímica acima de 95% e imunoreatividade apreciável, desde que esteril e apirogênico, pode ser injetado em pacientes.

APLICAÇÃO DE FRAGMENTOS FAB RADIOIODADOS EM MEDICINA NUCLEAR

Os fragmentos Fab radiomarcados são usados para localização de tumor (Wright e col., 1979) e também para a imagem do miocárdio (Khaw e col., 1976; 1979).

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 tumores podem ser isolados pelo método desenvolvido por Order e col. (1973). Antígenos tumorais tais como (hCG) gonadotrofina corionica (Goldenberg e col., 1980; Bagshave, col., 1980) e (AFP) alfa feto proteína (Primus e col., 1980; Kim e col., 1980; Koji e col., 1980) são usados na produção de anticorpos específicos. Localizam-se nos tumores através dos antígenos correspondentes.

A aplicação desses radiofármacos em terapêutica, embora limitado, (Oder e col., 1980) encorajam a pesquisa no tratamento do câncer.

Experimentos terapêuticos ulteriores desenvolvidos por Larson e Col., (1983); (1985) demonstram o potencial desses radiofármacos na radioimunoterapia de câncer humano. Um exemplo clássico de diagnóstico radioimunológico de tecido não maligno é a detecção de infarto do miocárdio por fragmentos radiomarcados para a miosina (Khaw e col., 1976 ; 1979). Miosina é a proteína mais abundante nas células cardíacas (Katz, 1970). Após o infarto do miocárdio, o dano irreparável às células conduz a um aumento na permeabilidade da membrana celular miocárdial permitindo a entrada de macromoléculas, o que não acontece com o miocárdio normal. Se a molécula extracelular é um anticorpo monoclonal para um componente intracelular, concentra-se dentro do tecido danificado. Assim um anticorpo monoclonal para miosina cardíaca identifica necroses do miocárdio por localizar-se nas membranas das células danificadas. Essa localização identificada por cintilografia, permite diagnóstico e a avaliação rápidos nos quadros de infarte. Neste sistema os componentes intracelulares são usados como antígenos para o imunodiagnóstico.

A técnica de traçador radioativo conjugado à cintilografia, ^{99m}Tc tetraciclina (Holman e col., 1973), ^{99m}Tc glucoheptonato (Rosman e col., 1975) já é usada no diagnóstico do infarto do miocárdio. O maior sucesso desses radiofármacos ocorre com o ^{99m}Tc pirofosfato (Parkey e col., 1974 ; Coleman e col., 1976), porém a sua especificidade não é exclusiva para infarto do miocárdio. Pode ocorrer no músculo esquelético (Pugh e col., 1976) e carcinoma do pulmão (Harford e col., 1977) e a sua concentração no infarto do miocárdio não é proporcional a nível de necrose miocárdial (Marcus e col., 1976).

O fragmento de antimiosina cardíaca humana radioiodado, concentrando-se dentro do tecido danificado é o agente ideal para a visualização do infarte miocárdial (Khaw e col., 1976).

Os anticorpos monoclonais são extremamente específicos, porém sua especificidade é para epítomos antigênicos e não para a molécula o que faria supor uma redução substancial da sua localização. Foi observado, porém, uma localização elevada no infarto miocárdial canino (Khaw e col., 1983) sugerindo que a quantidade de anticorpo monoclonal antimiosina ligada não está diminuída, visto que existe um excesso de epítomo

de miosina em relação a concentração de anticorpo usado (Khaw e col. , 1984).

Os anticorpos monoclonais são obtidos em camundongos de forma rotineira, entretanto seria desejável que fossem de origem humana para a sua administração em pacientes. Até agora, porém, embora com progressos neste sentido (Olsson e Kapla, 1980) não se conseguiu ainda a linhagem humana adequada aos experimentos de fusão como as linhagens de camundongos.

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 que recebem o nome de anticorpos anti-idiotípicos porque reconhecem o idiótipo (porção do anticorpo - anticorpo 1 - que contém os sítios de ligação do antígeno). As reações alérgicas ocasionadas não constituem um fator limitante para a aplicação desses radiofármacos no uso clínico, uma vez que as quantidades a nível de μg dos fragmentos Fab radioiodado e a remoção do fragmento Fc da molécula do anticorpo previnem tais reações. (Beller e col; 1977; Moldofsky e col., 1983; Larson e col., 1983 b).

ANTICORPO CONVENCIONAL (POLICLONAL). SORO IMUNE

Parece paradoxal tecer 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 mono-especificidade 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 pequena 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 3 são descritas as vantagens e desvantagens do soro imune e anticorpos monoclonais.

TABELA 1

(Strudler e Larson, 1985)

Seleção de Radionuclídeos para a Radioimunodeteção				
Nuclídeo	meia vida	Decaimento	Vantagens	Desvantagens
Tc-99m	6h	IT(95%); $\gamma = 141$ kev (89%)	eficácia. energia de decaimento.	meia vida curta. Problemas químicos.
I-123	13h	EC(100%); $\gamma = 159$ kev(83%)	energia de decaimento. Química de Iodo.	eficácia. custo. meia vida curta.
In-111	68h	EC(100%); $\gamma = 171$ kev(88%)	energia de decaimento. meia vida ótima. Química quelante	metabolismo in vivo.
I-131*	8.05d	(100%); $\gamma = 364$ kev	eficácia. Química de Iodo. meia vida ótima.	energia de decaimento. deiodação in vivo.
Ru-97	69h	EC(100%); $\gamma = 216$ kev(86%)	Química que lante	eficácia. metabolismo in vivo.
Cu 67*	62h	(100%); $\gamma = 91$ kev(7%) $\gamma = 93$ kev(17%) $\gamma = 184$ kev(47%)	-	-

* Usado também em terapia

TABELA 2

(Strudler e Larson, 1985)

Seleção de Radionuclídeos para Radioimunoterapia				
Nuclídeo	meia vida	Decaimento	Vantagens	Desvantagens
I-131*	8.05d	β^- (100%); $\gamma = 364 \text{ kev}$ (82%)	0,608 mev (86%) imagem. custo	eficácia. trajetória longa nos tecidos.
Y-90	64h	β^- (100%);	2,29 mev (100%) gerador ^{90}Sr decaí- mento β^- puro.	problemas quími- cos. Metabolismo in vivo?
Cu-67*	62h	β^- (100%); $\gamma =$ $\gamma = 93 \text{ kev}$ (17%) $\gamma = 184 \text{ kev}$ (49%)	91 kev (7%) imagem.	metabolismo in vivo?
Bi-212	1h	α (36%) β^- (64%) \rightarrow ^{212}Po (0.3 μg .sec TL/2. $\alpha = 8,78 \text{ mev}$	decaimento alto.	meia vida curta. Química desconhe- cida.
At-211	7,2h	α (41%) EC (59%)	5,9 mev (41%) decaimento alto.	meia vida curta. Química desconhe- cida.
I-125	60,2d	EC (100%); raio x = 27 kev	$\gamma = 35 \text{ kev}$ decaimento alto.	necessidade de estar no nucleo para destruir o tumor.

* Usado também na imagem.

TABELA 3

(Strudler e Larson, 1986)

Comparação entre soro imune (policlonal) e anticorpo monoclonal		
Item	Soro imune (policlonal)	Anticorpo Monoclonal
Origem	Soro de animal imunizado	Células de hibridoma (linfó cito-mieloma) camundongo.
Quantidade	Relativamente limitada. Utiliza-se um grande número de animais de laboratório. Quantidades produzidas na ordem de miligramas.	Praticamente ilimitada. Quantidades produzidas na ordem de gramas.
Composição Reprodutibilidade.	Contêm mistura de anticorpos com afinidade e correlação variando de animal para animal, de sangria para sangria.	Proteína homogênea monoc específica.
Vantagens	A sua produção é relativamente fácil.	Produzido através de hibridoma. Alto grau de confiança e reprodutibilidade.
Aplicação	Radioimunoensaio	Imunohistoquímica. Imunodeteção. Imunoterapia.

REFERÊNCIAS

01. BAGSHAW, K.D.; SEARLE, F.; LEWIS, J. Preliminary therapeutic and localization studies with human chorionic gonadotropin. Cancer Res. 40:3016-3017, 1980.
02. BALE, W.F.; SPAR, I.L.; GOODLAND, R.L. In vivo and in vitro studies of labelled antibodies against rat kidney and walker carcinoma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89:564-568, 1955.
03. BELLER, G.A.; KHAW, B.A.; HAVER, E.; SMITH, T.W. Localization of radiolabelled cardiac myosin specific antibody in myocardial infarcts. Circulation 55:74-78, 1977.
04. BROW, J.P.; WOOD BURY, R.G.; HART, C.E.; HELLSTROM, I.; HELLSTROM, K.E. Quantitative analysis of melanoma associated antigen p. 97 in normal and neoplastic tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. 18:539-543, 1981.
05. CARRASQUILLO, J.A.; KROHN, K.A.; BEAUMIER, P. Diagnosis and therapy for solid tumors with radiolabelled antibodies and immune fragments. Cancer Treat. Rep. 68:317-328, 1984.
06. CHATAL, J.F.; SACCAVINI, J.S.; FUMOLEAU, P.; DOMILLARD, J.Y. CURTET, C.; KREMER, M.; MEVEL, B.; KOPROWSKI, H. Immunoscintigraphy of colon carcinoma. J. Nucl. Med. 25:307-314, 1984.
07. COLEMAN, E.R.; KLEIN, M.S.; ROBERTS, R.; SOBELL, B.E. Improved detection of myocardial infarction with technetium 99m stannous pyrophosphate and serum MB creatine phosphokinase. Am. J. Cardiol. 37:732-737, 1976.
08. DE LAND, F.H.; GOLDENBERG, D.M. In vivo cancer diagnosis by radioimmunodetection. In radioimmunodetection and radioimmunotherapy, Burchiel, S.W. and Rhodes, B.A., eds, NY: Elsevier Publ, p.329-330, 1983.

09. DONILLARD, J.Y.; CHATAL, J.F.; SACCAVINI, J.C.; CHATAL, C.; KREMER, M.; PENVIEL, P.; KAPROWSKI, H. Pharmacokinetic study of radio-labeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibodies in tumor-bearing nude mice. Eur. J. Nucl. Med. 11:107-113, 1985.
10. EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKINS, C.R. Isolation of pure IgG, IgG_{2a} e IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein-A-sepharose. Immunochem. 15:429-436, 1978.
11. FAZEKAS, S.S.G.; SEHEIDEGGER, D. Production of monoclonal Antibodies: Strategy and tactics. J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980.
12. FRAKER, P.J.; SPECK, J.C. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-diphemylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:849-857, 1978.
13. GOLD, P.; FREEDMAN, S.O. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinoma by immunological and adsorption techniques. J. Exp. Med. 121:439-462, 1965.
14. GOLDENBERG, D.M.; KIM, E.E.; DELAND, F.H. Clinical radioimmuno-detection of cancer with radioactive antibodies to human chorionic gonadotropin. Science 208:1284-1286, 1980.
15. GODING, J.W. Preparation of Fab Fragments of mouse and rat IgG. In monoclonal antibodies: Principles and Practice. Copyright by Academic Press Inc. (London) Ltd. p. 126-132, 1986.
16. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, W.N.; GLOVER, J.S. The preparation by ¹³¹I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89:114-123, 1963.
17. HARFORD, W.; WEINBERG, M.N.; BUJA, L.M.; PARKEY, R.W.; BONTE, F. J.; WILLERSON, J.T. Positive ^{99m}Tc-stannous pyrophosphate myocardial image in a patient with carcinoma of the lung. Radio -

- logy 122:747-751, 1977.
18. HAISMA, H.J.; HILGERS JANUZURAWSKI, V.R. Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a convenient one vial method. J. Nucl. Med. 27:1890-1895, 1986.
 19. HOLMAN, B.L.; DEWANGEE, M.K.; IDOINE, J.; FLIEGEL, C.P.; DAVIS, M. A.; TREVES, S.; ELDH, P. Detection and localization of experimental myocardial infarction with ^{99m}Tc tetracycline. J. Nucl. Med. 14:595-599, 1973.
 20. JUNGERMAN, J.A.; YU, P.K.H.; ZANELLI, C.I. Radiation absorbed dose estimates at the cellular level for some electron-emitting radionuclides of Radioimmunotherapy. Int. J. Appl. Radiat Isot. 35:883-888, 1984.
 21. KATZ, A.M. Contractile proteins of the heart. Physiol. Rev. 50 : 63-158, 1970.
 22. 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. 15:129-132, 1987.
 23. KHAW, B.A.; BELLER, G.A.; HARBER, E. Localization of cardiac myosin specific antibody in myocardial infarction. J. Clin. Invest. 58:439-446, 1976.
 24. KHAW, B.A.; BELLER, G.A.; HARBER, E. Experimental myocardial infarct imaging following intravenous administration of Iodine-131 labeled antibody (Fab)₂ fragments specific for cardiac myosin. Circulation 57:743-750, 1980.
 25. KHAW, B.A.; FALLON, J.T.; BELLER, G.A. Specificity of localization of myosin specific antibody fragments in experimental myocardial infarction. Circulation 60:1527-1531, 1979.

26. KHAW, B.A.; FALLON, J.T.; STRAUSS, H.W. Myocardial infarct imaging of antibodies to canine cardiac myosin with ^{111}In diethylenetriamine pentaacetic acid. Science 209:295-297, 1980.
27. KHAW, A.B.; STRAUSS, H.W.; POHOST, G.M.; FOLLON, J.T.; KATUS, H.A.; HARBER, E. Relation of immediate and delayed thallium ^{201}Tl distribution to localization of iodine- ^{125}I antimyosin antibody in acute experimental myocardial infarction. Am. J. Cardiol. 51:1428-1432, 1983.
28. KHAW, B.A.; MATTIS, J.A.; MELINCOFF, G.; STRAUSS, H.M.; GOLD, H.K.; HARBER, E. Monoclonal antibody to cardiac myosin: imaging of experimental myocardial infarction. Hybridoma 3:11-23, 1984.
29. KHAW, B.A.; COONEY, J.; EDGINGTON, T.; STRAUSS, H.W. Differences in experimental tumor localization of dual-labeled monoclonal antibody. J. Nucl. Med. 27:1293-1299, 1986.
30. KOGI, T.; ISHII, N.; MUNAHISA, T. Localization of radioiodinated antibody to alpha fetoprotein in hepatoma transplanted in rats and a case report of alpha fetoprotein antibody treatment of a hepatoma patient. Cancer Res. 40:3013-3015, 1980.
31. KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497, 1975.
32. KNIGHT, L.C.; MAURER, A.H.; AMMAR, I.A.; SHEALY, D.J.; MATTIS, J.A. Evaluation of ^{111}In -labelled anti-fibrin antibody for imaging vascular thrombi. J. Nucl. Med. 29:494-502, 1988.
33. LARSON, S.M.; CARRASQUILLO, J.A.; KROHN, K.A. Localization of ^{131}I -labelled p-97 specific Fab fragments in human melanoma as a basis for radiotherapy. J. Clin. Invest. 72:2010-2114, 1983 a
34. LARSON, S.M.; BROWN, J.P.; WRIGHT, P.M.; CARRASQUILLO, M.A.; HELLSTRON, I.; HELLSTRON, K.E. Imaging of melanoma with ^{131}I -labeled

- monoclonal antibodies. J. Nucl. Med. 24:123-129, 1983 b
35. LARSON, S.M. Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in Diagnosis and therapy. J. Nucl. Med. 26:538-545, 1985.
 36. LINUMO, T.; BOVEN, E.; CUTTITA, F. Determination of the immune reactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immun. Meth. 72:77-89, 1984.
 37. LOPES, J.D.; ALVES, M.M. Production of monoclonal antibody by somatic cell hybridization. In Genes and antigens of parasites CM morel ed. Rio de Janeiro, Fiocruz p.419-431, 1984.
 38. MACH, J.P.; CARREL, S.; FORNI, M.; RITSCHARD, J.; DONATH, A.; ALBERTO, P. Tumor localization of radiolabeled antibodies against carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma. N. Engl. J. Med. 303:5-10, 1980.
 39. MARCHALONIS, Y.J. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. Biochem. J. 113:299-305, 1969.
 40. MOLDOFLKY; P.Y.; POWE, J.; MULHEM, C.B. Metastatic colon carcinoma detected with radiolabeled F (ab')₂ monoclonal antibody fragments. Radiology 149:549-555, 1983.
 41. OLSSON, L.; KAPHAN, H.S. Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. 77:5429-5431, 1980.
 42. ORDER, S.E.; DANALME, V.; KNAPP, R. Immunotherapy of ovarian carcinoma. Cancer 32:573-579, 1973.
 43. ORDER, S.E.; KLEIN, J.L.; EITTINGER, D. Use of isotopes immunoglobulin in therapy. Cancer Res. 40:3001-3007, 1980.

44. PARKEY, R.E.; BONTE, F.J.; MEYER, S.L.; OTKINS, J.M.; CURRY, G.C. ; WILLERSON, J.T. A new method for radionuclide imaging of a acute myocardial infarction in humans. Circulation. 50:540-546, 1974.
45. PPASQUIER, R.; TARDASH, M.R.; BOTVINICK, E.H.; SHAMES, D.M.; PARMLEY, W.W. The specificity of the diffuse pattern of cardiac uptake in myocardial infarction imaging with technetium-99m-stannous pyrophosphate. Circulation 55:61-66, 1977.
46. PRESSMAN, D.; KORNGOLD, L. The in vivo localizing of anti-wagner ' osteogenic sarcoma antibodies. Cancer 6:619-623, 1953.
47. PRIMUS, F.J.; WANG, R.H.; GOLDENBERG, D.M.; HANSEN, H.J. Localization of human GW 39 tumours in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. Cancer Res. 33:2977-2982, 1973.
48. PRIMUS, F.J.; BENNET, S.J.; KIM, E.E. Circulating immune complexes in cancer patients receiving goat radiolocalizing antibodies to carcinoembryonic antigen. Cancer Res. 40:447-501, 1980.
49. RUGH, B.R.; HUJA, L.M.; PARKEY, R.W.; POLINER, L.R.; STOLEY, E.M. ; BONTE, F.J.; WILLERSON, J.T. Cardioversion and "false fastive " technetium 99m stannous pyrophosphate myocardial scintigrams. Circulation 54:399-404, 1976.
50. ROSSMAN, D.J.; STRAUSS, H.W.; SIEGEL, M.E.; PITT, B. Accumulation of 99m Tc glucoheptonate in acutely infarited myocardium. J.Nucl. Med. 16:875-880, 1975.
51. SFAKIANAKIS, G.N.; DELAND, F.H. Radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy. J. Nucl. Med 23:840-850, 1982.
52. STUDLER, P.K.; LARSON, S.M. Radiolabeled monoclonal antibodies: A "decisive" technology. J. Nucl. Med. Technol. 13:46-52, 1985.

53. YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39:1157-1175, 1960.
54. WRIGHT, T.; SINANAN, M.; ILANINGTON, D. Immunoglobulin: applications to scanning and treatment. Appl. Radial/NI 120-124, 1979.