Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2014;35(4):633-642
ISSN 1808-4532

Engenharia de anticorpos na busca por fragmentos funcionais para insumos de diagnóstico e aplicações terapêuticas

Michelle Suelen da Silva Morais[1,2]; Soraya dos Santos Pereira[1]; Rodrigo Guerino Stábeli[1]; Carla Freire Celedonio Fernandes[1,*]

[1]Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ/Rondônia;
[2]Faculdade São Lucas – Rondônia

RESUMO

Anticorpos, agentes empregados no desenvolvimento de pesquisas biomédicas, no diagnóstico e na terapêutica, possuem elevada capacidade de interação aos mais variados ligantes. Estruturalmente são heterotetrameros constituídos por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas com massa molecular de aproximadamente 150 kDa. Visando melhorar as características farmacocinéticas e minimizar possíveis reações adversas desencadeadas por imunoglobulinas de origem não humana, a engenharia molecular de anticorpos vem obtendo fragmentos de anticorpos como porções Fab, F(ab')2, scFv e Fv. Em adição aos anticorpos convencionais, camelídeos produzem imunoglobulinas funcionais desprovidas de cadeia leve, onde o domínio variável da cadeia pesada, denominado VHH ou nanocorpo, é responsável pelo reconhecimento antigênico. Apresentando características adequadas ao desenvolvimento de fármacos com alta capacidade de neutralização, fragmentos VHHs vêm sendo propostos para uso em imunoterapia passiva ou em *drug-delivery*. No diagnóstico esses fragmentos podem ser aplicados na construção de biosensores ou na imagiologia, atuando na detecção de células cancerígenas, no monitoramento de tumores ou em alterações celulares.

Palavras-chaves: Fragmento de anticorpo. Nanocorpo. VHH. diagnóstico. terapêutica.

Autor correspondente: Carla Freire Celedonio Fernandes, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rondônia. E-mail: carlaceledonio@fiocruz.br

INTRODUÇÂO

Visando a neutralização e a eliminação de antígenos, o repertório imune do organismo vertebrado sintetiza e secreta, por meio de plasmócitos, uma ampla diversidade de anticorpos com elevado grau de afinidade e especificidade a uma variedade de ligantes (Kipriyanov & Little, 1999; Chames *et al*., 2009; Wesolowski *et al*., 2009). Devido a essas características, imunoglobulinas vêm sendo amplamente empregadas no reconhecimento antigênico e atualmente são ferramentas essenciais ao desenvolvimento de pesquisas biomédicas, de kits de diagnóstico e de protótipos biotecnológicos para aplicação em imunoterapia passiva ou em *drug-delivery* (Stábeli *et al*., 2005; Vincke & Muyldermans, 2012; Muyldermans, 2013).

A introdução da tecnologia do hibridoma no meio científico em 1975 propiciou um grande desenvolvimento à engenharia de anticorpos. Por meio da técnica é possível produzir, a partir da fusão entre mielomas e esplenócitos de camundongos imunizados, anticorpos monoclonais (mAbs) com alta especificidade a proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos ou haptenos (Köhler & Milstein, 1975; Muyldermans, 2001). A elevada especificidade e afinidade dos anticorpos monoclonais, somadas a homogeneidade e a disponibilidade ilimitada são essenciais para as diversas aplicações nos ramos das ciências biológicas (Pimentel, 2008; Huang *et al*., 2010). Entretanto, quando o objetivo da utilização dos mAbs é a aplicação clínica, essas estruturas podem apresentar algumas desvantagens, como dificuldade de penetração tecidual e reações adversas a proteínas de origem não humana. A imunogenicidade de anticorpos murinos estimulam uma resposta humoral no paciente que resulta na produção de imunoglobulinas humanas anti-camundongo, conhecidas como HAMA - do inglês: *Human Anti-Mouse Antibody* (Isaacs *et al*., 1992 *apud* Pimentel, 2008; Zhang *et al*., 2009; de Marco, 2011). Diante disso, além da humanização de imunoglobulinas heterólogas, seja pela fusão das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo de camundongo, com os domínios constantes da imunoglobulina humana, ou pela inserção das regiões

determinantes de complementaridade (CDR) murinas em cadeias variáveis humanas, a produção de fragmentos de anticorpos recombinantes, como Fab, F(ab')2, scFv e Fv, vem sendo alternativas propostas pela engenharia de anticorpos para o aumento da efetividade e segurança da imunoterapia.

Os camelídeos produzem anticorpos funcionais desprovidos de cadeias leves, onde as regiões de reconhecimento antigênico são formadas exclusivamente pelo domínio variável da cadeia pesada, denominado VHH ou nanocorpo (Hamers-Casterman *et al*., 1993). Devido ao pequeno tamanho, os domínios VHHs são capazes de penetrar em tecidos densos e de interagir com epítopos fracamente antigênicos aos anticorpos convencionais. Com baixa tendência à agregação e baixa imunogenicidade, esses fragmentos podem ser obtidos em culturas de microorganismos com bom rendimento e manipuláveis por técnicas moleculares, se apresentando como uma ferramenta versátil para aplicações biotecnológicas (De Genst *et al*., 2006; Vincke *et al*., 2009).

Entre as finalidades terapêuticas dos nanocorpos estão o desenvolvimento de drogas para doenças inflamatórias, neurodegenerativas, agentes neutralizantes virais e de toxinas animais (Coppierters *et al*., 2006; Hmila *et al*., 2010; Conrad *et al*., 2011; Hultberg *et al*., 2011;). Propostas ao uso de VHHs no direcionamento de drogas à parasitas ou à células cancerígenas indicam sua aplicabilidade em drug delivery. Ademais, diferentes métodos de detecção, incluindo o desenvolvimento de kits que propõem o uso de biosensores para diagnóstico de patologias vêm crescendo consideravelmente (Cortez-Retamozo *et al*., 2004; Saerens *et al*., 2004; Baral *et al*., 2006).

Visto que a utilização de anticorpos monoclonais no diagnóstico ou na terapêutica é uma realidade e que os produtos humanizados vêm assumindo uma crescente parcela do mercado farmacêutico de imunobiológicos, a produção de fragmentos de imunoglobulinas convencionais e, especialmente, de camelídeos abrem perspectivas a diagnósticos mais precisos, além de estratégias terapêuticas mais seguras e com maior efetividade.

Estrutura dos anticorpos convencionais

Anticorpos são macromoléculas flexíveis constituídas por duas cadeias leves (L) idênticas, cada uma com aproximadamente 25 kDa e duas cadeias pesadas (H), também idênticas, variando entre 50 e 70 kDa (Calich & Vaz, 2010; Janeway *et al*., 2010; Abbas *et al*., 2005). As cadeias leves estão ligadas covalentemente às cadeias pesadas por meio de pontes dissulfeto. Enquanto as cadeias pesadas apresentam um domínio variável (VH), com grande diversificação na sua composição aminoacídica e três domínios constantes (CH1, CH2 e CH3), os quais apresentam sequências homogêneas de aminoácidos responsáveis pelas ações efetoras das imunoglobulinas (CH2 e CH3), cada cadeia leve é formada por um domínio constante (CL) e um variável (VL) (Calich & Vaz, 2010).

Atuando na formação do complexo de ligação antígeno-anticorpo, as regiões variáveis possuem domínios de grande variabilidade de aminoácidos, denominados regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDR) (Calich & Vaz, 2010), intercalados a seqüências mais conservadas denominadas *frameworks* (FR1, FR2, FR3 e FR4) (Janeway *et al*., 2010). Além das regiões variáveis (VH e VL) e das regiões constantes (CH1 e CL) que constituem o Fab (sítio de ligação ao antígeno) e dos domínios CH2 e CH3 que formam a porção Fc (fragmento cristalizável – efetor) dos anticorpos, algumas classes de imunoglobulinas possuem uma região proteica rica em prolina e cisteína, denominada região de dobradiça, permitindo uma alta flexibilidade da molécula para ligação com o antígeno (Figura 1) (Roskos *et al*., 2004; Abbas *et al*., 2005; Calich & Vaz, 2010; Janeway *et al*., 2010).

A divergência de aminoácidos na porção C-terminal das cadeias pesadas, cargas elétricas e peso molecular classificam as imunoglobulinas em cinco grupos ou isótipos denominados IgG, IgA, IgM, IgD e IgE (Calich & Vaz, 2010).

Fragmentos de Anticorpos

Por meio de clivagem da região de dobradiça das imunoglobulinas, fragmentos de anticorpos podem ser obtidos utilizando enzimas proteolíticas como a papaína ou a pepsina. Especificamente, a papaína é capaz de clivar o sítio que antecede as pontes dissulfetos existentes entre os dois segmentos de cadeias pesadas, gerando três segmentos, dois fragmentos Fab e um Fc (Figura 1A). A pepsina, quando utilizada, digere o anticorpo na região carboxiterminal das pontes dissulfeto, produzindo fragmentos funcionais (Fab')2 com as mesmas características de ligação ao antígeno que o anticorpo original, mas sem atividade efetora (Figura 1B) (Roskos *et al*., 2004; Calich & Vaz, 2010; Janeway *et al*., 2010; Teva *et al*., 2010).

Além da produção de domínios Fab e (Fab')2 por digestão proteolítica, fragmentos variáveis em cadeia única (Fv e scFv) podem ser construídos pela tecnologia de DNA recombinante utilizando diferentes sistemas de expressão (Figura 1C-D) (Skerra & Plückthun, 1988; Choo *et al*., 2002; Galeffi *et al*., 2006; Ho *et al*., 2006) . O scFv, menor fragmento de anticorpo convencional, conserva a capacidade de se ligar ao antígeno e pode ser produzido com menor custo econômico (Griffiths & Duncan, 1998; Holliger & Hudson, 2005). Ambos, Fab e scFv, possuem sítios de ligação ao antígeno comuns, formados pela região N-terminal dos domínios VH e VL (Riechmann & Muyldermans, 1999), sendo a estrutura do scFv, um heterodímero não covalente (Skerra & Plückthun, 1988), mantida por um ligante peptídico flexível (Huston *et al*., 1998). Devido a ausência do domínio Fc, o peso molecular e, por consequência, o tempo de meia-vida desses fragmentos são consideravelmente menores (Schaumann *et al*., 1986; Renard *et al*., 1997; Adams *et al*., 1998). Além disso, apresentam boa penetração tecidual

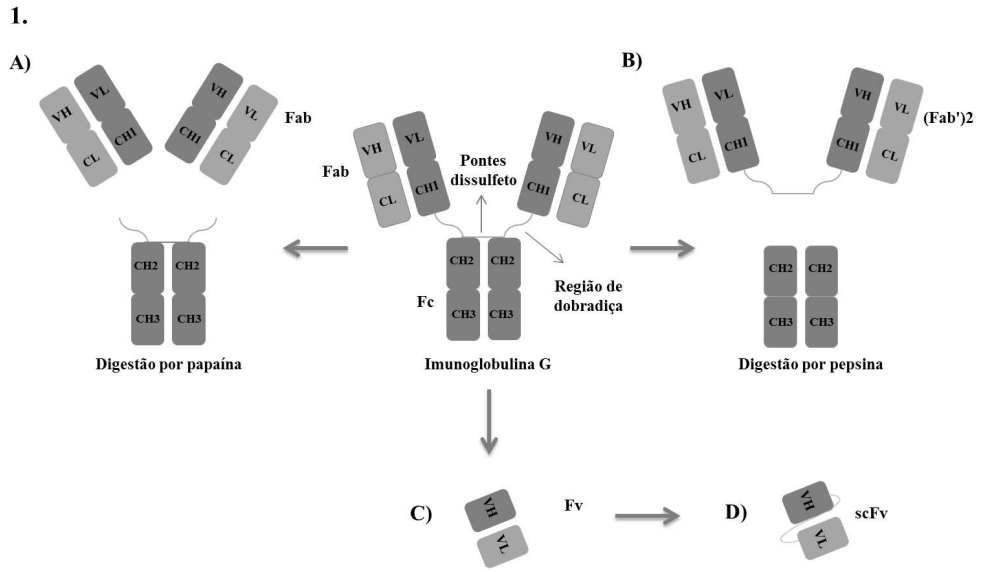

Figura 1: Estrutura da imunoglobulina G convencional e de fragmentos de anticorpos. A: Estrutura IgG convencional, indicando regiões Fab e Fc; B: Sítios de ligação ao antígeno (Fab')2, obtido após clivagem enzimática por pepsina; C: Domínio de ligação ao antígeno (Fab); D: Fragmento variável de cadeia única (Fv); E: Fragmento variável de cadeia única com ligante peptídico (scFv). (Adaptado de Vanlandschoot *et al*. 2011).

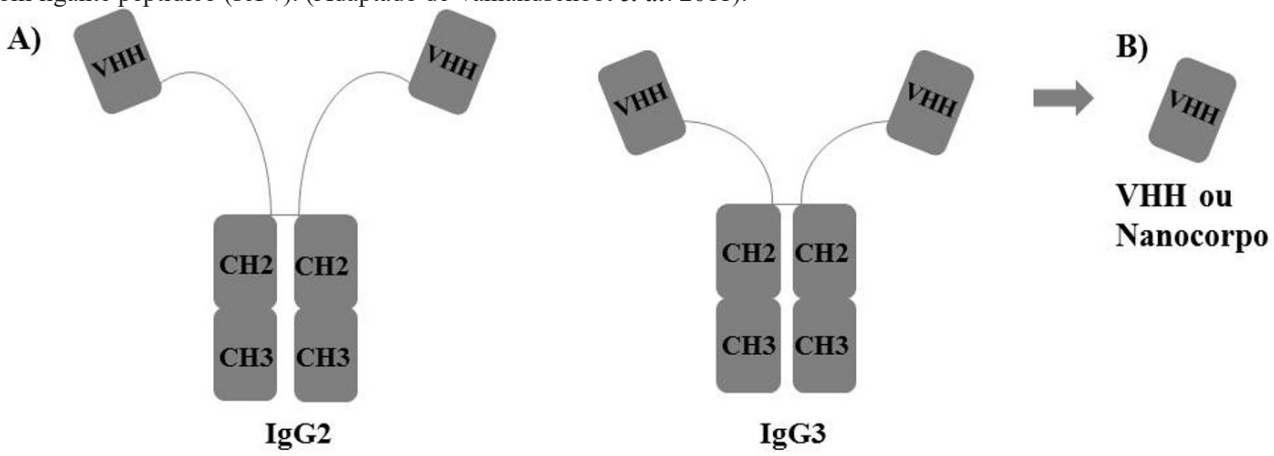

Figura 2: Estruturas dos anticorpos de cadeia pesada de camelídeos e região de reconhecimento antigênico. A: Imunoglobulina G 2 (IgG 2) e Imunoglobulina G 3 (IgG 3); B: Domínio único variável, VHH ou Nanocorpo. (Adaptado de Vanlandschoot *et al*., 2011; Muyldermans, 2001).

e menor imunogenicidade, os tornando mais eficientes para estudos estruturais (Ahmad *et al*., 2012; McManus & Riechmann,1991).

Anticorpos recombinantes, tipo Fab, têm sido utilizados para diversas aplicações clínicas. Além da prevenção de trombose durante o procedimento de cateterização da artéria coronária, por meio de um fragmento Fab contra o fator de crescimento endotelial vascular A, um Fab anti-TNF (fator de necrose tumoral) é proposto como terapêutica alternativa na doença de Crohn (Nelson, 2010). Esses fragmentos, entretanto, possuem um baixo rendimento de expressão em sistemas microbianos, baixa estabilidade e alto potencial de agregação (Saerens *et al*., 2008; Goel *et al*., 2001; Adams *et al*., 2001).

Aclopados à drogas e radionuclídeos, fragmentos scFv são capazes de localizar tumores, o que os tornam ferramentas úteis ao diagnóstico e tratamento de neoplasias (Ahmad *et al*., 2012; Kim *et al*., 2002; Jones & Marasco 1998; Oriuchi *et al*., 2005; Stipsanelli & Valsamaki 2005). Podem ser aplicáveis ainda no tratamento da artrite reumatóide ou outras doenças inflamatórias (Kaushik & Moots 2005) e, no diagnóstico, fusionados a diferentes antígenos (haptenos e proteínas) são empregáveis em imunoensaios.

Anticorpos de cadeia pesada

Em 1993, pesquisadores Belgas notificaram a interessante descoberta em que mamíferos da família *Camelidae* produzem no seu repertório imune, além dos

anticorpos convencionais, imunoglobulinas G funcionais desprovidas de cadeia leve, ou anticorpos de cadeia pesada (Hamers-Casterman *et al*., 1993). Normalmente, essas imunoglobulinas se apresentam em duas isoformas, IgG2 e IgG3 (Figura 2A). Com peso molecular de aproximadamente 90 kDa, são menores que os anticorpos convencionais (150 kDa) devido a ausência das cadeias leves. Isto é ocasionado pela remoção das sequências codificadoras de CH1 durante o processo de *splicing* do RNAm e reduz o local de reconhecimento antigênico ao domínio N-terminal variável único, denominado VHH ou Nanocorpo (Figura 2B) (Muyldermanas & Lauwereys, 1999; Nguyen *et al*., 2000; Muyldermans *et al*., 2009; Vincke e Muyldermans, 2012;).

Além de camelos (*Camelus bactrianus*), llamas (*Lama glama e Lama guanico*), vicugnas (*Vicugna vicugna e Vicugna pacos*) e dromedários (*Camelus dromedarius*), peixes cartilaginosos, como o tubarão-enfermeiro (*Ginglymostoma cirratum*) ou o tubarão wobbegong (*Orectolobus ornatus*), produzem o receptor de antígeno NAR (*new or nurse shark antigen receptor*) composto exclusivamente por duas cadeias pesadas covalentemente ligadas entre si (Greenberg *et al*., 1995; Flajnik *et al*., 2011).

Análises filogenéticas revelam que os genes que codificam os anticorpos de cadeia pesada de camelídeos surgiram há 25 milhões de anos, quando os tilópodes se separaram de outros mamíferos. Em relação aos peixes cartilaginosos, estudos apontam que NAR está presente em todos os elasmobrânquios, indicando o surgimento do receptor há mais de 220 milhões de anos (Nguyen *et al*., 2002; Conrath *et al*., 2003; Flajnik *et al*., 2011). Ainda não foi esclarecido como organismos tão diferentes, tanto morfologicamente como geneticamente, possuem nos seus sistemas imunológicos componentes tão similares. A hipótese mais aceita é a de que camelídeos e peixes cartilaginosos tenham sofrido um estresse similar proporcionando a seleção, propagação e fixação dessas moléculas, como forma de proteção a esses animais (Flajnik *et al*., 2011). Apesar da identificação de anticorpos de domínio único em peixes cartilaginosos, a maior parte das proposições relacionadas ao desenvolvimento de protótipos biotecnológicos dessa natureza está relacionada a fragmentos de imunoglobulinas de camelídeos (Harmsen & Haard 2007, Greenberg *et al*., 1995).

Nanocorpos de camelídeos

Com cerca de um décimo do tamanho dos anticorpos convencionais, VHHs reconhecem epítopos fracamente antigênicos para anticorpos convencionais, apresentam um perfil de rápida biodistribuição e eliminação, eficiente penetração tecidual, estabilidade a variações de pH e temperatura, além de alta solubilidade (Nguyen *et al*., 1999). A elevada solubilidade do VHH permite a construção de estruturas multiméricas (bivalentes, trivalentes, ou decavalentes) que aumentam a capacidade de neutralização do antígeno alvo em comparação a nanocorpos monovalentes (Conrath *et al*., 2001b; Zhang *et al*., 2004; Coppierters *et al*., 2006; Stone *et al*., 2007b; Hmila *et al*., 2010; Hultberg *et al*., 2011; Vanlandschoot *et al*.,2011).

A estrutura geral dos VHHs é similar aos domínios VH dos anticorpos convencionais. Além das quatro regiões estruturais (FRs) que formam o núcleo do domínio das imunoglobulinas, esses domínios possuem três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) envolvidas diretamente com a ligação ao antígeno. Nos VHHs, a substituição de quatro aminoácidos na região FR2 (Val37Phe, Gly44Glu, Leu45Arg, Trp47Gly) torna o domínio mais hidrofílico e promove uma reestruturação no seu arranjo tridimensional, desfavorecendo a interação com VL (Kabat *et al*., 1991; Vu *et al*., 1997; De Genst *et al*., 2006; Maass *et al*., 2007; Muyldermans *et al*., 2009). Para compensar a perda da cadeia leve, dados cristalográficos revelam que parte do loop da CDR3 dos VHHs se projeta ao lado VL (Decanniere *et al*., 1999; Dumoulin *et al*., 2002; Conrath *et al*., 2005). Ademais, as CDR1 e CDR3 são mais extensas contribuindo para uma melhor interação com o antígeno (Vu *et al*., 1997, Nguyen *et al*., 2000) e, normalmente, a estrutura é estabilizada por uma ponte dissulfeto adicional entre CDR1 ou FR2 e CDR3 (Muyldermans *et al*., 1994).

Nanocorpos e perspectivas de aplicações
Na terapêutica

Com propriedades físico-químicas e farmacológicas exclusivas, os nanocorpos vêm se tornando elementos interessantes a diversas aplicações terapêuticas (Eyer & Hruska, 2012; Dolk *et al*., 2005 *apud* Harmsen & Haard, 2007, Deffar *et al*., 2009). Em formatos mono e bivalentes, VHHs anti-TNF humanos são expressivamente mais potentes do que os anticorpos monoclonais humanizados infliximab e adalimumab em modelo murino de artrite reumatóide (Coppierters *et al*., 2006). Fusionados à elastina, estes fragmentos anti-TNF foram capazes de inibir a morte por septicemia de camundongos imunizados com TNF humano (Conrad *et al*., 2011).

Outros estudos indicam que a expressão de fragmentos VHH em meio intracelular (*intrabodies*) contra proteínas pró-apoptóticas, como Bax ou Caspase-3, confere resistência a apoptose induzida por estresse oxidativo. Diante disso, autores propõem a utilização de VHHs anti-Bax ou anti-Caspase-3 na prevenção da morte celular por estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas (Gueorguieva *et al*., 2006; McGonial *et al*., 2009).

Como agentes neutralizantes virais, diversos trabalhos vêm demonstrando a excelente atividade dos nanocorpos. A partir de llamas imunizadas com a proteína de envelope gp120 do vírus HIV-1, clones VHH, usados como *intrabodies*, foram capazes de reconhecer as proteínas de envelope, bem como neutralizar os vírons dos subtipos B e C (Forsman *et al*., 2008). Ainda na mesma perspectiva, o VHH anti-Rev, uma proteína essencial a expressão dos RNAm virais, suprimiu a expressão da Rev e inibiu a replicação do HIV-1 nas células (Vercruysse *et al*., 2010). Foram isolados também VHHs anti-proteínas de fusão ou proteínas triméricas do envelope do vírus sincicial respiratório (RSV). Além de neutralizar a estirpe do subgrupo A em sua forma

monomérica, a atividade dos VHHs anti-RSV foi ampliada em 4000 vezes após ensaios com formatos bivalentes. No mesmo estudo, VHHs capazes de reconhecer a glicoproteína do vírus rábico apresentaram atividade neutralizante contra 7 cepas laboratoriais e 3 de rua. A fusão de dois clones potencializou em 400 vezes a neutralização viral (Hultberg *et al*., 2011). O VHH se mostrou ainda promissor na prevenção e tratamento de doenças diarréicas virais, quando diferentes estirpes de rotavírus foram inibidas de forma eficaz tanto em ensaios *in vivo* como *in vitro* (Garaicoechea *et al*. 2008).

Alguns estudos vêm apresentando resultados promissores para a neutralização de toxinas animais por meio de nanocorpos de camelídeos. Nanocorpos selecionados contra a fração protéica AahI do escorpião *Androctonus australis Hector* foram capazes de neutralizar a atividade da toxina em 100% dos camundongos swiss inoculados via subcutânea e intracerebroventricular com a toxina e os nanocorpos previamente incubados (Hmila *et al*., 2008). Além disso, VHHs isolados contra α-cobratoxina (α-Cbtx), uma neurotoxina encontrada no veneno de *N. kaouthia*, foram capazes de reconhecer a toxina em ensaios imunoenzimáticos e de ressonância plasmônica de superfície (Stewart *et al*., 2007). Em adição, a partir de uma biblioteca imune de *Lama glama*, foram selecionados VHHs capazes de reconhecer especificamente toxinas de *Bothrophs jararacussu* (Prado *et al*., 2012; Prado, 2013). A soroterapia convencional, apesar de eficaz contra danos sistêmicos causados pelo envenenamento botrópico, não neutraliza efetivamente os danos locais ocasionado por este envenenamento ofídico, podendo evoluir para necrose e perda de função tecidualdos membros afetados.

No diagnóstico

A alta afinidade, sensibilidade e especificidade, aliados a boa solubilidade, estabilidade, capacidade de penetração tecidual, eficiente marcação radiotiva, o pequeno tamanho e a rápida depuração tornam os nanocorpos excelentes candidatos para utilização *in vivo* na imagiologia, auxiliando no monitoramento de tumores, de lesões metastáticas e de fibrilas amilóides (Schoonooghe *et al*., 2012; Huang *et al*., 2010; Eyer & Hruska, 2012). Ao contrário dos anticorpos monoclonais marcados radioativamente, VHHs apresentam o antígeno alvo e são rapidamente eliminados da corrente sanguínea, reduzindo a exposição do paciente a radiação (De Groeve *et al*., 2010; Eyer & Hruska, 2012).

A utilização de VHH na radioimunodetecção *in vivo* de tumores em murinos, mostrou a boa distribuição tecidual, além da alta especificidade e seletividade dos nanocorpos ao EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico, com alta expressão em carcinomas). Através da tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, *Single photon emission computed tomography*) foi possível discriminar tumores com alta e moderada super-expressão de EGFR (Huang *et al*., 2008). Para o câncer de próstata, onde o diagnóstico precoce é baseado na detecção do antígeno específico da próstata (PSA) circulante no sangue, a utilização de VHHs parece ser promissora. Nanocorpos anti-PSA foram capazes de inibir ou induzir a atividade proteolítica do antígeno, indicando que podem ser usados para detectar ou induzir mudanças conformacionais em diferentes isoformas de PSA, uma ferramenta que pode ser explorada para avaliar a flexibilidade conformacional do antígeno e discriminar diferentes estágios do câncer (Saerens *et al*., 2004).

Combinando a afinidade em escala nanomolar, a rápida eliminação e a necessidade de um diagnóstico não invasivo para doenças cardiovasculares, nanocorpos contra a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM1), um marcador de lesões ateroscleróticas, foram capazes de detectar a expressão de VCAM1 indicando o potencial do VHH para preparações radiofarmacêuticas na imagiologia da aterosclerose (Broisat *et al*., 2012).

Outra alternativa de utilização dos nanocorpos é baseada na fusão de VHHs às proteínas fluorescentes (GFP, *green fluorescence protein*). Denominados *chromobodies*, estas estruturas possibilitam a detecção de antígenos intracelulares em células de mamíferos (Schmidthals *et al*., 2010). São capazes de detectar antígenos nos complexos de cromatina e replicação, bem como no citoesqueleto, permitindo a visualização de alterações dinâmicas durante o ciclo celular, em tempo real, demonstrando sua aplicabilidade em diferentes compartimentos celulares (Rothbauer *et al*., 2006). Ademais, os nanocorpos foram utilizados em imunoensaios para análise de contaminantes em amostras de alimentos (Kim *et al*., 2012) . Outros estudos utilizando nanocorpos das mais variadas formas de aplicações diagnósticas foram realizados (Gainkam *et al*., 2008; Vaneycken *et al*., 2010).

CONCLUSÃO

Devido as suas características, anticorpos são hoje ferramentas essenciais à detecção ou tratamento de inúmeras patologias. Apesar da tecnologia do hibridoma ter revolucionado o campo da engenharia de anticorpos em meados da década de setenta, proporcionando a utilização de imunoglobulinas com elevada especificidade, homogeneidade e disponibilidade ilimitada, anticorpos murinos podem desencadear reações adversas, quando administrado em organismo humano, além de apresentar deficiências relacionadas a penetração tecidual e ao elevado custo de produção.

Visando contornar esses problemas, diferentes formas de imunoglobulinas vêm sendo engenheiradas. Além da humanização de anticorpos murinos, fragmentos funcionais de anticorpos convencionais, que garantam o reconhecimento antigênico com as mesmas propriedades do mAb, são obtidos. Com tamanho reduzido, esses fragmentos de anticorpos, entre outras propriedades, apresentam bom rendimento em culturas de microorganismos, baixa imunogenicidade e baixa tendência a agregação.

Após a identificação de anticorpos de cadeia pesada em camelídeos e em peixes cartilaginosos, e o isolamento

de seus domínios variáveis únicos e funcionais, crescentes proposições relacionadas ao diagnóstico e a terapêutica envolvendo fragmentos de anticorpos de cadeia pesada vêm surgindo ano a ano. Especificamente, nanocorpos ou VHHs são capazes de se ligar de forma eficaz a regiões não acessíveis aos anticorpos convencionais, apresentando melhor afinidade, solubilidade, resistência a atividade proteolítica e estabilidade a oscilações de temperatura e pH. O formato monomérico, com aproximadamente 15 kDa, apresenta menor risco de imunogenicidade ou de agregação. Somado a isto, a possibilidade de multimerização com estruturas VHHs semelhantes ou distintas, aumenta não só a capacidade de reconhecimento antigênico, como também sua atividade neutralizante. Ademais, a facilidade de se obter VHHs fusionados à drogas, à marcadores radioativos ou à proteínas recombinantes, amplia enormemente seu potencial de aplicação.

Como ferramentas versáteis em biotecnologia, fragmentos de anticorpos de camelídeos, tipo VHH, geram boas e novas perspectivas a engenharia de anticorpos no que diz respeito aos diversos desafios relacionados ao diagnóstico ou a terapêutica das doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, neoplasias, patologias inflamatórias crônicas, infecções de origem viral ou no envenenamento por toxinas animais.

ABSTRACT

Antibody engineering in the search for functional fragments for diagnostic inputs and therapeutic applications

Antibodies, agents employed for the development of biomedical research, diagnostic and therapeutic, have high ability to interact with different ligands. Structurally are heterotetramers constituted by two light and two heavy chains, with molecular weight of approximately 150 kDa. Aiming to improve the pharmacokinetic properties and minimize possible adverse reactions triggered by immunoglobulins of non-human origin, the molecular engineering of antibodies has been obtaining fragments of antibodies, such as Fab, F(ab')2, Fv and scFv. In addition to the conventional antibodies, camelids produce functional immunoglobulins devoid of light chain, in which the variable domain, named VHH or nanocorpo, is able to recognize the antigen. With appropriate characteristics for the development of drugs with high neutralizing capacity, VHH fragments have been proposed for use in passive immunotherapy or *drug-delivery***. To the diagnosis, these fragments can be used to construct biosensors, in the imagiology field, acting in the detection of cancer cells, tumor monitoring or cell changes.**

Keywords: Antibody fragment. Nanobody. VHH. Diagnosis. Therapeutic.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Anticorpos e Antígenos. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005:43-64.

Adams GP, Schier R, Marshall K, Wolf EJ, McCall AM, Marks JD, Weiner LM. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. Cancer Res. 1998;58(3):485–90.

Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. Cancer Res. 2001;61(12):4750–5.

Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Clin Dev Immunol. 2012;Article ID 980250.

Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, De Baetselier P. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. Nat Med. 2006;12(5):580–4.

Broisat A, Hernot S, Toczek J, De Vos J, Riou LM, Martin S, Ahmadi M, Thielens N, Wernery U, Caveliers V, Muyldermans S, Lahoutte T, Fagret D, Ghezzi C, Devoogdt N Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. Circ Res. 2012;110:927–37.

Calich V, Vaz C. Anticorpos. In: Calich V. Imunologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2010:55-81.

Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. Br J Pharmacol. 2009;157(2):220–33.

Choo ABH, Dunn RD, Broady KW, Raison RL. Soluble expression of a functional recombinan cytolytic immunotoxin in insect cells. Protein Expr Purif. 2002;24(3):338-47.

Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov A a, Nedospasov SA, Rose-John S, Scheller J. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. Plant Biotechnol J. 2011;9(1):22–31.

Conrath K, Lauwereys M, Wyns L, Muyldermans S. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. J Biol Chem. 2001;276(10):7346–50.

Conrath KE, Vincke C, Stijlemans B, Schymkowitz J, Decanniere K, Wyns L, *et al*. Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH. J Mol Biol. 2005;350(1):112–25.

Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK. Emergence and evolution of functional heavy-

chain antibodies in *Camelidae*. Dev Comp Immunol. 2003;27(2):87–103.

Coppieters K, *et al*. Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum. 2006;54(6):1856–66.

Cortez-retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, Baetselier P De, Muyldermans S, Revets H. Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. Cancer Res. 2004;64(8):2853-7.

De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K. Antibody repertoire development in camelids. Dev Comp Immunol. 2006; 30(1-2):187–98.

De Marco A. Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. Microb Cell Fact. 2011;10(1):44.

Decanniere K, Desmyter A, Lauwereys M, Ghahroudi MA, Muyldermans S, Wyns L. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A : non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. Structure. 1999;7(4):361–70.

Deffar K, Shi H, Li L, Wang X, Zhu X. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. Afr. J. Biotechnol. 2009;8(12):2645–52.

Dolk E, Vaart M Van Der, Hulsik DL, Vriend G, Haard H De, Spinelli S, *et al*. Isolation of Llama Antibody Fragments for Prevention of Dandruff by Phage Display in Shampoo. Appl Environ Microbiol. 2005;71(1):442–50.

Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, *et al*. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. Protein Sci. 2002; 11(3):500–15.

Eyer L, Hruska K. Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies : a review. Vet Med. 2012;57(9):439–513.

Flajnik MF, Deschacht N, Muyldermans S. A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? PLoS Bio. 2011; 9(8):e1001120.

Forsman A, *et al*. Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. J Virol. 2008;82(24):12069–81.

Gainkam LO, Huang L, Caveliers V, Keyaerts M, Hernot S, Vaneycken I, Vanhove C, Revets H, De Baetselier P, Lahoutte T. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two 99mTc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. J Nucl Med. 2008;49:788-95.

Galeffi P,*et al*. Functional expression of a single-chain antibody to ErbB-2 in plants and cell-free systems. J Transl Med.2006;29;4:39.

Garaicoechea L, Olichon A, Marcoppido G, Wigdorovitz A, Mozgovoj M, Saif L, *et al*. Protein Possess Broad Neutralizing Activity *In vitro* and Confer Protection Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity *In vitro* and Confer Protection against Diarrhea in Mice. J Virol. 2008;82(19):9753-64.

Goel A, Colcher D, Baranowska-Kortylewicz J, Augustine S, Booth BJ, Pavlinkova G, Batra SK. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: improved biodistribution and potential for therapeutic application. Cancer Res. 2001;60(24):6964–71.

Greenberg AS, Avila D, Hughes M, McKinney EC, Flajnik M. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. Nature. 1995;374(6518):168–173.

Griffiths AD, Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display. Curr Opin Biotechnol.1998;9(1):102–8.

Groeve K De, Deschacht N, Koninck C De, Caveliers V, Lahoutte T, Devoogdt N, *et al*. Nanobodies as Tools for *In vivo* Imaging of Specific Immune Cell Types. J Nucl Med. 2010;51(5):782–9.

Gueorguieva D, Li S, Walsh N, Mukerji A, Tanha J, Pandey S. Identification of single-domain, Bax-specific *intrabodies* that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. FASEB J. 2006;20(14):2636–8.

Hamers-Casterman c, atarhouch t, Muyldermans s, robinson g, Hammers c, bajyana Songa e, *et al*. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature. 1993;363:446-8.

Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;77(1):13–22.

Hmila I, Abdallah RBA, Saerens D, Benlasfar Z, Conrath K, Ayeb ME, Muyldermans S, Bouhaouala-Zahar B, VHH, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing eYcacy for scorpion toxin AahI. Mol Immunol. 2008; 45:3847–56.

Hmila I, Saerens D, Ben Abderrazek R, Vincke C, Abidi N, Benlasfar Z, Govaert J, El Ayeb M, Bouhaouala-Zahar B, Muyldermans, S. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming. FASEB J . 2010;24(9):3479–89.

Ho M, Nagata S, Pastan I. Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(25):9637-42.

Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 2005;23(9):1126–36.

Huang L, Muyldermans S, Saerens D. Nanobodies®: proficient tools in diagnostics. Expert Rev Mol Diagn. 2010;10(6):777–85.

Huang L, Gainkam LO, Caveliers V, Vanhove C, Keyaerts M, De Baetselier P, Bossuyt A, Revets H, Lahoutte T. SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for *in vivo* monitoring of EGFR expression. Mol Imaging Biol. 2008; 10(3):167-75.

Hultberg A, *et al*. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. PloS One. 2011; 6(4):e17665.

Huston JS, *et al*. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA.1998;85(16):5879–83.

Janeway CA, Travers P, Mark W, Shlomchik M. O Reconhecimento do Antígeno. In: Janeway CA, Travers P, Mark W, Shlomchik M. Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. Porto Alegre: Artmed; 2010:111-22.

Jones DS, Marasco WA. Antibodies for targeted gene therapy: extracellular gene targeting and intracelular expression. Adv Drug Deliv Rev. 1998;31(1-2):153–70.

Kabat E, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C, 1991. Sequence of proteins of immunological interest. US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication . 91:3242.

Kaushik W, Moots RJ. CDP-870 (certolizumab) in rheumatoid arthritis. Expert Opin Biol Ther. 2005;5(4):601–6.

Kim H-J, McCoy MR, Majkova Z, Dechant JE, Gee SJ, Tabares-da Rosa S, *et al*. Isolation of alpaca anti-hapten heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay. Anal Chem. 2012;84(2):1165–71.

Kim MK, Jeong HJ, Kao CHK, MAIS AUTORES *et al*. Improved renal clearance and tumor targeting of 99mTc-labeled anti-Tac monoclonal antibody Fab by chemical modifications. Nucl Med Biol. 2002;29(2):139–46.

Kipriyanov SM, Little M. Generation of recombinant antibodies. Mol Biotechnol. 1999; 12(2):173–201.

Köhler G, Milsten C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975;256:495-7.

Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB. Alpaca (Lama pacos) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). J Immunol Methods. 2007;324(1-2):13–25.

McGonigal K, Tanha J, Palazov E, Li S, Gueorguieva-Owens D, Pandey S. Isolation and functional characterization of single domain antibody modulators of Caspase-3 and apoptosis. Appl Biochem Biotechnol. 2009;57(2):226-36.

Mcmanus S, Riechmann L. Use of 2D NMR , Protein Engineering , and Molecular Modeling To Study the Hapten-Binding Site of an Antibody Fv Fragment against 2-Phenyloxazolone. Biochemistry. 1991;30(24):5851-7.

Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa J, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. Protein Eng. 1994;7:1129-35.

Muyldermans S, *et al*. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. Vet Immunol Immunopathol. 2009;128(1-3):178-83.

Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy- chain antibodies. J Mol Recognit. 1999; 12(2):131–40.

Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol. 2001; 74(4):277–302.

Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. MAbs. 2010;2(1):77–83.

Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Camel heavy-chain antibodies : diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen- binding repertoire. EMBO J. 2000;19(5):921–30.

Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Camel heavy-chain antibodies : diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen- binding repertoire. EMBO J. 2000;19(5):921–30.

Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IgG2A heavy chain antibodies. Mol.Immunol. 1999;36(8):515–24.

Nguyen VK, Su C, Muyldermans S, van der Loo W. Heavy-chain antibodies in *Camelidae*; a case of evolutionary innovation. Immunogenetics. 2002;54(1):39–47.

Oriuchi N, Higuchi T, Hanaoka H, Iida Y, Endo K. Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. Ann Nucl Med. 2005;19(5):355–65.

Pimentel BMA. Humanização e Expressão de Fragmentos de Anticorpos Anti-PLA2 de Bothrops atrox. 2007. 117 f. [Dissertação: Mestrado em Biologia Molecular]- Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Prado NDR, Pereira SS, Silva SCG, Morais MSS, Braum D, Silva LHP, Soares AM, Stabeli RG, Fernandes CFC. Snakebites envenomation and alternative serotherapy by camelid nanobodies. In: 44º Congresso Brasileiro

de Farmacologica e Terapêutica Experimental. Foz do Iguaçu, Paraná; 2012.

Prado NDR. Produção e caracterização parcial de fragmentos de anticorpos do tipo VHH, selecionados por phage display a partir de *Lama glama*, ativos contra toxinas bthtx-I e bthtx-II purificadas do veneno de Bothrops jararacussu.[Dissertação]. Porto Velho: Universidade Federal de Rondônia, UNIR; 2013.

Renard C, Grene-Lerouge N, Beau N, Baud F, Scherrmann JM. Pharmacokinetics of digoxin-specific fab: effects of decreased renal function and age. Br J Clin Pharmacol. 1997;44(2):135–8.

Riechmann L, Muyldermans S. Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. J Immunol Methods. 1999;231(1-2):25–38.

Roskos LK, Davis CG, Schwab GM. The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies. Drug Develop Res. 2004;61(3):108–20.

Rothbauer U, *et al*. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. Nat. Methods. 2006;3:887–89.

Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(5):600–8.

Saerens D, Kinne J, Bosmans E, Wernery U, Muyldermans S, Conrath K. Single Domain Antibodies Derived from Dromedary Lymph Node and Peripheral Blood Lymphocytes Sensing Conformational Variants of Prostate-specific Antigen J Biol Chem. 2004;279(50):51965-72.

Saerens D, Kinne J, Bosmans E, Wernery U, Muyldermans S, Conrath K. Single Domain Antibodies Derived from Dromedary Lymph Node and Peripheral Blood Lymphocytes Sensing Conformational Variants of Prostate-specific Antigen. J Biol Chem. 2004;279(50):51965-72.

Schaumann W, Kaufmann B, Neubert P, Smolarz A. Kinetics of the Fab fragments of digoxin antibodies and of bound digoxin in patients with severe digoxin intoxication. Eur J Clin Pharmacol. 1986;30(5):527–33.

Schmidthals K, Helma J, Zolghadr K, Rothbauer U, Leonhardt H. Novel antibody derivatives for proteome and high-content analysis. Anal Bioanal Chem. 2010; 397:3203–8.

Schoonooghe S, Laoui D, Van Ginderachter J a, Devoogdt N, Lahoutte T, De Baetselier P, *et al*. Novel applications of nanobodies for *in vivo* bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer. Immunobiology. 2012;217(12):1266–72.

Skerra A, Plückthun A. Assembly of functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science. 1998;240(4855):1038-41.

Stábeli RG, Magalhães LMP, Selistre-de-Araujo HS, Oliveira EB. Antibodies to a fragment of the Bothrops moojenil-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. Toxicon. 2005;46(3):308–17.

Stewart CS, MacKenzie CR, Hall JC. Isolation, characterization and pentamerization of alpha-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naïve phage display library: preliminary findings for antivenom development. Toxicon. 2007;49(5):699–709.

Stipsanelli E, Valsamaki P. 2005. Monoclonal antibodies: old and new trends in breast cancer imaging and therapeutic approach. Hell J Nucl Med. 2005;8(2):103–8.

Stone E, Hirama T, Tanha J, Tong-Sevinc H, Li S, MacKenzie CR, Zhang J.. The assembly of single domain antibodies into bispecific decavalent molecules. J Immunol Methods. 2007b;318(1-2):88–94.

Teva A, *et al*. Imunologia. In: Teva A, Fernandez JCC, Silva VL. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratório de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV;IOC. p. 19-125.

Vaneycken I, Govaert J, Vincke C, Caveliers V, Lahoutte T, De Baetselier P, Raes G, Bossuyt A, Muyldermans S, Devoogdt N. *In vitro* analysis and *in vivo* tumor targeting of a humanized, grafted nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT. J Nucl Med. 2010;51:1099–1106.

Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, Ibañez LI, Schepens B, Depla E, Saelens X. 2010. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. Antiviral Res. 2011;92(3):389-407.

Vercruysse T, Pardon E, Vanstreels E, Steyaert J, Daelemans D. si. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal alpha-helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. J Biol Chem. 2010;285(28):21768–80.

Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem. 2009;284(5):3273–84.

Vincke C, Muyldermans S. Single Domain Antibodies. Saerens D, Muyldermans S, editors. Totowa, NJ: Humana Press. 2012;911(1):15–26.

Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. Mol Immunol. 1997;34(16-17):1121-31.

Wesolowski J, *et al*. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol. 2009;198(3):157–74.

Zhang J, Mackenzie R, Durocher Y. Production of Chimeric Heavy-Chain Antibodies. In: Dimitrov A S, editor. Therapeutic Antibodies: methods and protocols. Humana Press; Series: Methods Mol Biol. 2009;525(1):323–36.

Zhang J, Tanha J, Hirama T, Khieu NH, To R, Tong-Sevinc, H, Stone E, Brisson JR, MacKenzie CR. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. J Mol Biol. 335:49–56.

Recebido em 23 de julho de 2013

Aceito em 7 de novembro de 2013