MATEUS DALCIN LUCHESE

DESENVOLVIMENTO DE ANTI-hTNFα TERAPÊUTICO

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

São Paulo
2015

MATEUS DALCIN LUCHESE

DESENVOLVIMENTO DE ANTI-hTNF*α* TERAPÊUTICO

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Ana Maria Moro

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Luchese, Mateus Dalcin.
Desenvolvimento de anti-hTNFα terapêutico / Mateus Dalcin Luchese. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Moro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produros para a saúde, diagnóstico e novas terapias.

Versão do título para o inglês: Development of therapeutic anti-hTNFα.

1. TNF-α 2. Anticorpo terapêutico 3. Autoimunidade 4. Células CHO 5. Geração de linhagem celular 6. Biossimilar/biosuperior I. Moro, Profa. Dra. Ana Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0185/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Mateus Dalcin Luchese.

Título da Tese: Desenvolvimento de anti-hTNFα terapêutico.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Maria Moro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Desenvolvimento de anticorpo monoclonal biossimilar anti-rh TNF-α", **protocolo nº 965/12**, sob a responsabilidade de Ana Maria Moro e Mateus Dalcin Luchese – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/10/2012.

Vigência do Projeto: 01/2013 - 07/2016	**N° de animais/espécie**
Laboratório de Biofármacos em Células Animais	180 camundongos C57Bl/6 4-5 semanas (M)

São Paulo, 11 de outubro de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

AGRADECIMENTOS

A Drª. Ana Maria Moro pela oportunidade de trabalho, confiança empregada e conhecimento dividido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Butantan do Instituto Butantan da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto.

À Drª. Mariana Lopes dos Santos pela orientação durante toda a etapa de geração da linhagem monoclonal, dentre auxílios diversos, além da revisão da tese. À MSc. Angélica Garbuio e Roselaine Campos Targino pelo treinamento e auxílio substancial nos experimentos envolvendo cultivo celular. Às Drªs. Lilian Rumi Tsuruta e Elisa Emiko Oshiro pela ajuda nas etapas de clonagem do anticorpo. Ao Dr. Wagner Quintilio pela importante colaboração nos experimentos utilizando ressonância plasmônica de superfície. À Drª. Maria Teresa Alves Rodrigues pelas orientações recebidas ao longo da execução do projeto.

À ajuda de Carla Ploeger Mansueli nos ensaios imunoenzimáticos realizados durante a geração de linhagem e de José Marcelino de Oliveira nos experimentos de purificação do anticorpo do sobrenadante de cultivo.

Aos integrantes/colaboradores do Laboratório Especial de Biofármacos em Células Animais do Instituto Butantan André Luís Inocencio, Dr. Eduardo Aliprandini, Drª. Fernanda Perez Yeda, Rozelita Pereira dos Reis, Priscila Mitsue Kussaba Kayano, Sônia de Fátima G. de Oliveira, Fátima Aparecida Mendonça de Oliveira, Suzi Alcântara do Nascimento, Silmara Aparecida Batista, Cosminiana Silva Ferreira, Maria José Alves da Silva e Caio César Irineu, pelo suporte em assuntos diversos.

Aos colegas Érika Akemi Kavati e Luis Guilherme Virgílio Fernandes pela ajuda e incentivo.

Ao Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, sob direção do Dr. Paulo Lee Ho, onde foi realizado o sequenciamento automático de nucleotídeos do anticorpo.

Ao Dr. Júlio Cesar Bertacini de Moraes e Dra. Karina Rossi Bonfiglioli do Centro de Medicamentos de Alta Complexidade (CEDMAC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina da USP e Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo pela doação do anticorpo adalimumabe (Humira®) utilizado como controle dos experimentos.

À secretaria acadêmica e Comissão de Pós-Graduação do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo (CPG/Biotec-USP), sob coordenação da Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, e aos estimados professores e colegas de cada disciplina realizada. Ao diretor do Instituto Butantan Dr. Jorge Kalil e ao diretor da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, Dr. Paulo Lee Ho.

Obrigado.

RESUMO

LUCHESE, M. D. **Desenvolvimento de anti-hTNFα terapêutico**. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O fator de necrose tumoral alfa (TNFα) é uma importante citocina pró-inflamatória que participa da homeostase da resposta imune. Quando produzido em concentrações exacerbadas, o TNFα é nocivo ao organismo, estando associado à patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas como artrite reumatoide e doença de Crohn, entre outras. Os antagonistas de TNFα são capazes de neutralizar seletivamente a função biológica da citocina acarretando na remissão sintomática clínica. No Brasil, a importação do medicamento de alto custo pelo Ministério da Saúde atribui gastos exorbitantes ao Sistema Único de Saúde, e sua disponibilização acaba restrita a pacientes com diagnóstico de doença em estágio avançado ou aos contemplados por decretos de ações judiciais. O objetivo do projeto foi desenvolver um anticorpo terapêutico anti-hTNFα com potencial para produção nacional através da geração de linhagem monoclonal eucariótica e comprovar sua funcionalidade. Os genes de cadeia leve e pesada de anti-hTNFα foram clonados em vetor plasmidial para lipofecção em hospedeiro CHO e a população estável mista de transfectantes foi selecionada diferencialmente com os agentes puromicina e metotrexato, em duas fases de concentração crescente. As análises do sobrenadante de cultivo mostraram expressão extracelular do anticorpo com reconhecimento de hTNFα em estrutura tridimensional. A população celular de maior produtividade específica foi escolhida e cultivada em meio semissólido para geração da linhagem monoclonal. O cultivo foi analisado pelo equipamento robótico ClonePix FL, onde do total de 4345 colônias observadas, 460 foram identificadas com aspecto de monoclonalidade e transferidas para placas de 96 poços contendo meio de cultivo líquido. Os clones foram ampliados em placas de 24, de 6, garrafas T25 ou frascos SF125 na medida em que apresentavam confluência >70% e/ ou eram escolhidos ao longo do processo com base em critérios de produtividade específica e adaptação a condições de cultivo. Por fim, 33 clones estáveis em agitação orbital foram classificados para um cultivo de 14 dias em batelada alimentada para determinar a produtividade acumulada. O anti-hTNFα produzido pelos diferentes clones foi purificado por cromatografia de afinidade em proteína A e avaliado frente à cinética de ligação ao TNFα por ressonância plasmônica de superfície, mostrando equivalência entre todos os anticorpos, incluindo controle comercial. Não houve também diferença estatística entre o reconhecimento diferencial dos anticorpos por receptores do tipo Fcγ. O ensaio de atividade funcional realizado com o anti-TNFα produzido pelos 11 melhores clones mostrou que o imunobiológico desenvolvido foi capaz de neutralizar a citotoxicidade induzida por TNFα em fibroblasto murino L929 sensibilizado com actinomicina-D, sem causar toxicidade celular. Três anticorpos, entretanto, apresentaram resultados insatisfatórios e foram descontinuados. Os demais foram submetidos à confirmação da atividade antagonista a TNFα em um segundo experimento, comprovando inibição da expressão de moléculas de adesão em células HUVEC. A estabilidade de expressão contínua permitiu identificar os três melhores clones, estáveis por, pelo menos, 60 gerações. Os resultados finais de comparabilidade entre o anti-TNFα desenvolvido e o comercial não permitiram justificá-lo como um anticorpo biossuperior (*biobetter*), entretanto, representam um passo importante de "não inferioridade", parte do processo necessário ao desenvolvimento de um biossimilar.

Palavras-chave: TNFα. Anticorpo terapêutico. Autoimunidade. Células CHO. Geração de linhagem celular. Biossimilar/biossuperior.

ABSTRACT

LUCHESE, M. D. **Development of therapeutic anti-hTNFα**. 2015. 126 p. Doctoral Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Tumor necrosis factor alpha (TNFα) is a potent proinflammatory cytokine that mediates the homeostasis of immune responses. The exacerbated production of TNFα is detrimental to the organism, being associated with the pathogenesis of autoimmune and chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease. The therapeutic TNFα antagonists are able to selectively neutralize the biological function of the cytokine resulting in remission of the clinical symptoms. In Brazil, the importation of the biopharmaceutical by the Ministry of Health assigns extremely high expenditures to the United Health System, restricting prescriptions to patients diagnosed with late-stage disease or those covered by legal decrees. The aim of the project was to develop a therapeutic anti-hTNFα with potential for national production through the generation of eukaryotic cell lineages and demonstrate the antibody functionality. The light and heavy chain genes of anti-hTNFα were cloned into a plasmid vector for lipofection in CHO host and the stable mixed population of transfectants was differentially selected with puromycin and methotrexate agents, in two phases of increasing concentration. The analyses of the culture supernatant showed extracellular expression of the antibody with hTNFα three-dimensional structure recognition. Thus, the higher specific productivity cell population was selected and cultured in a semisolid media for the generation of monoclonal lineage. The culture was analyzed by ClonePix FL, where from a total of 4345 colonies, 460 were identified as monoclonal and transferred to 96-well microplates containing liquid media. The clones were expanded in 24 and 6-wells microplates, T25 and SF125 flasks, as confluence showed >70% and/or were chosen along the process based on specific productivity and adaptation to culture conditions criteria. At the end, 33 top-ranked clones were submitted to 14-day fed-batch culture in an orbital shaking platform to determine the cumulative productivity. The anti-hTNFα produced by different clones were purified by protein A affinity chromatography and evaluated regarding the binding kinetics to TNFα by surface plasmon resonance, showing equivalent affinities for all antibodies, including the commercial control. No statistical difference was observed between differential recognition of antibodies by Fcγ receptors. The functional activity assay performed with the antibodies produced by top 11 clones showed that the immunobiological was able to neutralize TNFa induced cytotoxicity in L929 murine fibroblast sensitized with D-actinomycin, and not causing cell toxicity. Three clones, however, showed unsatisfactory results and were discontinued. The remaining clones were submitted for confirmation of the TNFα antagonist activity in a second experiment, demonstrating inhibition of the expression of cell adhesion molecules in HUVECs. The stability of continuous expression experiment allowed identifying the three top clones, stable for at least 60 generations. The analyses performed with both the developed and commercial anti-TNFα does not confer a biobetter attribute, however, represents an important step of "non-inferiority", part of the process required for a biosimilar development.

Keywords: TNFα. Therapeutic antibody. Autoimmunity. CHO cells. Cell line generation. Biosimilar/biobetter.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 Estrutura da construção gênica empregada para clonagem de *HC* e *LC* de anticorpo anti-TNFα adabut 36

Figura 3.2 Fluxograma esquemático mostrando o protocolo empregado para seleção de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes 42

Figura 3.3 Coleta de colônia realizada pelo equipamento robótico ClonePix FL 46

Figura 4.1 Visualização de DNA em gel de agarose em experimento para confirmação da clonagem de inserto *HC* em pCHO 1.0 55

Figura 4.2 Visualização de DNA em gel de agarose após clonagem de insertos *LC* e *HC* em pCHO1.0 58

Figura 4.3 Células CHO-S® transfectadas com vetor plasmidial contendo *GFP* em experimento realizado para controle da lipofecção 59

Figura 4.4 Análise de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em gel de agarose em experimento de otimização da linearização plasmidial com *Nru*I 61

Figura 4.5 Análise de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em gel de agarose para controle da total linearização plasmidial 62

Figura 4.6 Curvas de viabilidade celular em seleção de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes 63

Figura 4.7 Colônias monoclonais isoladas a partir de cultivo em meio semissólido 69

Figura 4.8 Aquisição de imagens por equipamento robótico ClonePix FL para identificação e coleta de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* monoclonais 70

Figura 4.9 Distribuição percentual para **a)** colônias "aceitas" e **b)** colônias "irregulares aceitas" a partir de seleção em população celular 1B e 2B 72

Figura 4.10 Produtividade de adabut e ponto de corte de clones cultivados em **a**) placas de 6 poços e **b**) garrafas T25 75

Figura 4.11 Curvas de **a**) crescimento e **b**) viabilidade celular de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* 77

Figura 4.12 Quantificação de adabut de sobrenadante de cultivo por **a**) ELISA e **b**) SPR 79

Figura 4.13 Distribuição dos clones por faixa de produtividade de anticorpo 80
Figura 4.14 Cromatograma e gel de poliacrilamida mostrando a purificação do anticorpo adabut expresso por CHO-S®/pCHO 1.0/*HL-LC.adabut* no sobrenadante de cultivo 82
Figura 4.15 Afinidade de ligação de anti-TNFα produzido por diferentes clones ao TNFα 83
Figura 4.16 Curva de crescimento de fibroblasto L929 86
Figura 4.17 Curva de citotoxicidade de TNFα em células L929 87
Figura 4.18 Prova de ausência de citotoxicidade intrínseca de anti-TNFα adabut purificado 88
Figura 4.19 Efeito de neutralização de anti-hTNFα a TNFα e concentração inibitória (IC_{50}) 89
Figura 4.20 Inibição da expressão de selectina ELAM-1 em células HUVEC 94
Figura 4.21 Estudo de estabilidade de clones: i) crescimento e ii) produtividade 97
Figura 4.22 PCD médio e percentual de variação de produtividade de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes ao longo de 60 gerações..... 100
Figura 4.23 Curva de crescimento celular de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* clones 70, 123 e 225 em cultivo de bateada alimentada 102
Figura 4.24 Afinidade de ligação de anti-TNFα produzido por diferentes clones aos receptores FcγRI e FcγRIIB/C..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento automático de *HC* e *LC* 39

Tabela 3.2 Critérios utilizados para a seleção dos melhores clones ao longo do processo de geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* 48

Tabela 4.1 Número de nucleotídeos (nt) de *HC* e *LC* sequenciados em cada respectivo oligonucleotídeo iniciador 57

Tabela 4.2 Lotes de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* produzidos para obtenção de material com elevados grau de pureza e concentração 60

Tabela 4.3 Análise de produtividade específica (PCD) de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* a partir de cultivo de 5 dias 67

Tabela 4.4 Número e classificação de colônias cultivadas em meio semissólido e transferidas para placas de 96 poços 71

Tabela 4.5 Isolamento de clones produtores de anti-TNFα adabut em cada etapa da geração de linhagem celular 73

Tabela 4.6 Clones caracterizados com melhor produtividade acumulada durante a geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* 80

Tabela 4.7 Afinidade de ligação de anti-hTNFα produzido por diferentes clones a TNFα 84

Tabela 4.8 Ensaio de inibição da citotoxicidade induzida com TNFα por anti-TNFα produzido por diferentes clones 90

Tabela 4.9 Comparação entre os anticorpos produzidos pelos clones 109 e 225 em critérios de crescimento, viabilidade celular e produtividade 91

Tabela 4.10 Comparação entre os três clones mais estáveis segundo critérios de crescimento e viabilidade celular e concentração de anticorpos anti-TNFα. 101

Tabela 4.11 Afinidade de ligação de anti-hTNFα produzido por diferentes clones a receptores FcγRI e FcγRIIB/C 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	- aminoácido(s)
ACF	- *Animal Component-Free* (livre de componente animal)
ANS	- Agência Nacional de Saúde Suplementar
anti-hTNFα	- anticorpo anti-TNFα humano
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	- artrite reumatoide
BCG	- bacillus Calmette-Guérin
BSA	- *Bovine Serum Albumin* (albumina bovina sérica)
CDAI	- *Clinical Disease Activity Index* (Índice Clínico de Atividade da Doença)
CDRs	- *Complementarity Determining Regions* (regiões determinantes de complementariedade)
cGMP	- *Current Good Manufacturing Practice* (boas práticas de fabricação)
C_H	- *Heavy Chain* (domínios de imunoglobulina em cadeia pesada)
CHO	- *Chinese Hamster Ovary cell* (célula de ovário de Hamster)
CIAP	- *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina de intestino de bezerro)
CL	- *Constant Light* (região constante da cadeia leve do anticorpo)
CRDs	- *cysteine-rich domains* (porções proteicas ricas em cisteína)
CSF	- *Colony-Stimulating Factor* (fator estimulante de colônia)
C-terminal	- região carboxi-terminal
CV	- *Column Volume* (volume da coluna cromatográfica)
DAB	- 3, 3'-diaminobenzidina
DHFR	- dihidrofolato redutase
DMCDs	- Drogas Modificadoras do Curso da Doença
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
DO	- Densidade Óptica
EDTA	- *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELAM-1	- *Endothelial cell Leukocyte Adhesion Molecule-1* (moléculas de adesão ao endotélio de leucócitos)
ELISA	- *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)
EMA	- *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicamentos)
EMFI	- *Exterior Mean Fluorescence Intensity* (intensidade de fluorescência média exterior)
ε_{molar}	- coeficiente de extinção molar
Fab'	- *antigen-binding fragment* (fragmento de ligação ao antígeno)
Fc	- *Fragment crystallizable* (fragmento cristalizável da imunoglobulina - região constante de cadeias pesada)
FcR	- *Fc Receptors* (receptores de Fc)
FcγRI	- *Fc-gamma receptor 1* (receptor Fc-*gamma* 1)
FcγRIIB/C	- *Fc-gamma receptor 2B/C* (receptor Fc-*gamma* 2B/C)
FDA	- *United States Food and Drug Administration*
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
GFP	- *Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)
Gln	- glutamina
HACA	- *Human Anti-Chimeric Antibody* (anticorpos humanos anti-quimérico)
HAMA	- *Human Anti-Human Antibody* (anticorpos humanos anti-humano)
HBS-EP	- tampão composto por base HBS-N e EDTA/Tween 20
HBS-N	- tampão composto por Hepes e NaCl
HC	- *Heavy Chain* (cadeia pesada do anticorpo)
HPLC	- *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)
HUVEC	- *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (células humanas de endotélio umbilical
IC_{50}	- concentração inibitória em 50% da população celular experimental
ICAM-1	- *intercellular adhesion molecule* (molécula de adesão intercelular)
IFN-γ	- interferon-γ
Ig	- imunoglobulina
IL	- *Interleukin* (interleucinas)

iTIM	- *immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif* (motivo inibidor do imunorreceptor baseado em tirosina)
IVCC	- *Integral Viable Cell Concentration* (integral da concentração de células viáveis)
k_a	- constante de associação
kb	- quilobase
k_d	- constante de dissociação
K_D	- afinidade de ligação
kDa	- quilodalton
k_{off}	- ver k_d
k_{on}	- ver k_a
kV	- quilovolt
LB	- *Luria Bertani* (meio de cultivo quimicamente não definido)
LC	- *Light Chain* (cadeia leve do anticorpo)
LPS	- lipopolissacarídio
M	- molar (ou M: MTX)
MCP-1	- *Monocyte Chemotactic Protein*-1 (proteína quimiotáxica de monócitos)
MHC	- *Major Histocompatibility Complex* I (complexo principal de histocompatibilidade tipo I)
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro
ms	- milissegundos
MS	- Ministério da Saúde
MTT	- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
MTX (M)	- metotrexato
NCBI	- *National Center for Biotechnology Information*
NF-κB	- *Nuclear Factor κB* (fator nuclear κB)
nt	- nucleotídeo
NHS/EDC	- N-hidroxisuccinimida/ hidrocloreto de 1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil) carbodiimida
N-terminal	- região amino-terminal
P	- puromicina

P.M.	- Peso Molecular
PAF	- *Platelet-Activating Factor* (fator de ativação plaquetário)
PAGE	- *Polycrylamide Gel Eletrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)
PBS	- tampão salina fosfato
$PBST_{20}$	- tampão salina fosfato com tween 20
PCD	- produtividade específica por célula ou ρg/célula/dia
PDT	- *Population Doubling Time* (tempo de duplicação da população)
PES	- membrana de polietersulfona
pH	- potencial hidrogeniônico
pI	- ponto isoelétrico
PMAC	- Programa de Medicamentos de Alto Custo
PVDF	- *Polyvinylidene Fluoride* (membrana de fluoreto de polivinilideno)
R&D	- *Research and Development* (pesquisa e desenvolvimento)
rhTNFα	- TNFα humano recombinante
scFv	- *single chain Fragment variable* (fragmento variável de cadeia única)
SDS	- *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SF	- *Shaker Flask* (frascos para cultivo em agitação orbital)
SFB	- Soro Fetal Bovino
SFM	- *Serum-Free Medium* (meio de cultivo livre de soro)
SPR	- *Surface Plasmon Resonance* (ressonância plasmônica de superfície)
SUS	- Sistema Único de Saúde
TA	- Temperatura Ambiente
TAE	- tampão Tris-HCl-Acetato
THD	- TNF *homology domain* (domínio homólogo de TNF)
TMB	- tetrametilbenzidina
TNFRs	- TNF *receptors* (receptores de TNF)
TNFα	- *Tumoral Necrosis Factor* α (Fator de Necrose Tumoral *alpha*)
Tris-HCl	- hidroximetil aminometano (pH ajustado com ácido clorídrico)
U	- unidade
V	- volt (voltagem à eletroforese)
v.c.	- *viable cells* (células viáveis)

VCAM-1	- *vascular cell adhesion molecule* (molécula de adesão de célula vascular)
VH	- *Variable region Heavy chain* (região variável de cadeia pesada)
VL	- *Variable region Light chain* (região variável de cadeia leve)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 Caracterização funcional do TNFα no organismo 20
1.2 Antagonistas de TNFα como biofármacos terapêutico 22
1.3 Engenharia de anticorpos recombinantes na biotecnologia industrial 28
1.4 Justificativa para a escolha do tema 31
2 OBJETIVOS 34
2.1 Objetivo geral 34
2.2 Objetivos específicos 34
3 MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1 Clonagem de anticorpo anti-hTNFα 35
3.1.1 Construção gênica do anticorpo anti-hTNFα adabut *35*
3.1.2 Clonagem de genes* HC *e* LC *de adabut em vetor pCHO 1.0 ..... *36*
***3.1.3 Confirmação de clones recombinantes para pCHO1.0/*HC-LC.adabut** *38*
3.2 Transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em CHO-S® para geração de população estável mista 39
3.3 Seleção de transfectantes estáveis CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* para a expressão de anti-hTNFα adabut recombinante 41
3.4 Avaliação preliminar da expressão do anticorpo anti-TNFα 43
3.5 Análise da produtividade específica (Qp, *cell-specific productivity*) 44
3.6 Geração de linhagem celular CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* 45
3.7 Purificação de adabut do sobrenadante de cultivo 49
3.8 Cinética de ligação de anti-TNFα adabut ao rhTNFα 50
3.9 Atividade funcional do anticorpo adabut 50
3.9.1 Neutralização de citotoxicidade induzida por TNFα em células L929 ..... *50*
3.9.2 Inibição da expressão de ELAM-1 em células HUVEC *52*
3.10 Estabilidade de clones produtores de anti-TNFα 53
3.11 Avaliação de clones produtores de anti-TNFα de segunda geração 53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 55
4.1 Clonagem de cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hTNFα 55

*4.1.1 Sequenciamento automático de clones pCHO 1.0/***HC-LC.adabut** *recombinantes*..... *56*
4.2 Transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em hospedeiro CHO-S® para expressão de anti-hTNFα adabut 58
4.2.1 Controle de eficiência da transfecção..... *58*
*4.2.2 Produção de lotes de plasmídeo pCHO 1.0/***HC-LC.adabut**..... *59*
*4.2.3 Transfecção de pCHO 1.0/***HC-LC.adabut** *em CHO-S®* *60*
4.3 Seleção de clones CHO®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes 62
4.4 Avaliação da expressão de adabut e reconhecimento a TNFα..... 64
4.4.1 Expressão do anticorpo recombinante adabut..... *65*
4.4.2 Reconhecimento de adabut a TNFα *65*
4.5 Análise das produtividades absoluta e específica Q_p (ρg/célula/dia) nas populações mistas..... 66
4.6 Geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* 67
4.7 Purificação de anti-hTNFα adabut..... 81
4.8 Cinética de ligação do anticorpo ao TNFα 83
4.9 Ensaios de caracterização funcional do anticorpo 85
4.9.1 Neutralização de citotoxicidade induzida por TNFα em células L929 ..... *86*
4.9.2 Inibição da expressão de ELAM-1 em células HUVEC *92*
4.10 Estabilidade de expressão de anti-hTNFα em clones submetidos a cultivo por tempo prolongado..... 96
4.11 Avaliação de clones potencialmente produtores de anticorpo de segunda geração 102
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 107
REFERÊNCIAS..... 109
APÊNDICES 123
APÊNDICE A - Mapa de vetores plasmidiais 123
APÊNDICE B - Análise *in silico* realizada pela ferramenta ProtParam, ExPaSy para cadeia única (HC+LC) de anti-hTNFα 125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização funcional do TNFα no organismo

O fator de necrose tumoral alfa (TNFα, *Tumor Necrosis Factor alpha*) é uma potente citocina pró-inflamatória que exerce efeito pleiotrópico em diferentes tipos de células mediando a homeostasia de respostas imunes (BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002). Produzido predominantemente por macrófagos ativados, inicialmente, o TNFα é expresso como uma proteína de 233 aminoácidos (aa) ancorada na membrana plasmática (pró-peptídeo de ~26 kDa). Após clivagem por metaloproteases extracelulares entre os aminoácidos alanina76 e valina77 (BLACK et al., 1997) a forma madura solúvel de 157 aa (~17 kDa) é secretada, sendo monomérica e biologicamente inativa (TANG; HUNG; KLOSTERGAARD, 1996). A forma ativa compreende um homotrímero composto pelos monômeros de 17 kDa, embora haja envolvimento do TNFα transmembrânico na resposta inflamatória, igualmente existente como homotrímero formado por monômeros não clivados de 26 kDa (PEREZ et al., 1990; TANG; HUNG; KLOSTERGAARD, 1996).

Descrita por Carswell e colaboradores, 1975, em experimentos de regressão e "necrose" de sarcomas, a presença do TNFα foi demonstrada em soro murino após infecção experimental com bacillus Calmette-Guérin (BCG) sensibilizado com endotoxina (CARSWELL et al., 1975). Somente após cerca de dez anos o TNFα pôde ser clonado, expresso em hospedeiro heterólogo e caracterizado (PENNICA et al., 1984/85). Em paralelo, Beutler et al., 1985, elucidaram que o até então fator secretado por macrófagos denominado como caquexina tratava-se da mesma proteína designada como "TNF" (BEUTLER et al., 1985). Estudos subsequentes confirmaram a importância do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano na produção da proteína TNFα bem como participação em efeitos sistêmicos inflamatórios e também no choque séptico (BAUSS; DROGE; MANNEL, 1987; MICHIE et al., 1988). A citocina é capaz de induzir tanto a migração de neutrófilos, através da quimiotaxia pelo endotélio vascular, que auxiliam durante o processo inflamatório (DEJANA; JI-MING; MANTOVANI, 1987), quanto estimular funções celulares proapoptóticas dependentes de concentração (MURRAY et al., 1997); consequentemente, o TNFα desempenha um papel essencial na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e imunomediadas (BRADLEY, 2008; HEHLGANS; PFEFFER, 2005). Atualmente sabe-se que o

fator descrito como necrótico induz, na verdade, apoptose via ativação de caspases (DEVIN et al., 2001; MURRAY et al., 1997), podendo causar também necroptose (DEGTEREV et al., 2008). Entretanto, em algumas linhagens celulares, o TNFα pode estimular a proliferação celular, auxiliando na sobrevivência e diferenciação (BERNARDINO et al., 2008; DAVIS et al., 2012; MUKHOPADHYAY et al., 2001; NOTI et al., 2010).

A produção de TNFα em concentrações baixas e persistentes ocorre em infecções crônicas, com ação autócrina e parácrina (leucócitos e células endoteliais) para: (i) controle de sobrevivência ou morte celular (BRADLEY, 2008); (ii) aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, *Major Histocompatibility Complex* I) de classe I (HALLERMALM et al., 2001); (iii) ativação de moléculas de adesão para a migração leucocitária (BEVILACQUA et al., 1994); (iv) ativação e expansão clonal de linfócitos CD8+ (CROFT, 2009), fibroblastos, macrófagos, neutrófilos e mastócitos (ROACH et al., 2002) e quimiotaxia a monócitos e células polimorfonucleares (MING; BERSANI; MANTOVANI, 1987; ROACH et al., 2002); (v) regulação da fagocitose e toxicidade por eosinófilos (LEGRAND et al., 2009); (vi) produção de interferon-γ (IFN-γ), interleucinas (IL, *Interleukin*) IL-1, IL-6, IL-8, fatores estimulantes de colônia (CSF, *Colony-Stimulating Factor*) e proteína quimiotáxica de monócitos-1 (MCP-1, *Monocyte Chemotactic Protein*-1) (CROFT, 2009; GOLDSTEIN et al., 1996; KITAURA et al., 2005; TANABE et al., 2010); e (vii) indução da síntese de mediadores lipídicos de fase aguda como prostaglandinas e fator de ativação plaquetário (PAF, *Platelet-Activating Factor*) (GRUNFELD et al., 1990).

Produções exacerbadas de TNFα ocorrem em infecções agudas com indução endócrina de danos citotóxicos aos múltiplos órgãos, decorrentes de morte celular disseminada e hemorrágica, podendo causar um estado letal de choque (choque séptico) (BEUTLER; CERAMI, 1986; TRACEY; CERAMI, 1990). Além disso, estão relacionados efeitos sistêmicos de anorexia, perda de peso e anemia devido à liberação de hormônios catabólicos, motivo pelo qual o TNFα havia sido denominado “caquexina” (TRACEY; CERAMI, 1990). Dentre as principais condições clínicas relacionadas ao aumento desregulado de citocinas pró-inflamatórias, como TNFα, com consequente nocividade causada pelo sistema imune, estão bacteremias e septicemias, rejeição a transplantes e doenças inflamatórias crônicas, como: artrite reumatoide (AR), enterite regional (doença de Crohn), esclerose múltipla, asma, psoríase, glomerulonefrite, doença pulmonar obstrutiva crônica, espondilite anquilosante, entre outras (CROFT, 2009; BRADLEY, 2008).

A superfamília de ligantes TNF compreende 18 genes que codificam 19 proteínas transmembranares (porção N-terminal intracelular e C-terminal extracelular) caracterizadas pela presença conservada de um domínio C-terminal, denominado de domínio homólogo de TNF (THD, *TNF Homology Domain*) (BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002). O domínio THD é trimérico e apresenta homologia de sequência de ~20-30% entre os membros da família TNF, sendo reconhecido por porções proteicas ricas em cisteína (*cysteine-rich domains*, CRDs) dos receptores de TNF (TNFRs) (BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Os fatores de regulação TNF mais importantes são, essencialmente: TNF-α (caquexina ou necrosina) e TNF-β (linfotoxina ou LTA-α). Ambos são capazes de ligar-se aos receptores TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75) desempenhando atividades biológicas similares no organismo, embora com diferentes intensidades de resposta (AGGARWAL; EESSALU; HASS, 1985; BLÜML et al., 2012; NEDWIN et al., 1985). Após reconhecimento de THD por CRDs dos receptores de TNF ocorre ativação de domínios citoplasmáticos que recrutam complexos intracelulares responsáveis pela inflamação, principalmente via fator de transcrição nuclear κB (NF-κB, *Nuclear Factor κB*), ou apoptose/necroptose (NEWTON; DIXIT, 2012).

1.2 Antagonistas de TNFα como biofármacos terapêuticos

Tendo em vista a participação de TNFα nos processos infecciosos, autoimunes e imunomediados foram desenvolvidos antagonistas que visam conter a resposta imune exacerbada. Os principais utilizados na clínica terapêutica são: (i) infliximabe (Remicade®, J&J Inc., Horsham, PA, EUA), um anticorpo monoclonal quimérico que possui região constante humana (IgG_1) e região variável murina; (ii) etanercept (Enbrel®, Pfizer, Thousand Oaks, CA, EUA), um análogo solúvel do receptor de TNF composto por dois domínios de TNFR2 fusionados à região constante de cadeia pesada (Fc, *fragment crystallizable*) da IgG_1; (iii) adalimumabe (Humira®, Abbott Biotechnology Ltd., North Chicago, IL, EUA), anticorpo humano recombinante obtido por *phage display* e produzido em célula de ovário de Hamster (CHO, *Chinese Hamster Ovary cell*); (iv) certolizumab pegol (Cimzia®, UCB S.A., Smyrna, GA, EUA), fragmento de ligação ao antígeno (Fab, *Fragment antigen-binding*) murino humanizado peguilado; e, (v) golimumabe (Simponi®, J&J Inc., Horsham, PA, EUA), IgG_1 humano produzido

a partir de hibridoma de camundongo transgênico. Estes medicamentos são aprovados por agências nacionais de saúde no mundo todo principalmente para o tratamento de doenças como AR e doença de Crohn. A AR é uma doença autoimune inflamatória sistêmica que afeta membranas sinoviais das articulações periféricas (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006). Considerada a principal doença autoimune, sua prevalência na população mundial é estimada entre 0,5 a 1,0%, podendo atingir prevalências de até 6,8% em populações indígenas (SILMAN; PEARSON, 2002). A enterite regional ou doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal crônica, idiopática, que afeta primariamente o intestino delgado (íleo) e o cólon (LOFTUS; SCHOENFELD; SANDBORN, 2002). Associada a uma significativa morbidade, a prevalência de casos por 100.000 habitantes é de: <1 na Ásia e América do Sul; 1 a 3 no sul da Europa e África do Sul; 16 na Nova Zelândia e Austrália; 14 no Canadá e 7 nos Estados Unidos (BERNSTEIN et al., 2010). O uso de inibidores de TNF-α permite a remissão efetiva dos sintomas clínicos de ambas as patologias, reduzindo a necessidade de colectomia em pacientes com doença de Crohn (BRADLEY, 2008).

O primeiro anti-TNFα com registro concedido para exploração comercial foi o anticorpo murino MAK 195 (MÖLLER; EMLING, 1988). O anticorpo foi amplamente caracterizado e apresentava elevada afinidade ao TNFα humano, porém foi pouco abordado em aplicabilidade clínica. Seu uso foi apresentado como insumo para ensaios laboratoriais e para controle da doença do enxerto versus hospedeiro (MÖLLER et al., 1990). No final da década de 1980 e início dos anos 1990, foi desenvolvido o primeiro anti-TNFα murino humanizado, com intenção inicial de uso no tratamento da sepse (KNIGHT et al., 1993). Apesar dos dados consistentes de proteção que vinham sendo obtidos em modelo experimental (BEUTLER; MILSARK; CERAMI, 1985; SILVA; BAYSTON; COHEN, 1990; TRACEY et al., 1987), os resultados dos ensaios clínicos não foram satisfatórios. Embora tenha sido observada uma tendência na redução na taxa de mortalidade por choque com diminuição abrupta das concentrações elevadas de TNFα circulante, a diferença entre pacientes tratados com anti-TNFα e o grupo controle não foi significativa (ABRAHAM et al., 1995; DHAINAUT et al., 1995; FISHER et al., 1993). Partindo dos conhecimentos adquiridos, o anti-TNFα passou a ser testado como modulador em outras doenças inflamatórias e autoimunes, mostrando-se eficaz em modelo animal para o tratamento da AR (PIGUET et al., 1992; WILLIAMS; FELDMANN; MAINI, 1992), e, progressivamente, conquistando espaço na pesquisa clínica reumatológica para diversas outras doenças.

O anticorpo anti-TNF quimérico Infliximabe (Remicade®), denominado inicialmente cA2, foi desenvolvido na escola de medicina da universidade de Nova York pela Centocor (KNIGHT et al., 1993), adquirida pela atual fabricante J&J Inc. Os ensaios clínicos comprovaram a efetividade do anticorpo para tratamento da artrite reumatoide (ELLIOTT et al., 1994) e fístulas ocasionadas pela doença de Crohn (VAN DULLEMEN et al., 1995), mostrando também, posteriormente, que o uso combinado do anti-TNFα com metotrexato melhorava a eficácia do tratamento (LIPSKY et al., 2000; MAINI et al., 1998). A partir das perspectivas clínicas, o anticorpo foi registrado sob patente para o tratamento de ambas as doenças (LE et al., 1997; US 5656272 e US 5698195), licenciado pelos órgãos de regulamentação em saúde em agosto de 1998 nos EUA e no ano seguinte na Europa (BOURGOIN; NUSKEY, 2013). Nos anos seguintes, seu uso foi autorizado para o tratamento de outras doenças autoimunes como espondilite anquilosante (BRAUN et al., 2002), artrite idiopática juvenil (LAHDENNE; VÄHÄSALO; HONKANEN, 2003), psoríase (GOTTLIEB et al., 2004) e artrite psoriásica (ANTONI et al., 2005).

Paralelamente, foi descrito o desenvolvimento da primeira proteína de fusão TNFR p75-IgG1 Fc (PEPPEL; CRAWFORD; BEUTLER, 1991), mostrando, no final dos anos 90, resultados promissores em ensaios clínicos para tratamento da AR (MORELAND et al., 1997; WEINBLATT et al., 1999) e outras doenças autoimunes (MEASE et al., 2000; BRANDT et al., 2003). A aprovação do Etanercept (Enbrel®) como anticorpo comercial ocorreu nos EUA em novembro de 1998 (BOURGOIN; NUSKEY, 2013). A proteína conquistou sucesso na clínica médica (DE VLAM; BOONE, 2015; GERLONI et al., 2008) e atualmente tem sido estudada até como tratamento auxiliar na doença de Alzheimer (BUTCHART et al., 2015).

No final da década de 90 foi comprovada a eficácia clínica do primeiro anti-TNFα inteiramente humano, originalmente denominado de D2E7, o adalimumabe (Humira®) (SALFELD et al., 2000). O anticorpo foi desenvolvido pela BASF Pharma, atualmente produzido por AbbVie Inc., para tratamento da AR e licenciado com o argumento de apresentar antigenicidade minimizada em humanos. O maior desafio para se obter um anticorpo humano contra o TNFα humano (autoanticorpo) foi a força de afinidade à molécula endógena, conseguidos por Salfeld et al., 2000, através da técnica de *phage display*. Os ensaios preliminares mostraram a capacidade de D2E7 em neutralizar a atividade funcional de TNFα em modelo murino transgênico para a prevenção de poliartrite, onde o grupo tratado não apresentou sinais

clínicos e histopatológicos da doença (KEFFER et al., 1991). Os ensaios clínicos mostraram-se seguros, associando uma melhoria significativa na sintomatologia da AR ativa (DEN BROEDER et al., 2002; KEMPENI, 1999; RAU et al., 1999), até que, em dezembro de 2002, o *United States Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o anticorpo para seu tratamento (BOURGOIN; NUSKEY, 2013). Ensaios clínicos mais recentes confirmam a efetividade sustentada do adalimumabe para tratamento de pacientes com AR, ao longo de, pelo menos, cinco anos de acompanhamento (BURMESTER et al., 2014), preservado também em outras condições clínicas (GORDON et al., 2012; MEASE et al., 2015; REINISCH et al., 2013). Atualmente, o adalimumabe vem sendo pesquisado pela empresa para tratamento da hidradenite supurativa severa (KIMBALL et al., 2012).

A partir dos resultados dos ensaios clínicos e da experiência prática adquirida durante os primeiros anos de comercialização dos biológicos antagonistas de TNFα, diversos efeitos indesejados passaram a ser observados nos pacientes (ANTONI; BRAUN, 2002). Apesar de corresponder, indiscutivelmente, ao tratamento mais eficaz existente para doenças inflamatórias crônicas, o biológico causa imunossupressão que por sua vez pode acarretar no surgimento de reações inflamatórias no local de injeção, de desordens neurológicas, metabólicas e hematológicas, falência cardíaca, além da geração de autoanticorpos e predisposição a infecções oportunistas, como, principalmente, tuberculose, ou infecções virais e fúngicas vaginais (CONNOR, 2011; GERLONI et al., 2008; KWON et al., 2014). Os benefícios da complexa abordagem terapêutica, entretanto, superam seus riscos, justificando-a quando acompanhada do monitoramento constante dos pacientes, para detecção e prevenção dos efeitos adversos (CONNOR, 2011; GERLONI et al., 2008).

Uma das principais preocupações com o anticorpo monoclonal quimérico infliximabe é o potencial para a formação de anticorpos humanos anti-quimérico (HACA, *Human Anti-Chimeric Antibody*), que neutralizam o medicamento e limitam sua eficácia em longo prazo ou causam reações de hipersensibilidade durante a infusão (BAERT et al., 2003). O mesmo é descrito para o anticorpo humano adalimumabe, com denominação de anticorpos humanos anti-humano (HAHA, *Human Anti-Human Antibody*) (BARTELDS et al., 2006). A frequência de autoanticorpos raramente é observada para a proteína de fusão etanercept, em torno de 6% segundo o fabricante (ENBREL®, 2013), 0-18% segundo a literatura (AIKAWA et al., 2010), consideravelmente inferior a de outros biológicos anti-TNFα, de 12-44% para anti-infliximabe e 1-87% para anti-

adalimumabe (AIKAWA et al., 2010; YI et al., 2014). Nenhuma correlação foi demonstrada entre a presença do anticorpo anti-etanercepte e baixa resposta clínica, embora exista um grande número de pacientes refratários ao tratamento com etanercepte, por motivos ainda não elucidados (YI et al., 2014). A perda de eficácia é frequentemente referida como a principal razão de interrupção do tratamento com anti-TNFα (DE KEYSER et al., 2014; DE VLAM; BOONE, 2015), de modo que anticorpos alternativos auxiliam na troca do produto, extendendo o período de tratamento (KOSMAČ et al., 2011). Um estudo realizado por Kosmač et al., 2011 mapeou epítopos reconhecidos por anticorpos anti-infliximabe em pacientes pediátricos portadores de diferentes doenças reumatológicas e em tratamento com o biológico, mostrando que todos os sítios de ligação dos anticorpos foram dirigidos para segmentos descontínuos dos domínios variáveis do infliximabe (KOSMAČ et al., 2011).

Um estudo de coorte realizado com 507 pacientes portadores de artrite reumatoide ativa, refratários ao metrotexato e com prescrição para o anticorpo infliximabe mostrou após 10 anos de acompanhamento que 21% dos pacientes seguiam o tratamento com controle satisfatório da doença, os demais foram perdidos do estudo ou substituídos para tratamentos com outros biológicos, corticoides ou metotrexato (MTX). Considerando apenas os pacientes responsivos ao infliximabe, 110/144 ou 76%, o tratamento foi considerado excelente (DE KEYSER et al., 2014). A eficácia sustentada do tratamento com anti-TNFα também é reportada em pacientes pediátricos portadores da doença de Crohn, mostrando durabilidade da resposta que pode ser potencializada por uma imunomodulação concomitante. A resposta clínica também foi associada ao aumento de crescimento observado nas crianças, particularmente em pacientes com início precoce da terapia (CHURCH et al., 2014). Outro estudo de coorte realizado durante 6 anos com 163 crianças portadoras de artrite idiopática juvenil acompanhou o surgimento de efeitos adversos durante o tratamento com os antagonistas de TNFα infliximabe e etanercepte. A terapia mostrou-se segura, entretanto, associada a alguns efeitos adversos graves e reversíveis, dentre os quais trombocitopenia, desordens neuropsiquiátricas como cefaleia, hiperatividade e fadiga, e também o surgimento de reações mais intensas como síndrome de Crohn e doença inflamatória intestinal, raramente descritas anteriormente na literatura. O total de 63% dos casos de efeitos adversos foi observado em pacientes em tratamento com infliximabe, dos quais em torno de 50% foram interrompidos ou substituídos por etanercepte; 54% dos efeitos foram observados em pacientes tratados com etanercepte, dos quais 75% foram interrompidos ou alguns substituídos por

infliximabe (GERLONI et al., 2008). Outro estudo prospectivo multicêntrico realizado durante 5,5 anos para a artrite psoriásica ativa mostrou que de 303 pacientes acompanhados, 51% aderiram ao tratamento com etanercepte até o final do estudo e 35% interromperam o tratamento devido à perda de efetividade. Foram reportados efeitos adversos em 58% dos pacientes, 17% com reações graves (DE VLAM; BOONE, 2015). Um estudo realizado em 27 pacientes pediátricos com doença de Crohn resistentes ao tratamento com infliximabe mostrou que a substituição por adalimumabe causou benefício clínico em 70% dos pacientes, sem observação de efeitos adversos, e mantendo-se responsivos ao longo dos 16 meses de acompanhamento (FUMERY et al., 2015). Outro estudo reporta a reintrodução eficaz de infliximabe após rejeição do tratamento com infliximabe e adalimumabe por pacientes com doença de Crohn (GAGNIERE et al., 2015).

Conforme mostram os ensaios clínicos, a variabilidade de resposta observada em cada paciente é extremamente ampla e os diferentes biológicos anti-TNFα podem desempenhar uma alternativa eficaz nos casos não responsivos ao tratamento convencional com corticoides/ antimetabólitos sintéticos (KOSMAČ et al., 2011). O tratamento com corticosteróides baseia-se no bloqueio inespecífico de genes proinflamatórios ativados durante a inflamação, como do gene para TNFα, e da ativação de genes antinflamatórios, como para IκB-α que reduz a expressão de NF-κB, consequentemente, levando a redução do mRNA para TNFα e também de outros genes associados à resposta inflamatória (BARNES et al., 2011). Portanto, é imprescindível um constante acompanhamento clínico para controle e ajuste da terapia, variando, quando necessário, combinações entre biológicos anti-TNFα e medicamentos sintéticos, ou outros biológicos como os anti-receptores de interleucina anti-ILR1 (FLEISCHMANN et al., 2003) e anti-IL6R (GENOVESE et al., 2008), e moduladores celulares como o anti-CD20 (ØSTERGAARD et al., 2010), etc. Ainda, há fabricações/formulações alternativas aos anticorpos comerciais comumente utilizados, como os antagonistas golimumabe e certolizumabe, já consolidados na clínica médica, e os anticorpos biossimilares (em desenvolvimento).

Com a explosão no número de vendas dos biológicos antagonistas de TNFα, a indústria farmacêutica passou a investir em novas opções de anticorpos, variando sua composição, técnicas de obtenção, ou aplicação clínica para justificar caráter inventivo e registrá-los sob forma de patente. O anticorpo humano anti-TNFα golimumabe corresponde a uma evolução na posologia e forma de tratamento, de modo que a administração se dá por via subcutânea e, em determinados

pacientes, apenas uma vez ao mês (WILLIAM et al., 2012) (forma de aplicação atualmente disponível também para o anticorpo Humira®). O Fab peguilado é citado com custo-benefício superior quando comparado aos demais inibidores de TNFα classicamente prescritos (HIDALGO-VEGA et al., 2015). Os estudos comparativos entre os antagonistas de TNFα são conflitantes e podem estar vinculados a interesses comerciais, de modo que assumindo a efetividade e licenciamento de cada produto, cabe ao clínico acompanhar a resposta específica do paciente.

Após aproximados 12 anos de exploração comercial do anticorpo infliximabe (BOURGOIN; NUSKEY, 2013), em julho de 2012 a Coréia do Sul aprovou o primeiro anticorpo anti-TNFα biossimilar do mundo, o CT-P13 denominado de Remsima (Celltrion®), com indicação para tratamento da artrite reumatoide, espondilite aquilosante, psoríase, artrite psoriásica, doença de Crohn em adultos, pediátrica e fistulizante, colite e retocolite ulcerativa (LEE, 2014). Em junho de 2013, o Remsima foi recomendado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) para comercialização nos países da união europeia; atualmente licenciado em mais de 60 países (REMSIMA, 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou sua comercialização em abril de 2015 (BIOFÁRMACOS, 2015). Ainda, há registros de outros anticorpos biossimilares em fase clínica de estudo, como por exemplo, um anticorpo adalimumabe pela empresa alemã Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals®, com denominação de BI695501, um da americana Amgen Inc. ®, com denominação de ABP 501, e testes com, pelo menos, outros cinco biossimilares de etanercepte (SCHEINBERG; KAY, 2012).

1.3 Engenharia de anticorpos recombinantes na biotecnologia industrial

Dentre as principais estratégias para se obter um anticorpo monoclonal estão: i) a engenharia de regiões variáveis das cadeias leve e pesada (VL, *Variable region Light chain* e VH, *Variable region Heavy chain*) com a região constante (Fc), independente da origem da espécie de cada região (formando assim construções de anticorpos humanos ou quiméricos); ii) técnicas de *display* a partir de bibliotecas de imunoglobulinas (Igs), como *phage* ou *yeast display*, etc.; iii) animais trangênicos para sequências gênicas V(D)J e C de Ig humanas; iv) hibridização celular a partir da fusão de linfócitos B com células de potencial proliferativo; v) humanização de um

anticorpo produzido em outra espécie, por técnicas de biologia molecular; vi) transplante de regiões determinantes de complementariedade (CDRs, *Complementarity Determining Regions*) de anticorpos de outra espécie imunizada em um arcabouço de Ig humana; e, vi) a síntese de anticorpo recombinante a partir de sequências conhecidas (BODER; JIANG, 2011; BREKKE; SANDLIE, 2003). Os anticorpos quiméricos são 70% humanos e possuem porção Fc totalmente humana, o que os torna consideravelmente menos imunogênicos quando comparados a equivalentes produzidos em outras espécies de elevada homologia imunológica, além de permitir sua interação com células efetoras e sistema complemento. Já os anticorpos humanizados são 85-90% humano, potencialmente menos imunogênicos do que os anticorpos quiméricos. No entanto, para o transplante de CDRs, por exemplo, há uma maior complexidade metodológica do que a simples fusão de sequências, pois são frequentemente necessárias abordagens de mutagênese dirigida para restaurar a afinidade do anticorpo parental (CHAMES et al., 2009).

A engenharia de imunoglobulinas permite modelar estruturas diversas, capazes de atingir resultados *in vivo* variáveis de acordo com o interesse clínico. Os fragmentos Fab simples ou bivalentes $F(ab')_2$ (contendo ligações dissulfeto entre as duas regiões Fab) são produzidos a partir da Ig por proteólise ou recombinantes e preservam a função de ligação ao antígeno com elevada afinidade, porém, devido ao fato de não apresentarem região Fc, não induzem estímulo imunológico. Já o fragmento variável de cadeia única (scFv, *single chain Fragment variable*), composto por domínios VH e VL em um único polipeptídeo interligado por uma região flexível, corresponde a uma molécula menor que pode ser produzida por hospedeiro heterólogo procarioto, e é capaz de penetrar de forma eficiente em tecidos sólidos. Ainda, arquiteturas bivalentes podem direcionar a mesma molécula para diferentes antígenos, como por exemplo, o scFv-Fc, fusão de uma região Fc a scFv na porção N-terminal do domínio de cadeia pesada (C_H, *Heavy Chain*) C_H2, para criar uma molécula de ligação ao antígeno com braços encurtados, ou em C_H3 (*minibody*), com apenas parte do Fc (BODER; JIANG, 2011).

A vasta aplicabilidade terapêutica dos medicamentos biológicos aliada à tecnologia bioindustrial de produção escalonada consolidou um mercado bilionário. Em 2011 o comércio mundial de biológicos foi de U$ 157 bilhões, com estimativa de crescimento para U$ 200 bilhões em 2016 (IMS HEALTH, 2012). As indústrias biofarmacêuticas são predominantemente americanas (49%) e europeias (30%) e o elevado custo de importação dos produtos limita o acesso aos demais grupos populacionais (HUGGETT; LÄHTEENMAKI, 2012). No Brasil,

grande parte destes medicamentos é disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), embora obedecendo a critérios que dificultam sua liberação. Segundo a ANVISA, os biofármacos representam 2-3% do total de medicamentos distribuídos pelo governo, porém sendo responsáveis por 41-50% dos gastos anuais assumidos pelo Ministério da Saúde (MS) com todos os medicamentos (SUS/MS, 2012; TSURUTA; DOS SANTOS; MORO, 2015). Entre os produtos bioterapêuticos, apenas 1% são anticorpos monoclonais, os quais representam 32% destes gastos. Estima-se que o SUS gaste anualmente, em média, R$ 25 mil por paciente em tratamento com biológicos (SUS/MS, 2012). Anticorpos como Enbrel® (etanercepte) e Remicade® (infliximabe) estão na lista de medicamentos distribuídos, com custo de, respectivamente, R$ 1.217,13 e R$ 1.136,70 por caixa/dose (BRATS, 2012). O custo particular do anticorpo Humira® (adalimumabe) é de R$ 7.304 a cada 40 mg (consulta realizada em outubro de 2015, PANVEL, 2015), quantidade média necessária para tratamento em um período de 15 dias. Monteiro e Zanini, 2008, avaliaram em modelo matemático baseado na análise de Markov os custos envolvidos para o tratamento da AR em diferentes estágios clínicos. Foram incluídos na análise gastos com medicamentos, materiais médico-hospitalares e exames laboratoriais. O tratamento que apresentou o melhor custo-benefício foi a monoterapia com MTX, estimando R$ 28.475,00 por paciente/ano. O tratamento utilizando Remicade® (infliximabe) e MTX atingiu custos de R$ 2.323.219,82 paciente/ano (MONTEIRO; ZANINI, 2008).

Frente aos bilhões de dólares arrecadados anualmente pelas empresas biofarmacêuticas com a comercialização dos produtos biotecnológicos, a comunidade científica e órgãos públicos de saúde mobilizaram-se para investigar os gargalos financeiros envolvidos no processo de produção industrial. Devido à ampla variabilidade de cada processo e aos interesses econômicos das grandes indústrias biotecnológicas, não existem dados concisos em domínio público que especifiquem os custos finais de produção de um anticorpo monoclonal e/ou recombinante (DIMASI; GRABOWSKI, 2007; KELLEY, 2009). Para estimar o custo médio, além de variáveis relacionadas ao tempo de pesquisa e desenvolvimento do produto (R&D, *Research and development*), ensaios clínicos, investimentos em instalações industriais, custos gerais da fabricação em larga escala e à mercadologia e vendas, devem ser analisados fatores como: (i) a linhagem celular utilizada como hospedeiro de expressão e o rendimento (concentração) de anticorpo obtido; (ii) tipo e volume do biorreator, meios de cultivo e retroalimentação empregados; (iii) eficácia da etapa de purificação; (iv) perdas com agregação e estabilidade, entre

outros (KELLEY, 2009; SINCLAIR, 2009). Além disso, é fundamental considerar também: (i) os custos diretos (variáveis) de produção, que incluem matérias-primas e utilidades; (ii) custos indiretos (fixos), tais como encargo de capital e depreciação e manutenções, geralmente proporcionais ao investimento do capital (SINCLAIR, 2009); e (iii) custos ocultos, como falhas de lotes produzidos, riscos e esforços do investimento, tempo e efeitos da curva de aprendizagem, e, a porção ativa das instalações em relação à demanda necessária de produção (PUGH, 1998). Novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas pela indústria biofarmacêutica visando à obtenção de produtos mais concentrados, puros e a um custo de produção cada vez mais reduzido. Neste enfoque, além do desenvolvimento de novos compostos, os estudos aplicados à biotecnologia industrial primam inovar metodologias relacionadas às etapas de fabricação.

Dentre os fatores envolvidos no custo de produção o mais discutido, e que apresenta maior influência no valor final do produto, é o título de anticorpo recuperado do sobrenadante de cultivo (FARID, 2007; SINCLAIR, 2009). A evolução dos processos industriais permitiu o aumento de produtividade de 0,02-0,05 gramas de anticorpo por litro de cultivo (g/L), em 1985, para 0,5-2.0 g/L em 1995, chegando a 3.0-5.0 g/L em 2005 (SINCLAIR, 2009). Atualmente já são reportados títulos de produção de 10-13 g/L, para cultivos realizados em longos períodos (KELLEY, 2009). As análises matemáticas estimam que o valor de custo de produção de um anticorpo esteja entre U$ 50-100 por grama (g), considerando um rendimento de 2 a 5 g de anticorpo por litro de sobrenadante de cultivo e quando produzido em uma fábrica já instalada, operante em capacidade completa (KELLEY, 2009; SINCLAIR, 2009). Em geral, o custo de produção representa 15-25% do valor das vendas (MOSCHO et al., 2000). A diferença é justificada pelas empresas como custos de infraestrutura, riscos de *R&D* e ensaios clínicos, e gastos vinculados a outros medicamentos cuja eficácia e/ou segurança foram reprovadas (DIMASI; GRABOWSKI, 2007). O custo dos anticorpos disponíveis no mercado varia em torno de U$ 2 a 20 mil por grama, e, acredita-se que com o surgimento de medicamentos biossimilares poderia haver redução de 10% a 30% no preço final (KELLEY, 2009).

1.4 Justificativa para a escolha do tema

A elevada morbimortalidade observada nas patologias associadas à disfunção homeostática de TNFα e os exorbitantes valores admitidos pelo MS em tratamentos justificam

medidas de intervenção. A recente incorporação de biológicos antagonistas de TNFα na lista de medicamentos distribuídos pelo SUS através do Programa de Medicamentos de Alto Custo (PMAC) ampliou o acesso para a população, porém gerando gastos excessivos ao orçamento público e insuficientes para atender toda a demanda. O número acentuado de ações judiciais solicitando biofármacos como infliximabe, etanercepte e adalimumabe, conduziu a Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) a instituir uma resolução, vigente a partir de janeiro de 2012, obrigando cobertura destes medicamentos também pelo sistema privado. A iniciativa objetivou amenizar os gastos de importação até então assumidos apenas pelo governo federal. Entretanto, assim como na rede pública, a concessão pela rede privada é dificultada e acaba restrita a pacientes que comprovam estágio de doença avançada através de rigorosos diagnósticos ou aos contemplados judicialmente (BRANDÃO et al., 2011; MOTA et al., 2012), confrontando os preceitos de universalidade, equidade e integralidade a saúde promulgados na constituição nacional. No tratamento da AR, por exemplo, o imunobiológico apenas é disponibilizado a pacientes com Índice Clínico de Atividade da Doença (CDAI) maior do que 10, refratários ao tratamento convencional com drogas de primeira linha (DMCDs, Drogas Modificadoras do Curso da Doença) por um período mínimo de três meses e, pelo menos, duas tentativas posológicas, de forma sequencial ou combinada. A conduta impede o uso da terapia mais eficaz preconizada segundo o consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia (2012), pela administração sinérgica de MTX e algum biológico antagonista de TNFα (MOTA et al., 2012). A intervenção médica com biológicos acaba postergada dos estágios iniciais da doença, período determinante para evitar a progressão clínica e instauração de danos permanentes. Alguns pacientes apresentam resistência ou sensibilidade aos medicamentos sintéticos, restringindo-os ao uso de biológicos, outros rejeitam também a terapia com os imunobiológicos usuais, fazendo-se necessário a substituição por outro biológico alternativo (KOSMAČ et al., 2011; MOTA et al., 2012).

A produção nacional efetiva de um medicamento anti-hTNFα (anti-TNFα humano) propõe satisfazer a demanda pública em saúde com investimentos biotecnológicos autossustentáveis, consequentemente, reduzindo os altos gastos de importação suportados pelo MS. Além de economicamente vantajosa, a nacionalização de um anticorpo anti-hTNFα terapêutico acarretaria no direcionamento financeiro federal às entidades públicas de saúde do país, primando pelo desenvolvimento biotecnológico estatal ao invés de transferi-lo às empresas multinacionais pertencentes aos países desenvolvidos. A existência de um anticorpo nacional

facilitaria o acesso da população ao tratamento com burocracia reduzida e permitindo sua prescrição nos estágios iniciais da doença, além de disponibilizar uma molécula variante para tratamento alternativo em casos de pacientes refratários aos antagonistas de TNFα convencionais. O desenvolvimento de um anti-TNFα terapêutico em uma diferente composição/formulação poderia aprimorar a atual eficácia e/ou posologia do medicamento comercial (*biobetter*), sustentando adesão ao tratamento, aumentando a sobrevida do paciente e reduzindo gastos hospitalares. Ainda que empresas nacionais estejam se mobilizando para o desenvolvimento de biossimilares, estas farão transferência de tecnologia do exterior. O projeto propôs gerar e selecionar a linhagem em nosso meio, além de estudar a possibilidade de se obter um anticorpo que apresente vantagens quando comparado ao disponível atualmente para uso na clínica médica.

Não há riscos no investimento relacionados às etapas de desenvolvimento (*R&D*), pois a tecnologia principal para aquisição do anticorpo compreende técnicas descritas na literatura, o laboratório de execução possui experiência e infraestrutura aplicadas ao propósito do projeto. O processo de produção é seguro devido aos avanços biotecnológicos na área de cultivo celular e purificação de biomoléculas, dominados pelo Instituto Butantan, sede do laboratório. Não há investimento mercadológico, pois o intuito é o suprimento para o MS, visando a distribuição gratuita para a população.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir anticorpos monoclonais anti-hTNFα capazes de neutralizar a atividade funcional de TNFα e aplicá-los para uso terapêutico.

2.2 Objetivos Específicos

- Gerar linhagens produtoras de anti-hTNFα utilizando células eucarióticas como sistema de expressão;
- Selecionar os clones com base no comportamento de cultivo, produtividade e cinética de ligação ao rhTNFα (força de afinidade e tempo de dissociação);
- Avaliar a atividade funcional do anti-hTNFα produzido pelo(s) clone(s) selecionado(s) através da capacidade de: (i) neutralização da citotoxicidade; (ii) inibição de função efetora;
- Comparar, em termos de funcionalidade, o anticorpo produzido (clone selecionado) com a formulação comercial disponível para uso terapêutico;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem de anticorpo anti-hTNFα

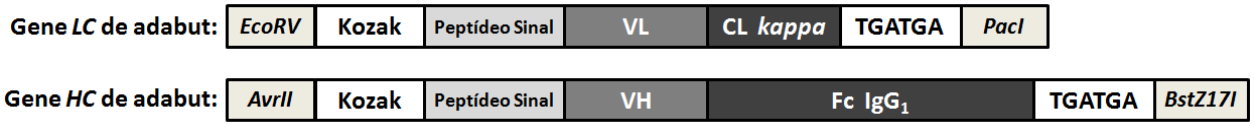
O anticorpo anti-TNFα desenvolvido está denominado neste trabalho como **adabut,** para facilitar a leitura. O protocolo adotado para a clonagem e geração de linhagens CHO-S®/ pCHO 1.0/ *HC-LC.adabut* foi adaptado do recomendado para o sistema *Freedom® CHO-S®* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

3.1.1 Construção gênica do anticorpo anti-hTNFα adabut

As construções gênicas sintetizadas para a expressão do anticorpo adabut foram desenhadas com base nas sequências de regiões variáveis das cadeias VL e VH do anticorpo humano adalimumabe (US 6090382, SALFELD et al., 2000) e regiões constantes líderes de cadeias leve (CL, *Constant-Light*) e pesada (Fc) de Igγ1 e Ig_{κ} disponibilizadas em banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As sequências foram desenhadas de modo que apresentassem nas extremidades adjacentes (*upstream* e *downstream*) às regiões constantes os sítios de restrição enzimática necessários para clonagem no vetor plasmidial pCHO 1.0 (Life Technologies), além de outros elementos necessários para expressão gênica em hospedeiro CHO. A cadeia pesada (HC) foi construída para anelamento a *Avr*II (5'-CCTAGG-3') e *Bst*Z17I (5'-GTATAC-3'), sendo composta como primeira subunidade de expressão, e a cadeia leve (LC) para expressão sequencial, com anelamento nos sítios *Eco*RV (5'-GATATC-3') e *Pac*I (5'-TTAATTAA-3'), segunda subunidade.

A ordem dos elementos necessários para a clonagem e expressão gênica está ilustrada na figura 3.1, consta: (i) sequencia Kozak com o nucleotídeo A na posição -3 (GCCACC) (KOZAK, 1987); (ii) sequência de peptídeo sinal com códon de iniciação ATG; (iii) sequências das regiões variáveis (VH e VL) do anticorpo adalimumabe (SALFELD et al., 2000); (iv) sequências das regiões constantes IgG_1 Fc e LC *kappa*; e (v) códon de terminação (TGATGA) (BROWN et al., 1990).

Figura 3.1 - Estrutura da construção gênica empregada para clonagem de *HC* e *LC* de anticorpo anti-TNFα adabut.



Sequência de Kozak (**GCCACC**), peptídeo sinal, regiões variáveis (**VH** e **VL**), constantes (**LC *kappa*** e **Fc IgG$_1$**) e códon de terminação (**TGATGA**), e sequências para reconhecimento de sítios de restrição enzimático (EcoRV e PacI para *LC* e AvrII e BstZ17I para *HC*).

A síntese de nucleotídeos foi realizada pela Geneart (Life Technologies, Brasil) com otimização de códons para expressão em hospedeiro CHO e para ausência dos sítios *Sfi*I (5'-GGCCNNNNNGGCC-3') e *Nru*I (5'-TCGCGA-3'). Os genes foram recebidos em vetor plasmidial de transporte, os mapas dos vetores plasmidiais estão detalhados no apêndice A. Uma análise *in silico* foi realizada para as sequências do anti-hTNFα em cadeia única (HC+LC) pela ferramenta *ProtParam*, ExPaSy, *Swiss Institute of Bioinformatics*, conforme apêndice B.

3.1.2 Clonagem de genes HC *e* LC *de adabut em vetor pCHO 1.0*

Para a clonagem dos genes *LC* e *HC* em vetor plasmidial pCHO 1.0, inicialmente, os plasmídeos de transporte da Geneart e o plasmídeo pCHO 1.0 foram ampliados por choque térmico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) para obtenção de material de trabalho. Cerca de 100 ng de DNA plasmidial em volume de 1 µL foi incubado a 50 µL de célula quimiocompetente *E. coli* TOP 10 (Life Technologies) em gelo por 30 min, sendo em seguida submetido ao choque térmico sob 42 ºC por 30 seg e resfriamento em gelo por 2 min para recuperação das propriedades de enrijecimento da membrana. O total de 250 µL de meio S.O.C. (Life Technologies) a temperatura ambiente foi adicionado para cultivo do material a 37 °C por 1 hora. As células transformadas foram cultivadas a partir de 20 e 200 µL do cultivo em placas contendo meio Luria Bertani (LB) sólido (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1% NaCl, e agar bacteriológico a 1,5%) suplementado com canamicina (Life Technologies) a 50 µg/mL para pCHO 1.0 e plasmídeo de transporte-HC ou ampicilina (Sigma-Aldrich Corporate, St Louis, MO, EUA) a 100 µg/mL para plasmídeo de transporte-LC. A eficiência de transformação foi determinada e algumas colônias escolhidas para cultivo em 10 mL de meio LB líquido (0,5% extrato de levedura, 1% triptona, 1%

NaCl) suplementado com o respectivo antibiótico. Por fim, o DNA plasmidial foi extraído utilizando *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation, Madisson, WI, EUA), conforme manual do fabricante, e quantificado por espectrofotometria a DO_{260nm} (Ultrospec 6300pro, GE Healthcare/ Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), aceitando apenas as amostras que apresentavam baixa concentração de contaminantes, através da razão DO_{260nm}/DO_{280nm} entre 1,7 e 2,0.

A clonagem de *HC* em pCHO 1.0 foi realizada a partir de 10 µg de DNA dos plasmídeos de transporte-HC e pCHO 1.0, que foram separadamente submetidos a dupla digestão com as respectivas enzimas de restrição (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) a 37 ºC e 16 h. Os plasmídeos digeridos foram precipitados com etanol (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e ressuspendidos em 30 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Molsheim, França) autoclavada e 6 µL de tampão de carregamento concentrado seis vezes (0,5% de azul de bromofenol, 50% glicerol e 100 mM de EDTA pH 8,0). O material foi tratado com cuidados estéreis e submetido à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (*UltraPure Low Melting Point Agarose*, Life Technologies) a 1% para pCHO 1.0 e 1,5% para o plasmídeo de transporte-HC com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (Life Technologies) e em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA e água Milli-Q autoclavada), sob 50 V por 200 min. O plasmídeo pCHO 1.0 linearizado e o gene *HC* digerido do plasmídeo de transporte foram recortados manualmente e purificados utilizando *Wizard SV gel and PCR clean up system* (Promega). Os produtos recuperados foram novamente submetidos à precipitação alcoólica, sendo ressuspendidos em 10 µL para obtenção do DNA em maior concentração/volume. Em seguida, os insertos foram quantificados por fluorometria utilizando *Quant-it ds DNA BR assay 2-1000 ng* (*Qubit*, Life Technologies) e a ligação de *HC* em pCHO 1.0 foi preparada em reação contendo 2 unidades (U) da enzima T4 DNA ligase (Life Technologies), tampão de ligação 5X, Polietilenoglicol 6000 (Sigma) a 30% e água Milli-Q para volume final de 20 µL. O protocolo da ligação foi otimizado a partir de diferentes proporções de vetor/ inserto (100 ng) de 1:1, 1:2 e 1:3, 1:3,5, 1:5, temperatura de 16 ou 23 ºC e tempo de incubação de 16 a 22 h.

A clonagem de *LC* em *HC*-pCHO 1.0 foi realizada utilizando o mesmo protocolo descrito para *HC* em pCHO 1.0, porém, anterior à aplicação de *HC*-pCHO 1.0 linear em gel de agarose, foi necessário incluir uma etapa de defosforilação de grupamentos fosfato 5'. A defosforilação foi realizada em reação utilizando 1 U da enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIAP,

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Life Technologies) a 50 ºC por 60 min seguida de inativação enzimática com 0,25 mM de EDTA (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 65 ºC por 15 min.

Para triagem de recombinantes, os produtos de ligação (HC-pCHO 1.0 e LC/HC-pCHO 1.0) foram transformados por eletroporação em *E. coli* TOP 10 (Life Technologies) eletrocompetente conforme protocolo descrito por Sambrook e Russel, 2001. O volume total de 1 ou 2 µL do material de ligação foi incubado cuidadosamente a 70 µL de células eletrocompetentes por 10 min a 4 ºC, sendo em seguida transferidos para uma cubeta resfriada de 0,2 cm de espessura entre os eletrodos (cuvette 0,2 cm, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para aplicação de descarga elétrica de 2,5 kV sob 5 ms, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω (Multiporator, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O material transformado foi incubado em 3 mL de meio S.O.C. (0,5% extrato de levedura, 2% triptona, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl2 10 mM, MgSO4 10 mM, Glicose 20 mM) a 37 ºC e 200 rpm por 1 h, e em seguida plaqueado em LB sólido suplementado com canamicina 50 µg/ mL, em volumes de 100 µL a 2 mL (a partir de precipitado celular obtido de centrifugação do cultivo, a 3.000 x *g* por 10 min), e incubado a 37 ºC/12-16 h.

O crescimento de colônias indicou a possibilidade de clones recombinantes, que foram escolhidos aleatoriamente e ampliados por cultivo em meio LB a 37 ºC, por 16 h e sob 200 rpm. Por fim, o DNA plasmidial foi extraído utilizando *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) e triado para a liberação dos insertos *HC* e *LC*, pelo uso das enzimas *Avr*II, *Pac*I, *Eco*RV e *Bst*Z17I a partir da dupla digestão enzimática e visualização das bandas de pCHO 1.0, *HC* e *LC* por eletroforese em gel de agarose.

*3.1.3 Confirmação de clones recombinantes para pCHO1.0/*HC-LC.adabut

O sequenciamento automático foi realizado pelo método de Sanger, Nicklen e Coulson, 1977, utilizando sequenciador de 8 capilares Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer e *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster city, CA), conforme manual do fabricante (Life Technologies).

As amostras foram preparadas obedecendo a relação recomendada de 150 ng para um plasmídeo de 3-4 Kb, 1,6 ρmol de oligonucleotídeos iniciadores (tabela 3.1), 1 µl do reagente

BigDye® e 1,5 µl do tampão de sequenciamento concentrado cinco vezes, em volume final de reação de 10 µL completado com água Milli-Q. Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer3web v. 4.0.0 e os dados analisados utilizando o programa Chromas Lite 2.1.1 e ferramentas ClustalW2 e *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, NCBI).

Tabela 3.1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento automático de *HC* e *LC*.

Iniciador*	Sequência do iniciador
adabut/ HC - R1 (01)	5' GTAGTCTTTCACCAGGCAGC 3'
adabut/ HC - R2 (02)	5' GTACTCTTTGCCGTTCAGCC 3'
adabut/ HC - R3 (03)	5' ATACTCATCACTTGCCGGGG 3'
adabut/ HC - F1 (04)	5' CGAGGACCCTGAAGTGAAGT 3'
adabut/ LC - R1 (01)	5' GGAGGGTGGGAAGATGAACA 3'
adabut/ LC - R2 (02)	5' GCCCCGGTTGAAGGACTT 3'
EP-For_pCHO/ LC (03)	5' GGTGTCGTGAGGAATTTCAG 3'
EP-Revr_pCHO/ LC (04)	5' GAGGCAGCCGGATCATAATC 3'

*Oligonucleotídeos iniciadores senso (F) e anti-senso (R).

3.2 Transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em CHO-S® para geração de população estável mista

Inicialmente a construção pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi ampliada em grande volume de cultivo e o DNA plasmidial extraído utilizando *PureLink® HiPure Plasmid DNA Purification Kit* (Life Technologies) para elevado grau de pureza. Foram produzidos diferentes lotes do vetor plasmidial, testando como eluentes do DNA ligado na coluna de purificação o tampão TAE e água Milli-Q estéril, até obter um lote de elevada concentração de DNA e presença reduzida de contaminantes quando avaliado na razão de DO_{260nm}/DO_{280nm} >1,9, condições desejadas para a transfecção em célula de mamífero CHO.

Em seguida e para aumentar as chances de integração do vetor no genoma da célula hospedeira sem que houvesse rompimento aleatório dos genes *LC* e *HC* ou de elementos

necessários para a expressão em célula de mamífero, o plasmídeo foi linearizado por digestão enzimática com *Nru*I (New England Biolabs). Foram testados diferentes protocolos de digestão, incluindo a enzima em concentrações de 1 U, 2 U, 3 U e 4 U, tempo de incubação de 1 e 3 h a 37 ºC, e presença de albumina bovina sérica (BSA, *Bovine Serum Albumin*) no tampão de digestão. A reação de digestão foi submetida à filtração estéril utilizando colunas de acetato de celulose 0,22 µm (SPIN-X *Centrifuge Filter Unit*, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) e o material foi quantificado por DO_{280nm}, utilizando como branco da análise uma solução contendo os mesmos componentes da reação e com substituição da enzima por glicerol a 50% (quantidade correspondente à composição comercial).

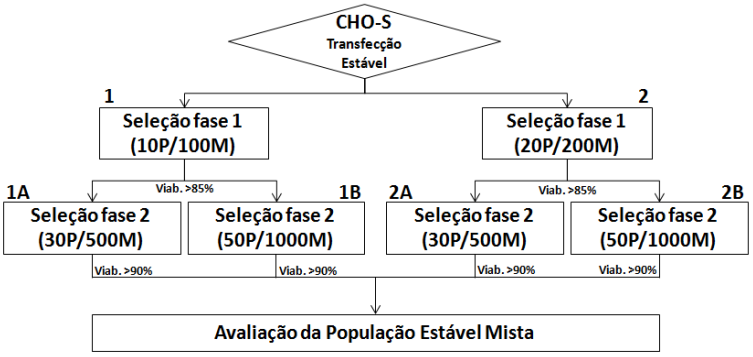
A transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em CHO-S® foi realizada por lipofecção, técnica onde ocorre a formação de complexos lipídicos com o DNA que são endocitados pelas células e carreados ao núcleo para inserção aleatória no genoma. O total de 3 x 10^7 células viáveis (v.c., *viable cells*) CHO-S® provenientes de um cultivo em suspensão de viabilidade celular >95% foram filtradas em poros de 40 µm (BD Biosciences, São José, CA, EUA) e separadas em volume final de 30 mL de meio quimicamente definido e livre de componentes de origem humana ou animal CD FortiCHO (Life Technologies) suplementado com 8 mM de L-Glutamina (Gln) (Life Technologies). Paralelamente, 50 µg do DNA plasmidial pCHO 1.0/ *HC-LC.adabut* linearizado foi diluído em 1,5 mL de meio de cultivo livre de soro (SFM, *Serum-Free Medium*) OptiPRO™ SFM (Life Technologies), e 50 µL do reagente para lipofecção FreeStyle™ MAX (Life Technologies) foi, separadamente, diluído em 1,45 mL de meio OptiPRO™ SFM. O reagente FreeStyle™ MAX diluído foi lentamente adicionado ao DNA, totalizando 3 mL de reação incubada por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir a formação de complexos lipídicos com o DNA. A reação foi lentamente adicionada às células CHO-S®, sob leve agitação, e cultivadas em frascos Erlenmeyer estéreis de policarbonato de 125 mL (SF125, Corning) por 48 h a 37 ºC, sob agitação orbital a 150 rpm, 8% de CO_2 e 70-80% umidade. O mesmo protocolo foi realizado para controle de eficiência da transfecção utilizando um plasmídeo contendo o gene *GFP* para expressão da proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*). Em seguida, deu-se início a seleção de transfectantes estáveis para a expressão proteica.

3.3 Seleção de transfectantes estáveis CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* para a expressão de anti-hTNFα adabut recombinante

A população de clones estáveis para a transfecção de pCHO 1.0/ *HC-LC.adabut* foi selecionada a partir da resistência aos agentes Puromicina (P) e MTX (M). A puromicina é um aminonucleosídeo que inibe a síntese proteica em células de mamífero através da interferência na função ribossomal. Células que possuem o vetor pCHO 1.0, e portanto o gene *pac* são resistentes para a presença do antibiótico. O MTX ou hidrato de metotrexato é um antagonista do ácido fólico que transportado ao interior da célula pelo transportador de folatos é convertido pela enzima folilpoliglutamato sintetase a um metabólito poliglutamatado de alto peso molecular, que se liga inibindo a atividade da enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Células transfectadas com pCHO 1.0 apresentam o gene *DHFR* e são capazes de catalisar a redução de 5,6-dihidrofolato a 5,6,7,8-tetrahidrofolato, molécula essencial para a síntese de DNA e duplicação celular, promovendo portanto maior resistência ao MTX do que a basal existente nas células parentais.

A figura 3.2 esquematiza a estratégia de seleção empregada para seleção de transfectantes estáveis. Foram realizados dois experimentos simultâneos e independentes, cada um composto por duas fases distintas de tratamento com os agentes seletores P e M, em concentrações variáveis e crescentes: no experimento 1, a primeira fase de seleção foi iniciada com P (Life Technologies) a 10 μg/mL e M (Sigma) a 100 nM pH 10, onde o cultivo foi mantido até recuperação da viabilidade celular quando deu-se início a segunda fase de seleção, realizada com P a 30 μg/mL e M a 500 nM (experimento 1A) ou com P a 50 μg/mL e M a 1000 nM (experimento 1B), e sendo o experimento finalizado quando obtida viabilidade celular >90%; o experimento 2 foi realizado utilizando concentrações de P a 20 μg/mL e M a 200 nM na primeira fase, e na segunda fase as mesmas condições descritas no experimento 1 (denominados, entretanto, como experimentos 2A e 2B). O protocolo originou quatro diferentes populações estáveis mistas, que foram avaliadas quanto ao perfil de resistência celular ao tratamento com agentes seletores e quanto à produtividade específica de anticorpo (item 3.5). A melhor condição estabelecida foi empregada para originar a linhagem celular produtora do anticorpo anti-hTNFα adabut.

Figura 3.2 - Fluxograma esquemático mostrando o protocolo empregado para seleção de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes.



A população estável mista foi tratada com duas diferentes concentrações de agentes seletores P: Puromicina em µg/mL, e M: MTX em nM, originando dois experimentos independentes. Na segunda fase de seleção, cada um dos experimentos foi dividido em dois novos grupos de seleção originando quatro diferentes populações estáveis, selecionadas diferencialmente para posterior avaliação da produtividade específica de anti-TNFα. Fluxograma adaptado de Life Technologies®.

Os cultivos foram realizados em meio CD FortiCHO (Life Technologies) suplementado com 8 mM de L-Glutamina (Life Technologies) e agente anti-aglutinação (*anti-clumping*, Life Technologies) na diluição recomendada de 1:100. A primeira fase de seleção foi iniciada com 0,5 x 10^6 cels/mL e volume de 40 mL, em cultivo estático utilizando garrafas estéreis de poliestireno de 150 mL e filtro de 2 µm (T150, Corning), a 37 ºC sob variação de CO_2 de 5-8% e umidade de 70-80%, durante 7 dias, tempo esperado para recuperação de viabilidade celular >30%. Posteriormente, foi realizada uma troca completa de meio, a partir da centrifugação das células a 200 x *g* por 7 minutos, e iniciado o cultivo sob agitação a 150 rpm com 0,3 x 10^6 cels/mL. A seleção foi monitorada pela viabilidade celular realizando periodicamente trocas parciais ou completas de meio e renovando o agente seletor. A contagem do número total de células e viabilidade celular foi realizada pelo método de azul de tripano em plataforma automatizada Vi-CELL (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Ao final do experimento, as células foram aliquotadas e criopreservadas na concentração de 1,0-1,5 x 10^7 v.c. em volume de 1 mL de meio CD FortiCHO suplementado com 8 mM Gln contendo dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, em protocolo de congelamento gradual desde -20 até -196 ºC e com armazenamento final em nitrogênio líquido.

3.4 Avaliação preliminar da expressão do anticorpo anti-TNFα

O sobrenadante de cultivo foi recuperado e submetido a uma caracterização preliminar que objetivou confirmar: (i) a expressão do anticorpo recombinante adabut pelo hospedeiro CHO-S®, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (*sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) e 80 V e pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) sanduíche (direto); e (ii) a capacidade de reconhecimento ao TNFα, por ELISA indireto e por *imunoblotting*. O ELISA foi realizado a partir da sensibilização de placas de polipropileno (Nunc-MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) com 1,0 µg/mL (100 ng/100 µl por poço) de anticorpo Goat anti-human IgG-UNLB (cat. 2040-01, Southern Biotech, Alabama, EUA) para ELISA sanduíche (direto) ou TNFα humano recombinante (rhTNFα) (cat. rhtnf-a, Invivogen, São Diego, CA, EUA) para ELISA indireto em concentrações diluídas serialmente na razão de 1:2 a partir de 1,0 µg/ mL até 0,03 µg/ mL, em tampão carbonato de sódio 15 mM (Merck) e bicarbonato de sódio 35 mM (Merck) (pH 9,6), e incubação em câmara úmida a 4-8 ºC por 18 h. A placa foi lavada com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 e Tween 20 (Sigma) a 0,05% ($PBST_{20}$) e bloqueada por 2 h em temperatura ambiente (TA) com solução de PBS e leite desnatado (Nestle, Araçatuba, SP, Brasil) a 10%, sendo, em seguida, lavada novamente com $PBST_{20}$ para remoção da solução de bloqueio. O ensaio foi realizado adicionando as amostras (anticorpo primário) provenientes do sobrenadante de cultivo e anticorpos controle positivo anti-hTNFα (cat. htnfa-mab1, Invivogen) ou negativo IgG humano (WA 10452, Sigma) em diluições seriadas realizadas em PBS e leite desnatado a 5%, em incubação em câmara úmida a 37 ºC por 1 h. A placa foi lavada com $PBST_{20}$ para adição do anticorpo secundário Goat anti-human IgG-HRP (cat. 2040-05, Southern Biotech) a 37 ºC por 1 h, em concentração de uso previamente padronizada a partir de diluições sucessivas de 1:500 até 1:32.000. Após incubação, a placa foi lavada para revelar a reação com 100 µL de solução contendo cromógeno tetrametilbenzidina 1% (TMB, Sigma), DMSO (Sigma) e substrato H_2O_2 em tampão acetato de sódio/ácido cítrico 100 mM pH 6, por 20 min a TA e ao abrigo de luz. Por fim, a reação foi interrompida com 50 µL de H_2SO_4 4,7 N e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro (iEMS Analyser, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em filtro de 450 nm. A quantificação foi realizada através do cálculo de regressão logística não linear de uma curva padrão obtida com o anticorpo IgG humano (WA 10452, Sigma) em concentrações de 0,194 a 0,003 µg/mL. Os dados foram analisados pelos

programas Genesis v. 3.03 e GraphPad Prism 5 ou Microsoft Excel®. O *immunoblotting* foi realizado a partir da transferência de 500 ng de TNFα a membranas de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Buckinghmshire, Reino Unido) em sistema semisseco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad). As bandas foram visualizadas após coloração com vermelho de Ponceau (Sigma) e a reação revelada com o substrato de peroxidase 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma) a 0,6 mg/mL. Foi utilizado como controle positivo 1 µg do anticorpo anti-hTNFα comercial (cat. htnfa-mba1, Invivogen) e negativo 1 µg de anticorpo IgG humano (WA 10452, Sigma), empregando como anticorpo secundário Goat anti-human IgG-HRP (cat. 2040-05, Southern Biotech) em diluição de 1:500.

3.5 Análise da produtividade específica (Q_p, *cell-specific productivity*)

O total de 1 x 10^7 v.c. de cada experimento (1A, 1B, 2A e 2B) foi separado em volume de 30 mL e cultivado a 37 ºC e 5% de CO_2 sob agitação de 150 rpm. Após 3 e 5 dias de cultivo, foram coletadas amostras de 1 mL para contagem do número de células viáveis em equipamento Vi-CELL e para recuperação do sobrenadante e quantificação de anticorpo expresso por ELISA sanduíche. O consumo de glicose também foi monitorado utilizando o sistema de dosagem por ultravioleta *UV Accu-Check Advantage II* (Roche, Basiléia, Suíça).

O cálculo de Q_p (produtividade específica) foi determinado a partir da relação entre a produtividade (g/L) e a integral da concentração de células viáveis (IVCC, *Integral Viable Cell Concentration*), indicador de crescimento celular em um cultivo, com resultado em pcd (pico-célula-dia). O Q_p foi calculado utilizando $Q_p = P_{g/L}/IVCC_t$, onde $P_{g/L}$ representa a concentração total de anticorpos quantificados por ELISA ou ressonância plasmônica de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*, BIAcore®), conforme item 3.6, em médias de duplicatas obtidas com diluições seriadas de 1:100 a 1:12.800, dividida pela IVCC total ($IVCC_t$), calculado por $IVCC_t = \sum IVC_i$, onde IVC representa a concentração de células viáveis no tempo $_i$ de análise, e que pode ser determinado por $IVC_i = 0{,}5 \times (X_{vi} + X_{vi-1}) \times (t_i - t_{i-1})$, sendo X_v a concentração de células viáveis (v.c./mL) em relação ao tempo t, onde $_i$ representa o tempo no ponto da análise e $_{i-1}$ no ponto anterior.

3.6 Geração de linhagem celular CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*

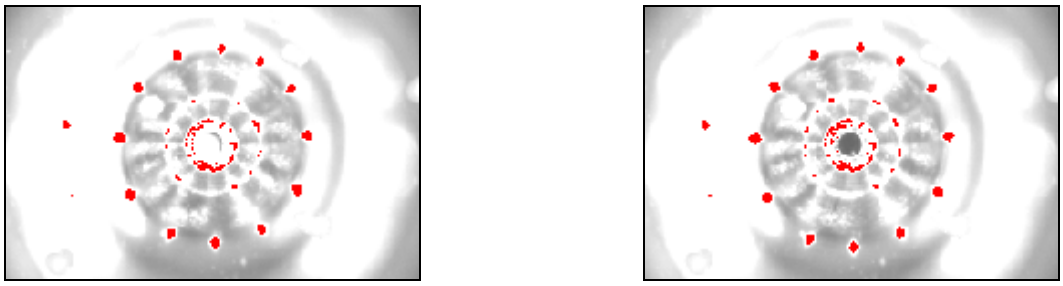
O isolamento monoclonal de recombinantes produtivos para a expressão de anti-TNFα adabut foi realizado utilizando o equipamento robótico ClonePix FL (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a partir das populações estáveis mistas mais produtivas. Para cada experimento, 300 células/mL foram adicionadas a 50 mL de meio semissólido CloneMedia CHO (Molecular Devices), totalizando 3 x 10^4 células em 100 mL de meio suplementado com 6 mM de Gln (Life Technologies) e 10.000 U do anticorpo anti-IgG H+L humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) CloneDetect (K8200, Molecular Devices) para detecção dos anticorpos expressos por microscopia óptica acoplada a um filtro de fluorescência (488/530 nm). As células foram divididas em microplacas de 6 poços (EquiGlass non TC, Molecular Devices) a 2 mL por poço, e submetidas a cultivo estático por 8-10 dias, sob 37 ºC/8% de CO_2. Após este período, as placas foram analisadas pelo programa ClonePix FL (Molecular Devices) para identificação de colônias monoclonais, onde cada poço foi subdividido em 6 seções, totalizando 36 seções por placa, expostas para aquisição de imagens com luz branca em intensidade 92 por 410 ms seguida de leitura por luz fluorescente em intensidade 128 por 1000 ms. A detecção de colônias monoclonais foi realizada utilizando o algoritmo "*Local Threshold*", ou seja, considerando a fluorescência individual emitida pela colônia quando comparada à fluorescência detectada em sua proximidade na placa, e selecionando-as para coleta de acordo com a intensidade de fluorescência média exterior (EMFI, *Exterior Mean Fluorescence Intensity*), tamanho e densidade/compactação da colônia, e distância entre colônias vizinhas.

As colônias que satisfizeram estes parâmetros e que apresentavam diâmetro ≥ 0,6 mm foram classificadas como "aceitas"; colônias intermediárias, de diâmetro ≤ 0,6 mm, foram consideradas "irregulares" e avaliadas individualmente para a possibilidade de coleta, sendo classificadas como "irregulares aceitas" ou apenas "irregulares" (rejeitadas). As colônias que apresentavam elevada irregularidade foram classificadas como "rejeitadas" e desconsideradas na análise, bem como demais colônias diretamente rejeitadas pelo programa.

As colônias "aceitas" e "irregulares aceitas" foram coletadas em uma placa de 96 poços contendo 200 µL de meio CD Forti CHO suplementado com 8 mM de Gln, onde o crescimento celular foi monitorado por microscopia óptica (Eclipse TS100, Nikon Inc., Melville, NY, EUA)

para a expansão do cultivo. A coleta da colônia pelo robô foi observada atraves de imagem gerada pelo equipamento, conforme demonstrado na figura 3.3.

Figura 3.3 - Coleta de colônia realizada pelo equipamento robótico ClonePix FL.



(a) (b)

Imagem captada pelo programa ClonePix FL mostrando a) colônia identificada com caráter de monoclonalidade e imagem adquirida b) após a coleta do clone e transferência para placa de 96 poços contendo meio de cultivo líquido. Entre cada etapa de coleta de um monoclonal, a agulha de punção é intensamente lavada com etanol 79%, não havendo risco de contaminação com células isoladas na coleta anterior.

A partir do quarto dia de cultivo a confluência dos poços foi acompanhada para transferência em microplacas de poliestireno de 24 poços próprias para cultivo de células (Corning) e, sequencialmente, microplacas de 6 poços e garrafas estéreis de policarbonato de 25 cm^2 (T25, Corning), as duas últimas com adição de agente anti-aglutinação a 1:1.000. Inicialmente os clones foram avaliados quanto ao crescimento e, nos intervalos do processo, por produtividade. A confluência foi individualmente qualificada como: i) suficiente, quando ≥ 70%; ii) intermediária, quando entre 40-70%; e baixa, quando ≤ 40%. Os poços qualificados como intermediário foram subdivididos entre “intermediário suficiente” e “intermediário baixo”, sendo eleitos para expansão os classificados como “suficiente” e “intermediário suficiente”. Os demais foram mantidos em cultivo e acompanhados periodicamente até transferência/descarte.

A tabela 3.2 mostra os critérios analisados para a transferência dos clones. Todas as colônias consideradas “aceitas” e “irregulares aceitas” foram transferidas do meio semissólido para microplacas de 96 poços, onde as colônias foram acompanhadas até confluência > 70% para transferência a placas de 24 poços. Nesta etapa, a presença de anticorpo foi detectada por ELISA, excluindo apenas clones que apresentavam baixa/nula concentração no sobrenadante, os demais foram transferidos para placas de 6 poços. A transferência das células de placas de 6 poços para garrafas T25 foi realizada considerando os clones que apresentavam melhor perfil de crescimento

celular e produtividade: concentração de anticorpo detectado por ELISA/número de células viáveis x 10^6 estimado pelo citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini* (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA). A transferência de T25 para frascos SF125 foi realizada após determinação da produtividade média específica por célula (PCD) em experimento de três dias, onde os clones escolhidos permaneceram monitorados para avaliação da capacidade de cultivo em suspensão a 150 rpm. Os clones adaptados e triados frente a um novo PCD de 5 dias foram aceitos para cultivo de batelada alimentada (*Fed-Batch*), onde o total de 0,3 x 10^6 células/mL foram cultivadas em 30 mL de meio CD Forti CHO suplementado com Gln a 8 mM e agente anti-aglutinação a 1:1.000 sob 37 ºC, 150 rpm e 8% CO_2 por 14 dias, com alimentação de glicose a 4 g/L nos dias 3 e 5 e a 6 g/L no dia 7. Foram coletadas amostras nos dias 3, 5, 7, 10, 12 e 14 para determinação do número e viabilidade celular e para quantificação de anticorpos por ELISA, estabelecendo assim a curva de produtividade de cada clone. As concentrações de anticorpo dos dias 3, 7 e 12 e 14 foram novamente mensuradas por SPR, utilizando *Human Antibody Capture Kit* (BR-1008-39, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) conforme instruções do fabricante e empregando uma curva padrão composta por diluições de 0 a 12 μg/mL do anticorpo produzido pela população estável mista da seleção 2B (anti-TNFα adabut/seleção 2B, item 3.3). As quantificações de anticorpo realizadas nos dias onde há produção acumulada (dias 12 e 14) permitiram maior fidedignidade na classificação dos clones mais produtivos, considerando o processo empregado. Ao longo de todas as etapas, as células foram congeladas para armazenamento em nitrogênio líquido, conforme detalhado no item 3.3. Ao final da geração de linhagem foram obtidos oito clones principais que tiveram suas células ampliadas e congeladas, primeiramente em sistema de banco de células de pesquisa, e para futura montagem do banco mestre de células (MCB).

Tabela 3.2 - Critérios utilizados para a seleção dos melhores clones ao longo do processo de geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*.

	Algorítmo de ClonePix FL	Cultivo			Produtividade			Ensaios Funcionais	
		Confluência >70%	v.c. x 10^6	Estabilidade	Presença de anticorpo	Absoluta	Específica (PCD)	Afinidade ao TNFα	Atividade Biológica
Meio semissólido	X								
Placas de 96 poços		X							
Placas de 24 poços		X			X				
Placas de 6 poços		X	X			X			
Garrafas T25		X					X		
Erlenmeyer SF125			X	X			X		
***Fed-Batch* SF125**			X	X		X		X	
Estabilidade 60 gerações			X	X			X	X	X
Classificação final	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Critérios considerados em cada uma das etapas da geração de linhagem para selecionar os melhores clones em estabilidade de cultivo, produtividade de anticorpo e sua atividade funcional. Nas primeiras etapas foram observados aspectos gerais como confluência das células nos poços e presença/ausência de anticorpos expressos. Com a ampliação do no número de células e, consequentemente, volume do cultivo, foi possível determinar a produtividade específica. Os clones selecionados seguiram em um cultivo de batelada alimentada para determinar a curva de produção e, posteriormente, os melhores classificados foram analisados quanto a estabilidade de expressão do anticorpo ao longo de 60 gerações. A classificação final considerou todas as variáveis analisadas no processo de geração de linhagem celular, incluindo a atividade funcional do anticorpo em dois diferentes ensaios *in vitro*.

3.7 Purificação de adabut do sobrenadante de cultivo

O anticorpo recombinante anti-hTNFα adabut expresso no sobrenadante de cultivo pelo hospedeiro CHO-S® foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) utilizando como fase estacionária uma coluna de afinidade em proteína A, a partir de protocolos pré-estabelecido no laboratório (SERPIERI et al., 2010). Inicialmente, os cultivos foram centrifugados a 3.000 x *g* ou rotação máxima em rotor F45-24-11 (Eppendorf) por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de polietersulfona (PES) de 0,22 µm (Millex GP, Millipore). A coluna *HiTrap rProtein A FF* (GE Healthcare) foi equilibrada com 5 volumes de coluna (CV, *Column Volume*) de tampão fosfato de sódio 20 mM (Synth, Diadema, SP, Brasil), pH 7,0, e a amostra clarificada aplicada a um fluxo de 0,5 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 até estabilização da leitura de DO_{280nm}, e o anticorpo eluído em tampão citrato trissódico 100 mM (Merck) pH 3,2. As frações que apresentaram leitura de DO_{280nm} foram coletadas, sendo o pH do eluato correspondente ao anticorpo imediatamente neutralizado com solução Tris-HCl 1M (Life Technologies). Por fim, a coluna foi regenerada com 5 CV dos tampões Glicina 50 mM (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil)/NaCl 150 mM (Synth) pH 2,3, e Tris 50 mM/NaCl 1 M, pH 8,6, e lavada com 5 CV de tampão Tris 50 mM e NaCl 150 mM, pH 8,6. Durante todas as etapas, foram coletadas alíquotas para visualização do perfil proteico em SDS-PAGE.

A amostra contendo o anticorpo purificado foi submetida à diálise em membrana de celulose para retenção molecular >14 kDa (*Dialysis tubing cellulose membrane*, Sigma), realizando trocas de tampão PBS após uma incubação de 16 h/4-8 ºC, seguida por uma troca após 5 h/4-8 ºC. O material foi filtrado em membrana de PVDF de 0,22 µm (Millex-GV, Millipore) e armazenado a -20 ºC. A concentração do anticorpo foi determinada por leitura em DO_{280nm}, a partir da fórmula $C_{mg/mL} = \{DO_{280nm}/[(\mathcal{E}_{molar} \times 10)/P.M.]\} \times 10$, onde $C_{mg/mL}$ representa a concentração de anticorpo em mg/mL, DO_{280nm} a leitura de absorbância a 280 nm obtida de amostra purificada, $\mathcal{E}_{molar}$ o coeficiente de extinção molar e P.M. o peso molecular do anticorpo, ambos obtidos de predição *in silico* realizada com a ferramenta *ProtParam* (ExPaSy, apêndice B).

3.8 Cinética de ligação de anti-TNFα adabut ao rhTNFα

Os anticorpos anti-hTNFα adabut produzidos pelos clones recombinantes durante o experimento de batelada alimentada (item 3.6) foram purificados (item 3.7) e avaliados quanto a afinidade por cinética de ligação ao rhTNFα por SPR em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare). Para a análise, o TNFα (Invivogen) foi imobilizado em sensores CM5 (*Sensor Chip CM5*, GE Healthcare) utilizando o método de ligação por amina: TNFα a 10 µg/mL em tampão acetato pH 5,0; tempo de contato de 420 s a 10 µL/min sob 25 ºC.

Os estudos de cinética foram feitos na abordagem de ciclos múltiplos. Foram cinco concentrações de cada amostra, 0 a 20 µg/mL, fator 2, aplicadas por 180 s a 30µL/min em tampão de corrida HBS-EP (HBS-N - Hepes 0,01 M pH 7.4 e NaCl 0,15 M - com EDTA 3 mM e Tween 20 a 0,005%). Após dissociação de 540 s, a regeneração foi feita com pulso de 15 µL de HCl 100 mM. As constantes cinéticas, k_a (ou k_{on}) (1/Ms) de associação e k_d (ou k_{off}) (1/s) de dissociação, foram calculadas pelo modelo de interação 1:1 de Langmuir. A afinidade da ligação (K_D), expressa em M, foi determinada a partir da razão $K_D = k_d/k_a$, o resultado para cada clone representa a média de dois experimentos independentes. As afinidades ao TNFα dos anticorpos produzidos pelos diferentes clones foram comparadas entre si e entre à do anticorpo controle adalimumabe (Humira®) por análise estatística de variância (ANOVA) não paramétrica - teste de Friedman ou teste t de Student, utilizando o programa GraphPad Prism 5®.

3.9 Atividade funcional do anticorpo adabut

A atividade funcional do anticorpo monoclonal anti-hTNFα adabut recombinante foi avaliada em dois ensaios que demonstram a capacidade de bloqueio da função biológica do TNFα.

3.9.1 Neutralização de citotoxicidade induzida por TNFα em células L929

O ensaio de neutralização de citotoxicidade induzida por rhTNFα em fibroblastos murinos L929 sensibilizados foi adaptado de Hansen, Nielsen e Berg, 1989 e Salfeld et al., 2000 e baseia-se na capacidade do anti-TNFα em inibir morte celular após incubação com rhTNFα, em até 24 h.

Inicialmente, fibroblastos L929 (CCL-1, ATCC, Manassas, VA, USA) foram cultivados para estabelecer a curva de crescimento celular, onde o total de 1 x 10^6 v.c. em 10 mL de meio DME/F12 (Sigma) e soro fetal bovino (SFB, Cultilab) a 10% foram distribuídas em diferentes garrafas estéreis de poliestireno de 50 mL e filtro de 2 µm (T50, Corning) para cultivo estático e contagem do número de células após 24, 48, 72 e 96 horas pelo método de azul de tripano 0,4% (Sigma) diluído em PBS. O tempo de duplicação foi estimado a partir da média de quatro contagens de $t_i - t_{i-1}$ obtidas na fase exponencial do cultivo. As células foram investigadas para a ausência de Mycoplasma pelo método de luminescência *MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit* (Lonza, Walkersville, MD, USA).

Para estabelecer a curva de toxicidade de rhTNFα em fibroblastos L929, o total de 5 x 10^4 células/poço (1x10^6 células/mL) em meio DME/F12, 10% FCS, 2 mM Gln (HyClone, Logan, UT, EUA) foram incubadas com rhTNFα em concentrações de 40 ng/mL a 0,01 ng/mL, volume de 50 µL, incluindo o agente sensibilizador actinomicina-D (Sigma) a 1 µg/mL em 50 µL. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços (Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific) a 37 ºC sob CO_2 a 5% por 20 h, e, após este período, a viabilidade celular foi quantificada pelo método colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) que compreende a redução de sais de tetrazólio a formazan por enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). Para tal, o volume de 100 µL do sobrenadante foi cuidadosamente removido para a adição de 50 µL de MTT (Sigma) a 5 mg/mL diluído em PBS estéril. A placa foi novamente incubada a 37 ºC sob CO_2 a 5% por 4 h, sendo em seguida adicionados 50 µL de SDS (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 20% para dissolução completa dos sais de formazan, em incubação a 37 ºC por 20 h. Por fim, as densidades ópticas foram mensuradas em DO a 540 ou 595 nm. O experimento foi realizado em duplicatas utilizando como controle células L929 contendo apenas meio de cultivo (controle negativo) e células L929 com apenas anti-TNFα adabut/seleção 2B, para avaliar também o efeito de toxicidade celular causado pelo anticorpo purificado.

A janela de neutralização do anti-TNFα, ou concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}), foi realizada para os anticorpos produzidos pelos clones melhor classificados e para o adalimumabe (Humira®). Inicialmente o experimento foi padronizado com os anticorpos anti-TNFα adabut/seleção 2B purificado e controle anti-hTNFα comercial (Invivogen) diluídos serialmente 1:2 em meio DME/ F12, 10% SFB, 2 mM Gln em concentrações de 33 µg/mL a 16

ng/mL ou 1 μg/mL a ~0,5 ng/mL por poço, volume de 100 μL, e incubados com rhTNFα na concentração final de 10 ng/mL, volume de 50 μL a TA por 30 min. O ensaio de MTT foi realizado utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente. A IC_{50} dos anticorpos produzidos pelos diferentes clones foi determinada em três a quatro experimentos independentes com auxílio do programa GraphPad Prism 5. A média foi comparada à IC_{50} obtida para o anticorpo controle adalimumabe (Humira®) através do teste estatístico t de Student, utilizando o programa Microsoft Excel®. Os clones produtores de anticorpos com atividade funcional inferior a de adalimumabe foram descontinuados e os demais, estatisticamente equivalentes, foram avaliados em um segundo experimento de caracterização funcional, conforme segue.

3.9.2 Inibição da expressão de ELAM-1 em células HUVEC

O protocolo de inibição da função efetora de TNFα para a expressão de moléculas de adesão ao endotélio de leucócitos (ELAM-1, *Endothelial cell Leukocyte Adhesion Molecule-1*) em células humanas de endotélio umbilical (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) foi desenvolvido com base em Bevilacqua et al., 1994, Polchow et al., 2012, Salfeld et al., 2000 e Zeller et al., 2012. O equivalente a 0,15 x 10^6 células/mL HUVEC (CC-2519, Lonza) foram cultivadas em meio EGM completo (Lonza) a 37 ºC por 16-18 h em placas de 24 poços. Em seguida, o meio de cultivo foi cuidadosamente removido para a adição de uma reação antígeno-anticorpo contendo anti-hTNF-α na concentração final de 300 μg/mL e TNFα em concentrações de 50, 100 e 200 ng/mL, previamente homogeneizada e incubada por 30 min a TA. As células foram mantidas com a reação durante 4h e em seguida marcadas para a análise qualitativa da expressão de selectinas. Assim, após o período de incubação, o sobrenadante de cultivo foi recuperado para a quantificação paralela de TNFα livre/residual por SPR e as células incubadas com *Fc Blocking Reagent* (BD Biosciences) para impedir o reconhecimento inespecífico dos anticorpos a receptores de Fc (FcRs, *Fc receptors*) de membrana celular, conforme condições recomendadas pelo fabricante. O anticorpo murino anti-ELAM-1 humano IgG2a (AHS6211, Life Technologies) a 1 μg/mL, volume de 0,2 mL, foi incubado com a reação nas células por 1h a TA. Em seguida, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS para a adição do anticorpo secundário anti-mouse IgG marcado com FITC (F2883, Sigma) a 1:128, volume de 0,2 mL, por 1h/TA. As células foram novamente lavadas com PBS e, por fim, visualizadas em

microscopia de fluorescência (Eclipse TE300, Nikon). A quantificação do TNFα livre a partir do sobrenadante de cultivo foi realizada em plataforma BIAcore utilizando o sensor CM5 sensibilizado via ligação amino com anti-TNFα (Invivogen). Para tal, uma solução do anticorpo a 25 µg/mL em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,5 foi aplicada no sensor ativado com NHS/EDC (N-hidroxisuccinimida/ hidrocloreto de 1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil) carbodiimida), em reação realizada a 25 °C. Para a tentativa de quantificação do TNFα livre foi utilizado como referência uma curva de TNF de 0 até 100 ng/mL.

Como controle da reação as células foram incubadas com apenas TNFα, meio de cultivo ou o anticorpo anti-TNF adalimumabe (Humira®). Além destes, com o intuito de investigar a possibilidade de toxicidade intrínseca às células humanas, os anticorpos produzidos também foram incubados em cultivo, isoladamente.

3.10 Estabilidade de clones produtores de anti-hTNFα

A análise da estabilidade de expressão de anti- hTNFα foi realizada a partir de um cultivo prolongado durante 60 gerações utilizando o meio Dynamis AGT (*Life Technologies*) suplementado com 8 mM de glutamina e agente anti-aglutinação a 1:1000, sob 37 ºC, 150 rpm e 8% CO_2. Ao longo de todas as passagens, realizadas a cada 3-4 dias, foram coletadas amostras para a quantificação de anticorpos por BIAcore (item 3.6) e para a determinação do número de células/viabilidade. A produtividade específica (PCD) foi comparada nas gerações 0, 25, 45 e 60 em um cultivo paralelo e simultâneo de duração de cinco dias.

3.11 Avaliação de clones produtores de anti-hTNFα de segunda geração

Inicialmente o sensor NTA (*Sensor Chip NTA*, GE Healthcare) foi equilibrado em tampão contendo HBS-N (Hepes 0,01 M pH 7.4 e NaCl 0,15 M), Tween 20 a 0,00 5% e EDTA a 50 µM e sensibilizado com $NiCl_2$ 500 mM por 60 s a 10 µL/min. Os receptores FcγRI ou FcγRIIB/C (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) foram capturados a 5 µg/mL por 60 s a 10 µL/min, em reação a 25 ºC e, em seguida, os anticorpos purificados, produzidos pelos diferentes clones, foram avaliados quanto a cinética do tipo *single cycle* para cálculo de afinidade de ligação (K_D). Foram utilizadas cinco concentrações diferentes de amostra, variando de 1,25 a 20 µg/mL, razão

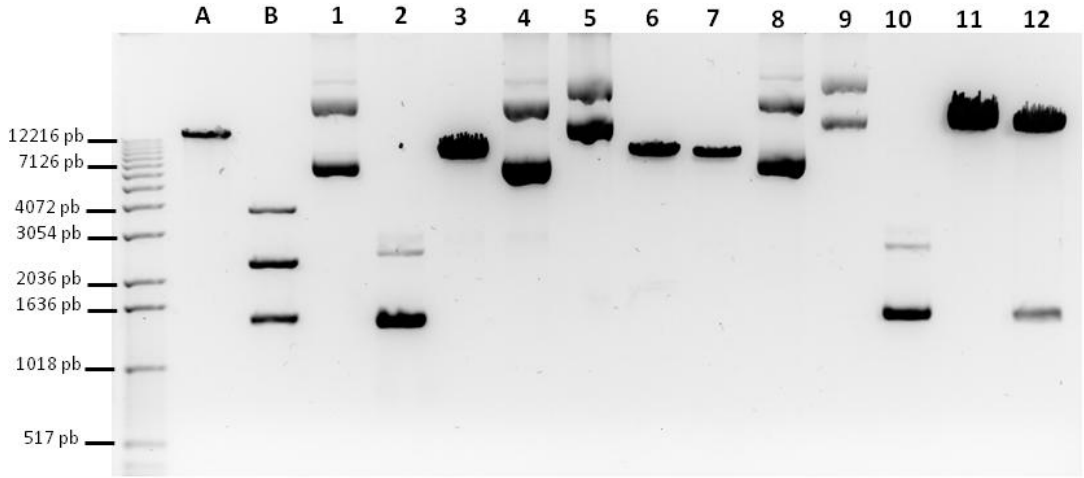
1:2, e sob 240 s de contato, 600 s de dissociação e fluxo de 30 µL/min. A regeneração do sensor foi realizada com ~0,3 M EDTA dissódico por 60 s a 30 µL/min. O ensaio de cinética foi realizado em dois experimentos independentes, sendo a média da constante K_D comparada pela análise de variância (ANOVA) não paramétrica - teste de Friedman utilizando o programa GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem de cadeias leve e pesada do anticorpo anti-hTNFα

As sequências gênicas das cadeias leve e pesada do anticorpo anti-TNFα, sintetizadas a partir de construções contendo os elementos necessários para a expressão em hospedeiro CHO, foram removidas do vetor de transporte e clonadas em vetor de expressão pCHO 1.0. Dentre os protocolos testados, a proporção vetor/inserto de 1:3 em reação a 16 ºC e 20 h foi a que permitiu clonagem de *HC* em pCHO 1.0, apresentando eficiência de transformação de 5 x 10^7 UFC/ μg DNA. Do total de 12 clones analisados nesta condição, apenas um se mostrou recombinante para *HC*, o clone 12 apresentado na figura 4.1, o qual foi ampliado para inserção de *LC*.

Figura 4.1 - Visualização de DNA em gel de agarose em experimento para confirmação da clonagem de inserto *HC* em pCHO 1.0.



Gel de agarose a 1% mostrando em **A**: pCHO 1.0 de 12988 pb, **B**: plasmídeo de transporte-HC com liberação do inserto *HC* de 1434 pb e em **1** a **12** os clones analisados por dupla digestão enzimática para liberação do inserto *HC* quando clonado no vetor plasmidial. Apenas o clone 12 apresentou dois componentes moleculares de tamanho esperado para o vetor plasmidial e inserto *HC*, sendo, portanto, ampliado para posterior clonagem de *LC*.

A clonagem de *LC* em pCHO 1.0/*HC* foi possível apenas através da razão vetor/inserto de 1:3,5, em protocolo de ligação a 23 ºC e 20 h que apresentou eficiência de transformação de 9,4 x 10^6 UFC/μg DNA. Foram triados 16 clones nesta condição, sendo obtidos 15 recombinantes que originaram um plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* de ~15 Kb. Dos 15 clones recombinantes, 6 foram escolhidos para confirmar a preservação de *HC* em ensaio de dupla digestão enzimática.

Todos apresentaram o gene quando analisados em eletroforese. Dos 6 clones recombinantes para *HC* e *LC*, 3 foram escolhidos aleatoriamente para confirmação da sequencia de nucleotídeos (item 4.1.1).

A escolha de sequências *VH* e *VL* do anticorpo adalimumabe para clonagem e desenvolvimento do anti-TNFα adabut deu-se no início do projeto em 2012. Tratava-se do primeiro anticorpo inteiramente humano com prazo próximo para expiração de patente. O anticorpo apresentava resultados clínicos seguros (DEN BROEDER et al., 2002; RAU et al., 1999) e correspondendo a uma das principais frações de gastos do MS na importação de medicamentos (BRANDÃO et al., 2011; MONTEIRO; ZANINI, 2008).

Embora a eficiência de transformação de *HC* em pCHO 1.0 tenha sido maior do que a para *LC* em pCHO 1.0/*HC*, o número de clones recombinantes obtidos foi menor (1 em 12 analisados) quando comparado aos recombinantes pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* (14 de 15 analisados). O resultado indica que o protocolo de ligação utilizado para *HC* em pCHO 1.0 pode ser otimizado além das condições testadas. A melhoria na ligação pode estar associada à mudança no protocolo que, para *LC* em pCHO 1.0/*HC*, foi realizado incluindo prévia defosforilação das extremidades do plasmídeo linearizado com a enzima CIAP.

*4.1.1 Sequenciamento automático de clones pCHO 1.0/***HC-LC.adabut** *recombinantes*

A confirmação da clonagem e integridade gênica das construções projetadas (item 3.1.1) foi realizada por sequenciamento automático em três clones que se mostraram recombinantes para ambos os genes *HC* e *LC*. Cada reação utilizou 500 ng de DNA plasmidial e 1,6 ρmol de oligonucleotídeo iniciador. A análise confirmou identidade de 100% com as sequências dos genes de cadeia leve e pesada de anti-TNFα sintetizados com códons otimizados e suas regiões plasmidiais adjacentes. O número de nucleotídeos sequenciados por cada oligonucleotídeo iniciador está apresentado na tabela 4.1.

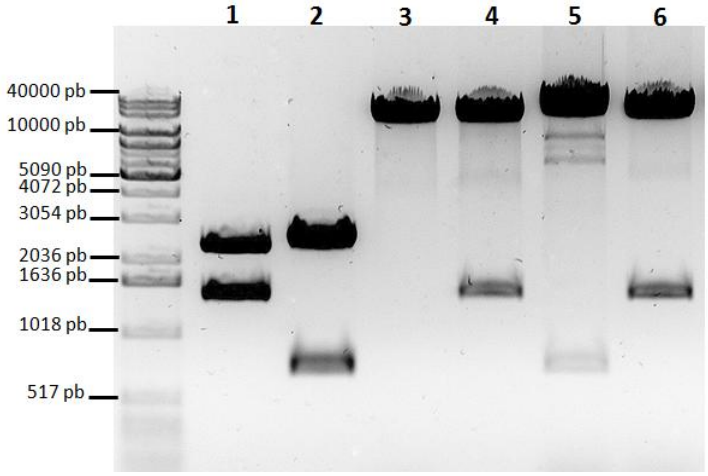
Tabela 4.1 - Número de nucleotídeos (nt) de *HC* e *LC* sequenciados em cada respectivo oligonucleotídeo iniciador.

Clone/ Cadeia	Iniciador*	Início de sequenciamento	Término do sequenciamento	Nº de nt sequenciados em pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*
Clone 02/ HC	adabut/ HC-R1 (HC1)	**1 nt**	479 nt	479
Clone 02/ HC	adabut/ HC-R2 (HC2)	221 nt	980 nt	760
Clone 02/ HC	adabut/ HC-R3 (HC3)	611 nt	1385 nt	775
Clone 02/ HC	adabut/ HC-F1 (HC4)	933 nt	**1434 nt**	502
Clone 02/ LC	adabut/ LC-R1 (LC1)	**1 nt**	379 nt	379
Clone 02/ LC	adabut/ LC-R2 (LC2)	**1 nt**	654 nt	654
Clone 02/ LC	EP-For_pCHO (LC3)	**1 nt**	552 nt	552
Clone 02/ LC	EP-Rev_pCHO (LC4)	198 nt	**725 nt**	528
Clone 04/ HC	adabut/ HC-R1 (HC1)	**1 nt**	479 nt	479
Clone 04/ HC	adabut/ HC-R2 (HC2)	174 nt	991 nt	818
Clone 04/ HC	adabut/ HC-R3 (HC3)	605 nt	1385 nt	781
Clone 04/ HC	adabut/ HC-F1 (HC4)	930 nt	**1434 nt**	505
Clone 04/ LC	adabut/ LC-R1 (LC1)	**1 nt**	389 nt	389
Clone 04/ LC	adabut/ LC-R2 (LC2)	**1 nt**	654 nt	654
Clone 04/ LC	EP-For_pCHO (LC3)	**1 nt**	594 nt	594
Clone 04/ LC	EP-Rev_pCHO (LC4)	397 nt	**725 nt**	329
Clone 05/ HC	adabut/ HC-R1 (HC1)	**1 nt**	483 nt	483
Clone 05/ HC	adabut/ HC-R2 (HC2)	294 nt	976 nt	683
Clone 05/ HC	adabut/ HC-R3 (HC3)	589 nt	1386 nt	798
Clone 05/ HC	adabut/ HC-F1 (HC4)	930 nt	**1434 nt**	505
Clone 05/ LC	adabut/ LC-R1 (LC1)	**1 nt**	377 nt	377
Clone 05/ LC	adabut/ LC-R2 (LC2)	**1 nt**	647 nt	647
Clone 05/ LC	EP-For_pCHO (LC3)	**1 nt**	573 nt	573
Clone 05/ LC	EP-Rev_pCHO (LC4)	148 nt	**725 nt**	578

*Oligonucleotídeos iniciadores senso (F) e antisenso (R). Destaque para início e término do gene sequenciado.

Dos 3 clones com sequências confirmadas, um deles foi aleatoriamente escolhido para dar continuidade ao protocolo de clonagem em célula eucariótica. A figura 4.2 mostra o clone escolhido para transfecção em hospedeiro CHO, com liberação de insertos *LC* e *HC*.

Figura 4.2 - Visualização de DNA em gel de agarose após clonagem de insertos *LC* e *HC* em pCHO1.0.



Gel de agarose a 0,8% mostrando o clone pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* escolhido para transfecção em célula eucariótica CHO-S®, onde **1**: *HC*: 1434 pb e plasmídeo de transporte-HC: 2278 pb; **2**: *LC*: 725 pb e plasmídeo de transporte-LC: 2374 pb; **3**: pCHO 1.0: 12988 pb; **4**: pCHO 1.0/*HC*: 14422 pb; **5**: pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* (15147 pb), com os fragmentos pCHO 1.0/*HC* (14422 pb) e inserto *LC* (725 pb) liberado por digestão enzimática; e **6**: pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* (15147 pb), com os fragmentos pCHO 1.0/*LC* (13713 pb) e *HC* (1434 pb).

4.2 Transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em hospedeiro CHO-S® para expressão de anti-hTNFα adabut

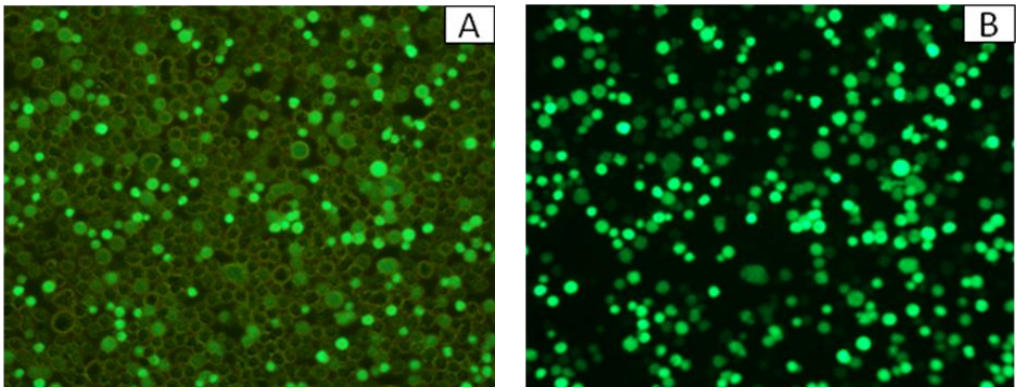
A transfecção da construção plasmidial pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi realizada em hospedeiro CHO-S®, conforme detalhamento a seguir:

4.2.1 Controle de eficiência da transfecção

O controle da lipofecção em hospedeiro CHO-S® com o plasmídeo contendo *GFP* foi verificado por microscopia óptica (figura 4.3), onde através da fluorescência emitida observa-se que as células foram capazes de expressar a proteína GFP. Esta análise foi importante, pois permitiu confirmar a efetividade dos reagentes e protocolo de lipofecção que não haviam sido

testados no laboratório, fazendo-se desnecessário padronizar a transformação por eletroporação, protocolo mais agressivo à célula e que apresentou, em resultados anteriores obtidos pelo laboratório, menor taxa de internalização do DNA na célula.

Figura 4.3 - Células CHO-S® transfectadas com vetor plasmidial contendo *GFP* em experimento realizado para controle da lipofecção.



Visualização de células CHO-S®/*GFP* por microscopia óptica acoplada a um filtro de fluorescência (488/530 nm) em aumento de 10x20. **A**: para filtros com emissão de luz branca e fluorescente e **B**: apenas fluorescente. O vetor plasmidial linearizado contendo *GFP* e reagente para lipofecção foram lentamente adicionados às células CHO-S® provenientes de um cultivo em suspensão de viabilidade celular >95% realizado em meio quimicamente definido e livre de componentes de origem humana ou animal. Após 48 h de cultivo a 37 ºC, 150 rpm, 8% de CO_2 e 70-80% umidade as células foram visualizadas em microscopia. A expressão da proteína verde fluorescente confirma a efetividade do protocolo de lipofecção empregado às células CHO-S®.

*4.2.2 Produção de lotes de plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut

Após constatação da correta inserção das sequências gênicas para HC e LC de anti-TNFα em pCHO 1.0, a construção pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi preparada para transfecção em hospedeiro CHO-S® e geração da população estável mista. O plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* ampliado em *E. coli* foi recuperado até a obtenção de um lote de trabalho de concentração >1 mg/mL e grau de pureza >1,9 quando analisado sob leitura de DO em razão 260 nm/280 nm. Foram produzidos três lotes do vetor, testando eluições em tampão TAE ou água Milli-Q e volume mínimo recomendado de 100 µL. Os dados estão apresentados na tabela 4.2. O lote 3 apresentou ~3 mg/mL, $DO_{260/280nm}$ = 1,9 e foi o empregado para a transfecção em células CHO-S®.

Tabela 4.2 - Lotes de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* produzidos para obtenção de material com elevados grau de pureza e concentração.

Lote	Eluição	DO_{260nm}	DO_{280nm}	$DO_{260/280nm}$	Concentração (µg/mL)
Lote 1	TAE (200 µL)	0,464	0,243	1,91	1161
Lote 2	Água (100 µL)	0,752	0,457	1,64	1882
Lote 3	TAE (100 µL)	1,156	0,604	1,91	2890

Os diferentes lotes foram produzidos com o intuito de se obter um material concentrado, estéril e ausente de contaminantes que poderiam prejudicar a eficiência da transfecção no hospedeiro. A eluição em tampão TAE realizada no lote 1 não permitiu uma completa solubilização dos grumos de DNA em volume de 100 µL ou mesmo quando dobrado para volume final de 200 µL. Apesar do grau de pureza satisfatório, o material recuperado em 200 µL apresentou concentração insuficiente para o propósito desejado. Por este motivo, foi testada a eluição em 100 µL de água estéril, eluente de menor viscosidade do que o TAE, entretanto, ainda assim não foi possível a total solubilização do DNA, que aliada a redução no grau de pureza do material originou em um lote insatisfatório. A estratégia empregada para a produção do lote 3, eluição em 100 µL de TAE, originou com sucesso um material mais concentrado, preservando o grau de pureza desejado, previamente observado no lote 1.

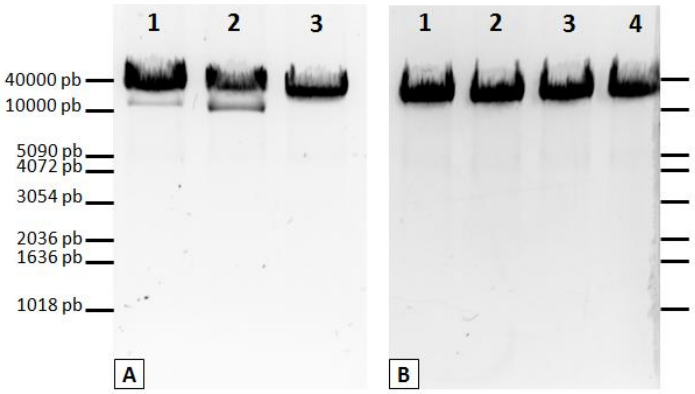
Na etapa de extração da massa de DNA produzido pelo cultivo bacteriano foi imprescindível aceitar apenas material com concentração alta, condição necessária para viabilizar a linearização do vetor (item 4.2.3) sem que a reação diluísse o material impedindo sua utilização na lipofecção, além de estéril e ausente de contaminantes que poderiam prejudicar a eficiência da transfecção no hospedeiro, como endotoxinas e agentes químicos, que poderiam causar morte celular, ou sais, que poderiam interferir na complexação lipídica do DNA. O volume, viscosidade e pureza do eluente influenciaram para a obtenção de um lote satisfatório, isento de grumos de DNA. Os grumos não solubilizados foram removidos por centrifugação.

*4.2.3 Transfecção de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut *em CHO-S®*

Com o objetivo de estabelecer o protocolo ideal para a completa linearização de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em quantidades maiores do que 50 µg, etapa prévia à transfecção em CHO-S®, o total de 0,5 µg de DNA plasmidial foi testado em digestão com *Nru*I otimizando para variáveis de tempo de incubação a 37 ºC e concentração enzimática. Embora o protocolo recomendado pelo fabricante indique que 1 U de enzima seja capaz de digerir 1 µg de DNA do bacteriófago λ em reação a 37 ºC por 1 h, o gel de agarose apresentado na figura 4.4 mostra que nestas condições foram necessárias 3 U da enzima para total linearização do plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*. Já a digestão realizada durante 3 h em tampão com presença de BSA foi

capaz de linearizar completamente o plasmídeo com apenas 1 U da enzima (figura 4.4). Para confirmar a eficiência de digestão de 1 U de *Nru*I a 37 ºC em 3 h, foram testadas digestões com concentrações mais altas de DNA: 0,5 µg, 0,75 µg, 1 µg, 1,25 µg e 1,5 µg. Todas elas apresentaram perfil de linearização completa do DNA.

Figura 4.4 - Análise de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em gel de agarose em experimento de otimização da linearização plasmidial com *Nru*I.

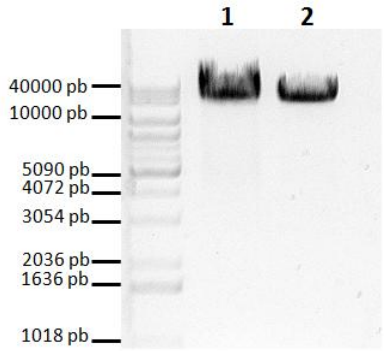


Gel de agarose a 0,8% mostrando pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em incubação a **A**: 1 h/37 ºC, com *Nru*I a **1**: 1 U, **2**: 2 U e **3**: 4 U; e a **B**: 3h/37 ºC, utilizando *Nru*I a **1**: 1 U, **2**: 2 U, **3**: 3 U e **4**: 4 U. O experimento mostra a influencia do tempo na atividade enzimática de *Nru*I para a clivagem sítio específica da construção pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*. A concentração de 1 U enzimática foi efetiva para a total linearização do vetor em condições otimizadas de 3 h.

Considerando a eficiência da digestão de 0,5 µg de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* com 1 U de *Nru*I a 37 ºC em 3 h, e a concentração de DNA do lote 3 de 2,8 µg/µL, foi realizado um escalonamento para linearização de 200 µg de DNA, quantidade escolhida por segurança devido as perdas esperadas durante a digestão e filtração estéril do material. Assim, seriam necessárias 400 U da enzima em volume de reação de 400 µL (incluindo o volume de enzima e tampão de uso). Esta proporção compreende o volume máximo de reação para preservar a concentração final de DNA linear desejado à lipofecção, ou seja, em torno de 50 µg em 100 µL.

A digestão de 200 µg de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi realizada com 400 U de *Nru*I a 37 ºC por 4 h, incluindo um controle positivo de digestão de 0,5 µg do plasmídeo com 5 U da enzima. A reação contendo DNA diluído para 0,50 µg/µL foi submetida à filtração estéril e novamente quantificada, apresentando no término do experimento concentração de 0,46 µg/µL. A eficiência da linearização foi confirmada em eletroforese e está apresentada na figura 4.5.

Figura 4.5 - Análise de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* em gel de agarose para controle da total linearização plasmidial.



Gel de agarose a 0,8% mostrando **1**: 0,5 µg do plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* digerido com 5 U da enzima *Nru*I para controle positivo da reação, e **2**: o plasmídeo linearizado em reação de digestão de 200 µg de DNA. Em ambos os experimentos observa-se completa linearização do vetor. Etapa realizada previamente à lipofecção em hospedeiro CHO-S® para expressão de anti-TNFα adabut.

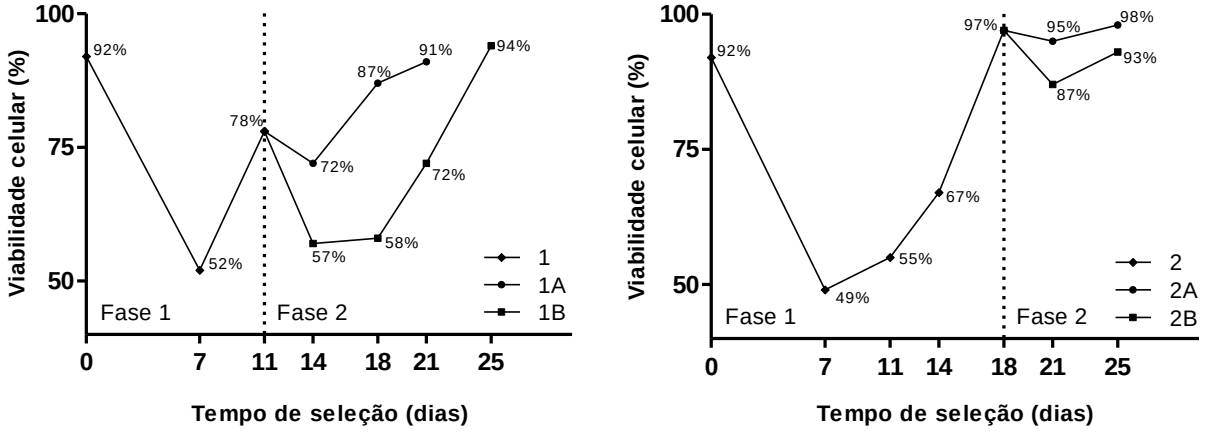
O manual do produto *Freedom CHO* (Life Technologies) sugere diversos sítios de restrição enzimática para a linearização de pCHO 1.0 e a escolha pelo sítio de clivagem em *Nru*I mostrou-se eficiente e segura para a construção gênica de adabut. Devido à síntese otimizada de códons, este sítio cliva seletivamente no gene *aph* de resistência à canamicina, necessário apenas para seleção de transfectantes na etapa de clonagem em *E. coli*, e dispensável à expressão em hospedeiro eucariótico. A reação necessária para digestão de grandes quantidades de DNA plasmidial poderia diluir o material inviabilizando seu uso para lipofecção, motivo pelo qual foi necessário otimizar o protocolo de uso. O total de 200 µg de pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi digerido com sucesso por *Nru*I e o material filtrado de forma estéril para transfecção em célula CHO-S® apresentou perda de 0,04 µg/µL de DNA.

4.3 Seleção de clones CHO®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes

O início da seleção de clones CHO-S® transfectados com pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi observado logo na primeira fase de adição dos agentes seletores puromicina e MTX, realizada com 10 P/100 M para o experimento 1 ou 20 P/200 M no experimento 2. A viabilidade celular decaiu em torno de 50% no sétimo dia de cultivo, apresentando recuperação para em torno de 80% no dia 11 de cultivo no experimento 1, e recuperação gradual que atingiu 97% no dia 18 de cultivo para o experimento 2.

A recuperação da viabilidade celular >70% permitiu dar início à segunda fase de seleção, onde para o experimento 1 observou-se no experimento 1A, de concentrações 30 P e 500 M, um leve decaimento da viabilidade celular de 78% para 72% no dia 14, que foi recuperada a partir do dia 18 finalizando o experimento com viabilidade >90% no dia 21, e, no experimento 1B, de concentrações 50 P e 1000 M, um decaimento mais acentuado da viabilidade, de 78% para 57% no dia 14, percentual mantido até o dia 18 e que mostrou recuperação a partir do dia 21, com viabilidade >90% e término do experimento apenas no dia 25. No experimento 2, a viabilidade celular foi preservada com o aumento de 20 P e 200 M para 30 P e 500 M (experimento 2A) e reduzida em 10% quando as concentrações de P/M foram aumentadas para 50 P e 1000 M (experimento 2B), encerrando ambos os experimentos no dia 25 (figura 4.6).

Figura 4.6 - Curvas de viabilidade celular em seleção de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes.



(a) **(b)**

A viabilidade celular de transfectantes CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi monitorada a partir de cultivo em suspensão com o intuito de selecionar a população estável mista após tratamento com os agentes seletores Puromicina e MTX. As curvas mostram dois experimentos independentes que variaram em concentração de agente seletor. (**a**) 1 indica a primeira fase de seleção com 10 P/100 M e 1A e 1B a continuidade com uma segunda fase de seleção utilizando respectivamente 30 P/500 M e 50 P/1000 M; (**b**) 2 indica a primeira fase de seleção com 20 P/ 200 M e 2A e 2B a segunda fase, com uso respectivo de 30 P/ 500 M e 50 P/ 1000 M. P: puromicina em µg/mL e M: MTX em nM. As linhas pontilhadas indicam o ponto de recuperação da viabilidade celular para seguimento com o protocolo de seleção, da fase 1 para a fase 2 empregando concentrações mais altas dos agentes seletores.

O decaimento da viabilidade celular de CHO-S® observado com o acréscimo dos agentes seletores 10 P e 100 M para 50 P e 1000 M no experimento 1 (experimento 1B) pode indicar que a população celular não estava completamente selecionada pela concentração inicial utilizada ou ainda que, na mistura populacional, havia clones com variação no número de cópias de genes

inseridos. O aumento de pressão seletiva permitiu que apenas os clones contendo o plasmídeo pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* fossem cultivados e/ou que aqueles com poucas cópias gênicas ou inserção em sítios não produtivos fossem eliminados. Estes dados mostram a eficiência do protocolo de seleção que foi empregado.

O hospedeiro de expressão eucariótico CHO escolhido para este trabalho é amplamente utilizado na produção em grande escala de proteínas terapêuticas recombinantes (D'ANNA et al., 1997; DEAVEN; PETERSEN, 1973). Sua origem parenteral provém de uma célula aneuplóide estável de ovário de hamster chinês adulto (PUCK; CIECIURA; ROBINSON, 1958). A linhagem celular CHO-S® (*Life Technologies*™) provém de banco de células certificado em boas práticas de fabricação (cGMP, *Current Good Manufacturing Practice*), tendo sido adaptada para cultivos em suspensão de alta densidade utilizando meio ausente de componentes de origem animal (ACF, *Animal Component-Free*) e preservando a correta glicosilação proteica. A adaptação da linhagem CHO para o crescimento em suspensão utilizando meio de cultura quimicamente definido (linhagem denominada de CHO-S®) permite a expressão de imunobiológicos em condições de qualidade preconizadas para medicamentos injetáveis. Os primeiros meios empregados para o cultivo de células de mamíferos continham em sua composição soro fetal bovino ou proteínas de origem animal, entretanto, devido à dificuldade de atender requisitos regulatórios pela não homogeneidade dos lotes e presença de contaminantes indesejados, foram desenvolvidos meios livre de soro e com inclusão de hidrolisados vegetais. Os lotes compostos por hidrolisados apresentavam muita diferença entre si, motivo pelo qual foram desenvolvidas versões mais atuais, ACF e quimicamente definidos, como o meio CD Forti CHO utilizado neste trabalho.

4.4 Avaliação da expressão de adabut e reconhecimento a TNFα

Em paralelo ao protocolo de seleção executado (item 4.3), o sobrenadante de cultivo proveniente da transfecção transiente foi coletado durante as primeiras horas do experimento (primeira fase de seleção com agentes puromicina e MTX) para realização das seguintes análises preliminares:

4.4.1 Expressão do anticorpo recombinante adabut

A presença do anticorpo expresso foi verificada por SDS-PAGE e *immunoblotting* a partir de amostra centrifugada. O gel de poliacrilamida 12,5% mostrou dois compostos moleculares protéicos, um com tamanho em torno de 50 kDa e outro em torno de 25 kDa, tamanho correspondente ao esperado para as cadeias HC e LC de anti-TNFα adabut a partir de predição *in silico* que determinou para cadeia única o peso molecular de 72.781,7 Daltons, onde HC: 49,3 kDa e LC: 23,4 kDa, portanto 145,5 kDa para o anticorpo completo. O *immunoblotting* confirmou as bandas proteicas como cadeias de anticorpo (dados não mostrados). Estes resultados confirmaram que o anticorpo estava sendo expresso pelo hospedeiro, além de validar a construção gênica, onde se inclui o peptídeo sinal empregado, para expressar o anticorpo em meio extracelular (sobrenadante de cultivo).

4.4.2 Reconhecimento de adabut a TNFα

O anticorpo presente no sobrenadante de cultivo foi analisado frente ao reconhecimento de hTNFα por *immunoblotting*. A banda correspondente à aplicação de 500 ng da proteína hTNFα foi visualizada corretamente após coloração da membrana de PVDF com vermelho de Ponceau, mostrando que houve correta transferência, entretanto, não foram observadas bandas em revelação com DAB, nem mesmo para o anticorpo anti-TNFα utilizado como controle positivo. O experimento foi inconclusivo, porém, levantou-se a hipótese de que os anticorpos anti-TNFα são específicos para o reconhecimento de TNFα apenas em sua conformação tridimensional, forma biológica ativa (homotrímero), motivo pelo qual o experimento foi realizado pela metodologia de ELISA.

O ELISA foi padronizando inicialmente frente ao reconhecimento do anticorpo de cabra anti-IgG humano sensibilizado em placa a IgG humano e anticorpos anti-hTNFα (adabut e controle Invivogen). Foram testadas concentrações do conjugado que variaram de 1:500 até 1:32.000 e a diluição de 1:4.000 foi escolhida para uso pois permitiu leitura em uma faixa de DO_{450nm} em torno de 1,8 quando analisada para o reconhecimento de IgG humana total a 0,01 µg/mL, anticorpo utilizado como controle positivo. O anti-IgG humano sensibilizado em placas foi capaz de reconhecer o anticorpo adabut expresso no sobrenadante de cultivo e também

o anti-hTNFα controle (Invivogen). O resultado indica que não há necessidade de sensibilização das placas com a proteína hTNFα, reagente oneroso e de consumo limitante.

Para avaliar o reconhecimento de adabut ao hTNFα, as placas foram sensibilizadas com hTNFα em concentrações de 1,0 µg/mL a 0,03 µg/mL. Adabut reconheceu a proteína em todas as concentrações testadas, sendo obtidas as mesmas leituras para as concentrações sensibilizadas de 1,0 µg/mL e 0,5 µg/mL quando incubadas a 0,01 µg/mL e 0,002 µg/mL do anticorpo controle anti-TNFα (Invivogen) e para todas as diluições testadas do sobrenadante de cultivo (1:10, 1:20, 1:40 e 1:80).

4.5 Análise das produtividades absoluta e específica Q_p (ρg/célula/dia) nas populações mistas

A partir da confirmação da expressão do anticorpo no sobrenadante de cultivo e de sua capacidade de reconhecimento ao hTNFα, foi realizado um experimento para determinar a produtividade específica das populações estáveis mistas selecionadas diferencialmente pelos agentes puromicina e MTX (item 4.3). O experimento de PCD para cálculo de Q_p foi realizado em um cultivo em batelada (*batch*) de cinco dias onde se analisou o número de células viáveis, a concentração de anticorpo produzido e o consumo de glicose nos dias 0, 3 e 5 (tabela 4.3). No terceiro dia de experimento, o número de células viáveis apresentou variação de ~5 x 10^6 para o experimento 1B a ~7 x 10^6 para o experimento 2A, sendo finalizado no dia 5 com mínimo de ~13 x 10^6 e máximo de ~16 x 10^6, respectivamente nos mesmos experimentos. A menor produtividade de anticorpos foi obtida no experimento 1A, com concentrações de 24,57 µg/mL no dia 3 e 91,94 µg/mL ao término do cultivo no dia 5, quase 2 vezes inferior ao máximo produzido de 178,75 µg/mL ao término do experimento 2B. Considerando a produtividade específica, os experimentos 1B e 2B apresentaram valores de 5,9 pcd, enquanto que os experimentos 2A e 1A, respectivamente, de 4,4 e 3,2 pcd. Observou-se também que o consumo de glicose foi similar em todos os experimentos, reduzida em torno de 47% ± 3% no dia 3 e depletada ao término do cultivo.

Tabela 4.3 - Análise de produtividade específica (PCD) de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* a partir de cultivo de 5 dias.

Experimento	Dia 0			Dia 3			Dia 5			Q_p (pcd)
	v.c. ($x10^6$)	adabut (µg/mL)	Glicose (g/L)	v.c. ($x10^6$)	adabut (µg/mL)	Glicose (g/L)	v.c. ($x10^6$)	adabut (µg/mL)	Glicose (g/L)	
1A	0,33	0	6,40	5,49	24,57	2,83	14,73	91,94	<0,1	3,2
1B	0,33	0	6,40	4,96	57,39	2,87	13,53	153,41	<0,1	5,9
2A	0,33	0	6,40	6,88	46,98	3,21	16,48	150,23	<0,1	4,4
2B	0,33	0	6,40	6,05	53,68	3,20	15,14	178,75	<0,1	5,9

As células CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* de cada experimento de seleção (1A, 1B, 2A e 2B) foram cultivadas em meio CD Forti CHO completo durante 5 dias a 37 ºC, 150 rpm e CO_2 8% para determinar a produtividade específica das populações estáveis mistas. Ao longo do experimento foram coletadas amostras para contagem do número de células viáveis e quantificação de anticorpo expresso no sobrenadante de cultivo. O consumo de glicose também foi monitorado.

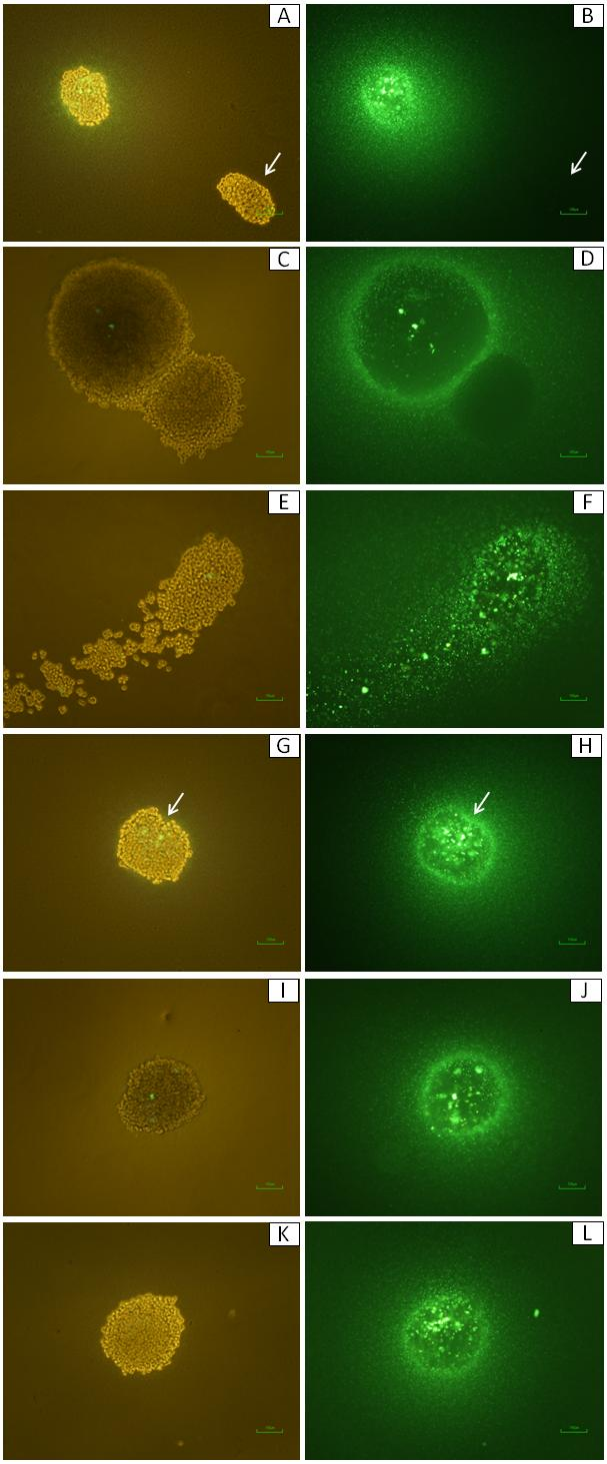
Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado conforme os dados apresentados nas curvas de seleção (figura 4.6), onde o emprego de maiores concentrações de agente seletor na segunda fase (experimentos 1B e 2B) pode ter influenciado na pressão seletiva de uma população mista transfectada estavelmente com a construção pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* portando um maior número de genes.

4.6 Geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*

Considerando os resultados de produtividade obtidos no experimento de PCD (item 4.5), as populações mistas selecionadas nos experimentos 1B e 2B foram escolhidas para o isolamento de clones produtores de anti-hTNFα adabut ou geração de linhagem celular CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*. Cada população foi dividida em quatro placas para cultivo em meio semissólido contendo anti-IgG H+L humano marcado com fluorocromo FITC durante 8 dias para o experimento 2B e 10 dias para o experimento 1B, momento em que as colônias foram visualizadas em microscopia de fluorescência (figura 4.7) para garantir que se apresentavam com tamanho e distribuição adequados (sem proximidade entre colônias) para identificação e coleta pelo equipamento robótico ClonePix FL. A partir da confirmação, as placas foram submetidas à aquisição de imagens e as colônias analisadas para isolamento e cultivo monoclonal. A etapa de aquisição e análise de imagens pode ser visualizada na figura 4.8, que apresenta exemplos das

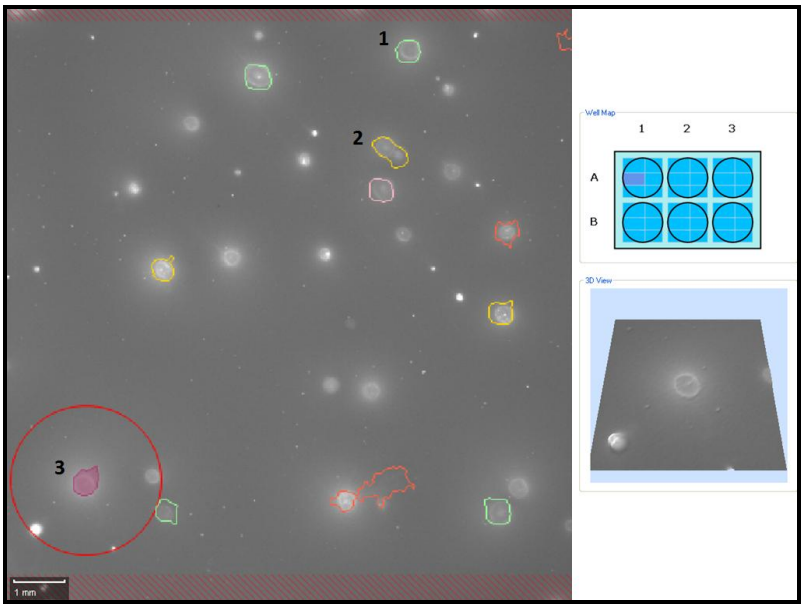
três principais classificações que estão sendo apresentadas: colônias “aceitas”, “rejeitadas” e “irregulares aceitas”.

Figura 4.7 - Colônias monoclonais isoladas a partir de cultivo em meio semissólido.



Visualização por microscopia óptica em aumento de 10x10 respectivamente para luz branca e fluorescência (488/530 nm). **A** e **B** correspondem a duas colônias celulares com seta indicando a ausência de fluorescência em uma delas, **C** e **D** duas colônias unindo-se, **E** e **F** uma colônia fragmentada, **G** e **H** clone irregular rejeitado e seta mostrando local de possível fusão com a dupla colônia, **I** e **J** clone irregular/aceito, e **K** e **L** clone aceito.

Figura 4.8 - Aquisição de imagens por equipamento robótico ClonePix FL para identificação e coleta de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* monoclonais.



Classificação diferencial de colônias por ClonePix FL, onde **1**: colônia "aceita", **2**: colônia "rejeitada", **3**: colônia "irregular/aceita". O cultivo realizado em placas de 6 poços utilizando meio semissólido é analisado pelo equipamento robótico para aquisição de imagens. Cada poço é subdividido em 6 seções e as colônias são classificadas conforme a fluorescência individual emitida, tamanho e densidade/compactação da colônia, e distância entre colônias vizinhas, etc.

Conforme resultados apresentados na tabela 4.4, considerando o total de 8 placas de experimentos, onde o experimento 1 representa a população 1B, placas 1 a 4 (1.1, 1.2, 1.3 e 1.4) e o experimento 2 a população 2B, placas 1 a 4 (2.1, 2.2, 2.3, 2.4), foram identificadas 4345 colônias, das quais 355 classificadas como "aceitas". Outras 969 colônias classificadas como levemente irregulares ("*irregular 2*") foram analisadas individualmente, das quais 105 foram identificadas e assumidas com parâmetros de monoclonalidade: perfil do halo de fluorescência emitida, isolamento em relação às demais colônias, tamanho/diâmetro e margem da população celular, sendo classificadas em um novo grupo como "irregulares aceitas". Ao todo, foram coletadas 460 colônias pelo equipamento, 10,5% do total de colônias identificadas, onde as "aceitas" representaram 7,7% e as incluídas como "irregulares aceitas" 2,4%. Esta estratégia objetivou ampliar o número de colônias recuperadas, preservando os critérios de monoclonalidade às reportadas com imprecisão em análise automatizada.

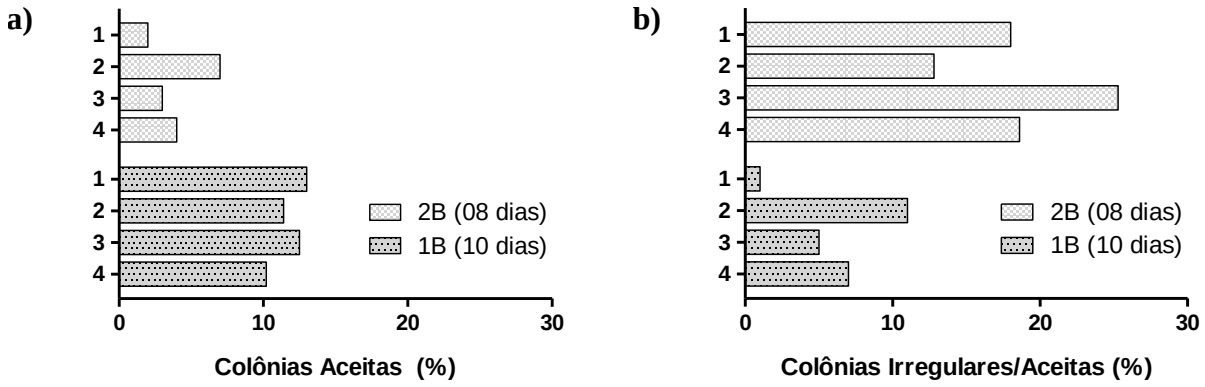
Tabela 4.4 - Número e classificação de colônias cultivadas em meio semissólido e transferidas para placas de 96 poços.

Experimento	Total de Colônias Identificadas	Colônias Aceitas (%)	Colônias Irregulares/ Aceitas (%/%)	Total de Colônias Coletadas (%)
1.1	723	94 (13)	205/2*(28/1)	96 (13)
1.2	499	57 (11)	109/13 (22/12)	70 (14)
1.3	634	79 (12)	194/11 (31/6)	90 (14)
1.4	354	36 (10)	56/4 (16/7)	40 (11)
2.1	657	18 (3)	100/18 (15/18)	36 (5)
2.2	472	33 (7)	109/14 (23/13)	47 (10)
2.3	545	18 (3)	99/25 (18/25)	43 (8)
2.4	461	20 (4)	97/18 (21/17)	38 (8)
Total:	4345	355 (8)	969/105 (22/2)	460 (10)

Os experimentos iniciados com numeração 1 representam origem da população de células 1B, e os de início com numeração 2, da população 2B. O número subsequente compreende a ordem sequencial das placas de 6 poços analisadas, cultivo em meio semissólido para transferência correspondente para placas de 96 poços contendo meio liquido. Do total de colônias identificadas, as classificadas como "aceitas" foram coletadas. As consideradas "irregulares" foram analisadas individualmente para inclusão como "aceitas". *q.s.p. 96 poços.

Analisando o número de colônias coletadas em ambos os experimentos (1B e 2B), observa-se que o experimento 1B, realizado em cultivo de 10 dias, apresentou maior número de colônias "aceitas" (tabela 4.4 e figura 4.9). As placas do experimento 1B apresentaram colônias de maior densidade populacional quando observadas visualmente em microscopia de fluorescência, variável que pode ter influenciado na diferenciação entre colônias "aceitas" e "irregulares" em análise automatizada. Neste sentido, o experimento 1B também apresentou menor número de colônias "irregulares aceitas" (figura 4.9).

Figura 4.9 - Distribuição percentual para **a)** colônias "aceitas" e **b)** colônias "irregulares aceitas" a partir de seleção em população celular 1B e 2B.



Percentual referente ao número de colônias aceitas pelo equipamento ClonePix FL com critério de monoclonalidade. O cultivo dos transfectantes CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* foi realizado em meio semissólido por 8 ou 10 dias, respectivamente para as populações celulares proveniente da seleção 2B e 1B. Ambos os tempos de cultivo permitiram o isolamento monoclonal, entretanto, o cultivo realizado em 10 dias aumentou em 55% o número de aceitação de monoclonalidade pelo equipamento.

Durante a execução do ensaio, a primeira análise foi realizada com o experimento 2B, cultivado por 8 dias. A visualização das placas em microscopia de fluorescência indicou, aparentemente, colônias adequadas para a aquisição de imagens e coleta pelo equipamento. Devido ao número de colônias monoclonais recuperadas abaixo do desejado em experimento 2B, optou-se por esperar 10 dias (ao invés de 8) para fazer a aquisição de imagens e coleta das colônias do segundo experimento em andamento (população proveniente da seleção 1B). Esta estratégia objetivou submeter os cultivos em meio semissólido a tempos diferentes até a aquisição de imagens e isolamento de clones, garantindo que, pelo menos um deles, estaria adequado para continuidade no protocolo de geração de linhagem. Na etapa de cultivo da população estável mista para isolamento monoclonal é esperado uma variação no crescimento entre colônias, de modo que, aumentar o tempo de cultivo favorece o aproveitamento de algumas colônias, eventualmente que apresentam crescimento estático mais lento (não necessariamente melhores ou piores em termos de produtividade ou cultivo sob agitação), comprometendo colônias de crescimento muito rápido que podem perder o critério de isolamento.

Ambos os tempos de cultivo de 8 e 10 dias mostraram-se efetivos para o isolamento monoclonal, com recuperação de 296 colônias para o experimento 1B e 164 para 2B. Entretanto, o experimento 1B (10 dias) permitiu aproveitamento de um número de colônias quase duas vezes

maior do que o experimento 2B (8 dias), que apresentou um maior número de colônias irregulares necessitando de análise individual para inclusão no experimento (como grupo "irregulares aceitas"). A tabela 4.5 discrimina os clones selecionados em cada etapa para os experimentos 1B e 2B. Os critérios específicos adotados estão detalhados no item 3.6, tabela 3.2.

Tabela 4.5 - Isolamento de clones produtores de anti-TNFα adabut em cada etapa da geração de linhagem celular.

Experimento	Total de Colônias Identificadas	Cultivo Estático				Cultivo sob Agitação		Produtividade	
		96 poços	24 poços	6 poços	T25	SF125	*Fed-Batch* (14 dias)	ELISA	SPR
1.1	723	96	56	20	12	8	7	0	0
1.2	499	70	41	16	10	9	8	0	0
1.3	634	90	60	19	9	9	8	1	1
1.4	354	40	24	9	5	2	1	0	0
2.1	657	36	20	12	4	2	1	1	1
2.2	472	47	27	18	10	4	3	1	1
2.3	545	43	21	10	7	4	4	0	0
2.4	461	38	15	10	7	2	1	0	0
Total:	4345	460	264	114	64	40	33	3	3

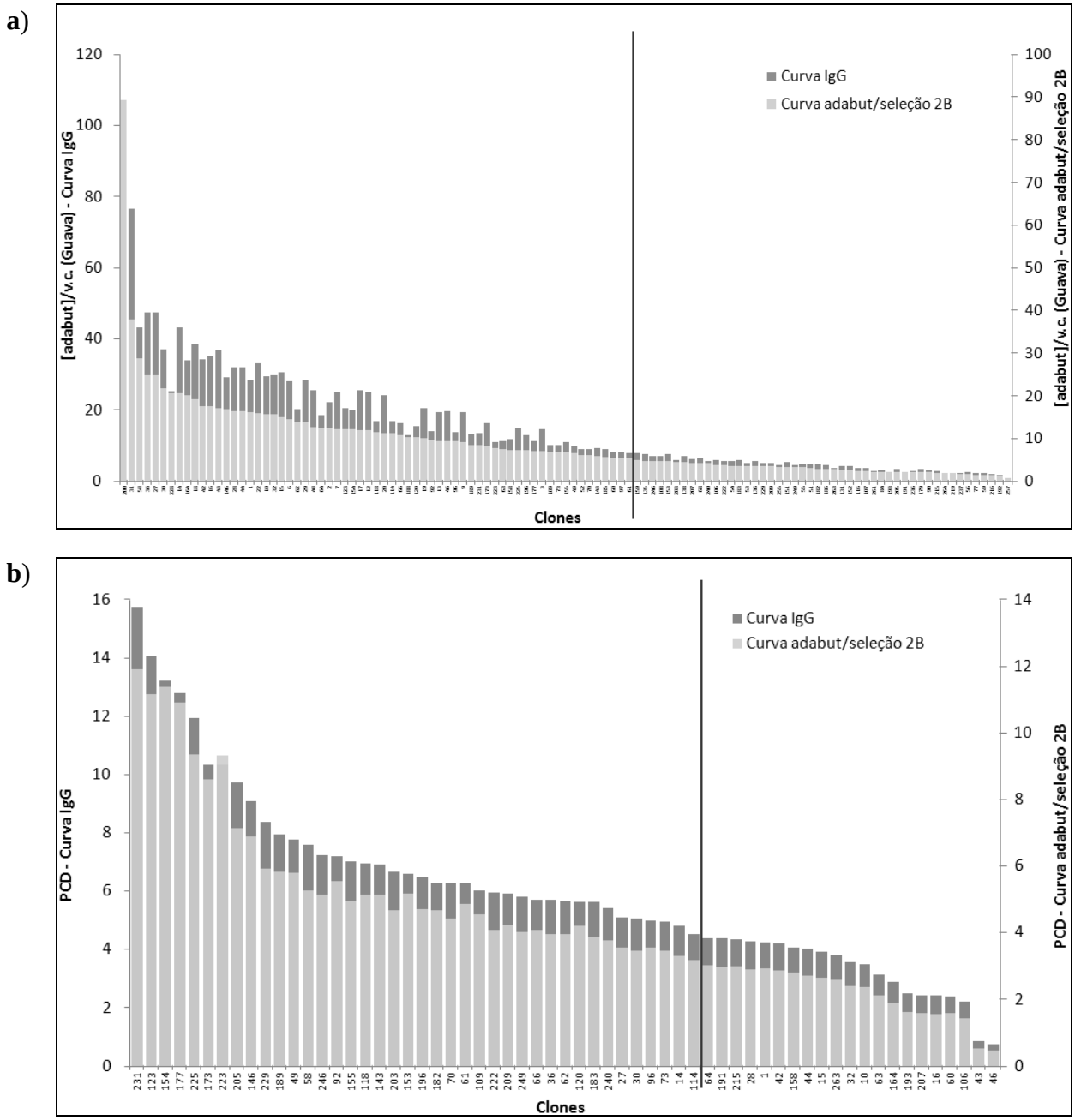
Total de clones analisados em cada etapa da geração de linhagem e respectiva origem nas placas de isolamento em meio semissólido. As colônias em cultivo estático foram transferidas das placas de 96 poços para de 24 poços, por sua vez transferidas para placas de 6 poços onde as selecionadas foram cultivadas em garrafas T25. O total de 64 melhores clones foram transferidos para cultivo em agitação em SF125. Por fim, os 33 clones melhor adaptados e escolhidos considerando critérios de produtividade e crescimento celular foram cultivados em batelada alimentada, a partir de onde foi possível determinar os 3 mais produtivos (ELISA e SPR).

As colônias foram transferidas para uma placa de 96 poços contendo meio de cultivo líquido e incubadas por 4 (1B) ou 5 dias (2B). Após este período, todos os poços foram monitorados diariamente para verificar a confluência celular >70%, momento em que as colônias foram transferidas para placas de 24 poços (bem como nos estágios subsequentes onde outros critérios de classificação foram incluídos, conforme apresentado a seguir).

Dos 400 clones isolados em placas de 96 poços por automação e monitorados individualmente durante 7 a 8 dias, 264 (66%) cresceram em meio líquido e atingiram confluência >70%, sendo transferidos para placas de 24 poços. Os demais foram descartados. Os clones cultivados em placas de 24 poços foram triados quanto à expressão do anticorpo, excluindo os de concentração nula ou muito baixa e transferindo os melhores 114 clones para

placas de 6 poços. Em placas de 6 poços, os clones foram avaliados quanto à relação entre anticorpo produzido e o número aproximado de células, onde 64 clones foram escolhidos para cultivo em garrafas T25. A figura 4.10 apresenta as curvas de distribuição de clones das placas de 6 poços e garrafas T25, conforme produtividade de anticorpo e o ponto de corte estabelecido. A imagem permite a visualização de que os melhores clones foram seguramente escolhidos para continuidade no processo de isolamento monoclonal. Os clones que apresentaram melhor desempenho em T25 frente a um experimento de produtividade específica (PCD de 3 dias) foram transferidos para cultivo em frascos SF125, onde o total de 40 clones foi avaliado quanto à capacidade de adaptação em cultivo sob agitação durante duas passagens, e relação com a produtividade específica em dois experimentos de PCD, um de 3 dias e um de 4 dias (dados não mostrados). Por fim, 33 clones foram selecionados para cultivo em agitação orbital e experimento de batelada alimentada de 14 dias.

Figura 4.10 - Produtividade de adabut e ponto de corte de clones cultivados em **a**) placas de 6 poços e **b**) garrafas T25.

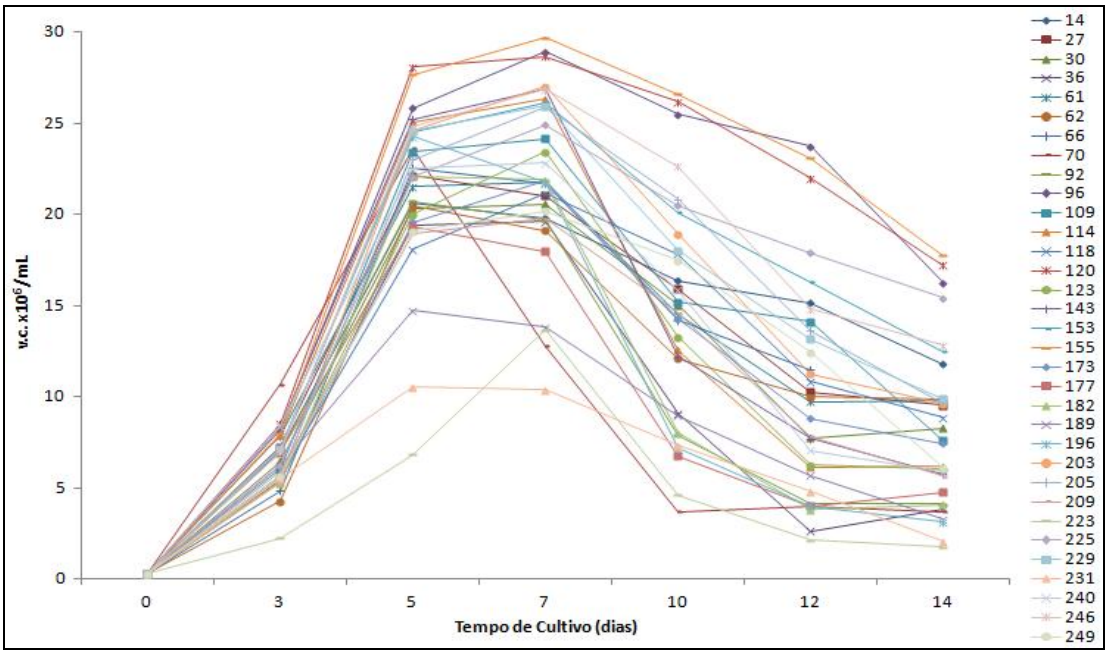


Classificação dos clones analisados conforme produtividade (razão [adabut]/v.c. em placas de 6 poços e PCD em garrafas T25, e o respectivo ponto de corte estabelecido. De um total de 114 clones cultivados em placas de 24 poços, 64 foram selecionados e transferidos para cultivo em garrafas T25, onde os 40 melhores foram eleitos para a etapa subsequente. É possível observar, em ambas as etapas, a margem de segurança >50% que garantiu com que os melhores clones seguissem em continuidade durante o processo de isolamento monoclonal.

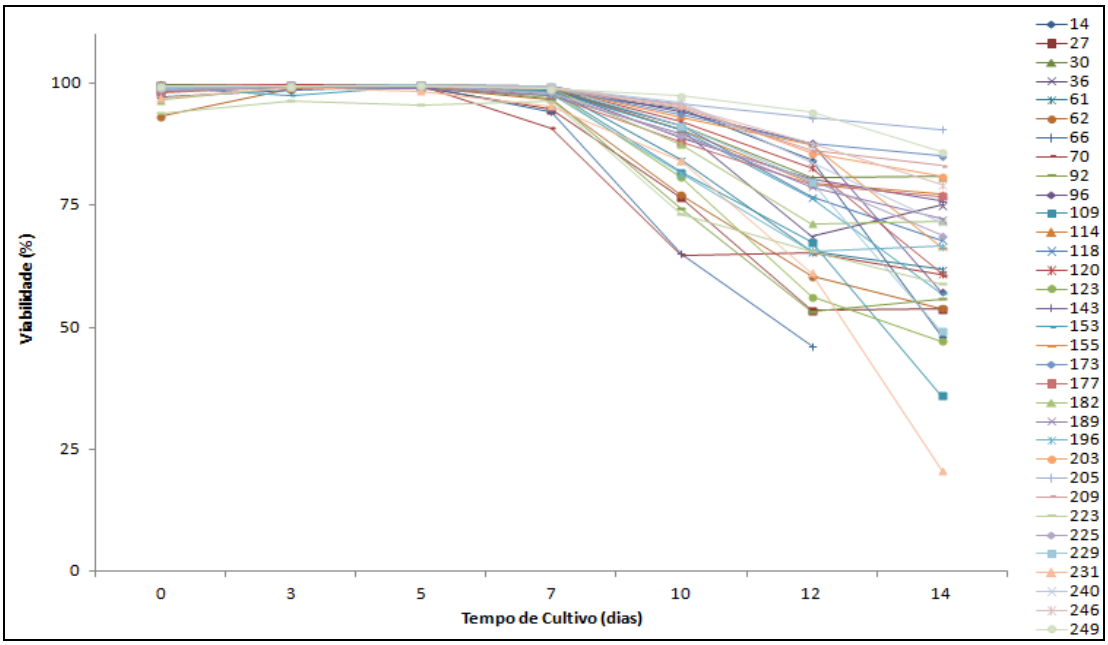
A despeito de variações entre as técnicas de quantificação por ELISA e SPR, os resultados mostraram classificação similar, porém não idêntica. Para escolha dos clones mais produtivos, foi considerada a concentração de anticorpo acumulada no dia 12 do cultivo em batelada alimentada, quantificada por SPR. A concentração acumulada no dia 14 não foi considerada devido à elevada mortalidade celular observada, possivelmente influenciada pelo protocolo de cultivo em batelada alimentada que foi empregado (recomendado pela empresa que licencia as células). Os dados mostram que a partir do dia 7 a viabilidade e número de células viáveis começam a reduzir, indicando que a estratégia de alimentação do cultivo pode ser aprimorada. De qualquer forma, apesar dos ganhos que podem advir pela otimização do cultivo, todos os clones encontravam-se nas mesmas condições, de modo que foi possível escolher com segurança os clones mais produtivos e estáveis ao processo. No dia 12 de cultivo, 20 dos 33 clones ou ~60% apresentavam viabilidade celular >75%, enquanto que no dia 14 apenas 11 ou ~33%, embora 27 ou ~82% com viabilidade >50%. Apenas o clone 205 apresentou viabilidade > 90% no dia 14. Somente o clone 66 não concluiu os 14 dias de experimento, tendo seu cultivo encerrado no dia 12 com viabilidade <50%. Três clones, 62, 66 e 223, apresentaram-se em constante formação de grumos, mesmo após filtração em membrana durante as passagens em SF125, e por este motivo foram excluídos da classificação final que considerou a produtividade acumulada ao término do cultivo e definiu os três clones mais produtivos. A figura 4.11 mostra os gráficos de crescimento e viabilidade celular de todos os clones analisados em cultivo de batelada alimentada.

Figura 4.11 - Curvas de **a**) crescimento e **b**) viabilidade celular de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*.

a)



b)

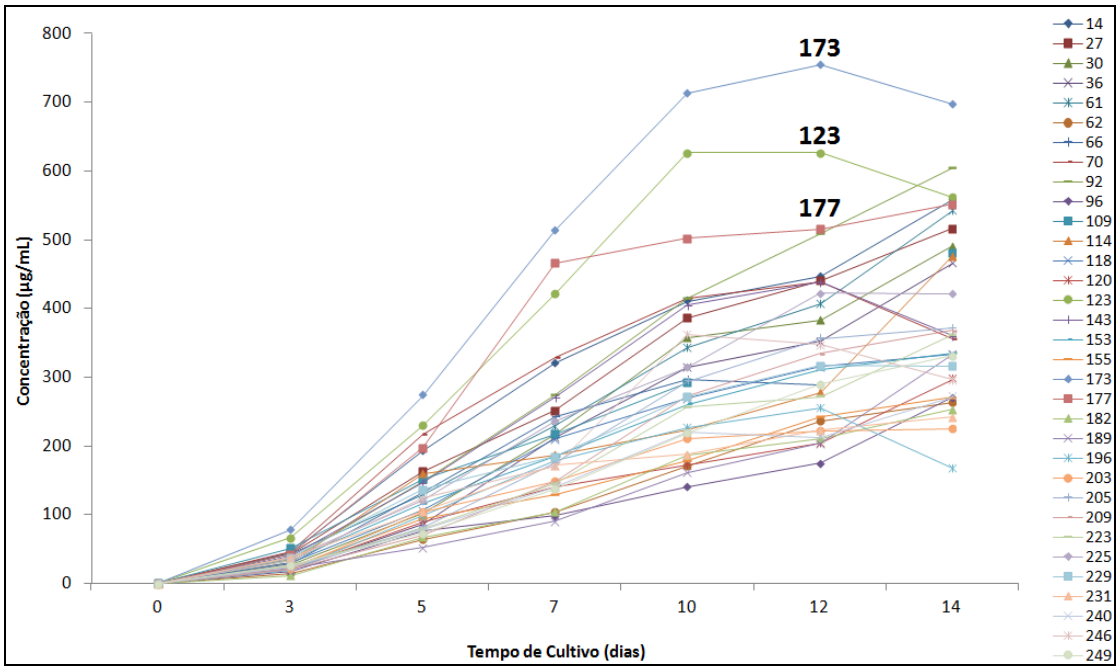


Valores mensurados a partir do método de azul de tripano em plataforma automatizada Vi-CELL. O cultivo de batelada alimentada foi realizado a partir de 0,3 x 10^6 células/mL em 30 mL de meio CD Forti CHO suplementado com Gln a 8 mM e agente anti-aglutinação a 1:1.000, a 37 ºC, 150 rpm e 8% CO_2 durante 14 dias. Conforme recomendações do fabricante, a suplementação com glicose foi realizada ao longo do cultivo nos dias 3 e 5, com 4 g/L, e 7, com 6 g/L.

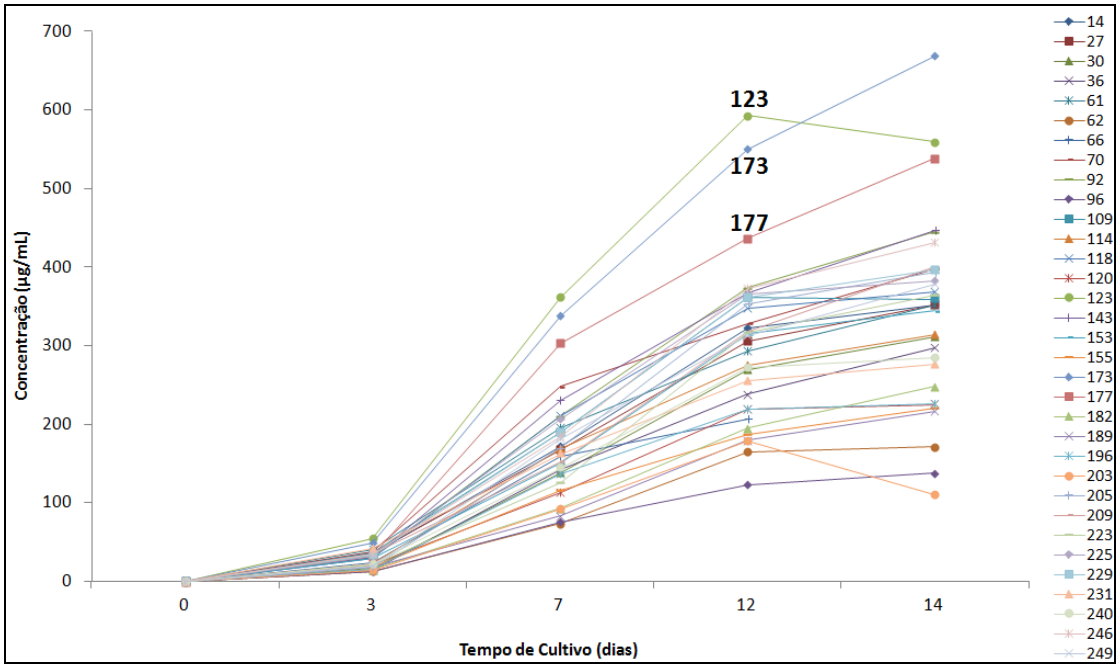
Os 33 clones analisados variaram em produtividade de adabut de ~120 a ~600 µg/mL (figura 4.12). Analisando a distribuição por faixa de produtividade (figura 4.13), observa-se que há tendência a uma distribuição normal, de modo que os clones selecionados compreendem a porção descendente da curva. A tabela 4.6 mostra a concentração de anticorpo encontrada para os três clones mais produtivos no experimento de batelada alimentada: 123, 173 e 177. Dois dos clones foram oriundos da seleção 2B, os clones 173 e 177, e um da seleção 1B, o clone 123. O clone 177 pertencente ao grupo de classificação “irregular aceito” e os demais ao grupo “aceito”.

Figura 4.12 - Quantificação de adabut de sobrenadante de cultivo por **a**) ELISA e **b**) SPR.

a)

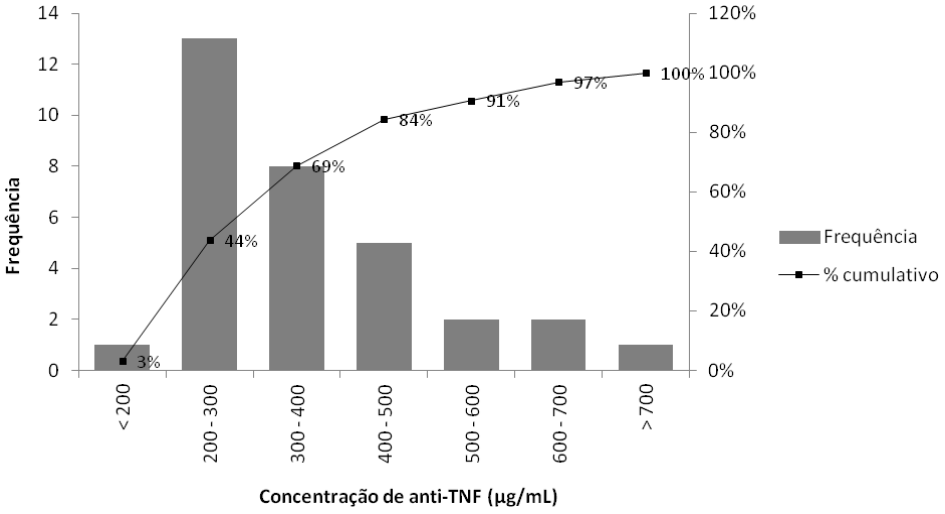


b)



Quantificação de anti-TNFα expresso no sobrenadante de cultivo ao longo do cultivo em batelada alimentada. Os gráficos mostram as quantificações realizadas nos dias 3, 5, 7, 10, 12 e 14 pelo método de ELISA (a) e nos dias 3, 7, 12 e 14 por SPR (b). Destaque para os três clones de maior concentração de anticorpo encontrados: 173, 123 e 177 em quantificação por ELISA e 123, 173 e 177 em quantificação pelo método de SPR.

Figura 4.13 - Distribuição dos clones por faixa de produtividade de anticorpo.



Distribuição estabelecida a partir da quantificação de anti-TNFα por ELISA no ponto de coleta realizado no dia 12 do cultivo em batelada alimentada. Do total de 33 clones analisados, cerca de 85% apresentaram produtividade inferior a 500 µg/mL. Os 15% restantes representam os clones de maior concentração de anticorpo no sobrenadante de cultivo, consequentemente, os de maior interesse para a geração de linhagem monoclonal anti-TNFα adabut.

Tabela 4.6 - Clones caracterizados com melhor produtividade acumulada durante a geração de linhagem CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut*.

Clone	Concentração - dia 12 (µg/ mL)		Origem	
	ELISA	SPR	Experimento	Classificação CLonePix FL
123	632,4	593,7	1.3	"Aceito"
173	758,5	550,6	2.1	"Aceito"
177	519,4	437,1	2.2	"Irregular Aceito"

Os três melhores clones em termos de produtividade acumulada foram estabelecidos a partir de cultivo em batelada alimentada de 14 dias. As dosagens de anti-TNFα realizadas por ELISA e SPR no dia 12 indicaram os mesmos clones como os mais produtivos. O clone 123 proveniente da população mista 1, placa 3, classificado diretamente pelo ClonePix FL com critério de monoclonalidade. O clone 123 proveniente da população mista 1, placa 3, classificado diretamente pelo ClonePix FL com critério de monoclonalidade; o clone 173 proveniente da população mista 2, placa 1, também identificado pelo ClonePix FL como "aceito" para monoclonalidade; e, o clone 177 proveniente da população mista 2, placa 2, identificado como "irregular", porém incluído como "aceito" em análise individualizada.

Durante a geração de uma linhagem celular produtora de anticorpos é importante considerar a expressão do gene transfectado e sua relação com a taxa de crescimento. Clones que apresentam uma elevada expressão, porém baixa taxa de crescimento celular, ou os que atingem altas densidades de cultivo, mas com baixa produção de anticorpos podem apresentar

produtividade acumulada equivalente. Estas variáveis podem ser melhoradas com a otimização das condições de cultivo, incluindo, redução na velocidade de agitação orbital, o uso de outros meios de cultura ou mesmo controlando o acumulo de metabólitos produzidos em cultivos de alta densidade (que poderiam afetar produtividade ou alguma modificação pós-traducional dos anticorpos expressos, como perfil de glicosilação, etc).

A estratégia adotada para isolamento monoclonal empregou o uso do equipamento robótico ClonePix FL, que é capaz de coletar colônias selecionadas, uma vez que identifica-as pelo halo fluorescente formado a partir da ligação do anticorpo secretado pelas células com agente de detecção (anti-IgG humana) conjugado com FITC (CloneDetect) adicionado ao meio semissólido. Além disso, possibilita a coleta de colônias com maior densidade celular, de forma mais rápida e com melhor recuperação do que o protocolo utilizando diluição limitante. No método de diluição limitante, o cultivo é diluído até a concentração correspondente a "0,3-0,5 célula" por poço, de modo que se aumentem as chances de obter poços com uma única célula, a qual se multiplica lentamente (considerando o tempo de duplicação médio da linhagem CHO-S® de 17 a 20 h) para dar origem a uma colônia. O ClonePix FL permite maior velocidade na proliferação e recuperação celular pois o cultivo em placas de 96 poços é iniciado a partir de uma população de células oriunda do mesmo clone. Um estudo anterior realizado no laboratório comparou as duas abordagens para seleção de clones e geração de linhagens produtoras de anticorpo recombinante (YEDA et al., 2013), mostrando a versatilidade do equipamento robótico e capacidade de escolher colônias a partir de células que provavelmente não cresceriam nos poços caso isoladas por diluição limitante. Outra vantagem é que o uso do equipamento robótico permite análise mais representativa dos clones presentes na população estável mista.

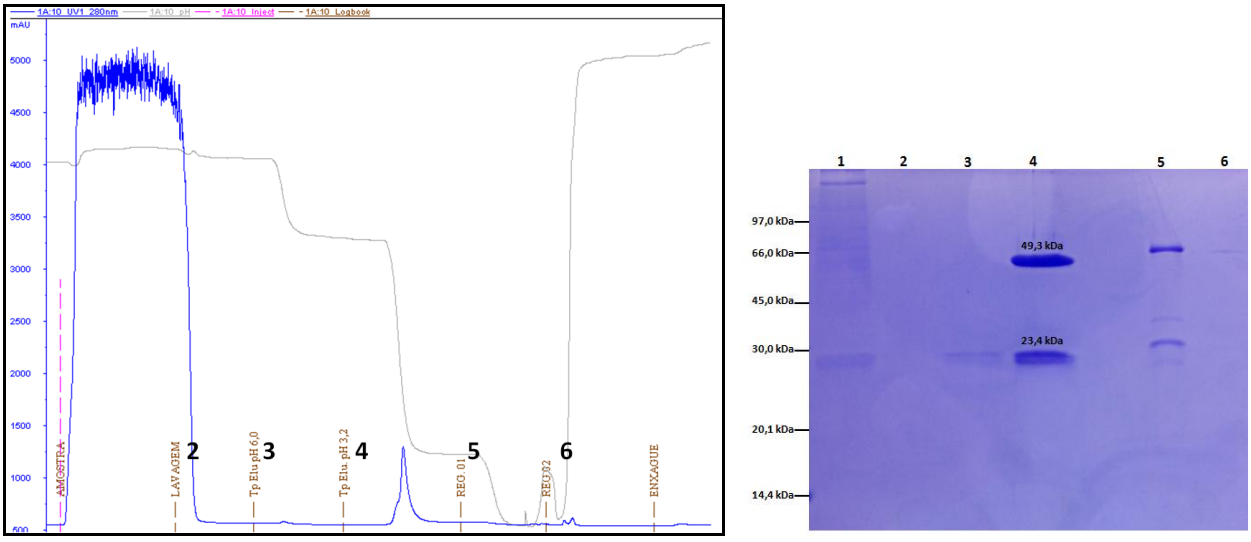
4.7 Purificação de anti-hTNFα adabut

Os anticorpos expressos pelas populações recombinantes (item 4.5 e 4.6) foram purificados por cromatografia de afinidade em proteína A-Sepharose. Conforme visualizado no cromatograma e gel de poliacrilamida 12,5% apresentados na figura 4.14, a fração de maior leitura de DO_{280nm} correspondeu ao desligamento do anticorpo da resina, na segunda etapa de eluição com alteração do pH para 3,2. O anticorpo purificado mostrou-se ausente de bandas secundárias quando analisado por coloração de gel com azul de Coomassie. A neutralização do

pH do eluato para pH 7,0 foi realizada gradualmente com Tris-HCl 1M, onde o volume de 100 µL foi necessário para cada 0,9 mL de eluato recuperado. A proporção corrobora resultados anteriores obtidos para a purificação de outros anticorpos no laboratório (MORO et al., 1994).

Apesar de ter sido observada perda de anticorpo na etapa de regeneração da coluna com pH 2,3, que indica ligação à proteína A com maior afinidade do que a necessária para eluição em pH 3,2, a fração foi desconsiderada do protocolo padronizado devido ao fato de apresentar-se com bandas secundárias (possíveis contaminantes).

Figura 4.14 - Cromatograma e gel de poliacrilamida mostrando a purificação do anticorpo adabut expresso por CHO-S®/pCHO 1.0/*HL-LC.adabut* no sobrenadante de cultivo.



(**a**) (**b**)

(**a**) cromatograma mostrando a leitura de absorbância a 280 nm e (**b**) gel de poliacrilamida 12,5% corado com azul de Coomassie. **1**: *void* (material não aderido); **2**: lavagem, com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0; **3**: eluição 1, pH 6,0; **4**: eluição 2, pH 3,2; **5**: regeneração 1, pH 2,3; e, **6**: regeneração 2, pH 8,6. Bandas de anticorpo com destaque para o peso molecular determinado *in silico*, onde HC: 49,3 kDa e LC: 23,4 kDa. Marcador de peso molecular utilizado: LMW (G.E Healthcare).

A análise *in silico* (ProtParam) realizada para determinar o coeficiente de extinção molar (apêndice B), e, portanto concentração de proteína a partir de leitura em DO_{280nm}, resultou em 106.200 para cadeia única ou 212.400 para o anticorpo completo. Assim, considerando o peso molecular de 145,5 kDa, foi possível calcular o coeficiente de extinção específico ($\mathcal{E}_{1\%}$) de 1,4, quando $(\mathcal{E}_{molar} \times 10)/P.M.$ O coeficiente de extinção específico determinado a partir de predição teórica encontra-se próximo ao descrito por Harlow e Lane, 1988 para anticorpos IgG, de 1,35.

4.8 Cinética de ligação do anticorpo ao TNFα

Os anticorpos produzidos pelos 33 clones cultivados em batelada alimentada foram purificados e avaliados quanto à cinética de ligação ao TNFα. O experimento realizado por SPR mostrou força de afinidade média (K_D) variável de 4,66 x 10^{-10} no clone 27 a 9,51 x 10^{-10} para o clone 153, sendo 7,35 x 10^{-10} o encontrado para o anticorpo de comparação adalimumabe (Humira®). Os resultados estão apresentados na figura 4.15 e tabela 4.7.

Figura 4.15 - Afinidade de ligação de anti-TNFα produzido por diferentes clones ao TNFα.

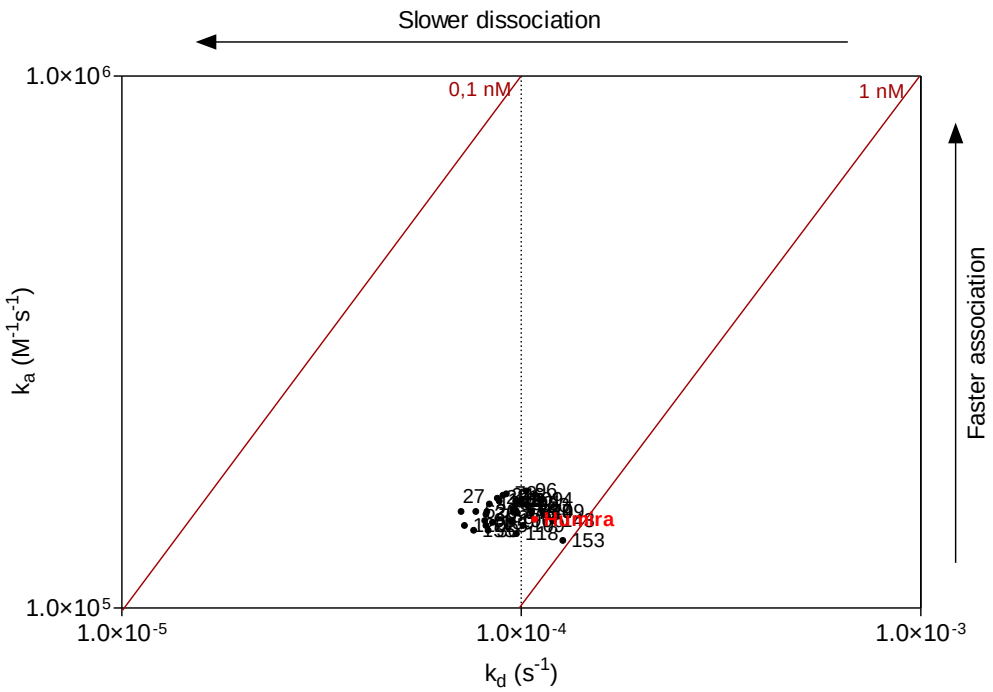


Gráfico representando a relação entre as constantes de associação (k_a), expressa em 1/M.s e de dissociação (k_d) em s^{-1} para os 33 anticorpos produzidos pelos diferentes clones. As constantes foram determinadas por SPR em dois experimentos independentes e o valor apresentado refere-se à média dos resultados obtidos. A linha diagonal corresponde a constante de afinidade (K_D) expressa em nM. Destaque para o resultado obtido para o anticorpo referência adalimumabe (Humira®).

Tabela 4.7 - Afinidade de ligação de anti-hTNFα produzido por diferentes clones a TNFα.

Clone	1ª série			2ª série			Média		
	k_d (1/s)	k_a (1/MS)	K_D (M)	k_d (1/s)	k_a (1/MS)	K_D (M)	k_d (1/s)	k_a (1/MS)	K_D (M)
27	4,75 x10^{-5}	1,35 x10^{5}	3,52 x10^{-10}	9,38 x10^{-5}	1,68 x10^{5}	5,58 x10^{-10}	7,07 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	4,66 x10^{-10}
120	5,59 x10^{-5}	1,50 x10^{5}	3,73 x10^{-10}	8,83 x10^{-5}	1,36 x10^{5}	6,49 x10^{-10}	7,21 x10^{-5}	1,43 x10^{5}	5,04 x10^{-10}
62	5,83 x10^{-5}	1,49 x10^{5}	3,91 x10^{-10}	9,56 x10^{-5}	1,55 x10^{5}	6,17 x10^{-10}	7,70 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	5,06 x10^{-10}
123	8,10 x10^{-5}	1,57 x10^{5}	5,16 x10^{-10}	8,54 x10^{-5}	1,57 x10^{5}	5,44 x10^{-10}	8,32 x10^{-5}	1,57 x10^{5}	5,30 x10^{-10}
203	7,97 x10^{-5}	1,59 x10^{5}	5,01 x10^{-10}	8,45 x10^{-5}	1,44 x10^{5}	5,87 x10^{-10}	8,21 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	5,42 x10^{-10}
155	7,75 x10^{-5}	1,50 x10^{5}	5,17 x10^{-10}	7,45 x10^{-5}	1,30 x10^{5}	5,73 x10^{-10}	7,60 x10^{-5}	1,40 x10^{5}	5,43 x10^{-10}
231	8,95 x10^{-5}	1,66 x10^{5}	5,39 x10^{-10}	8,47 x10^{-5}	1,55 x10^{5}	5,46 x10^{-10}	8,71 x10^{-5}	1,61 x10^{5}	5,43 x10^{-10}
36	4,92 x10^{-5}	1,49 x10^{5}	3,30 x10^{-10}	1,14 x10^{-4}	1,50 x10^{5}	7,60 x10^{-10}	8,16 x10^{-5}	1,50 x10^{5}	5,46 x10^{-10}
246	7,90 x10^{-5}	1,78 x10^{5}	4,44 x10^{-10}	1,01 x10^{-4}	1,47 x10^{5}	6,87 x10^{-10}	9,00 x10^{-5}	1,63 x10^{5}	5,54 x10^{-10}
66	6,10 x10^{-5}	1,45 x10^{5}	4,21 x10^{-10}	1,01 x10^{-4}	1,47 x10^{5}	6,87 x10^{-10}	8,10 x10^{-5}	1,46 x10^{5}	5,55 x10^{-10}
182	7,01 x10^{-5}	1,64 x10^{5}	4,27 x10^{-10}	1,06 x10^{-4}	1,53 x10^{5}	6,93 x10^{-10}	8,81 x10^{-5}	1,59 x10^{5}	5,56 x10^{-10}
70	7,24 x10^{-5}	1,64 x10^{5}	4,41 x10^{-10}	1,11 x10^{-4}	1,63 x10^{5}	6,81 x10^{-10}	9,17 x10^{-5}	1,64 x10^{5}	5,61 x10^{-10}
225	7,20 x10^{-5}	1,53 x10^{5}	4,71 x10^{-10}	9,12 x10^{-5}	1,33 x10^{5}	6,86 x10^{-10}	8,16 x10^{-5}	1,43 x10^{5}	5,71 x10^{-10}
189	7,68 x10^{-5}	1,49 x10^{5}	5,15 x10^{-10}	9,26 x10^{-5}	1,40 x10^{5}	6,61 x10^{-10}	8,47 x10^{-5}	1,45 x10^{5}	5,86 x10^{-10}
30	5,12 x10^{-5}	1,37 x10^{5}	3,74 x10^{-10}	1,14 x10^{-4}	1,42 x10^{5}	8,03 x10^{-10}	8,26 x10^{-5}	1,40 x10^{5}	5,92 x10^{-10}
61	5,86 x10^{-5}	1,48 x10^{5}	3,96 x10^{-10}	1,36 x10^{-4}	1,70 x10^{5}	8,00 x10^{-10}	9,73 x10^{-5}	1,59 x10^{5}	6,12 x10^{-10}
96	8,23 x10^{-5}	1,58 x10^{5}	5,21 x10^{-10}	1,24 x10^{-4}	1,73 x10^{5}	7,17 x10^{-10}	1,03 x10^{-4}	1,66 x10^{5}	6,23 x10^{-10}
205	9,05 x10^{-5}	1,63 x10^{5}	5,55 x10^{-10}	1,05 x10^{-4}	1,50 x10^{5}	7,00 x10^{-10}	9,78 x10^{-5}	1,57 x10^{5}	6,25 x10^{-10}
177	9,95 x10^{-5}	1,55 x10^{5}	6,42 x10^{-10}	9,09 x10^{-5}	1,49 x10^{5}	6,10 x10^{-10}	9,52 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	6,26 x10^{-10}
209	7,93 x10^{-5}	1,65 x10^{5}	4,81 x10^{-10}	1,21 x10^{-4}	1,54 x10^{5}	7,86 x10^{-10}	1,00 x10^{-4}	1,60 x10^{5}	6,28 x10^{-10}
114	8,02 x10^{-5}	1,50 x10^{5}	5,35 x10^{-10}	1,13 x10^{-4}	1,56 x10^{5}	7,24 x10^{-10}	9,66 x10^{-5}	1,53 x10^{5}	6,31 x10^{-10}
92	6,39 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	4,20 x10^{-10}	1,38 x10^{-4}	1,62 x10^{5}	8,52 x10^{-10}	1,01 x10^{-4}	1,57 x10^{5}	6,43 x10^{-10}
196	8,29 x10^{-5}	1,54 x10^{5}	5,38 x10^{-10}	1,05 x10^{-4}	1,37 x10^{5}	7,66 x10^{-10}	9,40 x10^{-5}	1,46 x10^{5}	6,46 x10^{-10}
173	8,25 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	5,43 x10^{-10}	1,13 x10^{-4}	1,49 x10^{5}	7,58 x10^{-10}	9,78 x10^{-5}	1,51 x10^{5}	6,50 x10^{-10}
223	8,23 x10^{-5}	1,58 x10^{5}	5,21 x10^{-10}	1,25 x10^{-4}	1,53 x10^{5}	8,17 x10^{-10}	1,04 x10^{-4}	1,56 x10^{5}	6,67 x10^{-10}
240	1,07 x10^{-4}	1,56 x10^{5}	6,86 x10^{-10}	1,05 x10^{-4}	1,48 x10^{5}	7,09 x10^{-10}	1,06 x10^{-4}	1,52 x10^{5}	6,97 x10^{-10}
229	6,95 x10^{-5}	1,52 x10^{5}	4,57 x10^{-10}	1,42 x10^{-4}	1,51 x10^{5}	9,40 x10^{-10}	1,06 x10^{-4}	1,52 x10^{5}	6,98 x10^{-10}
118	6,63 x10^{-5}	1,44 x10^{5}	4,60 x10^{-10}	1,28 x10^{-4}	1,31 x10^{5}	9,77 x10^{-10}	9,72 x10^{-5}	1,38 x10^{5}	7,07 x10^{-10}
14	1,16 x10^{-4}	1,50 x10^{5}	7,73 x10^{-10}	1,10 x10^{-4}	1,69 x10^{5}	6,51 x10^{-10}	1,13 x10^{-4}	1,60 x10^{5}	7,08 x10^{-10}
109	7,89 x10^{-5}	1,38 x10^{5}	5,72 x10^{-10}	1,24 x10^{-4}	1,48 x10^{5}	8,38 x10^{-10}	1,01 x10^{-4}	1,43 x10^{5}	7,09 x10^{-10}
Humira	9,22 x10^{-5}	1,40 x10^{5}	6,59 x10^{-10}	1,24 x10^{-4}	1,54 x10^{5}	8,05 x10^{-10}	1,08 x10^{-4}	1,47 x10^{5}	7,35 x10^{-10}
249	1,03 x10^{-4}	1,46 x10^{5}	7,05 x10^{-10}	1,23 x10^{-4}	1,58 x10^{5}	7,78 x10^{-10}	1,13 x10^{-4}	1,52 x10^{5}	7,43 x10^{-10}
143	1,05 x10^{-4}	1,47 x10^{5}	7,14 x10^{-10}	1,35 x10^{-4}	1,44 x10^{5}	9,38 x10^{-10}	1,20 x10^{-4}	1,46 x10^{5}	8,25 x10^{-10}
153	1,37 x10^{-4}	1,44 x10^{5}	9,51 x10^{-10}	1,17 x10^{-4}	1,23 x10^{5}	9,51 x10^{-10}	1,27 x10^{-4}	1,34 x10^{5}	9,51 x10^{-10}

Valores de força de afinidade encontrados para os 33 clones em análise e para o anticorpo controle adalimumabe (Humira®). Foram realizados dois experimentos independentes utilizando o sobrenadante de cultivo purificado de um cultivo de batelada alimentada de 14 dias. Valores de k_d expressos em 1/s, de k_a em 1/MS e K_D em M.

Considerando a média das afinidades obtidas, o teste t mostrou com um intervalo de confiança de 95% que não há diferença estatística entre a K_D dos anticorpos produzidos pelos clones 27 e 153 ao TNFα, valores dos extremos de afinidade encontrados. O teste de Friedman (ANOVA) realizado para combinações entre todas as amostras originou 561 análises, todas elas indicando que não há diferença estatística para reconhecimento de TNFα a nenhum dos anticorpos testados. O resultado indica a não inferioridade dos anticorpos produzidos ao existente comercialmente em termos de afinidade ao TNFα. Embora o valor absoluto encontrado para a afinidade do anticorpo produzido pelo clone 27 corresponda a cerca de duas vezes mais do que a do anticorpo do clone 153, deve-se considerar que ambos encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza de afinidade, o mesmo para os demais anticorpos, resultado embasado pela análise estatística. Fu et al., 2015, reportaram recentemente valores similares de afinidade ao TNFα para o anticorpo adalimumabe de $6{,}215 \pm 0{,}336 \times 10^{-10}$, e $2{,}661 \pm 0{,}516 \times 10^{-10}$ para infliximabe.

Cabe destacar que, apesar da sequência gênica dos anticorpos produzidos pelos diferentes clones serem supostamente idênticas, a ocorrência de qualquer mutação nos nucleotídeos das regiões hipervariáveis (CDRs), tanto de cadeias leve como pesada do anticorpo, poderia influenciar na afinidade de reconhecimento ao TNFα. Mesmo após confirmação das sequências corretamente clonadas no vetor de expressão (sequenciamento automático descrito em 3.1.3 e 4.1.1), há risco de instabilidade gênica durante as etapas de transfecção aleatória no genoma celular, seleção e isolamento monoclonal, que podem originar anticorpos com afinidade diferencial à esperada, imperceptível às constatações relacionadas à expressão ou produtividade. O mesmo pode ocorrer na porção Fc do anticorpo, influenciando o perfil de glicosilação e seu consequente reconhecimento pelos receptores de imunoglobulina presentes nas células (conforme discutido a seguir no item 4.11).

4.9 Ensaios de caracterização funcional do anticorpo

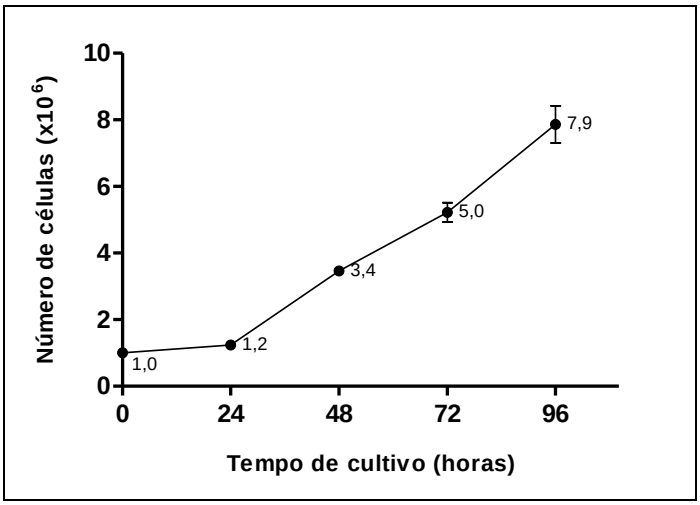
Os ensaios descritos a seguir foram realizados para os anticorpos purificados que apresentaram melhor desempenho nos critérios de produtividade e comportamento celular em cultivo de batelada alimentada (item 3.6), e cinética de ligação ao hTNFα (item 3.8), conforme tabela 3.2.

4.9.1 Neutralização de citotoxicidade induzida por TNFα em células L929

O ensaio inicial realizado para avaliar a atividade funcional do anticorpo adabut foi através da capacidade de neutralização da citotoxicidade induzida por rhTNFα em fibroblasto murino L929. O experimento permitiu determinar a curva de crescimento dos fibroblastos L929 utilizados, a curva de citotoxicidade de TNFα e a janela de neutralização e IC_{50} dos anticorpos anti-hTNFα produzidos pelos diferentes clones.

Inicialmente foi estabelecida a curva de crescimento da célula L929 quantificando o número de células de 0 até 96 horas a partir de um cultivo de 0,1 x 10^6 células/mL. A curva construída e apresentada na figura 4.16 permite visualizar a fase lag de adaptação das células nas primeiras 24 horas, bem como a fase exponencial onde foi possível determinar o tempo médio de duplicação celular de 22,5 h. O resultado encontrado corrobora o reportado para as células L929 fornecidas pela empresa DSMZ® (Braunschweig, Alemanha), que varia de 21 a 24 h. A curva de crescimento foi realizada para confirmar as boas condições fisiológicas das células, pois as mesmas encontravam-se criopreservadas há muitos anos no laboratório. O teste de micoplasma resultou negativo.

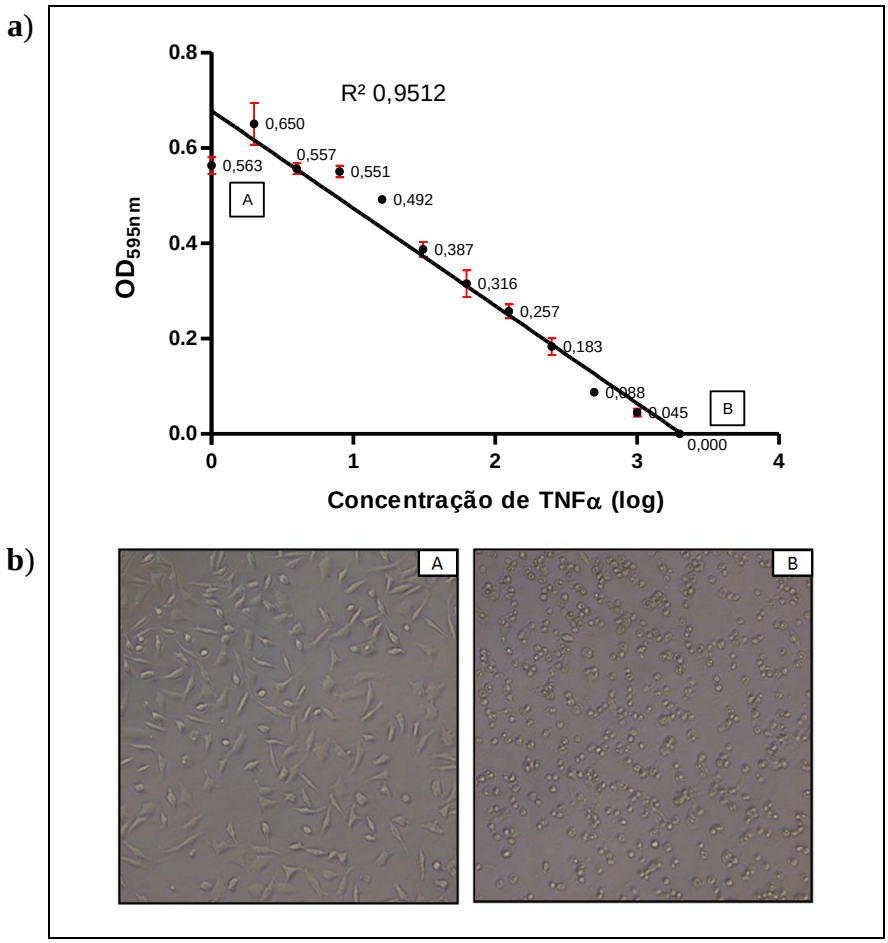
Figura 4.16 - Curva de crescimento de fibroblasto L929.



Cultivo de fibroblasto murino L929 em meio RPMI durante 96 horas. O cultivo inicial foi subdividido em cinco garrafas T25 para tripsinização e contagem após 24, 48, 72 e 96 horas. Os valores no gráfico correspondem à média e desvio padrão obtidos a partir de quatro contagens independentes do número de células viáveis utilizando o método de azul de tripano.

Em seguida, foi realizada a curva de citotoxicidade de TNFα aos fibroblastos L929, onde as células foram incubadas com diluições seriais de ordem 1:2 de TNFα iniciadas em 40 ng/mL até 0,01 ng/mL. Os resultados apresentados na figura 4.17 mostram relação linear de toxicidade em protocolo de sensibilização com actinomicina-D. As células incubadas com e sem TNFα também foram visualizadas em microscopia óptica para confirmar a morte celular (figura 4.17).

Figura 4.17 - Curva de citotoxicidade de TNFα em células L929.

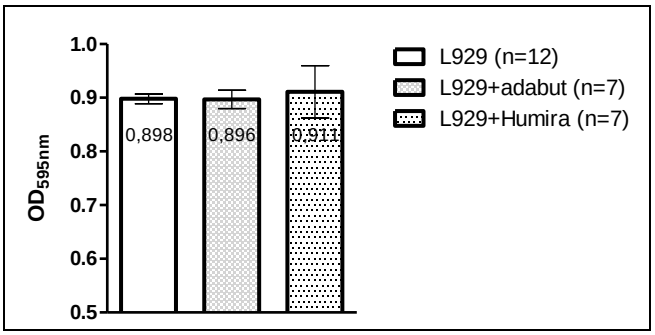


Viabilidade celular de fibroblastos L929 em cultura após 24 horas de incubação com TNFα em concentrações crescentes de 40 ng/mL a 0,01 ng/mL. a) representa a curva de regressão linear mostrando a citotoxicidade de TNFα em células L929 e, b) a morfologia celular observada em microscopia óptica em aumento de 10x100 (Nikon Eclipse TE300) para (A) células viáveis e (B) células apoptóticas em adição de 2 ng de rhTNFα.

O anticorpo adabut/seleção 2B purificado foi avaliado frente à possibilidade intrínseca de causar citotoxicidade. Utilizando o ensaio de MTT, foram quantificados 7 poços contendo células L929 incubadas com apenas o anticorpo, onde obteve-se leitura média de DO_{595nm} 0,897 ± 0,05,

resultado semelhante ao encontrado no controle sem adição de anticorpo (apenas células) em média de leitura realizada para 12 poços, DO_{595nm} 0,898 ± 0,03 (figura 4.18). O resultado mostra que não há efeito de toxicidade celular causado pelo anticorpo adabut produzido e purificado. Junto aos resultados mostrados na figura 4.18 para o experimento com células L929 e anticorpo adabut, estão apresentados também dados obtidos em outro teste realizado posteriormente para avaliar a citotoxicidade intrínseca do anticorpo adalimumabe (Humira®), resultando negativo assim como o anticorpo teste adabut. A ausência de toxicidade intrínseca também foi indicada visualmente em células humanas HUVEC, conforme item 4.9.2.

Figura 4.18 - Prova de ausência de citotoxicidade intrínseca de anti-TNFα adabut purificado.

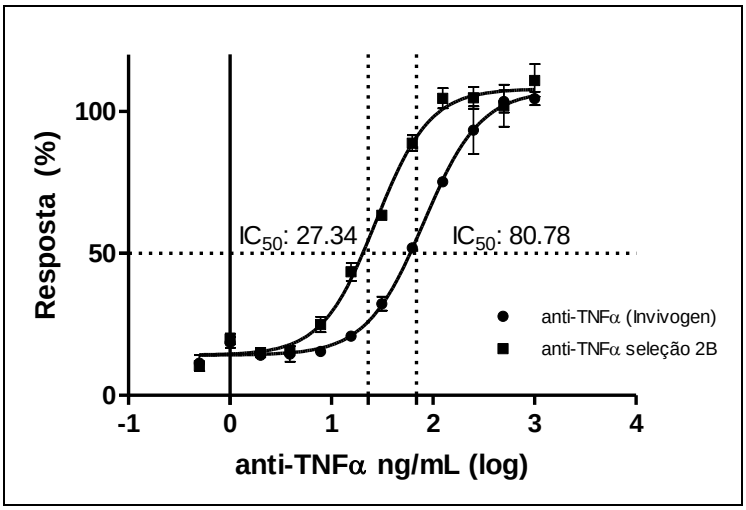


Média de leituras de DO_{595nm} obtidas em ensaio colorimétrico de viabilidade celular por MTT a 5 mg/mL durante a padronização do protocolo de neutralização de citotoxicidade induzida com rhTNFα 10 ng/mL por anti-TNFα. Fibroblastos murinos L929 sensibilizados com actinomicina-D foram incubados em meio RPMI a 37 °C em CO_2 5% durante 20 h com 1 µg/mL de anticorpo anti-hTNFα/seleção 2B apenas e, posteriormente, também para o anticorpo adalimumabe (Humira®). O gráfico apresenta o número amostral e a barra de erro corresponde ao desvio padrão estabelecidos na análise.

Para determinar a janela de neutralização de anti-TNFα a concentração de TNFα escolhida foi 0,5 ng/mL, pois apresentou elevada citotoxicidade celular impedindo com que excessos da proteína saturassem a detecção de neutralização pelo anticorpo. A padronização do protocolo foi iniciada com o anticorpo adabut/seleção 2B que se mostrou capaz de neutralizar 100% do TNFα nas concentrações de 1 µg/mL, com leituras de DO_{595nm} 0,704 ± 0,05, até 0,12 µg/mL, de DO_{595nm} 0,664 ± 0,03, leituras similares às obtidas com o controle sem adição de TNFα, de DO_{595nm} 0,635 ± 0,05 (figura 4.19). O anticorpo utilizado como controle positivo (Invivogen) apresentou neutralização máxima de TNFα nas concentrações de 1 µg/mL, DO_{595nm} 0,664 ± 0,02, até 0,25 µg/mL, DO_{595nm} 0,593 ± 0,08. O cálculo de IC_{50} indicou concentração de 27,34 ng/mL para adabut/seleção 2B e de 80,78 ng/mL para o controle anti-TNFα (Invivogen).

As variações existentes na metodologia de quantificação de anticorpos (como a empregada para o adabut em relação ao método utilizado pelo fabricante, não reportado) e no próprio ensaio de neutralização de citotoxicidade não permitem assumir que a atividade de adabut seja superior à encontrada no anticorpo controle. Um método alternativo para quantificação que responderia esta pergunta poderia ser a liofilização do material e posterior quantificação a partir de peso seco. Desta forma, o anticorpo poderia seguramente ser ressuspendido com a concentração de trabalho. Ainda assim, o experimento permitiu validar o protocolo, comprovando que o anticorpo adabut produzido apresenta atividade funcional, ou seja, é capaz de impedir a toxicidade celular induzida por TNFα *in vitro*, propósito da análise.

Figura 4.19 - Efeito de neutralização de anti-hTNFα a TNFα e concentração inibitória (IC_{50}).



Curva de IC_{50} (ng/mL) de anti-TNFα em experimento de inibição da citotoxicidade induzida por rhTNFα em fibroblasto murino L929. Os anticorpos anti-TNFα adabut/seleção 2B e Invivogen foram diluídos serialmente na razão 1:2 em concentrações de 1 µg/mL a ~0,5 ng/mL e incubados com rhTNFα a 10 ng/mL. As curvas foram obtidas utilizando a média e desvio padrão de duplicatas a partir da leitura de DO_{595nm} em ensaio colorimétrico de viabilidade celular por MTT a 5 mg/mL.

Analisando os resultados prévios de cultivo em batelada alimentada e cinética de ligação ao TNFα, os anticorpos produzidos pelos diferentes clones foram classificados e escolhidos para seguimento com os ensaios de caracterização. Sabendo-se que não houve diferença entre a afinidade dos anticorpos ao TNFα, os critérios de escolha foram baseados na melhor produtividade e perfil celular em cultivo. Assim, foram testados no ensaio de neutralização de citotoxicidade os clones eleitos: 14, 70, 109, 123, 143, 173, 177, 223, 225, 231, 246, totalizando

11 dos 33 anticorpos produzidos ou um terço dos que apresentaram melhor desempenho. Foi incluído na análise para comparação o anticorpo referência adalimumabe (Humira®).

O protocolo de neutralização de citotoxicidade foi reproduzido para cada um dos anticorpos, em réplicas de experimentos independentes. Conforme apresentado na tabela 4.8, o total de 6 dos 11 anticorpos não apresentou diferença estatística significativa (P>0,05) para a IC_{50} em teste estatístico t de Student quando comparados a IC_{50} encontrada para o anticorpo controle adalimumabe (Humira®): os clones 14, 70, 123, 177, 231 e 246.

Tabela 4.8 - Ensaio de inibição da citotoxicidade induzida com TNFα por anti-TNFα produzido por diferentes clones.

Clone	IC_{50} Média (ng/mL)	SD	CV	P*
14	284,7	106,0	37,2	0,088
70	160,4	101,7	63,4	0,281
109	350,7	148,2	42,3	**0,045**
123	184,7	65,3	35,4	0,408
143	427,3	114,0	26,7	**0,004**
173	339,3	67,3	19,8	**0,009**
177	242,6	27,1	11,2	0,078
223	417,8	98,0	23,5	**0,004**
225	325,2	126,5	38,9	**0,049**
231	254,5	198,6	78,0	0,286
246	236,0	83,4	35,3	0,213
Humira®	194,7	43,2	22,2	–

IC_{50} média (ng/mL), desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) estabelecidos a partir da leitura de duplicatas de 3 a 4 experimentos independentes realizados para cada anticorpo. *P<0,05 = significante obtido em teste estatístico t de Student para a comparação dos anticorpos expressos pelos clones 14, 70, 109, 123, 143, 173, 177, 223, 225, 231 e 246 com o anticorpo controle adalimumabe (Humira®). O experimento indicou com intervalo de confiança de 95% a diferença entre os anticorpos produzidos pelos clones 109, 143, 173, 223 e 225 e o anticorpo referência, conforme valor de P destacado na tabela.

Considerando a variabilidade observada no ensaio, inerente ao método colorimétrico de MTT em fibroblastos, e buscando sempre preservar um maior número de clones/anticorpos para avaliação nos ensaios subsequentes (experimentos de estabilidade em cultivo por tempo prolongado e um segundo ensaio de caracterização, respectivamente itens 4.10 e 4.9.2), a exclusão dos cinco anticorpos diferentes estatisticamente, 109, 143, 173, 223 e 225, foi cautelosamente ponderada em uma análise individual. Dos candidatos a exclusão, dois deles

apresentaram resultado estatístico muito próximo a referência aceita de P=0,05, os clones 109 e 225 (P=0,045 para o clone 109 e 0,049 para o clone 225), e foram reavaliados segundo o desempenho em critérios de crescimento, viabilidade celular e produtividade (tabela 4.9). Ambos os clones apresentaram grande semelhança em produtividade, em torno de ~360 µg/mL segundo quantificação realizada por SPR no dia 12 de cultivo em batelada alimentada (item 4.6), e também no parâmetro densidade celular atingida, em torno de 24 x 10^6 v.c./mL, ambos no dia 7 de cultivo. Entretanto, o clone 225 apresentou viabilidade celular superior ao clone 109 de 70% após 14 dias de cultivo em comparação com ~35% para o clone 109. Assim, optou-se por preservar o clone 225 para as próximas etapas, excluindo o clone 109.

Tabela 4.9 - Comparação entre os anticorpos produzidos pelos clones 109 e 225 em critérios de crescimento, viabilidade celular e produtividade.

Clone	v.c. máx (x10^6)	Viabilidade (%)		anti-TNFα (µg/mL)	
		Dia 12	Dia 14	Dia 12	Dia 14
109	24,18	67,5	35,9	362,58	359,9
225	24,94	80,1	68,8	365,67	383,4

Análise dos anticorpos produzidos pelos clones 109 e 225 em critérios de crescimento, viabilidade celular e produtividade absoluta. Dados obtidos de um cultivo de batelada alimentada de duração de 14 dias e a partir de 0,3 x 10^6 células/mL cultivadas em 30 mL de meio CD Forti CHO suplementado com Gln 8 mM e agente anti-aglutinação a 1:1.000 a 37 ºC, 150 rpm e 8% CO_2. A comparação objetivou escolher o melhor dos clones para compor o grupo de anticorpos eleitos para teste em um segundo ensaio de caracterização funcional e para o experimento de estabilidade em cultivo por tempo prolongado durante 60 gerações.

Os clones 143 e 223 foram excluídos com segurança, pois ambos apresentaram P=0,004 e com um CV <30%. Já o clone 173, apesar da significância estatística observada em P<0,05, foi conservado, pois se mostrou como um dos principais clones em produtividade após cultivo em batelada alimentada de 14 dias, com concentração final de anticorpo de 550,62 µg/mL.

Diversos protocolos para análise de citotoxicidade celular e coloração por MTT foram testados com sucesso após o primeiro ensaio descrito por Mosmann, 1983. Sua reprodutibilidade, entretanto, é dependente da capacidade variável das células em reduzir os sais de tetrazólio em formazan pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Um dos pontos mais críticos da análise envolve a solubilização dos cristais de formazan, que se acumulam como um precipitado insolúvel no interior das células, e são depositados próximos à superfície celular e também no meio de cultura (RISS et al., 2013). Os ensaios propostos por Carmichael et al., 1987 com uso de DMSO, são eficientes para a solubilização dos sais e práticos pois permitem que a leitura seja

realizada imediatamente, entretanto, necessitam da retirada do meio de cultivo para adição de DMSO, tornando-os técnicas menos reprodutíveis devido a possibilidade de carreamento diferencial de cristais. Já a solubilização com isopropanol proposta por Mosmann, 1983, é reportada como causa de interferência na leitura devido à precipitação de proteínas plasmáticas, provenientes da suplementação do meio de cultivo com SFB (DENIZOT; LANG, 1986). A escolha pela solubilização com SDS a 20%, apesar de demandar maior tempo operacional até a aquisição dos resultados, dispensava a necessidade de retirada do meio, o que poderia favorecer uma maior confiabilidade e reprodutibilidade dos experimentos.

Apesar da variabilidade observada no experimento, foi possível constatar a não inferioridade dos anticorpos produzidos quando comparados ao controle adalimumabe (Humira®). A IC_{50} média determinada para o anticorpo anti-hTNFα adabut/seleção 2B de 28,48 ± 1,7, mostra a possibilidade de que a população estável mista continha anticorpos com atividade funcional mais elevada, entretanto produzidos por clones instáveis ou concentrações abaixo do corte de produtividade estabelecido para a seleção dos clones. O resultado pode alertar para a necessidade de inclusão de critérios de classificação que também considerem a variável de atividade funcional ao longo do processo de isolamento monoclonal.

4.9.2 Inibição da expressão de ELAM-1 em células HUVEC

Os anticorpos produzidos pelos clones que apresentaram melhor resultado no experimento de neutralização de citotoxicidade foram avaliados novamente frente à capacidade de inibição da função efetora de TNFα em células humanas. O protocolo consiste no bloqueio da citocina pelo anti-TNFα com consequente inibição da expressão de moléculas de adesão ao endotélio de leucócitos (ELAM-1) de células HUVEC. Na presença de TNFα livre ocorre a ligação a TNFRs e expressão da selectina que pode ser reconhecida por outro anticorpo específico, passível de detecção.

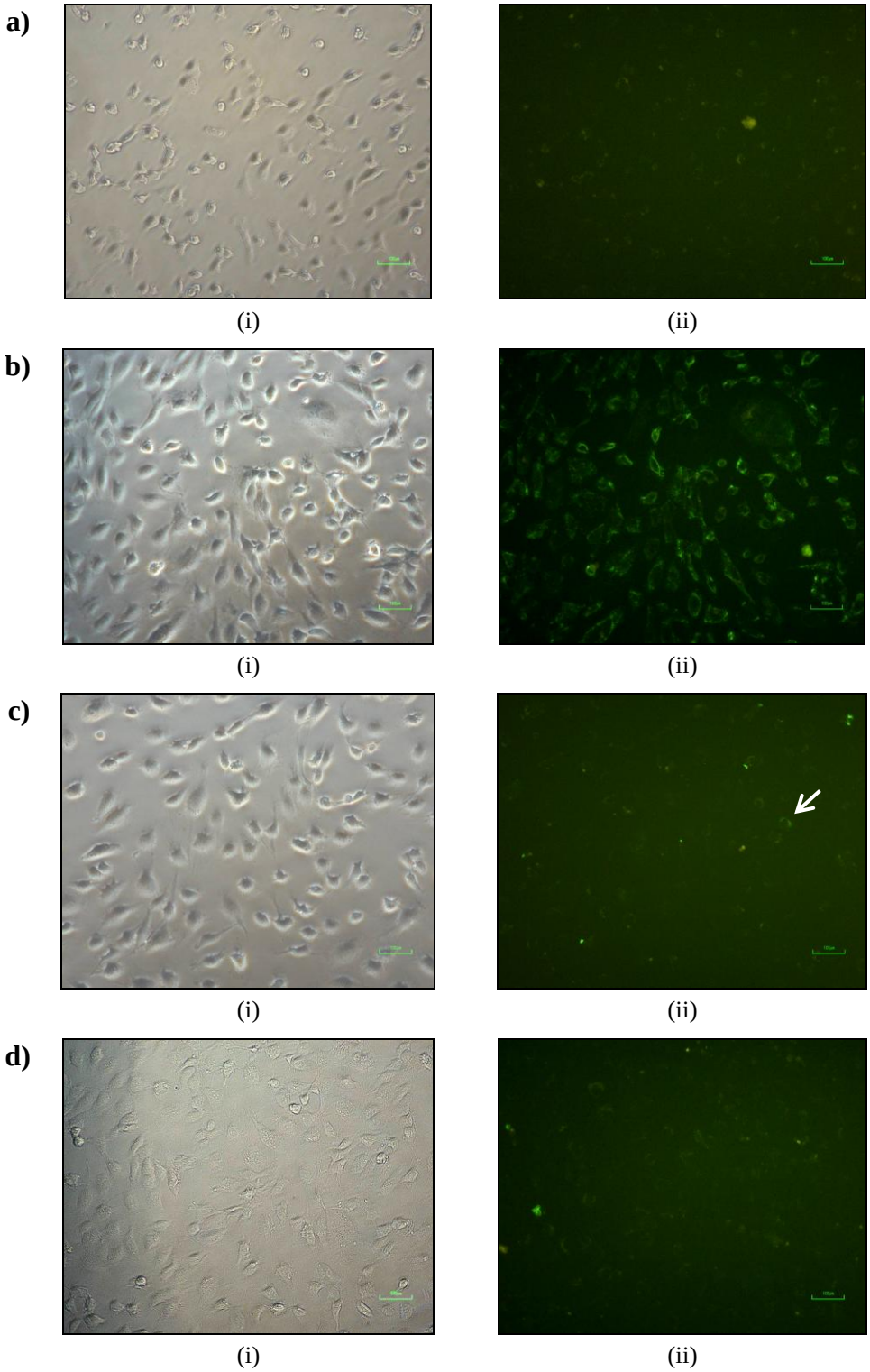
A expressão da selectina ELAM-1 ocorreu em HUVEC nas três concentrações de TNFα testadas: 50, 100 e 200 ng/mL, sendo reconhecida por seu anticorpo específico e conjugado marcado com FITC, conforme fluorescência que pode ser observada na figura 4.20. A imagem mostra a reação em aumento de 200 vezes, comparando as células em visualização por microscopia de campo claro e fluorescência. Já células HUVEC sem tratamento com TNFα,

utilizadas como controle negativo, não expressaram a molécula de adesão ELAM-1, e, consequentemente, não apresentaram fluorescência.

Os anticorpos anti-TNFα dos clones 14, 70, 123, 173, 177, 225, 231, 246 e adalimumabe (Humira®) foram incubados com TNFα na proporção Ac/Ag de 3000 vezes, razão aproximada a segunda diluição do anticorpo utilizada no ensaio de citotoxicidade para determinar a IC_{50} individual. O resultado apresentado na figura 4.20 compreende a concentração de TNFα de 100 ng/mL utilizada no ensaio para investigar a capacidade de bloqueio pelos anticorpos. Todos os anticorpos testados foram capazes de bloquear a citocina, impedindo expressão de ELAM-1, conforme perfil exemplificado na figura pelo anticorpo do clone 123. Entretanto, foi observada uma leve fluorescência para o anticorpo produzido pelo clone 173. A triagem realizada para o anticorpo adalimumabe (Humira®) também mostrou a existência de raras células com fluorescência, fato não observado nos demais anticorpos anti-TNFα adabut produzidos, mesmo em análise completa dos campos em aumento de 100 vezes. O achado não desqualifica o anticorpo produzido pelo clone 173, porém, cabe a observação de que o anticorpo produzido pelo clone 173 já apresentou histórico de atividade funcional diferenciada, inferior ao controle, motivo que pode permitir sua exclusão do grupo dos melhores anticorpos. O mesmo não foi constatado para o anticorpo do clone 225, que também apresentou diferença estatística em IC_{50} no experimento de citotoxicidade em fibroblasto murino.

A quantificação de TNFα residual por SPR mostrou resultados inconclusivos. Dentre as hipóteses levantadas que podem justificar os valores de ressonância contraditórios quando comparados ao controle estão: o material de análise ser instável, interferentes no meio de cultivo, e a baixa concentração do analito livre, inferior à capacidade de detecção pelo equipamento.

Figura 4.20 - Inibição da expressão de selectina ELAM-1 em células HUVEC.



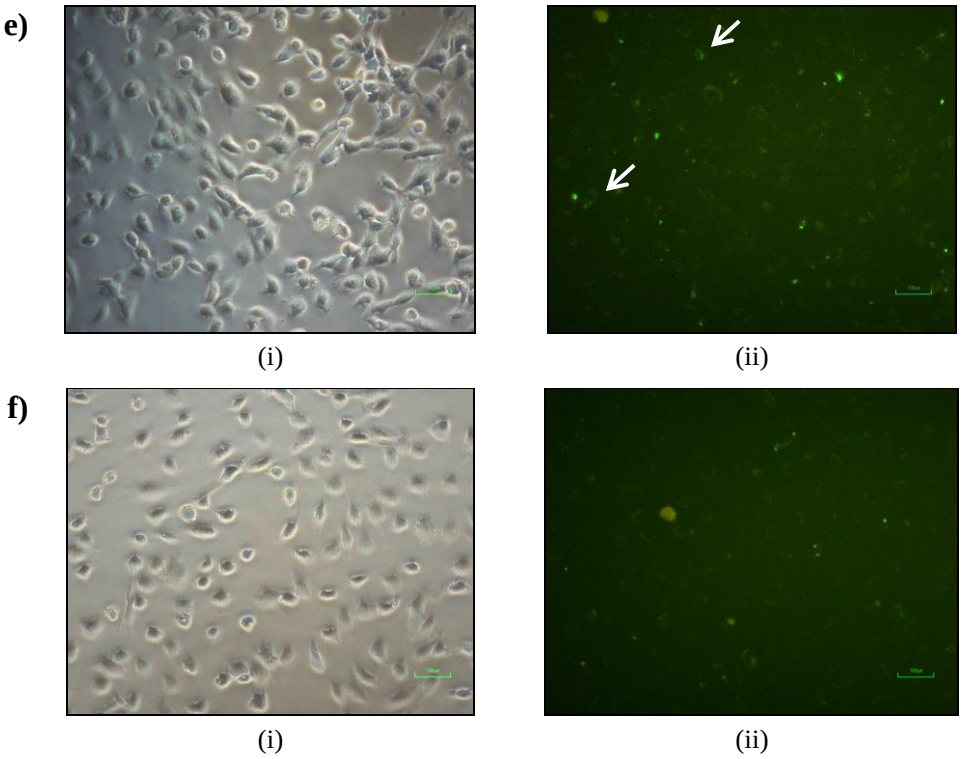


Imagem observada em microscopia de i) campo claro e ii) fluorescência para marcação de células com anti-ELAM-1 e conjugado murino anti-IgG-FITC em aumento de 10x20. **a)** células HUVEC; **b)** células HUVEC tratadas com TNFα a 100 ng/mL, e os ensaios com adição de anticorpo anti-TNFα a 300 µg/mL para bloqueio da citocina com **c)** adalimumabe (Humira®), e com os anticorpos expressos pelos clones **d)** 123, **e)** 173 e **f)** 225. A indicação em seta corresponde a leve fluorescência observada em raras células, quando incubadas com os anticorpos adalimumabe (Humira®) e o expresso pelo clone 173.

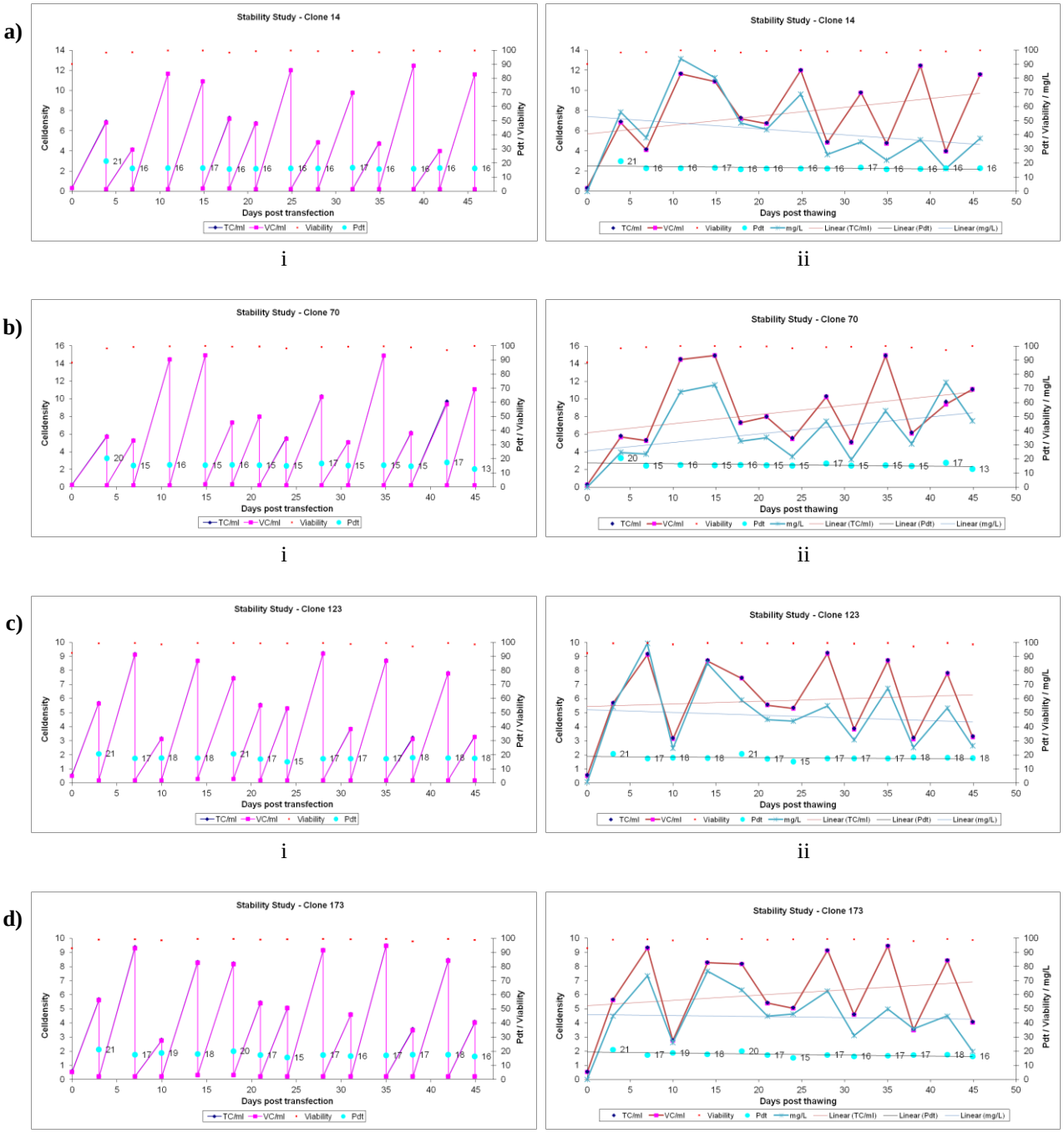
A expressão de E-selectina (ELAM-1) em células endoteliais ocorre após reconhecimento do TNFα por TNFR1 via NF-κB e também TNFR2, participando da resposta inflamatória durante o rolamento, adesão e migração transcelular de leucócitos ao sítio de inflamação (CHANDRASEKHARAN et al., 2007; TAUBITZ et al., 2013). Bevilacqua et al., 1994, compararam o perfil de expressão das selectinas em célula endotelial após indução com TNFα, e mostram que ELAM-1 atinge expressão máxima após 4-6 horas de indução, retornando a quantidades basais depois de 24-48h. Zeller et al., 2012, analisam a partir de protocolo desenvolvido de ELISA a expressão diferencial das moléculas de adesão ELAM-1, molécula de adesão de célula vascular (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule*) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule*) em células HUVEC induzidas com 100 ng/mL de TNFα durante 4 ou 15 horas. O experimento mostrou que o percentual de proteína expressa na superfície das células foi cerca de quatro vezes maior em ELAM-1 quando comparado a ICAM-1, sendo VCAM-1 expressa em percentuais intermediários (ZELLER et al.,

2012). A expressão de ELAM-1 está, naturalmente, aumentada na artrite reumatoide, bem como de VCAM-1 e ICAM-1, e em menor grau na osteoartrite, por exemplo (BEVILACQUA et al., 1994). Assim, o bloqueio da citocina pelo anticorpo anti-TNFα pode contribuir na redução da molécula livre, impedindo com que potencialize o efeito inflamatório e consequente patogenia das condições clínicas.

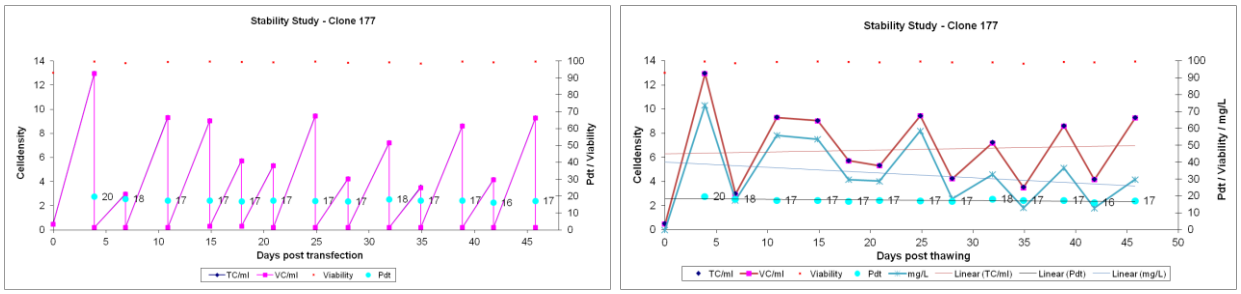
4.10 Estabilidade de expressão de anti-hTNFα em clones submetidos a cultivo por tempo prolongado

A estabilidade de expressão do anticorpo anti-hTNFα pelos clones 14, 70, 123, 173, 177, 225, 231 e 246 foi avaliada durante 60 gerações de cultivo, considerando um tempo médio de duplicação celular de 17 h e em um experimento contínuo de duração de 46 dias. Ao longo de todas as passagens, realizadas a cada 3 ou 4 dias, foram coletados pontos de todos os clones em teste para determinar o número de células e concentração de anticorpos expressos, além do congelamento de células aproximadamente nas gerações 0, 25, 45 e 60 para posterior análise de produtividade específica em um cultivo de cinco dias. Todos os clones continuaram a expressar o anticorpo durante os 46 dias de experimento, variando em relação ao número de células/concentração de anti-TNFα e onde foi possível estabelecer a tendência do crescimento celular e da expressão de anticorpos individualmente (figura 4.21).

Figura 4.21 - Estudo de estabilidade de clones: i) crescimento e ii) produtividade.

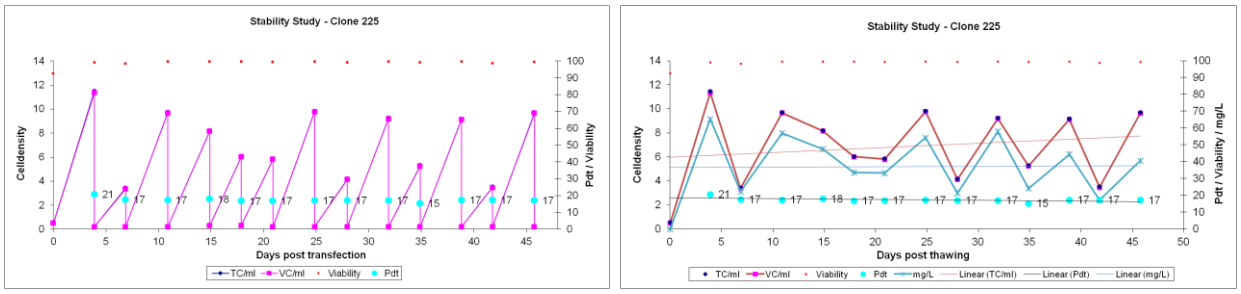


e)



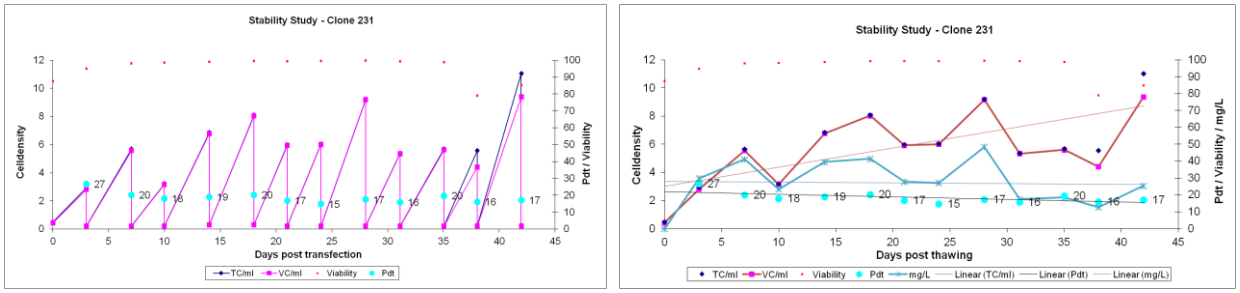
i ii

f)



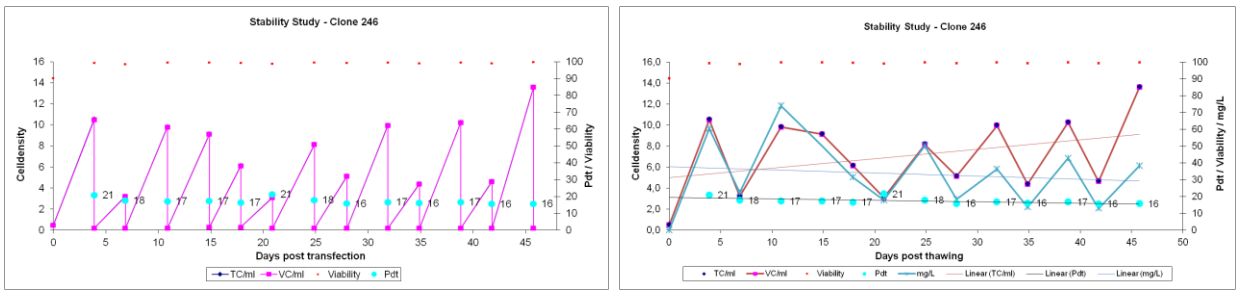
i ii

g)



i ii

h)

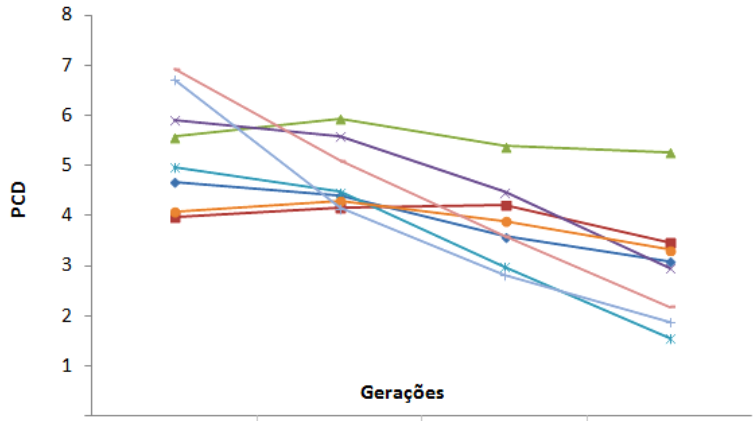


i ii

Estabilidade de expressão de anti-TNFα observada durante 60 gerações para: **a**) clone 14, **b**) clone 70, **c**) clone 123, **d**) clone 173, **e**) clone 177, **f**) clone 225, **g**) clone 231, **h**) clone 246. Os gráficos mostram em (i) densidade celular em cada uma das passagens, com sua respectiva viabilidade e PDT, e em (ii) densidade celular máxima, viabilidade e PDT obtidos em cada passagem, e respectiva produtividade de anticorpo ao longo das gerações, além de linhas de tendência para PDT, densidade celular e título de anticorpo. Cultivo realizado em meio Dynamis AGT, suplementado com 8 mM de glutamina e agente anti-aglutinação a 1:1000, sob 37ºC, 150 rpm e 8% CO_2 em um experimento contínuo de tempo médio de duração de 46 dias, e com passagens realizadas a cada 3-4 dias.

Os clones 14 e 246 apresentaram perfil semelhante com tendência a crescimento no número de células e decaimento na concentração de anticorpos, indicando uma possível instabilidade na expressão do anticorpo. Quando analisados individualmente em cultivo contínuo de cinco dias para determinar a produtividade específica (PCD) (figura 4.22), observou-se que o clone 14 apresentou redução de PCD de ~20% até a geração 45, chegando na geração 60 pouco acima de 30% (33,62%). Já o clone 246 apresentou decaimento próximo a 30% logo na geração 25, 50% na geração 45 e finalizando com redução de ~70%, considerado, portanto, instável. Os clones 70, 123 e 225 apresentaram tendência em crescimento celular e produtividade linear e constantes/estáveis finalizando o experimento na geração 60 com redução de, respectivamente, 12,57%, 5,49% e 18,54%. O clone 70 mostrou tendências paralelas crescentes para número de células e título de anticorpo. Os clones 123 e 225, com leve e gradual distanciamento das tendências ao longo das gerações, sendo observado um leve decaimento no título de anticorpo para o clone 123 e um leve aumento na densidade celular para o clone 225. Ambos os clones 173 e 177 manifestaram tendências paralelas e aparentemente estáveis: o clone 173 com tendências crescente no número de células e constante para a expressão de anticorpos, PCD <30% até a geração 45 e chegando a ~50% na geração 60; e, de maneira inversa, o clone 177 apresentou densidade celular constante, porém, título de anticorpo decrescente, decaindo em PCD >30% até a geração 45, e atingindo redução de aproximadamente 70% na geração 60. Estes dois clones foram considerados bons produtores apenas no início do cultivo, com PCDs em torno de 6 e 5 pcd na geração 0, respectivamente para clones 173 e 177. O clone 231 apresentou perfil de estabilidade atípico, onde foi constatada uma recorrente predisposição na formação de grumos de células, mesmo após filtração durante as passagens. O clone mostrou-se não adaptável a cultivo por tempo prolongado, utilizando agente anti-aglutinação na concentração de 1:1.000, e não foi possível determinar com segurança as tendências na relação entre o número de células/produtividade. A rastreabilidade do histórico do clone permitiu levantar a informação de que o mesmo já havia apresentado potencial para a formação de grumos, ambígua em cada etapa da geração de linhagem. O teste de estabilidade permitiu corroborar as evidências também pela observação do tempo de duplicação da população (PDT, *population doubling time*) desordenado, que variou de 15 a 27 horas, enquanto que os demais clones apresentaram PDTs mais constantes, coerentes com a média esperada para a célula CHO-S® (Life Technologies). O mesmo foi observado para a viabilidade celular, único clone com decaimento de ~99% para ~85%.

Figura 4.22 - PCD médio e percentual de variação de produtividade de clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes ao longo de 60 gerações.



Clone	0	25	45	60	Redução de produtividade entre gerações 0-60 (%)
14	4,66	4,40	3,58	3,09	33,62
70	3,96	4,17	4,20	3,46	**12,57**
123	5,57	5,93	5,38	5,26	**5,49**
173	5,91	5,59	4,47	2,96	49,88
177	4,97	4,47	2,98	1,56	68,59
225	4,08	4,29	3,89	3,32	**18,54**
231	6,72	4,15	2,82	1,88	72,10
246	6,93	5,10	3,58	2,18	68,50

Valores de PCD médios obtidos a partir de um cultivo de 5 dias para clones CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* recombinantes nas gerações 0, 25, 45 e 60. O percentual de redução de produtividade foi estabelecido para a geração 60, em comparação com o PCD determinado na geração 0. A imagem mostra as curvas de PCD onde, entre os clones, é possível distinguir os maiores valores de PCD médio encontrados na geração 60.

Vale destacar que o experimento foi realizado sem adição de agente de seleção (puromicina e metotrexato), de modo que a estabilidade obtida compreende a capacidade de expressão inerente de cada clone. Segundo Alvin e Ye, 2014, de uma maneira geral, a linhagem monoclonal é considerada estável quando a produtividade reduz em até 30% após 60-80 gerações. Assim, assumiu-se como estáveis os clones 70, 123 e 225, dentre os quais, o clone 123 foi o que apresentou resultados mais próximos de PCD entre as gerações 0 e 60, seguido pelos clones 70 e 225, de PCD similares. O clone 14 apresentou-se em estabilidade limítrofe, de modo que poderia ser reconsiderado, caso necessário.

Analisando o conjunto de dados levantados para os três clones considerados mais estáveis, como perfil de crescimento e viabilidade celular e expressão de anticorpos, observa-se que dentre todos os clones analisados no processo de geração de linhagem celular, os melhores foram o 123>70=225 (tabela 4.10). A produção absoluta de anticorpos foi maior para o clone

123, seguido por valores próximos nos clones 70 e 225, mesma relação observada em PCD médio de cinco dias no experimento de estabilidade (figura 4.22).

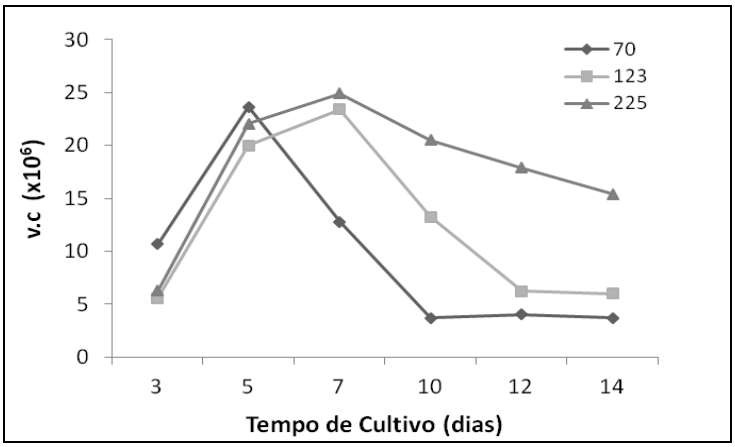
Tabela 4.10 - Comparação entre os três clones mais estáveis segundo critérios de crescimento e viabilidade celular e concentração de anticorpos anti-TNFα.

Clone	v.c. máx ($x10^6$)	Viabilidade (%)		anti-TNFα (µg/mL)			
				Dia 12		Dia 14	
		Dia 12	Dia 14	ELISA	BIAcore	ELISA	BIAcore
70	23,63	65,2	60,8	440,00	328,82	357,02	398,88
123	23,44	56,2	47,1	626,84	593,74	562,65	559,89
225	24,94	80,1	68,8	423,47	365,67	422,09	383,35

Análise dos clones 70, 123 e 225 em critérios de crescimento, viabilidade celular e produtividade absoluta. Resultados obtidos a partir de um cultivo de batelada alimentada de duração de 14 dias e partindo de 0,3 x 10^6 células/mL cultivadas em 30 mL de meio CD Forti CHO suplementado com Gln 8 mM e agente anti-aglutinação a 1:1.000 a 37 ºC, 150 rpm e 8% CO_2 (item 4.6). Na tabela são apresentadas as quantificações realizadas por ELISA e BIAcore.

A figura 4.23 mostra o perfil de crescimento celular diferencial entre os três clones ao longo dos 14 dias de cultivo em experimento de batelada alimentada (item 4.6). Todos os clones atingiram densidade celular máxima muito próxima, entre, aproximadamente 23,5 e 25 x 10^6, entretanto, em dias diferentes, sendo o clone 70 no dia 5 e os clones 123 e 225 no dia 7. O mesmo ocorreu para o decaimento, iniciado no dia 7 para o clone 70 e no dia 10 para os clones 123 e 225.

Figura 4.23 - Curva de crescimento celular de CHO-S®/pCHO 1.0/*HC-LC.adabut* clones 70, 123 e 225 em cultivo de bateada alimentada.



Curva de crescimento obtida em experimento de batelada alimentada de 14 dias e partindo de 0,3 x 10^6 células/mL em 30 mL de meio CD Forti CHO suplementado com Gln a 8 mM e agente anti-aglutinação a 1:1.000, a 37 ºC, 150 rpm e 8% CO^2 (item 4.6). Ao longo do cultivo, foram realizadas suplementações do meio com glicose nos dias 3 (4 g/L), 5 (4 g/L), e 7 (6 g/L). Contagem realizada pelo método de azul de tripano em plataforma automatizada Vi-CELL.

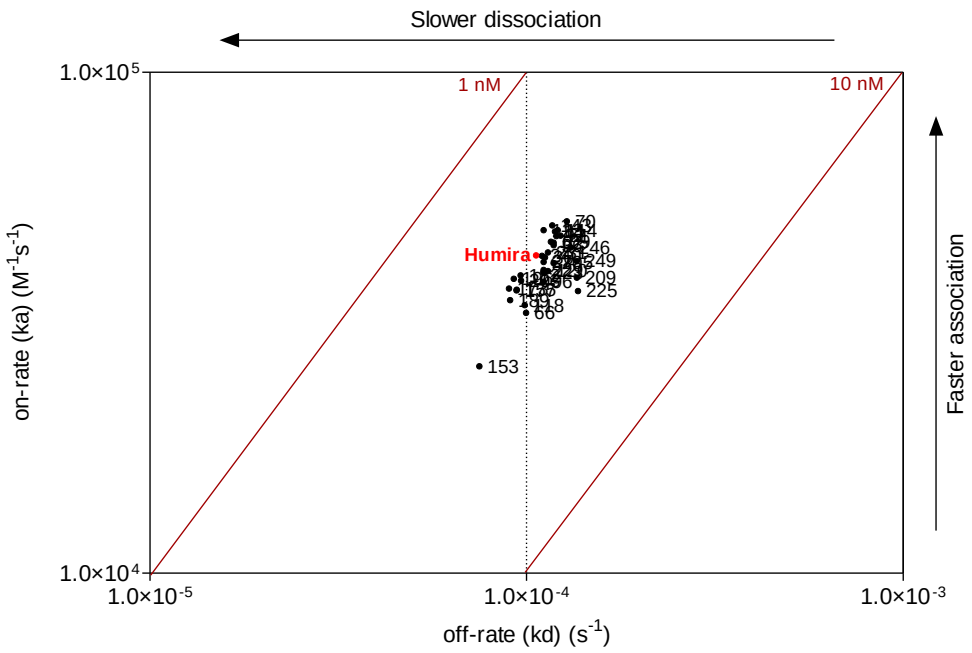
4.11 Avaliação de clones potencialmente produtores de anticorpo de segunda geração

Os 33 anticorpos produzidos pelos clones classificados para cultivo em batelada alimentada (item 4.6) foram purificados (item 4.7) e analisados quanto a variações no perfil de reconhecimento por receptores do tipo Fcγ. A afinidade diferencial poderia correlacioná-los a potenciais anticorpos de segunda geração. A triagem de variantes de região Fc do anti-TNFα foi realizada por SPR frente ao reconhecimento pelo receptor de ativação inflamatória FcγRI e o de inibição da resposta FcγRIIB/C.

Os dados de cinética para FcγRI mostram variação de afinidade máxima de 3,83 x 10^{-9} M para o anticorpo do clone 225 a mínima de 2,29 x 10^{-9} M para o anticorpo do clone 123, em comparação com um K_D de 2,51 x 10^{-9} M para o anticorpo adalimumabe (Humira®). Já para FcγRIIB/C a força de afinidade variou de 6,48 x 10^{-9} M para o anticorpo adalimumabe até 1,27 x 10^{-9} M para o anticorpo expresso pelo clone 182 (figura 4.24 e tabela 4.11).

Figura 4.24 - Afinidade de ligação de anti-TNFα produzido por diferentes clones aos receptores FcγRI e FcγRIIB/C.

a)



b)

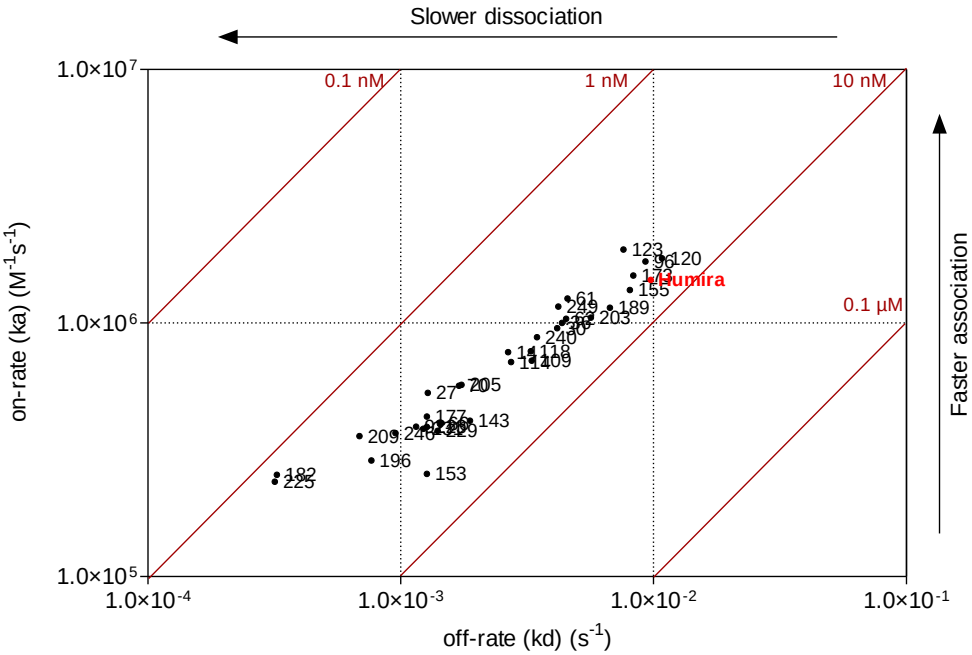


Gráfico representando a relação entre as constantes de associação (k_a), expressa em 1/M.s e de dissociação (k_d) em s^{-1} para 33 anticorpos produzidos por diferentes clones. **a)** corresponde a afinidade ao FcγRI e **b)** ao FcγRIIB/C. As constantes foram determinadas por SPR em dois experimentos independentes e o valor apresentado refere-se à média dos resultados obtidos. A linha diagonal corresponde a constante de afinidade (K_D) expressa em nM. Destaque para o resultado obtido para o anticorpo referência adalimumabe (Humira®).

Tabela 4.11 - Afinidade de ligação de anti-hTNFα produzido por diferentes clones a receptores FcγRI e FcγRIIB/C.

Clone	FcRI		FcRII	
	K_D médio (M)	**SD**	**K_D médio (M)**	**SD**
14	$2,64 \times 10^{-9}$	$5,44 \times 10^{-10}$	$3,44 \times 10^{-9}$	$1,63 \times 10^{-10}$
27	$2,86 \times 10^{-9}$	$6,72 \times 10^{-10}$	$3,11 \times 10^{-9}$	$2,53 \times 10^{-9}$
30	$2,87 \times 10^{-9}$	$8,27 \times 10^{-10}$	$3,93 \times 10^{-9}$	$9,33 \times 10^{-10}$
36	$2,87 \times 10^{-9}$	$9,26 \times 10^{-10}$	$3,79 \times 10^{-9}$	$1,15 \times 10^{-9}$
61	$2,80 \times 10^{-9}$	$7,28 \times 10^{-10}$	$3,29 \times 10^{-9}$	$7,57 \times 10^{-10}$
62	$2,82 \times 10^{-9}$	$9,12 \times 10^{-10}$	$3,85 \times 10^{-9}$	$1,03 \times 10^{-9}$
66	$3,04 \times 10^{-9}$	$3,68 \times 10^{-10}$	$3,55 \times 10^{-9}$	$3,61 \times 10^{-10}$
70	$2,73 \times 10^{-9}$	$7,35 \times 10^{-10}$	$2,94 \times 10^{-9}$	$3,75 \times 10^{-10}$
92	$2,70 \times 10^{-9}$	$5,87 \times 10^{-10}$	$2,95 \times 10^{-9}$	$5,66 \times 10^{-10}$
96	$3,01 \times 10^{-9}$	$7,71 \times 10^{-10}$	$5,26 \times 10^{-9}$	$1,05 \times 10^{-9}$
109	$2,80 \times 10^{-9}$	$1,05 \times 10^{-9}$	$4,40 \times 10^{-9}$	$6,93 \times 10^{-10}$
114	$2,74 \times 10^{-9}$	$9,12 \times 10^{-10}$	$3,77 \times 10^{-9}$	$4,17 \times 10^{-10}$
118	$2,96 \times 10^{-9}$	$7,49 \times 10^{-10}$	$4,10 \times 10^{-9}$	$3,32 \times 10^{-10}$
120	$3,00 \times 10^{-9}$	$9,76 \times 10^{-10}$	$6,00 \times 10^{-9}$	$7,99 \times 10^{-10}$
123	$2,29 \times 10^{-9}$	$2,12 \times 10^{-11}$	$3,87 \times 10^{-9}$	$5,3 \times 10^{-10}$
143	$2,37 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-11}$	$4,56 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-10}$
153	$2,90 \times 10^{-9}$	$1,41 \times 10^{-11}$	$4,90 \times 10^{-9}$	$1,17 \times 10^{-9}$
155	$2,58 \times 10^{-9}$	$2,76 \times 10^{-10}$	$5,31 \times 10^{-9}$	$1,63 \times 10^{-9}$
173	$2,45 \times 10^{-9}$	$2,47 \times 10^{-10}$	$5,28 \times 10^{-9}$	$1,22 \times 10^{-9}$
177	$2,58 \times 10^{-9}$	$2,12 \times 10^{-10}$	$2,96 \times 10^{-9}$	$2,97 \times 10^{-10}$
182	$2,49 \times 10^{-9}$	$4,53 \times 10^{-10}$	$1,27 \times 10^{-9}$	$2,83 \times 10^{-10}$
189	$2,59 \times 10^{-9}$	$2,26 \times 10^{-10}$	$5,63 \times 10^{-9}$	$9,97 \times 10^{-10}$
196	$2,42 \times 10^{-9}$	$3,39 \times 10^{-10}$	$2,59 \times 10^{-9}$	$5,94 \times 10^{-10}$
203	$2,53 \times 10^{-9}$	$2,40 \times 10^{-10}$	$4,10 \times 10^{-9}$	$2,62 \times 10^{-9}$
205	$2,85 \times 10^{-9}$	$6,01 \times 10^{-10}$	$3,03 \times 10^{-9}$	$4,95 \times 10^{-11}$
209	$3,53 \times 10^{-9}$	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,88 \times 10^{-9}$	$4,53 \times 10^{-10}$
223	$2,80 \times 10^{-9}$	$4,38 \times 10^{-10}$	$3,22 \times 10^{-9}$	$3,39 \times 10^{-10}$
225	$3,83 \times 10^{-9}$	$1,50 \times 10^{-9}$	$1,34 \times 10^{-9}$	$1,56 \times 10^{-10}$
229	$2,76 \times 10^{-9}$	$3,25 \times 10^{-10}$	$3,73 \times 10^{-9}$	$9,19 \times 10^{-11}$
231	$2,61 \times 10^{-9}$	$2,47 \times 10^{-10}$	$3,15 \times 10^{-9}$	$6,77 \times 10^{-10}$
240	$2,56 \times 10^{-9}$	$2,55 \times 10^{-10}$	$3,92 \times 10^{-9}$	$1,06 \times 10^{-10}$
246	$2,92 \times 10^{-9}$	$5,73 \times 10^{-10}$	$2,54 \times 10^{-9}$	$5,09 \times 10^{-10}$
249	$3,21 \times 10^{-9}$	$1,97 \times 10^{-9}$	$3,63 \times 10^{-9}$	$2,12 \times 10^{-11}$
Humira	$2,51 \times 10^{-9}$	$5,02 \times 10^{-10}$	$6,48 \times 10^{-9}$	$1,61 \times 10^{-9}$

Valores de força de afinidade encontrados para os 33 clones em análise e para o anticorpo controle adalimumabe (Humira®). Foram realizados dois experimentos independentes utilizando o sobrenadante de cultivo purificado de um cultivo de batelada alimentada de 14 dias. Valores de k_d expressos em 1/s, de k_a em 1/MS e K_D em M.

Todos os anticorpos apresentaram força de afinidade de mesma ordem de grandeza. A análise estatística indicou que não existe diferença significativa entre o K_D encontrado para ambos os receptores Fcγ estudados.

O reconhecimento de anticorpos pelos diferentes receptores de imunoglobulina pode interferir no perfil de resposta inflamatória celular (BRUHNS et al., 2009). O experimento objetivou analisar a expressão de Fc nos clones com o intuito de rastrear um anticorpo com afinidade superior ao receptor de inibição FcγRIIB/C quando comparado ao disponível comercialmente (adalimumabe, Humira®), e assim embasar o desenvolvimento de uma molécula biossuperiora (*biobetter* ou anticorpo de segunda geração), ou seja, com vantagens clínicas quando comparado ao tratamento atual. A investigação, entretanto, não é definitiva e pode ser continuada com a análise de moléculas de sinalização intracelulares que comprovem que, o anticorpo recombinante além de neutralizar a função de TNFα via reconhecimento de Fab, pode exercer função efetora de supressão da resposta inflamatória, via ativação do motivo inibidor do imunorreceptor baseado em tirosina (iTIM, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) (MUTA et al., 1994).

A expressão de anticorpos variantes pelos diferentes clones pode estar associada a modificações pós-traducionais pela célula, relacionadas à inserção aleatória do gene heterólogo no genoma do hospedeiro durante a transfecção, entre outras causas. A glicosilação de Fc compreende uma característica específica de cada clone (DOS SANTOS et al., 2013), de modo que a obtenção de um anticorpo biossuperior em termos de reconhecimento preferencial por FcγRIIB/C poderia acarretar em um tratamento de melhor prognóstico em doenças autoimunes devido ao estímulo de cessação de resposta imune. Magnusson et al., 2014, descrevem que pacientes com artrite reumatoide ativa apresentam função de FcγR desregulada, com superexpressão de FcγRI, II e IgG de superfície, fenótipo diferencial que poderia inclusive ser empregado como marcador diagnóstico para a AR ativa. Van Lent et al., 2001, examinaram a participação individual de FcγRs em modelo experimental de artrite induzida com BSA metilada utilizando camundongos FcγRI$^{-/-}$, FcγRII$^{-/-}$ e FcγRIII$^{-/-}$. Durante a resposta mediada por linfócitos T, ambos FcγRI e FcγRIII atuam estimulando a inflamação aguda e crônica, sendo FcγRI o principal FcγR envolvido na destruição de cartilagens. FcγRII participa como um fator crucial para a inibição da inflamação aguda e crônica e destruição de cartilagens. A presença de exudato e infiltração celular nas articulações após 7 dias de indução experimental foi similar em FcγRI$^{-/-}$ e

III$^{-/-}$, e, respectivamente, 230% e 340% superior em FcγRII$^{-/-}$ (VAN LENT et al., 2001). Além do envolvimento de FcγRII no controle de respostas imune e inflamatória, onde variações gênicas estão associadas à susceptibilidade a doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla e artrite reumatoide, o receptor também está associado à regulação da defesa pelo organismo contra infecções (SMITH; CLATWORTHY, 2010). Apesar do resultado encontrado no experimento, ainda há a possibilidade de aprimoramento do anticorpo produzido, como, por exemplo, através de modificações pontuais na molécula induzida por mutações sítio dirigidas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O projeto comprovou a factibilidade do desenvolvimento de anticorpos terapêuticos anti-TNFα capazes de neutralizar a atividade funcional de TNFα, e, portanto, empregá-los para o controle de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, utilizando plataforma estabelecida em nosso laboratório. Considerando os resultados obtidos, o trabalho apresentado nesta tese representa pela primeira vez descrita no país a capacitação para os estágios iniciais de desenvolvimento de um anticorpo monoclonal "biossimilar", com a geração de linhagens celulares produtoras do anticorpo adalimumabe/adabut. Ainda que várias empresas estejam atualmente envolvidas em parcerias para o desenvolvimento produtivo (PDPs), promovidas pelo Ministério da Saúde para a fabricação de anticorpos monoclonais biossimilares no Brasil, todas estão importando as etapas do desenvolvimento em processos de transferência de tecnologia. Cabe lembrar, entretanto, que este processo não inclui necessariamente as etapas para a geração das linhagens celulares.

A classificação como biossimilar proposta para o anticorpo desenvolvido neste trabalho deve ser utilizada com parcimônia, pois não avançamos em todos os aspectos e obstáculos legais necessários para a discutível "comprovação de biossimilaridade", dependente também de outros aspectos não triviais, como o modo de fabricação e da formulação do produto. Contudo, o anticorpo monoclonal produzido pelos clones e avaliado como "não inferior" finaliza uma etapa essencial e indispensável para o processo de desenvolvimento completo. Nenhum dos resultados dos testes realizados apresentou inferioridade quando confrontados com a referência, seja por métodos físico-químicos ou estudos de função efetora.

A estratégia utilizada para a identificação dos melhores clones mostrou-se bastante eficiente. Ao longo do processo, foram estabelecidos critérios de seleção desde a primeira etapa de ampliação dos clones em placas de 96 poços até o cultivo escalonado em SF sob agitação, considerando parâmetros como: i) crescimento celular, pela confluência nos primeiros estágios em placa de 96 e 24 poços, seguindo com o auxílio de citômetro de fluxo Guava em placa de 6 poços e finalmente, com a ampliação do cultivo, utilizando plataforma automatizada Vi-Cell; ii) viabilidade celular, nas primeiras etapas pela análise visual ou hemocitômetro, e, posterior ao aumento de volume do cultivo, com Vi-Cell; iii) concentração dos anticorpos, dosados no sobrenadante pelos métodos de ELISA e SPR; iv) produtividade, inicialmente considerando

apenas a produtividade absoluta e com a ampliação do cultivo e obtenção volume excedente para a contagem do número de células, analisando também a produtividade específica (PCD); v) adaptação das células ao cultivo, na transferência do crescimento estático para a agitação orbital, considerando a concentração do agente anti-aglutinação e também a formação de grumos.

O cultivo em batelada alimentada, normalmente escolhido para a produção dos anticorpos comerciais, foi realizado com o objetivo de avaliar e prever o comportamento de cada clone em grande escala e permitiu estabelecer a curva de produtividade. A estabilidade por tempo prolongado, durante 60 gerações, abrangendo além do período de produção em escala industrial (geralmente de 14 dias), permitiu conhecer o perfil de expressão dos clones, evitando a continuidade dos não robustos. O ensaio de cinética de afinidade ao hTNFα e os dois diferentes ensaios funcionais com as células L929 e HUVEC, estes últimos limitados aos clones de interesse devido ao grau de complexidade do experimento utilizando diversos anticorpos, permitiram qualificar os melhores anticorpos produzidos pelos diferentes clones. Estas etapas avançadas compreendem a fase mais crítica durante a geração da linhagem celular e são determinantes para garantir a qualidade do produto, encurtando prazos para o desenvolvimento de processos e reduzindo os custos finais de produção.

Os resultados apresentados indicam que dispomos de clones eficientes para a fabricação nacional de um anti-TNFα terapêutico. Neste sentido seguem as próximas etapas do projeto, onde será avaliada a possibilidade de comprovar a biossimilaridade segundo outros ensaios (alguns não disponíveis no Brasil) recomendados para regulamentação de medicamentos biossimilares junto aos órgãos competentes ou direcionar para o desenvolvimento de um anticorpo biossuperior em relação à referência.

REFERÊNCIAS[1]

ABRAHAM, E.; WUNDERINK, R.; SILVERMAN, H.; PERL, T. M.; NASRAWAY, S.; LEVY, H.; BONE, R.; WENZEL, R. P.; BALK, R.; ALLRED, R.; PENNINGTON, J. E.; WHERRY, J. C. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. **The Journal of the American Medical Association**, v. 273, p. 12, n. 934-941, 1995.

AGGARWAL, B. B.; EESSALU, T. E.; HASS, P. E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. **Nature**, v. 318, n. 6047, p. 665-667, 1985.

AIKAWA, N. E.; DE CARVALHO, J. F.; SILVA, C. A. A; BONFÁ, E. Immunogenicity of Anti-TNF-alpha agents in autoimmune diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 38, n .2-3, p. 82-89, 2010.

ALAMANOS, Y.; VOULGARI, P. V.; DROSOS, A. A. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 3, p. 182-188, 2006.

ALVIN, K.; YE, J. Generation of cell lines for monoclonal antibody production. **Methods in Molecular Biology**, v. 1131, p. 263-271, 2014.

ANTONI, C.; BRAUN, J. Side effects of anti-TNF therapy: current knowledge. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. S152-157, 2002. Suppl 28.

ANTONI, C. E.; KAVANAUGH, A.; KIRKHAM, B.; TUTUNCU, Z.; BURMESTER, G. R.; SCHNEIDER, U.; FURST, D. E.; MOLITOR, J.; KEYSTONE, E.; GLADMAN, D.; MANGER, B.; WASSENBERG, S.; WEIER, R.; WALLACE, D. J.; WEISMAN, M. H.; KALDEN, J. R.; SMOLEN, J. Sustained benefits of infliximab therapy for dermatologic and articular manifestations of psoriatic arthritis: results from the infliximab multinational psoriatic arthritis controlled trial (IMPACT). **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1227-1236, 2005.

BAERT, F.; NOMAN, M.; VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; D' HAENS, G.; CARBONEZ, A.; RUTGEERTS, P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 7, p. 601-608, 2003.

BARNES, P.J. Glucocorticosteroids: current and future directions. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 1, p. 29-43, 2011.

BARTELDS, G. M.; WOLBINK, G. J.; STAPEL, S.; AARDEN, L.; LEMS, W. F.; DIJKMANS, B. A.; NURMOHAMED, M. T. High levels of human anti-human antibodies to adalimumab in a

[1]De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

patient not responding to adalimumab treatment. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 9, p. 1249-1250, 2006.

BAUSS, F.; DROGE, W.; MANNEL, D. N. Tumor necrosis factor mediates endotoxic effects in mice. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 7, p. 1622-1625, 1987.

BERNARDINO, L.; AGASSE, F.; SILVA, B.; FERREIRA, R.; GRADE, S.; MALVA, J. O. Tumor necrosis factor-alpha modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2361-2371, 2008.

BERNSTEIN, C. N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J. H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S.; GEARRY, R.; GOH, K. L.; HAMID, S.; KHAN, A. G.; LEMAIR, A. W.; MALFERTHEINER; OUYANG, Q.; REY, J. F.; SOOD, A.; STEINWURZ, F.; THOMSEN, O. O.; THOMSON, A.; WATERMEYER, G. World Gastroenterology Organization Practice Guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, n. 1, p. 112-124, 2010.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. **Immunologic Research**, v. 5, n.4, p. 281-293, 1986.

BEUTLER, B.; GREENWALD, D.; HULMES, J. D.; CHANG, M.; PAN, Y. C.; MATHISON, J.; ULEVITCH, R.; CERAMI, A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature**, v. 316, n. 6028, p. 552-554, 1985.

BEUTLER, B.; MILSARK, I. W.; CERAMI, A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science**, v. 229, n. 4716, p. 869-871, 1985.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M.; MANNORI, G.; CECCONI, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BIOFÁRMACOS. Curitiba: Edumed, 2015. Disponível em: <http://www.biofarmacos.com.br/aprovado-o-primeiro-biossimilar-pela-anvisa#/aprovado-o-primeiro-biossimilar-pela-anvisa>. Acesso em: 28 out. 2015.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. **Nature**, v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997.

BLÜML, S.; SCHEINECKER, C.; SMOLEN, J. S.; REDLICH, K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. **International Immunology**, v. 24, n. 5, p. 275-281, 2012.

BODER, E. T.; JIANG, W. Engineering antibodies for cancer therapy. **Annual Review of Chemical Biomolecular Engeneering**, n. 2, p. 53-75, 2011.

BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2002.

BOURGOIN, A. F.; NUSKEY, B. White paper: an outlook on U.S. biosimilar competition. **Drugs of Today**, v. 49, n. 6, p. 399-410, 2013.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BRANDÃO, C. M. R.; GUERRA, A. A. J.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; ALMEIDA, A. M.; SILVA, G. D.; QUEIROZ, O. V. Q.; FALEIROS, D. R.; ACURCIO, F. A. Gastos do Ministério da Saúde do Brasil com medicamentos de alto custo: uma análise centrada no paciente. **Value in Health**, v. 14, n. 5, p. S71-77, 2011.

BRANDT, J.; KHARIOUZOV, A.; LISTING, J.; HAIBEL, H.; SÖRENSEN, H.; GRASSNICKEL, L.; RUDWALEIT, M.; SIEPER, J.; BRAUN, J. Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 6, p. 1667-1675, 2003.

BRATS, Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide**, ano VI, n. 19, 2012.

BRAUN, J.; BRANDT, J.; LISTING, J.; ZINK, A.; ALTEN, R.; GOLDER, W.; GROMNICA-IHLE, E.; KELLNER, H.; KRAUSE, A.; SCHNEIDER, M.; SÖRENSEN, H.; ZEIDLER, H.; THRIENE, W.; SIEPER, J. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. **Lancet**, v. 359, n. 9313, p. 1187-1193, 2002.

BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 52-62, 2003.

BROWN, C. M.; STOCKWELL, P. A.; TROTMAN, C. N.; TATE, W. P. Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 21, p. 6339-6345, 1990.

BRUHNS, P.; IANNASCOLI, B.; ENGLAND, P.; MANCARDI, D. A.; FERNANDEZ, N.; JORIEUX, S.; DAËRON, M. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3716-3725, 2009.

BURMESTER, G. R.; MATUCCI-CERINIC, M.; MARIETTE, X.; NAVARRO-BLASCO, F.; KARY, S.; UNNEBRINK, K.; KUPPER, H. Safety and effectiveness of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis over 5 years of therapy in a phase 3b and subsequent postmarketing observational study. **Arthritis Reseach & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R24, 2014.

BUTCHART, J.; BROOK, L.; HOPKINS, V.; TEELING, J.; PÜNTENER, U.; CULLIFORD, D.; SHARPLES, R.; SHARIF, S.; MCFARLANE, B.; RAYBOULD, R.; THOMAS, R.; PASSMORE, P.; PERRY, V. H.; HOLMES, C. Etanercept in Alzheimer disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. **Neurology**, v. 84, n. 21, p. 2161-2168, 2015.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, n. 4, p. 936-942, 1987.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CHAMES, P.; VAN REGENMORTEL, M.; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 220-233, 2009.

CHANDRASEKHARAN, U. M.; SIEMIONOW, M.; UNSAL, M.; YANG, L.; POPTIC, E.; BOHN, J.; OZER, K.; ZHOU, Z.; HOWE, P. H.; PENN, M.; DICORLETO, P. E. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) receptor-II is required for TNF-alpha-induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 1938-1944, 2007.

CHURCH, P. C.; GUAN, J.; WALTERS, T. D.; FROST, K.; ASSA, A.; MUISE, A. M.; GRIFFITHS, A. M. Infliximab maintains durable response and facilitates catch-up growth in luminal pediatric Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 20, n. 7, p. 1177-1186, 2014.

CONNOR V. Anti-TNF therapies: a comprehensive analysis of adverse effects associated with immunosuppression. **Rheumatology International**, v. 31, n. 3, p. 327-337, 2011.

CROFT, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 271-285, 2009.

D'ANNA, J. A.; VALDEZ, J. G.; HABBERSETT, R. C.; CRISSMAN, H. A. Association of G1/S-phase and late S-phase checkpoints with regulation of cyclin-dependent kinases in Chinese hamster ovary cells. **Radiation Research**, v. 148, p. 260-271, 1997.

DAVIS, R.; PILLAI, S.; LAWRENCE, N.; SEBTI, S.; CHELLAPPAN, S. P. TNF-α-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells involves Raf-1-mediated inactivation of Rb and transcription of E2F1-regulated genes. **Cell Cycle**, v. 11, n. 1, p. 109-118, 2012.

DE KEYSER, F.; DE KOCK, J.; LEROI, H.; DUREZ, P.; WESTHOVENS, R. Ten-year followup of infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients with severe, longstanding refractory disease: a cohort study. **The Journal of Rheumatology**, v. 41, n. 7, p. 1276-1281, 2014.

DE VLAM, K.; BOONE, C. Treatment adherence, efficacy, and safety of etanercept in patients with active psoriatic arthritis and peripheral involvement in Belgium for 66 months (PROVE study). **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 5, p. 624-631, 2015.

DEAVEN, L. L.; PETERSEN, D. F. The chromosomes of CHO, an aneuploid Chinese hamster cell line: G-band, C-band, and autoradiographic analyses. **Chromosoma**, v. 41, p. 129-144, 1973.

DEGTEREV, A.; HITOMI, J.; GERMSCHEID, M.; CH'EN, I. L.; KORKINA, O.; TENG, X.; ABBOTT, D.; CUNY, G. D.; YUAN, C.; WAGNER, G.; HEDRICK, S. M; GERBER, S. A.; LUGOVSKOY, A.; YUAN, J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 313-321, 2008.

DEJANA, E.; JI-MING, W.; MANTOVANI, A. The recruitment of leukocytes and their interaction with the vessel wall: the role of interleukin-1 and tumor necrosis factor. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 16, n. s66, p. 19-25, 1987.

DEN BROEDER, A.; VAN DE PUTTE, L.; RAU, R.; SCHATTENKIRCHNER, M.; VAN RIEL, P.; SANDER, O.; BINDER, C.; FENNER, H.; BANKMANN, Y.; VELAGAPUDI, R.; KEMPENI, J.; KUPPER, H. A single dose, placebo controlled study of the fully human anti-tumor necrosis factor-alpha antibody adalimumab (D2E7) in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 11, p. 2288-2298, 2002.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DEVIN, A.; LIN, Y.; YAMAOKA, S.; LI, Z.; KARIN, M.; LIU, Z. G. The α and β subunits of IκB Kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 12, p. 3986-3994, 2001.

DHAINAUT, J. F.; VINCENT, J. L.; RICHARD, C.; LEJEUNE, P.; MARTIN, C.; FIEROBE, L.; STEPHENS, S.; NEY, U. M.; SOPWITH, M. CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor-alpha: safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group. **Critical Care Medicine**, v. 23, n. 9, p. 1461-1469, 1995.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G. The cost of biopharmaceutical R&D; is biotech different? **Managerial and Decision Economics**, v. 28, p. 469-479, 2007.

DOS SANTOS, M. L.; YEDA, F. P.; TSURUTA, L. R.; HORTA, B. B.; PIMENTA, A. A.; DEGAKI, T. L.; SOARES, I. C.; TUMA, M. C.; OKAMOTO, O. K.; ALVES, V. A. F.; OLD, L. J.; RITTER, G.; MORO, A. M. Rebmab200, a humanized monoclonal antibody targeting the sodium phosphate transporter NaPi2b displays strong immune mediated cytotoxicity against cancer: a novel reagent for targeted antibody therapy of cancer. **Plos One**, v. 8, p. e70332, 2013.

ELLIOTT, M. J.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M.; KALDEN, J. R.; ANTONI, C.; SMOLEN, J. S.; LEEB, B.; BREEDVELD, F. C.; MACFARLANE, J. D.; BIJL, H. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 344, n. 8930, p. 1105-1110, 1994.

ENBREL®: (etanercept) for subcutaneous injection. Thousand Oaks, CA, U.S.A.: Immunex Corporation, 1998-2013. Bula de remédio.

FARID, S. S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 848, n. 1, p. 8-18, 2007.

FISHER, C. J. JR.; OPAL, S. M.; DHAINAUT, J. F.; STEPHENS, S.; ZIMMERMAN, J. L.; NIGHTINGALE, P.; HARRIS, S. J.; SCHEIN, R. M.; PANACEK, E. A.; VINCENT, J. L.; FOULKE, G. E.; WARREN, E. L.; GARRARD, C.; PARK, G.; BODMER, M. W.; COHEN, J.; VAN DER LINDEN, C.; CROSS, A. S.; SADOFF, J. C. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 3, p. 318-327, 1993.

FLEISCHMANN, R. M.; SCHECHTMAN, J.; BENNETT, R.; HANDEL, M. L.; BURMESTER, G. R.; TESSER, J.; MODAFFERI, D.; POULAKOS, J.; SUN, G. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 4, p. 927-934, 2003.

FU, W.; WANG, X.; YANG, W.; TAKEDA, H.; HU, S.; LOU, Z.; ZHAO, J.; BETHUNE, A. N.; GUO, Y. Structure-based development and optimization of therapy antibody drugs against TNFα. **Amino Acids**, v. 47, n. 6, p. 1259-1266, 2015.

FUMERY, M.; JACOB, A.; SARTER, H.; MICHAUD, L.; SPYCKERELLE, C.; MOUTERDE, O.; SAVOYE, G.; COLOMBEL, J.F.; PEYRIN-BIROULET, L.; GOWER-ROUSSEAU, C.; TURCK, D. Efficacy and safety of adalimumab after infliximab failure in pediatric Crohn disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 744-748, 2015.

GAGNIERE, C.; BEAUGERIE, L.; PARIENTE, B.; SEKSIK, P.; AMIOT, A.; ABITBOL, V.; ALLEZ, M.; COSNES, J.; SOKOL, H. Benefit of infliximab reintroduction after successive failure of infliximab and adalimumab in Crohn's disease. **Journal of Crohn's & Colitis**, v. 9, n. 4, p. 349-355. 2015.

GENOVESE, M. C.; MCKAY, J. D.; NASONOV, E. L.; MYSLER, E. F.; DA SILVA, N. A.; ALECOCK, E.; WOODWORTH, T.; GOMEZ-REINO, J. J. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 10, p. 2968-2980, 2008.

GERLONI, V.; PONTIKAKI, I.; GATTINARA, M.; FANTINI, F. Focus on adverse events of tumour necrosis factor alpha blockade in juvenile idiopathic arthritis in an open monocentric long-term prospective study of 163 patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 8, p. 1145-1152, 2008.

GOLDSTEIN, L. A.; STRIETER, R. M.; EVANOFF, H. L.; KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W. TNF-induced IL-8 and MCP-1 production in the eosinophilic cell line, EOL-1. **Mediators of Inflammation**, v. 5, n. 3, p. 218-223, 1996.

GORDON, K.; PAPP, K.; POULIN, Y.; GU, Y.; ROZZO, S.; SASSO, E. H. Long-term efficacy and safety of adalimumab in patients with moderate to severe psoriasis treated continuously over 3 years: results from an open-label extension study for patients from REVEAL. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 2, p. 241-251, 2012.

GOTTLIEB, A. B.; EVANS, R.; LI, S.; DOOLEY, L. T.; GUZZO, C. A.; BAKER, D.; BALA, M.; MARANO, C. W.; MENTER, A. Infliximab induction therapy for patients with severe plaque-type psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 4, p. 534-542, 2004.

GRUNFELD, C.; ADI, S.; SOUED, M.; MOSER, A.; FIERS, W.; FEINGOLD, K. R. Search for mediators of the lipogenic effects of tumor necrosis factor: potential role for interleukin 6. **Cancer Research**, v. 50, n. 14, p. 4233-4238, 1990.

HALLERMALM, K.; SEKI, K.; WEI, C.; CASTELLI, C.; RIVOLTINI, L.; KIESSLING, R.; LEVITSKAYA, J. Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1108-1115, 2001.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 p.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 1-20, 2005.

HIDALGO-VEGA, Á.; VILLORO, R.; BLASCO, J. A.; TALAVERA, P.; FERRO, B.; PURCARU, O. Cost-utility analysis of certolizumab pegol versus alternative tumour necrosis factor inhibitors available for the treatment of moderate-to-severe active rheumatoid arthritis in Spain. **Cost Effectiveness and Resourse Allocation**, v. 9, n 13, p. 11-23, 2015.

HUGGETT, B.; LÄHTEENMAKI, R. Public biotech 2011- the numbers. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 751-757, 2012.

IMS HEALTH. IMS Institute for Healthcare Informatics. **The Global Use of Medicines: Outlook Through 2016**, Parsippany, USA, 2012. 34 p.

KEFFER, J.; PROBERT, L.; CAZLARIS, H.; GEORGOPOULOS, S.; KASLARIS, E.; KIOUSSIS, D.; KOLLIAS, G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. **The EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4025-4031, 1991.

KELLEY, B. Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads. **Monoclonal Antibodies**, v. 1, n. 5, p. 443-452, 2009.

KEMPENI, J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFα monoclonal antibody D2E7. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, p. I70-72, 1999. Suppl 1.

KIMBALL, A. B.; KERDEL, F.; ADAMS, D.; MROWIETZ, U.; GELFAND, J. M.; GNIADECKI, R.; PRENS, E. P.; SCHLESSINGER, J.; ZOUBOULIS, C. C.; VAN DER ZEE, H. H.; ROSENFELD, M.; MULANI, P.; GU, Y.; PAULSON, S.; OKUN, M.; JEMEC, G. B. Adalimumab for the treatment of moderate to severe Hidradenitis suppurativa: a parallel randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 12, p. 846-855, 2012.

KITAURA, H.; ZHOU, P.; KIM, H.; NOVACK, D. V.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3418-3427, 2005.

KNIGHT, D. M.; TRINH, H.; LE, J.; SIEGEL, S.; SHEALY, D.; MCDONOUGH, M.; SCALLON, B.; MOORE, M. A.; VILCEK, J.; DADDONA, P.; GHRAYEB, J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. **Molecular Immunology**, v. 30, n. 16, p. 1443-1453, 1993.

KOSMAČ, M.; AVČIN, T.; TOPLAK, N.; SIMONINI, G.; CIMAZ, R.; CURIN ŠERBEC, V. Exploring the binding sites of anti-infliximab antibodies in pediatric patients with rheumatic diseases treated with infliximab. **Pediatric Research**. v. 69, n. 3, p. 243-248, 2011.

KOZAK, M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 20, p. 8125-8148, 1987.

KWON, M.; SUNG, M.; KWON, Y. J.; SONG, Y. G.; LEE, S. W.; PARK, M. C.; PARK, Y. B.; LEE, S. K.; SONG, J. J. Active tuberculosis risk with tumor necrosis factor inhibitors after treating latent tuberculosis. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 2, p. 68-73, 2014.

LAHDENNE, P.; VÄHÄSALO, P.; HONKANEN V. Infliximab or etanercept in the treatment of children with refractory juvenile idiopathic arthritis: an open label study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 3, p. 245-247, 2003.

LE, J.; VILCEK, J.; DADONNA, P.; GHRAYEB, J.; KNIGHT, D.; SIEGEL, S. A. Methods of treating tnf-alpha-mediated Crohn's disease using chimeric anti-tnf antibodies. **Patente**, Número da Publicação US 5656272, 1997.

LE, J.; VILCEK, J.; DADONNA, P.; GHRAYEB, J.; KNIGHT, D.; SIEGEL, S. A. Methods of treating rheumatoid arthritis using chimeric anti-TNF antibodies. **Patente**, Número da Publicação US 5698195, 1997.

LEE, H. Is extrapolation of the safety and efficacy data in one indication to another appropriate for biosimilars? **The AAPS Journal**, v. 16, n. 1, p. 22-26, 2014.

LEGRAND, F.; DRISS, V.; WOERLY, G.; LOISEAU, S.; HERMANN, E.; FOURNIÉ, J.; HÉLIOT, L.; MATTOT, V.; SONCIN, F.; GOUGEON, M.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. A functional γδTCR/CD3 complex distinct from γδT cells is expressed by human eosinophils. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5926, 2009.

LIPSKY, P. E.; VAN DER HEIJDE, D. M.; ST CLAIR, E. W.; FURST, D. E.; BREEDVELD, F. C.; KALDEN, J. R.; SMOLEN, J. S.; WEISMAN, M.; EMERY, P.; FELDMANN, M.; HARRIMAN, G. R.; MAINI, R. N. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 22, p. 1594-1602, 2000.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487-501, 2001.

LOFTUS, E. V.; SCHOENFELD, P.; SANDBORN, W. J. The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 16, n. 1, p. 51-60, 2002.

MAGNUSSON, S. E.; WENNERBERG, E.; MATT, P.; LINDQVIST, U.; KLEINAU, S. Dysregulated Fc receptor function in active rheumatoid arthritis. **Immunology Letters**, v. 162, n. 1 Pt A, p. 200-206, 2014.

MAINI, R. N.; BREEDVELD, F. C.; KALDEN, J. R.; SMOLEN, J. S.; DAVIS, D.; MACFARLANE, J. D.; ANTONI, C.; LEEB, B.; ELLIOTT, M. J.; WOODY, J. N.; SCHAIBLE, T. F.; FELDMANN, M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 9, p. 1552-1563, 1998.

MEASE, P.; SIEPER, J.; VAN DEN BOSCH, F.; RAHMAN, P.; KARUNARATNE, P. M.; PANGAN, A. L. Randomized controlled trial of adalimumab in patients with nonpsoriatic peripheral spondyloarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 4, p. 914-923, 2015.

MEASE, P. J.; GOFFE, B. S.; METZ, J.; VANDERSTOEP, A.; FINCK, B.; BURGE, D. J. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. **Lancet**, v. 356, n. 9227, p. 385-390, 2000.

MICHIE, H. R.; MANOGUE, K. R.; SPRIGGS, D. R.; REVHAUG, A.; O'DWYER, S.; DINARELLO, C. A.; CERAMI, A.; WOLFF, S. M.; WILMORE, D. W. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **New England Journal of Medicine**, v. 318, p. 1481-1486, 1988.

MING, W. J.; BERSANI, L.; MANTOVANI, A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of immunology**, v. 138, n. 5, p. 1469-1474, 1987.

MÖLLER, A.; EMLING, F. Monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor (tnf), and their use. **Patente**, Número da Publicação US 0260610, 1988.

MÖLLER, A.; EMLING, F.; BLOHM, D.; SCHLICK, E.; SCHOLLMEIER, K. Monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor alpha: *in vitro* and *in vivo* application. **Cytokine**, v. 2, n. 3, p. 162-169, 1990.

MONTEIRO, R. D. C.; ZANINI, A. C. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1, p. 25-33, 2008.

MORELAND, L. W.; BAUMGARTNER, S. W.; SCHIFF, M. H.; TINDALL, E. A.; FLEISCHMANN, R. M.; WEAVER, A. L.; ETTLINGER, R. E.; COHEN, S.; KOOPMAN, W. J.; MOHLER, K.; WIDMER, M. B.; BLOSCH, C. M. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 3, p. 141-147, 1997.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A.; GOUVEA, M. N.; SILVESTRI, M. L. Z.; KALIL, J. E.; RAW, I.; Multiparametric analyses of hybridoma growth on glass cylinders in a packed-bed bioreactor system with internal aeration. Serum-supplemented and serum-free media comparison for MAb production. **Journal of Immunological Methods**, v. 176, p. 67-77, 1994.

MOSCHO, A.; HODITS, R. A.; JANUS, F.; LEITER, J. M. E.; Deals that make sense. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 719-722, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, L. M. H.; BORIS AFONSO CRUZ, B. F.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M. V. C.; SILVA, N. A.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; GIORGI, R. D. N.; LIMA, R. A. C.; PINHEIRO, G. R. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 135-174, 2012.

MUKHOPADHYAY, A.; BUESO-RAMOS, C.; CHATTERJEE, D.; PANTAZIS, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human prostate cancer cell lines. **Oncogene**, v. 20, n. 52, p. 7597-7609, 2001.

MURRAY, J.; BARBARA, J.; DUNKLEY, S.; LOPEZ, A.; VAN OSTADE, X.; CONDLIFFE, I.; HASLETT, C.; CHILVERS, E. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirements for TNF-R55 and TNF-R75 for induction of apoptosis *in vitro*. **Blood**, v. 90, n.7, p. 2772-2783, 1997.

MUTA, T.; KUROSAKI, T.; MISULOVIN, Z.; SANCHEZ, M.; NUSSENZWEIG, M. C.; RAVETCH, J. V. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. **Nature**, v. 368, n. 6466, p. 70-73, 1994.

NEDWIN, G. E.; NAYLOR, S. L.; SAKAGUCHI, A. Y.; SMITH, D.; JARRETT-NEDWIN, J.; PENNICA, D.; GOEDDEL, D. V.; GRAY, P. W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 17, p. 6361-6373, 1985.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. a006049, 2012.

NOTI, M.; CORAZZA, N.; MUELLER, C.; BERGER, B.; BRUNNER, T. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 5, p. 1057-1066, 2010.

ØSTERGAARD, M.; BASLUND, B.; RIGBY, W.; ROJKOVICH, B.; JORGENSEN, C.; DAWES, P. T.; WIELL, C.; WALLACE, D. J.; TAMER, S. C.; KASTBERG, H.; PETERSEN, J.; SIERAKOWSKI, S. Ofatumumab, a human anti-CD20 monoclonal antibody, for treatment of rheumatoid arthritis with an inadequate response to one or more disease-modifying antirheumatic drugs: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase I/II study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2227-2238, 2010.

PANVEL. Eldorado do Sul: Dimed S/A Distribuidora de Medicamentos, 2015. Disponível em: <http://www.panvel.com/panvel/visualizarProduto.do?codigoItem=885370>. Acesso em: 28 out. 2015.

PENNICA, D.; NEDWIN, G. E.; HAYFLICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; DERYNCK, R.; PALLADINO, M. A.; KOHR, W. J.; AGGARWAL, B. B.; GOEDDEL, D. V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 724-729, 1984/85.

PEPPEL, K.; CRAWFORD, D.; BEUTLER, B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 6, p. 1483-1489, 1991.

PEREZ, C.; ALBERT, I.; DEFAY, K.; ZACHARIADES, N.; GOODING, L.; KRIEGLER, M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. **Cell**, v. 63, p. 251-258, 1990.

PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; VESIN, C.; LOETSCHER, H.; GENTZ, R.; LESSLAUER, W. Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor. **Immunology**, v. 77, n. 4, p. 510-514, 1992.

POLCHOW, B.; KEBBEL, K.; SCHMIEDEKNECHT, G.; REICHARDT, A.; HENRICH, W.; HETZER, R.; LUEDERS, C. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. **Journal of Translational Medicine**, n. 10, v. 98, p. 1-17, 2012.

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. **Journal of Experimental Medicine**, v. 108, p. 945-956, 1958.

PUGH, G. Cell culture manufacturing: an economic perspective from a contract manufacturer's viewpoint. Presentation at the US Biotechnology Symposium, Washington, DC, 1998.

RAU, R.; HERBORN, G.; SANDER, O.; VAN DE PUTTE, L. B. A.; VAN RIEL, P. L.; DEN BROEDER, A. A. Long-term treatment with the fully human anti-TNF-antibody D2E7 slows

radiographic disease progression in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 42, p.(suppl):S400, 1999.

REINISCH, W.; SANDBORN, W. J.; PANACCIONE, R.; HUANG, B.; POLLACK, P. F.; LAZAR, A.; THAKKAR, R. B. 52-week efficacy of adalimumab in patients with moderately to severely active ulcerative colitis who failed corticosteroids and/or immunosuppressants. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1700-1709, 2013.

REMSIMA. Celltrion Inc., Incheon Coréia. Disponível em: <http://www.celltrion.com/en/company/notice_view.asp?idx=364&code=ennews&intNowPage=3&menu_num=&align_year=all>. Acesso em: 15 nov. 2015.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Assay Guidance Manual**. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD. 2004-2013.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G.; DEMANGEL, C, FRANCE, M. P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4620-4627, 2002.

SALFELD, J. G.; ALLEN, D. J.; HOOGENBOOM, H. R. J. M.; KAYMAKCALAN, Z.; LABKOVSKY, B.; MANKOVICH, J. A.; McGUINNESS, B. T.; ROBERTS, A. J.; SAKORAFAS, P.; SCHOENHAUT, D.; VAUGHAN, T. J.; WHITE, M.; WILTON, A. J. Human antibodies that bind human TNFα. **Patente**, Número da Publicação US 6090382, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. vol. 1, 2 e 3.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHEINBERG, M. A.; KAY, J. The advent of biosimilar therapies in rheumatology-"O brave new world". **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 430-436, 2012.

SERPIERI, F.; INOCENCIO, A.; DE OLIVEIRA, J. M.; PIMENTA, A. A. J.R.; GARBUIO, A.; KALIL, J.; BRIGIDO, M. M.; MORO, A. M. Comparison of humanized IgG and FvFc anti-CD3 monoclonal antibodies expressed in CHO cells. **Molecular Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 218-225, 2010.

SILMAN, A. J.; PEARSON, J, E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research**, v. 4, p. S265-272, 2002.

SILVA, A. T.; BAYSTON, K. F.; COHEN, J. Prophylactic and therapeutic effects of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha in experimental gram-negative shock. **The Journal of Infectious Disease**, v. 162, n. 2, p. 421-427, 1990.

SINCLAIR, A. **Process Scale Purification of Antibodies**. Gottschalk Uwe: Wiley & Sons, 2009. 430 p.

SMITH, K. G.; CLATWORTHY, M. R. FcgammaRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 328-343, 2010.

SUS/MS. Portal da Saúde SUS, Ministério da Saúde. **Novos medicamentos para artrite serão ofertados no SUS**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/7049/162/novos-medicamentos-para-artrite-serao-ofertados-no-sus.html>. Acesso em: 17 de out. 2012.

TANABE, K.; MATSUSHIMA-NISHIWAKI, R.; YAMAGUCHI, S.; IIDA, H.; DOHI, S.; KOZAWA, O. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 16, 2010.

TANG, P.; HUNG, M-C.; KLOSTERGAARD, J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. **Biochemistry**, v. 35, n. 25, p. 8216-8225, 1996.

TAUBITZ, A.; SCHWARZ, M.; ELTRICH, N.; LINDENMEYER, M. T.; VIELHAUER, V. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68167, 2013.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.587, p. 325-331, 1990.

TRACEY, K. J.; FONG, Y.; HESSE, D. G.; MANOGUE, K. R.; LEE, A. T.; KUO, G. C.; LOWRY, S. F.; CERAMI, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, v. 330, n. 6149, p. 662-664, 1987.

TSURUTA, L. R.; DOS SANTOS, M. L.; MORO, A. M. Biosimilars advancements: Moving on to the future. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 5, p. 1139-1149, 2015.

VAN DULLEMEN, H. M.; VAN, DEVENTER, S. J.; HOMMES, D. W.; BIJL, H. A.; JANSEN, J.; TYTGAT, G. N.; WOODY, J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). **Gastroenterology**, v. 109, n. 1, p. 129-135, 1995.

VAN LENT, P. L.; NABBE, K.; BLOM, A. B.; HOLTHUYSEN, A. E.; SLOETJES, A.; VAN DE PUTTE, L. B.; VERBEEK, S.; VAN DEN BERG, W. B. Role of activatory Fc gamma RI and Fc gamma RIII and inhibitory Fc gamma RII in inflammation and cartilage destruction during experimental antigen-induced arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 6, p. 2309-2320, 2001.

WEINBLATT, M. E.; KREMER, J. M.; BANKHURST, A. D.; BULPITT, K. J.; FLEISCHMANN, R. M.; FOX, R. I.; JACKSON, C. G.; LANGE, M.; BURGE, D. J. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. **The New England Journal of Mededicine**, v. 340, n. 4, p. 253-259, 1999.

WILLIAM, M.; FAEZ, S.; PAPALIODIS, G. N.; LOBO, A. M. Golimumab for the treatment of refractory juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 2, n. 4, p. 231-233, 2012.

WILLIAMS, R. O.; FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9784-9788, 1992.

YEDA, F. P.; DOS SANTOS, M. L.; TSURUTA, L. R.; HORTA, B. B.; INOCENCIO, A. L.; OKAMOTO, O. K.; TUMA, M. C.; MORO, A. M. Strategies for clone detection, selection and isolation in Per.C6 cells-case for Rebmab100. **BMC Proceedings**, v. 7, p. 38, 2013.

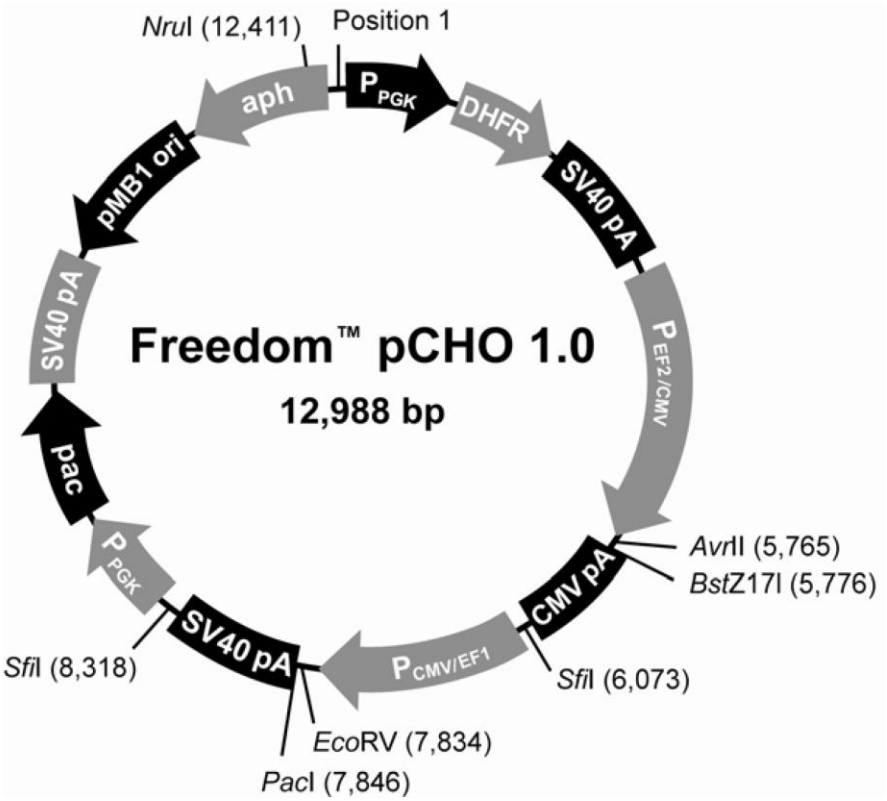
YI, H.; KIM, J.; JUNG, H.; RIM, Y. A.; KIM, Y.; JUNG, S. M.; PARK, S. H.; JU, J. H. Induced production of anti-etanercept antibody in collagen-induced arthritis. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2301-2308, 2014.

ZELLER, I.; WIEDEMANN, D.; SCHWAIGER, S.; STELZMÜLLER, M.; KREUTMAYER, S.; LEBERFING, O.; STUPPNER, H.; BERNHARD, D. Inhibition of cell surface expression of endothelial adhesion molecules by ursolic acid prevents intimal hyperplasia of venous bypass grafts in rats. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 42, n. 5, p. 878-884, 2012.

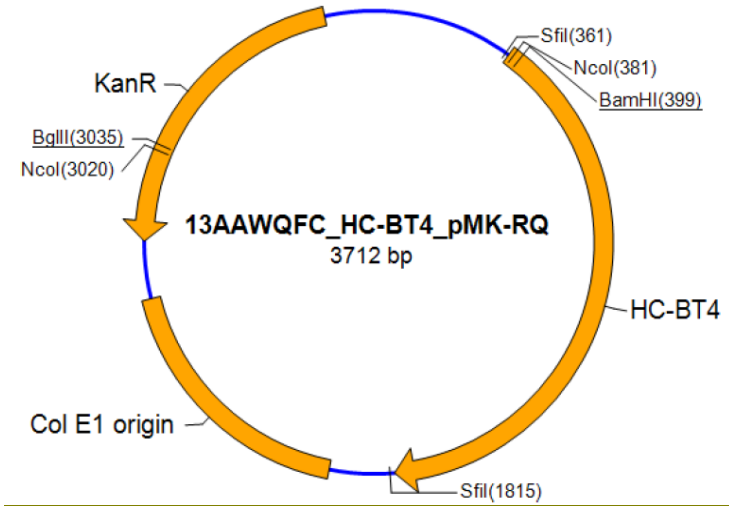
APÊNDICES

APÊNDICA A - Mapa de vetores plasmidiais

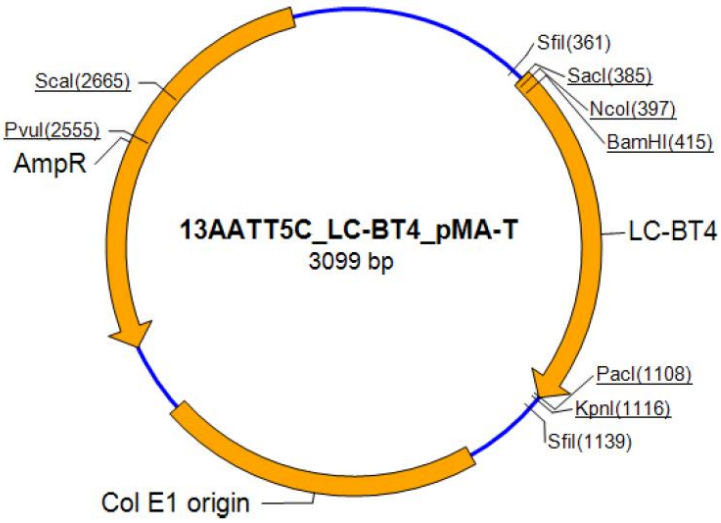
1. Plasmídeo pCHO 1.0: mapa do vetor pCHO 1.0 (12.988 pb) mostrando a origem de replicação (**pMB1 ori**), os sítios de reconhecimento enzimático *Avr*II (posição 5.765 pb) e *Bst*Z17I (posição 5.776 pb), *Eco*RV (posição 7.834 pb) e *Pac*I (posição 7.846 pb) para clonagem simultânea de dois genes, o gene de resistência à canamicina (**aph**) para seleção de recombinantes em hospedeiro *E. coli*, os genes de resistência a puromicina (**pac**) e dihidrofolato redutase (**DHFR**) para seleção em hospedeiro de expressão CHO, e os promotores de citomegalovírus (**$P_{EF2/CMV}$** e **$P_{CMV/EF1}$**) responsáveis pela expressão gênica das cadeias HC e LC do anticorpo (Life Technologies®).



2. Plasmídeos de transporte de HC e LC: mapa do (i) plasmídeo de transporte-HC (3.712 pb) e (ii) plasmídeo de transporte-LC (3.099 pb), com destaque para os genes de seleção à canamicina (**KanR**) e ampicilina (**AmpR**), respectivamente (Life Technologies®).



(i) plasmídeo de transporte-HC



(ii) plasmídeo de transporte-LC

APÊNDICE B - Análise *in silico* realizada pela ferramenta ProtParam, ExPaSy para cadeia única (HC+LC) de anti-hTNFα

Número de aminoácidos: 665

Peso molecular: 72781.7

Ponto isoelétrico (pI) teórico: 8.32

Composição percentual (%) de aminoácidos:

Ala (A)	39	5.9%
Arg (R)	22	3.3%
Asn (N)	26	3.9%
Asp (D)	28	4.2%
Cys (C)	16	2.4%
Gln (Q)	31	4.7%
Glu (E)	32	4.8%
Gly (G)	42	6.3%
His (H)	13	2.0%
Ile (I)	15	2.3%
Leu (L)	51	7.7%
Lys (K)	43	6.5%
Met (M)	6	0.9%
Phe (F)	20	3.0%
Pro (P)	44	6.6%
Ser (S)	85	12.8%
Thr (T)	51	7.7%
Trp (W)	11	1.7%
Tyr (Y)	30	4.5%
Val (V)	60	9.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Número total de resíduos de carga negativa (Asp + Glu): 60

Número total de resíduos de carga positiva (Arg + Lys): 65

Composição atômica:

Carbono	C	3224
Hidrogênio	H	5012
Nitrogênio	N	868
Oxigênio	O	1009
Enxofre	S	22

Fórmula: $C_{3224}H_{5012}N_{868}O_{1009}S_{22}$

Número total de átomos: 10135

Coeficiente de extinção (M^{-1} cm^{-1}, a 280 nm mensurado em água):

Coef. de extinção 106200

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.459, assumindo todos os resíduos de Cys na forma de cistina.

Coef. de extinção 105200

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.445, assumindo que todos os resíduos de Cys estão reduzidos.