

EDUARDO ALIPRANDINI

OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
HUMANOS ANTITETÂNICOS

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: Imunologia Aplicada

Orientadora: Dra. Ana Maria Moro

Co-Orientadora: Dra. Silvia Beatriz Boscardin

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

RESUMO

ALIPRANDINI, E. **Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos**. 2015. 119 f. - Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Anticorpos monoclonais (AcMos) para uso terapêutico correspondem a uma grande área na indústria de biofármacos pela sua especificidade e segurança no tratamento de câncer, doenças autoimunes, infecciosas e outras condições. AcMos humanos em especial têm importância maior comparado aos murinos, quiméricos ou humanizados pela menor probabilidade de imunogenicidade. Este trabalho teve o objetivo de obter anticorpos monoclonais humanos antitetânicos através da captura de linfócitos B produtores de anticorpos específicos utilizando o antígeno ou pela separação de plasmablastos após vacinação. A separação das células coletada de doadores foi feita por equipamento de *cell sorter*, que depositou uma célula B específica em cada poço em placa de 96 poços. As regiões variáveis dos anticorpos foram amplificadas e clonadas em vetores de expressão, que foram usados para transfectar transitoriamente células HEK293-F. Para a captura dos linfócitos B específicos raros foram usadas estratégias diferentes de marcação e *sorting*. A marcação do receptor dos linfócitos B de memória com anatoxina tetânica biotinilada e estreptavidina-PerCP-CyTM5.5 não foi adequada pois selecionou células inespecíficas, cujos anticorpos não reconheceram a toxina tetânica. A utilização da toxina tetânica conjugada independentemente com dois marcadores diferentes, biotina e Alexa Fluor® 647, possibilitou a separação específica de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos, que foram avaliados por ELISA, *western blotting* e pela inibição da ligação da toxina ao gangliosídeo GT1b. O ensaio *in vivo* mostrou proteção total dos animais quando três anticorpos monoclonais foram usados em conjunto, neutralizando a toxina tetânica e protegendo os animais desafiados com o antígeno.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais humanos. Tétano. Toxina tetânica. Separação *single cell*. Linfócitos B de memória. Plasmablastos.

ABSTRACT

ALIPRANDINI, E. **Anti-tetanus human monoclonal antibodies**. 2015. 119 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Monoclonal antibodies (mAbs) for therapeutic use correspond to a great area of the biopharmaceutical industry based on its specificity and safety for the treatment of cancer, auto-immune, infectious diseases and other health conditions. Human mAbs are especially important compared to murine, chimeric or humanized antibodies because they are less prone to elicit immunogenicity. The objective of this work was to obtain anti-tetanus human monoclonal antibodies through the capture of memory B lymphocytes producing specific antibodies or plasmablasts after vaccination. B cells were collected from donors and separated by a cell sorter equipment that isolated one B cell in each well of a 96-well plate, based on the surface immunostaining. The variable regions of the antibodies variable regions were amplified and cloned in expression vectors which were used for transient transfection of HEK293-F cells. Along the work different labeling and sorting strategies were tested for the capture of the rare specific B cells. The staining of the memory B cell receptor with biotinylated tetanus toxoid and streptavidin-PerCP-CyTM5.5 was found to be not efficient since non-specific cells were selected, producing antibodies not targeted to the tetanus toxin. The staining of the cells with the tetanus toxin labeled independently with two different markers, biotin and Alexa Fluor[®] 647 allowed the separation of specific anti-tetanus antibody producing B lymphocytes. The antibodies expressed were evaluated by ELISA, western blotting and the inhibition of the binding of the tetanus toxin to the ganglioside GT1b. The *in vivo* neutralization assay showed that a pool of three different monoclonal antibodies were able to protect the animals by neutralization of the tetanus toxin when challenged with the antigen.

Keywords: Human monoclonal antibodies. Tetanus. Tetanus toxin. Single cell separation. Memory B cells. Plasmablasts

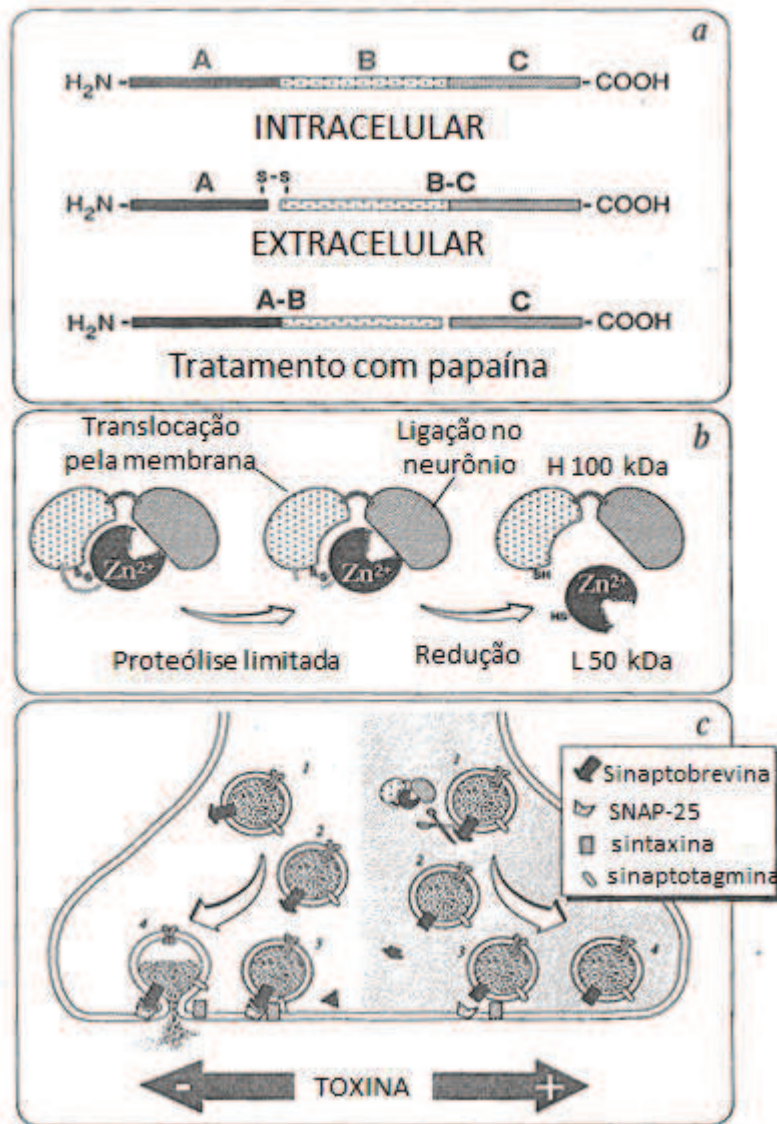
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tétano

O tétano é uma doença neurológica causada pela toxina da bactéria *Clostridium tetani*, um bacilo gram-positivo esporulado presente em grande quantidade no solo, instrumentos enferrujados e poeira (COLLINGRIDGE; DAVIES, 1982). A toxina tetânica (TxT) ativa é uma proteína composta por uma cadeia leve (cerca de 50 kDa) e uma pesada (100 kDa) ligadas por pontes dissulfeto. Sua síntese no citoplasma da bactéria ocorre como uma cadeia polipeptídica única. Quando transportada para o exterior, ocorre quebra da cadeia por enzimas presentes na parede celular do *C. tetani* gerando as cadeias pesada e leve mencionadas acima (BIZZINI, 1979; MATSUDA, MORIHIRO; YONEDA, 1974). A ação da TxT ocorre em neurônios medulares. Uma fração da cadeia pesada, conhecida como domínio C, é responsável pela ligação ao neurônio através da sua interação com gangliosídios presentes na membrana. Gangliosídios são glicosfingolípídeos complexados com ácido siálico (CHEN et al., 2009). Outro domínio (domínio B) da cadeia pesada tem função na translocação, que ajuda a toxina a atravessar a membrana neuronal. Depois de internalizada a TxT é transportada de forma retrógrada até neurônios da medula espinhal. A cadeia leve (domínio A) contém motivo de ligação de zinco que é responsável pela ação proteolítica sobre um complexo presente nas vesículas sinápticas chamado VAMP/sinaptobrevina. VAMP, quando intacta, tem a função de favorecer a aproximação e fusão da vesícula à membrana pré-sináptica, garantindo a liberação dos neurotransmissores inibitórios na sinapse (SCHIAVO et al., 1992a, 1992b). Assim, a principal ação da TxT envolve o bloqueio da liberação de neurotransmissores inibitórios (glicina e GABA-ácido- γ -aminobutírico) em neurônios medulares (HUMEAU et al., 2000). Como resultado, causa hipertonia muscular mantida, hiperreflexia e espasmos. A Figura 1 esquematiza a estrutura da TxT.

A dose letal tóxica (LD_{50}) da toxina em camundongos é entre 0,1 e 1 ng/kg de peso corporal. A sensibilidade em humanos para essa toxina é similar à dos camundongos. É uma das substâncias mais tóxicas que se conhece (SCHIAVO; MATTEOLI; MONTECUCCO, 2000).

Figura 1 - Estrutura e função da toxina tetânica



Em (a): estrutura representativa de toxina tetânica e seus domínios. Toxina intracelular composta de uma única cadeia polipeptídica e toxina extracelular, com a cadeia clivada e as subunidades ligadas por ponte dissulfeto. A estrutura após tratamento com papaína mostra o sítio de clivagem para liberação do fragmento C. Em (b), estão representados os domínios e suas funções, mostrando que a atividade de metaloprotease zinco-dependente do fragmento A é vista após redução da ponte dissulfeto, que ocorre no citoplasma do neurônio. Em (c): esquema da ação da toxina sobre sinaptobrevina, impedindo a fusão das vesículas contendo neurotransmissores. SNAP-25, syntaxina e sinaptotagmina são proteínas envolvidas na fusão da vesícula à membrana.

Fonte: RAPPUOLI (1997)

A letalidade causada pelo tétano chega a 30% e atinge principalmente os menores de cinco anos e os idosos (Ministério da Saúde, 2005). Em indivíduos idosos, observa-se maior número de pessoas sem proteção vacinal. Um estudo publicado em 2006 avaliou a imunidade de 98 idosos de um asilo em São Paulo, SP, com média de idade de 84 anos através da dosagem de anticorpos antitetânicos (anti-TT). O resultado mostrou que 94% dos indivíduos

testados eram suscetíveis ao tétano e, após uma dose reforço da vacina do tétano, esse número diminuiu para 79%, ainda considerado preocupante (WECKX et al., 2006).

A Tabela 1 mostra dados dos casos confirmados de tétano no Brasil.

Tabela 1 - Incidência de tétano (exceto o neonatal)

Casos confirmados por região

Ano	Região Norte	Região Nordeste	Região Sudeste	Região Sul	Região Centro-Oeste	Total	Cura	Óbito	Ign/Branco	Óbito por outra causa
2010	29	109	59	66	25	288	145	88	51	4
2011	44	133	72	54	32	335	188	101	39	7
2012	42	108	70	55	44	319	176	108	31	4
2013	37	60	64	59	62	282	152	92	32	6
2014	41	89	65	46	32	273	148	75	45	5
2015	10	24	26	16	7	83	31	22	28	2
TOTAL	203	523	356	296	202	1580				

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2015b)

1. Situação da base de dados de julho/2015
2. Excluídos casos não residentes no Brasil
3. Informações referentes a tétano acidental, apenas.

A incidência de tétano neonatal está diminuindo no Brasil. Em 2001 foram registrados 27 casos em todo o país, o que é considerado eliminação da doença, pois equivale a menos de um caso por 1000 nascidos vivos (FUNASA, 2001). Em 2012 (último registro encontrado) foram registrados dois casos no Brasil, um no Pará e outro em Minas Gerais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015a).

Um estudo feito em São Paulo mostrou que 3% da população não apresenta proteção contra o tétano (nível de anticorpo $< 0,01$ UI/mL) e em 18%, a quantidade de anticorpos circulantes no sangue está entre 0,01 e 0,1 U/mL, o que representa nível basal de proteção (DIVINO-GOES et al., 2007).

A imunidade contra a toxina é provida pela vacinação e a doença não confere imunidade ao paciente, já que a TxT é um imunógeno fraco. O que garante a imunogenicidade do toxoide na vacina é a presença do adjuvante, que pode ser o gel de hidróxido de alumínio, como no caso da vacina produzida pelo Instituto Butantan (BRASIL, 2010; LINDLEY-JONES; LEWIS; SOUTHGATE, 2004). A toxina é obtida a partir do cultivo da bactéria, filtração tangencial e destoxificação por tratamento com formaldeído e glicina durante 30 dias, gerando a AnT, que passa então por cromatografia em gel filtração (PRADO, 2008). Há mais de uma apresentação da vacina contra tétano: a vacina tríplice bacteriana DTP contra difteria, tétano e coqueluche, a vacina dupla bacteriana contra difteria e tétano tipo infantil (DT) que contém a mesma quantidade de toxoide diftérico e tetânico, e dupla do tipo adulto (dT) que contém menor quantidade do toxoide diftérico, além da vacina contendo somente o toxoide tetânico (TT) que é usada na falta da dT. O esquema de vacinação básico é composto

de três doses após o nascimento com a vacina DTP, com doses um, quatro e seis meses após o nascimento, e outra 15 meses após o nascimento. Aos 10 anos de idade é aplicada a vacina dT que deve ser repetida a cada 10 anos. Em caso de gravidez ou ferimentos de alto risco para tétano (ver Tabela 2), deve-se aplicar dose de reforço se decorridos cinco anos ou mais da última dose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A perfuração da pele com objetos contaminados está entre as principais causas para a evolução para tétano. Dentre os procedimentos para a profilaxia nos casos de ferimentos com alto risco de tétano que incluem ferimentos profundos ou superficiais sujos, queimaduras, mordeduras, entre outras, está a utilização do soro antitetânico equino (SAT), ou a imunoglobulina humana hiperimune antitetânica (IGHAT). A Tabela 2 mostra o esquema de tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde em casos de acidentes com risco de tétano.

Tabela 2 - Esquema de condutas profiláticas de acordo com o tipo de ferimento e situação vacinal

História de vacinação prévia contra tétano	Ferimentos com risco mínimo de tétano*			Ferimentos com alto risco de tétano**		
	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas
Incerta ou menos de 3 doses	Sim*	Não	Limpeza e desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e debridar o foco de infecção	Sim***	sim	Desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e remover corpos estranhos e tecidos desvitalizados. Debridar o ferimento e lavar com água oxigenada
3 doses ou mais, sendo a última dose há menos de 5 anos	Não	Não	-	Não	Não	-
3 ou mais doses, sendo a última dose há mais de 5 anos e menos de 10 anos	Não	Não	-	Sim (1 reforço)	Não****	-
3 ou mais doses, sendo a última dose há 10 ou mais anos	Sim	Não	-	Sim (1 reforço)	Não****	-

*Ferimentos superficiais, limpos, sem corpos estranhos ou tecidos desvitalizados.

**Ferimentos profundos ou superficiais sujos, com corpos estranhos ou tecidos desvitalizados; queimaduras; feridas puntiformes ou por armas brancas e de fogo; mordeduras; politraumatismos e fraturas expostas.

***Vacinar e aprazar as próximas doses, para complementar o esquema básico. Esta vacinação visa proteger contra o risco de tétano por outros ferimentos futuros. Se o profissional que presta o atendimento suspeita que os cuidados posteriores com o ferimento não serão adequados, deve considerar a indicação de imunização passiva com SAT ou IGHAT. Quando indicado o uso de vacina e SAT ou IGHAT, concomitantemente, devem ser aplicados em locais diferentes.

****Para paciente imunodeprimido, desnutrido grave ou idoso, além do reforço com a vacina está também indicada IGHAT ou SAT.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2005)

O SAT é obtido a partir da inoculação do toxoide tetânico em cavalos. Após a completa imunização dos animais, um volume de plasma é colhido por aférese, de onde é processado o soro que contém os anticorpos anti-TT. Os anticorpos são digeridos com pepsina

para geração da fração F(ab')₂, que compõe o produto final. A IGHAT corresponde a imunoglobulinas de cadeia completa obtidas a partir de uma mistura de plasma de doadores imunizados contra o tétano. Ambos os tratamentos podem ser administradas aos pacientes e têm a função de se ligar à toxina e neutralizá-la antes da internalização no neurônio. Nos casos em que o SAT é administrado, a proteção dura uma semana em média. A IGHAT é indicada em casos de hipersensibilidade ao soro heterólogo ou história pregressa de alergia ou reação de hipersensibilidade ao uso de outros soros heterólogos (FUNASA, 2001). O uso de imunoglobulinas humanas, ainda que devidamente testadas quanto à presença de vírus contaminantes, não é completamente isento de riscos devido ao potencial de conter vírus emergentes ou ainda não detectáveis.

Não existe opção disponível de tratamento de tétano com anticorpos monoclonais. Uma característica importante destes é a reprodutibilidade entre os diferentes lotes, já que sua produção não depende da resposta humoral do doador, como no caso do soro equino e humano, além da especificidade da ligação ao alvo.

Além do tratamento com anticorpos, o paciente recebe antibióticos para combater a infecção da bactéria que pode permanecer no local do ferimento. São utilizados medicamentos miorrelaxantes como diazepam e outros agonistas GABAérgicos para controlar espasmos, permitir ventilação e reduzir dores. É também recomendada a vacinação com toxoide tetânico (LISBOA et al., 2011)

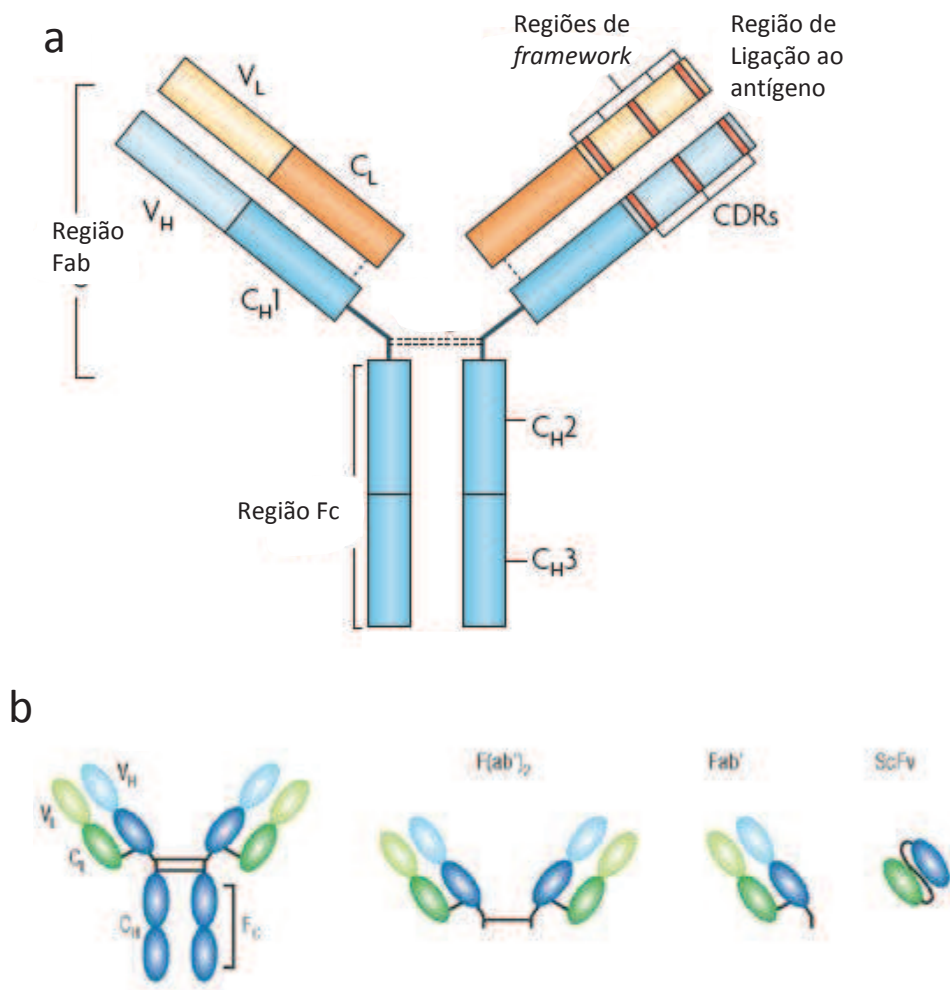
1.2 Anticorpos

Os anticorpos são moléculas secretadas por linfócitos B cuja região de reconhecimento do antígeno é igual à do receptor expresso na membrana. São formados por dois dímeros, cada um formado por uma cadeia pesada e uma leve. Ambas as cadeias são divididas em duas regiões, uma variável que é diferente em cada anticorpo e uma região constante. A região constante determina a classe e subclasse a qual o anticorpo pertence. As classes, conhecidas como isotipos podem ser IgM (cadeia constante μ), IgG (γ), IgA (α), IgE (ϵ) e IgD (δ), sendo que cada cadeia confere funções efetoras distintas. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve formam, em conjunto, o sítio de ligação ao antígeno. Cada cadeia leve contém três regiões chamadas de Regiões Determinantes de Complementaridade – CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Regions*). São segmentos hipervariáveis que interagem com o antígeno quando o anticorpo está na conformação nativa. As regiões que flanqueiam os CDRs são chamadas de *frameworks*, que são arcaibouços envolvidos na

conformação e exposição dos CDRs para interação com o antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A cadeia pesada de uma IgG (50 kDa) é formada por quatro regiões, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} que correspondem à região constante e V_H , que corresponde à região variável. A cadeia leve (25 kDa) é composta de uma região constante, C_L , e uma variável, V_L . A Figura 2 mostra a estrutura esquematizada de um anticorpo da classe IgG.

Figura 2 - Representação esquemática de um anticorpo da classe IgG



Em a, estrutura do anticorpo. Composta de dois dímeros, cada um composto de uma cadeia pesada (em azul) e uma leve (em laranja). A estrutura é mantida por pontes dissulfeto (linhas pontilhadas). As regiões constantes formam a região Fc que confere funções para o anticorpo como fixação de complemento ou ligação em receptores de Fc. A região Fab compreende as regiões variáveis e C_{H1} da cadeia pesada ou C_L da cadeia leve. É o local de ligação ao antígeno (Fab – *Fragment antigen-binding*) onde estão as CDR (*Complementarity Determining Regions* – Regiões Determinantes de Complementaridade). São as regiões de interação direta com o antígeno, e são sustentadas pelas regiões do arcabouço (*framework*). Em b, fragmentos obtidos a partir de digestão enzimática com pepsina [$F(ab')_2$], papaína (Fab') ou por técnicas de engenharia genética (ScFv, em que as cadeias variáveis são expressas como uma cadeia única).

Fonte: HANSEL et al. (2010) e PEER et al. (2007)

Existem dois tipos de cadeia leve: cadeia kappa (κ – gene localizado no cromossomo 2) e lambda (λ – gene localizado no cromossomo 22) que são diferenciadas pela região C_L . Em seres humanos, a relação entre cadeias kappa e lambda no repertório geral de anticorpos é de cerca de 60% kappa e 40% lambda (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MCBRIDE et al., 1982).

1.2.1 Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (AcMos) são ferramentas importantes para tratamento e diagnóstico por sua especificidade de ligação ao antígeno e produção homogênea em grandes quantidades. Os estudos com anticorpos ganharam grande incentivo na década de 70 quando foi desenvolvida a técnica de produção de hibridomas (KÖHLER; MILSTEIN, 1976). Através dessa técnica é possível imortalizar uma célula produtora de um anticorpo de interesse pela sua fusão com uma célula de mieloma de origem murina. O produto dessa fusão chama-se hibridoma, passível de ser cultivado *in vitro* e produzir os AcMos selecionados. A tecnologia dos hibridomas trouxe avanços importantes nas pesquisas relacionadas ao tratamento e diagnóstico de diversas patologias. A área de diagnóstico tem uma linha divisória antes e após a introdução de AcMos, de forma isolada ou em kits. A abordagem terapêutica dirigida ao alvo, proporcionada pelos AcMos, necessitou de outra onda de inovação em pesquisa, criando os anticorpos quiméricos ou humanizados. Há mais de quarenta AcMos aprovados pelo FDA para o tratamento de rejeição aos transplantes, câncer de mama, colorretal, linfoma, leucemia, esclerose múltipla, entre outras (Tabela 3) (DEFFAR et al., 2009; FDA, 2015; REICHERT, 2012).

Tabela 3 - Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA

Nome Comercial	Nome Genérico	Alvo	Origem	Ano de aprovação (FDA)	Indicação
Orthoclone	Muromonab	CD3	Murino	1986	Rejeição a transplantes
Reopror	Abciximab	GPIIb, IIIa	Quimérico/ fragmento Fab	1994	Angioplastia de alto risco
Prostascint	Capromab Pendetide	Antígeno prostático específico de membrana	Murino	1996	Diagnóstico por imagem de câncer de próstata
Rituxan	Rituximab	CD20	Quimérico	1997	Linfoma não-Hodgkins e artrite reumatoide
Zenapax	Daclizumab	CD25	Humanizado	1997	Rejeição a transplantes
Herceptin	Trastuzumab	HER-2	Humanizado	1998	Câncer de mama
Remicade	Infliximab	TNF- α	Quimérico	1998	Doença de Crohn's
Simulect	Basiliximab	CD25	Quimérico	1998	Rejeição a transplantes
Synagis	Palivizumab	Proteína F do RSV	Humanizado	1998	Infecção por RSV
Mylotarg	Gemtuzumab	CD33	Humanizado	2000	Leucemia mieloide aguda
Campath	Alemtuzumab	CD52	Humanizado	2001	Leucemia linfocítica crônica, linfoma de células T

Tabela 3, continuação.

Humira	Adalimumab	TNF- α	Humano	2002	Inflamações, principalmente autoimunes (AR, artrite psoriática, artrite Morbus Crohn)
Zevalin	Ibritumomab tiuxetan	CD20	Murino	2002	Linfoma não-Hodgkin's
Bexxar	Tositumomab	CD20	Murino	2003	Linfoma não-Hodgkin's
Xolair	Omalizumab	IgE	Humanizado	2003	Asma alérgica severa
Avastin	Bevacizumab	VEGF	Humanizado	2004	Cânceres colorretal e mamário metastáticos, câncer de pulmão <i>non-small cell</i>
Erbitux	Cetuximab	EGFR	Quimérico	2004	Câncer colorretal, de cabeça e pescoço
Tysabri	Natalizumab	Subunidade $\alpha 4$ de $\alpha 4\beta 1$	Humanizado	2004	Esclerose múltipla, doença de Crohn's
Lymphacide	Epratuzumab	CD22	Humanizado	2005	Linfoma não-Hodgkin's
Orencia	Abatacept	CTLA-4	Fragmento humanizado	2005	Artrite reumatoide
Lucentis Tm	Ranibizumab	VEGF-A	Fab humanizado	2006	Degeneração macular
Vectibix	Panitumumab	EGFR	Humano	2006	Carcinoma metastático colorretal
Soliris	Eculizimab	CD59	Humanizado	2007	Hemoglobinúria paroxística noturna
Benlysta	Bertilimumab	Proteína eotaxin 1	Humano	2008	Alergia
CAT-192	Metelimumab	TGF $\beta 1$	Humano	2008	Dye-sensitized solar cell
Cimzia	Certolizumab	TNF- α	Fab humanizado	2008	Morbus Crohn, artrite reumatoide
Humax CD4	Zanolimumab	CD4	Humano	2008	Linfoma de células T cutâneo e não-cutâneo
Arzerra	Ofatumumab	CD20	Humano	2009	Leucemia linfocítica crônica
Haris	Canakinumab	IL- $\beta 1$	Humano	2009	CAPS (Síndromes Periódicas Associadas à Criopirina)
Simponi	Golimumab	TNF- α	Humano	2009	Atrite reumatoide e psoriática
Stelara	Usteninumab	Subunidade p40 de IL-12 e IL-23	Humano	2009	Psoríase
Actemra	Tocilizumab	Receptor de IL-6	Humanizado	2010	Artrite reumatoide
Prolia	Denosumab	RANK-L	Humano	2010	Mieloma múltiplo, osteoporose pós-menopausa
Adcetris	Brentoximab vedotin	CD30	Humano	2011	Linfoma Hodgkin
Yervoy	Ipilimumab	CTLA-4	Humano	2011	Melanoma
Perjeta	Pertuzumab	HER2	Humanizado	2012	Câncer de mama
Raxibacumab	Raxibacumab	Toxina do antrax	Humano	2012	Profilaxia do antrax inalado
Gazyva	Obinutuzumab	CD20	Humanizado	2013	Leucemia linfocítica crônica
Kadcyla	Ado-trastuzumab emtansine	Receptor HER2/neu	Humanizado	2013	Câncer de mama
Blinicyto	Blinatumomab	CD19	Murino	2014	Leucemia linfoblástica aguda
Cyramza	Ramucirumab	Receptor 2 de VEGF	Humano	2014	Tumores sólidos (adenocarcinoma gástrico, carcinoma pulmonar de não células pequenas)
Entyvio	Vedolizumab	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Humanizado	2014	Colite ulcerativa e doença de Crohn
Keytruda	Pembrolizumab	Receptor PD-1	Humanizado	2014	Melanoma metastático
Sylvant	Siltuximab	IL-6	Quimérico (camundongo/humano)	2014	Câncer metastático renal, câncer de próstata
Cosentyx	Secukinumab	IL17A	Humano	2015	Psoríase
Opdivo	Ado-trastuzumab emtansine	Receptor HER2/neu	Humanizado	2015	Câncer de mama
Unituxin	Dinutuximab	GD2 (glicolípido disialogangliosídeo)	Quimérico	2015	Neuroblastoma

Fonte: Adaptado de DEFFAR et al (2009); REICHERT (2012) e FDA (2015)

O mercado de anticorpos monoclonais atrai muitos investimentos para pesquisa e desenvolvimento dessas moléculas para terapia de diversas doenças. Em 2014, metade dos 10 medicamentos de maior venda eram anticorpos monoclonais (Tabela 4).

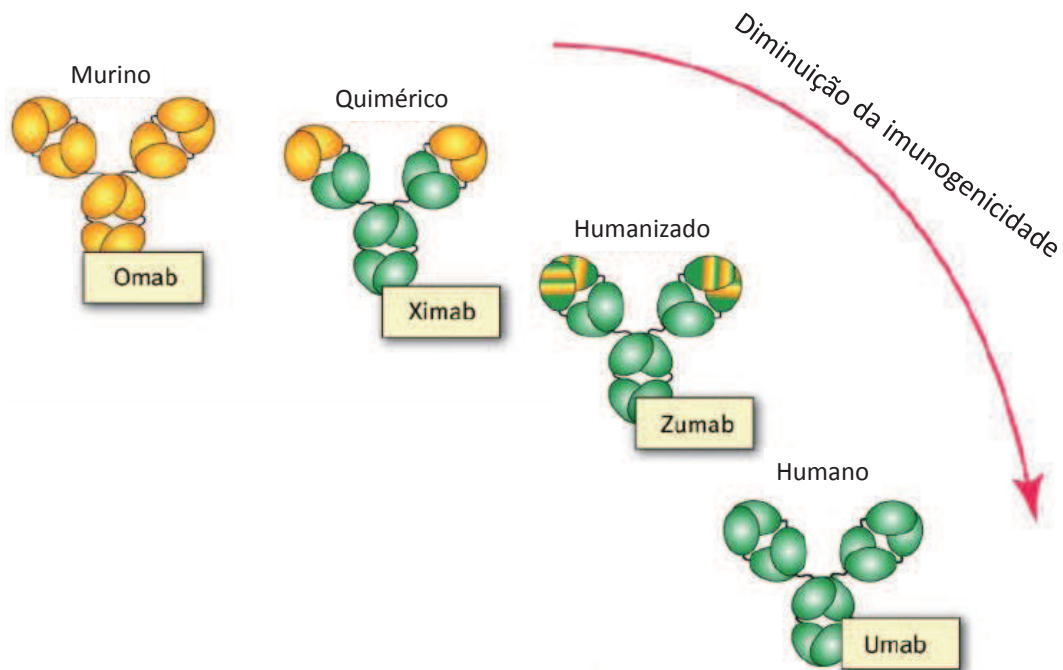
Tabela 4 - Relação dos dez produtos mais vendidos em 2014

10 produtos mais vendidos em 2014					
Rank	Produto	Companhia	Subcategoria terapêutica	Tecnologia	Vendas mundiais (milhões dólares)
1	Avastin (bevacizumabe)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	9.232
2	Humira (adalimumab)	Abbott + Eisai	Antirreumático	AcMo	9.134
3	Rituxan (rituximab)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	7.815
4	Enbrel (etanercept)	Wyeth + Amgen + Takeda	Antirreumático	Produto recombinante	6.583
5	Latinos (insulina glargina)	Sanofi-Aventis	Antidiabético	Produto recombinante	6.386
6	Herceptin (trastuzumab mtansine)	Roche	AcMo antineoplásico	AcMo	5.796
7	Crestor (rosuvastatina)	AstraZeneca	Anti-hiperlipidêmico	Química de moléculas pequenas	5.739
8	Spiriva (brometo de tiotrópio)	Boehringer Ingelheim	Anticolinérgico	Química de moléculas pequenas	5.552
9	Remicade (infliximab)	SGP + J&J + Mitsubishi Tanabe	Antirreumático	AcMo	5.220
10	Gleevec/Glivec (imatinib)	Novartis	Citostático	Química de moléculas pequenas	5.136

Fonte: EVALUATE (2015)

A imunoterapia é comprovadamente eficiente quando se conhece o antígeno e se dispõe de anticorpos que o reconhecem e exercem alguma função, seja citotóxica, bloqueio de vias de sinalização, adjuvante ou neutralizante. Devido ao interesse e potencial terapêutico comprovado dos anticorpos, há um investimento contínuo para torná-los mais eficazes e seguros. Um desafio consiste na produção de moléculas terapêuticas bem toleradas pelos pacientes, principalmente no que diz respeito à imunogenicidade da molécula. A Tabela 3 mostra que existem anticorpos monoclonais oriundos de diferentes tecnologias ou organismos, sendo que isso reflete no reconhecimento da molécula terapêutica pelo paciente. Além de reações de hipersensibilidade à proteína de origem heteróloga, a geração de anticorpos contra a imunoglobulina pode influenciar na farmacocinética e comprometer o tratamento. A Figura 3 mostra a evolução dos anticorpos quanto à origem do material genético usado na expressão da proteína, com a correlação com o potencial imunogênico.

Figura 3 - Classificação dos anticorpos terapêuticos quanto à origem do material genético que origina a proteína.



As técnicas originais de obtenção de anticorpos monoclonais geravam anticorpos com toda a estrutura proteica oriunda de DNA murino. Com o progresso nas técnicas de engenharia genética, foi possível o desenvolvimento de anticorpos com a estrutura mais próxima aos dos anticorpos humanos, com conseqüente diminuição da imunogenicidade. Anticorpos quiméricos são gerados com a substituição das regiões constantes murinas pelas humanas. Os anticorpos humanizados contêm somente as regiões determinantes de complementaridade de origem murina. Os termos descritos nos quadros indicam a nomenclatura de acordo com a origem do anticorpo. Fonte: RUULS et al., 2008

A seguir, estão descritas as tentativas principais de obtenção de anticorpos monoclonais:

1.2.1.1 Hibridomas

A tecnologia de hibridomas, descrita acima, possibilitou a produção de AcMos, porém permanece o fato de serem heterólogos, de origem murina. Na tentativa de evitar a formação de anticorpos anti-anticorpos murinos (HAMA, do inglês *Human anti-murine antibody*), foram desenvolvidas técnicas para produzir AcMos menos imunogênicos. A primeira alternativa tecnológica consistiu na geração de anticorpos quiméricos, formados pela junção da região constante humana com a região variável murina, para cada cadeia, leve e pesada, do anticorpo. Através de engenharia genética, transferiram-se os genes responsáveis pela expressão da região variável oriundos de um hibridoma murino para um vetor que codificava a região constante de uma imunoglobulina humana (MORRISON et al., 1984). A

técnica é bastante satisfatória, com a geração de uma molécula menos imunogênica que a imunoglobulina murina (SWANN et al., 2008).

1.2.1.2 Hibridomas humanos

Mesmo com a limitação da fonte de linfócitos e impossibilidade de imunizar humanos com qualquer molécula, houve tentativas de produzir hibridomas humanos, sem o mesmo sucesso obtido com hibridomas murinos. Um dos motivos metodológicos deveu-se ao fato de que não se obteve uma célula de mieloma humano adequada para a fusão com o linfócito B de interesse (JESSUP et al., 2000). As células de mieloma mostraram-se difíceis de serem estabelecidas para cultivo nas condições necessárias para a fusão. As células linfoblastoides, obtidas pela imortalização dos linfócitos B pelo vírus Epstein-Barr, são mais fáceis de cultivar, e são uma opção para realizar a fusão. Porém, a dificuldade na geração de híbridos com mutação passível de seleção e com produção constante de anticorpos são desvantagens dos hibridomas formados a partir das células linfoblastoides (COLE et al., 1984).

1.2.1.3 Imortalização de Linfócitos B

Surgiu com intuito de manter a célula em cultivo por períodos prolongados e a produção de AcMos humanos. A obtenção dessas células é feita pela transformação de linfócitos com vírus Epstein-Barr, que induz ativação metabólica, transformações morfológicas, proliferação e imortalização (YENAMANDRA et al., 2009). Os resultados dessa técnica mostraram-se insatisfatórios, pois as células transformadas mostram crescimento instável, baixa secreção de anticorpos, além de perder a capacidade de produzir o anticorpo específico após períodos em cultivo (JESSUP et al., 2000; RODER; COLE; KOZBOR, 1986). Verificou-se que a proteína LMP1 do vírus Epstein-Barr inativa o fator de transcrição BLIMP1 α que é necessário para diferenciação para plasmócitos, que são as células secretoras de anticorpos (VRZALIKOVA et al., 2011). Ao mesmo tempo, a expressão de BLIMP1 α pode promover a indução do ciclo lítico do vírus (REUSCH et al., 2015). Assim, a instabilidade dessas células imortalizadas pode ser explicada pela incompatibilidade dos dois eventos: infecção e maturação da célula.

1.2.1.4 Humanização de anticorpos murinos

Para diminuir a imunogenicidade dos AcMos murinos, uma abordagem de sucesso é a metodologia de humanização dos mesmos. Esta técnica pode ser feita com a transferência de CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Regions*) de um anticorpo murino para as porções intercaladas do arcabouço das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de origem humana. Nesse processo, conhecido como Transplante de CDR, as regiões variáveis contendo arcabouço humano e CDRs murinos são ligadas a regiões constantes de origem humana. Dessa forma, obtêm-se AcMos humanizados formados pela região constante de uma imunoglobulina humana e uma região variável desenhada de forma que sua sequência seja a mais próxima possível da região variável da imunoglobulina humana (STUDNICKA et al., 1994). Trata-se de técnica complexa, que frequentemente leva à obtenção de anticorpos que perdem a afinidade pelo antígeno pela desestruturação do arcabouço que sustenta as CDRs. Nesse caso são necessários estudos estruturais para a conservação da ligação com o antígeno. Grande parte dos anticorpos monoclonais aprovados para uso em seres humanos é obtido em forma humanizada (ver Tabela 3).

1.2.1.5 *Phage display*

Essa técnica gera uma biblioteca de sequências a partir da amplificação das regiões variáveis dos anticorpos de linfócitos B humanos ou de hibridomas. As sequências são clonadas em vetores específicos que podem expressar as regiões variáveis na forma de fragmentos scFv ou Fab fusionados à proteína de um bacteriófago de *Escherichia coli*. São construídas bibliotecas com diversas sequências que podem ser triadas de acordo com a interação do fragmento do anticorpo expresso com o antígeno de interesse em um processo chamado de *panning*, em que os bacteriófagos gerados são incubados em placas de ELISA com o antígeno imobilizado, por exemplo (McCAFFERTY et al., 1990; HAMMERS; STANLEY, 2013; MURATA et al., 2013).

O primeiro AcMo humano terapêutico aprovado para uso humano, Adalimumab, contra TNF α , foi obtido utilizando esta técnica, em um processo conhecido como humanização por seleção guiada. A partir de uma biblioteca de fagos, uma sequência da cadeia pesada e uma da leve de anticorpos humanos foram escolhidas para formar o anticorpo humano. A escolha foi baseada no pareamento das cadeias humanas da biblioteca com as do anticorpo murino anti-TNF α e seleção contra o antígeno (OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005). Posteriormente, as sequências do anticorpo humano escolhidas foram

transfectados em células de mamífero para obtenção de linhagem estável produtora do AcMo humano (ABBVIE CORPORATION, 2004).

1.2.1.6 Camundongos transgênicos

Outra tentativa de obtenção de AcMos “mais humanos” deveu-se à geração de camundongos transgênicos, nos quais os genes das cadeias IgH e Igk foram substituídos no genoma dos animais, através de recombinação homóloga, por genes humanos codificantes das cadeias leve e pesada. Dessa forma, o camundongo produz anticorpos humanos quando exposto a um antígeno. Assim, é possível imunizar camundongos e gerar hibridomas produtores de imunoglobulinas com sequências humanas. (GREEN, 1999). A desvantagem dessa técnica está na obtenção e manutenção dos camundongos. Alguns dos AcMos descritos na Tabela 3 foram obtidos a partir desta tecnologia, como Denosumab e Panitumumab, que foram gerados a partir do Xenomouse (Amgen British Columbia, Inc, Burnaby, BC, Canadá) ou Zanolimumab, a partir da tecnologia UltiMab (Medarex, Inc, Princeton, NJ, EUA), que também utiliza camundongo transgênico. Este último foi produzido por imunização dos camundongos, obtenção do hibridoma, clonagem das sequências do anticorpo e geração de uma linhagem produtora do anticorpo em células CHO (células de ovário de hamster chinês) (KIM et al., 2007).

1.2.1.7 Anticorpos Monoclonais Recombinantes Humanos

Mais recentemente, uma estratégia inovadora para a obtenção de AcMos humanos funcionais foi desenvolvida por um grupo de pesquisa da Universidade Rockefeller, em Nova York, liderado pelo Dr. Michel Nussenzweig (MOUQUET et al., 2010, 2011; SCHEID et al., 2009a, 2009b; TILLER et al., 2008; WARDEMANN et al., 2003; WARDEMANN; KOFER, 2013). Essa estratégia baseia-se na clonagem e expressão dos genes produtores de imunoglobulinas obtidos diretamente de linfócitos B humanos. Por essa técnica, linfócitos B são identificados de acordo com a ligação com o antígeno e separados individualmente, por exemplo, em placas de 96 poços. A partir do mRNA de cada célula, as cadeias variáveis dos anticorpos são amplificadas, clonadas em vetores contendo genes de regiões constantes de cadeias leve e pesada humanas. Dessa forma, após transfecção com esses vetores, as células eucariotas produzirão uma molécula de anticorpo inteiro, com estrutura idêntica à humana. Para a produção de anticorpos por essa metodologia são necessários: a coleta de sangue de doadores que tenham células B de memória circulantes contra um determinado antígeno e o

antígeno purificado para a identificação dessas células por imunofenotipagem. Essa estratégia também foi utilizada para a obtenção de outros AcMos, como contra *Plasmodium falciparum*, com a utilização do antígeno GMZ2 (específico do parasita) para identificação das células de memória de doadores infectados (MUELLENBECK et al., 2013). Outra estratégia utilizada é a separação de plasmablastos a partir do sangue de doadores vacinados, neste caso sem a necessidade de marcação com antígeno específico. AcMos contra o vírus Varicella-Zoster (BIRLEA et al., 2013), *Bacillus anthracis*, o agente causador do antraz (SMITH et al., 2012) e vírus Influenza (KAUR et al., 2015) foram obtidos a partir de plasmablastos.

1.3 Linfócitos B

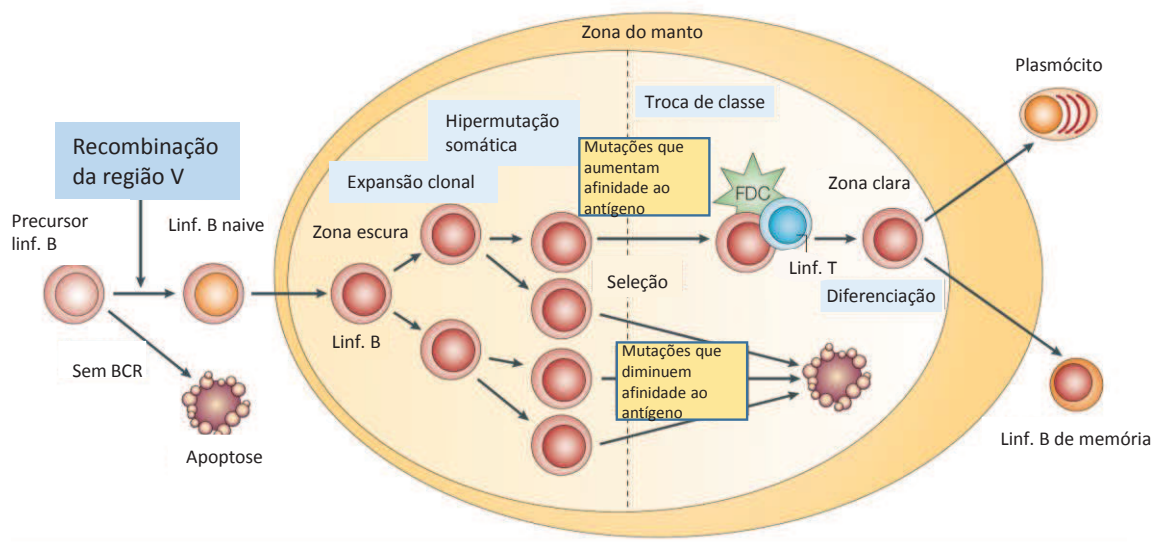
Os linfócitos B são as células produtoras das imunoglobulinas. São originados das células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea. O primeiro estágio reconhecido é chamado de pró-linfócito B e já ocorre a expressão de alguns marcadores específicos da linhagem das células B, como CD19. A sequência de DNA da imunoglobulina que a célula produzirá em sua linhagem não está definida nessa etapa. É nesse momento em que se inicia o rearranjo dos genes V, D e J no *locus* da cadeia pesada germinativa através de recombinação somática pela ação de enzimas conhecidas como RAG-1 e RAG-2 (*Recombination activating genes*), que geram quebras no DNA em regiões específicas (OETTINGER et al., 1990; SCHATZ; OETTINGER; BALTIMORE, 1989). Existem cerca de 100 segmentos V, 23 D e 6 J para a cadeia pesada, com combinação aleatória. Considerando a presença de vários segmentos possíveis de escolha, a variabilidade de sequências previstas é alta. Além disso, uma enzima específica dos tecidos linfoides chamada desoxinucleotidiltransferase terminal (TdT) adiciona nucleotídeos nas regiões 3' das junções de forma aleatória (ALT; BALTIMORE, 1982). Essa etapa contribui para aumentar a diversidade das sequências dos anticorpos, sendo na região das junções que se localiza o segmento CDR3, considerada a porção mais importante do anticorpo na determinação da especificidade da ligação ao antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Com o rearranjo produtivo (com a fase de leitura correta do mRNA) a célula expressa a cadeia pesada μ rearranjada juntamente com uma cadeia leve substituta, ainda não rearranjada, formando o pré-BCR. Nesta etapa, a célula passa a ser chamada de pré-linfócito B. Sinalizações do receptor pré-BCR geram um fenômeno chamado de exclusão alélica, que corresponde à inibição do rearranjo do segundo *locus* da cadeia pesada no outro cromossomo. Caso o receptor não seja formado adequadamente, o segundo *locus* é rearranjado para geração de outra cadeia μ . Outra sinalização gerada pelo receptor é em relação ao rearranjo dos *locus* da cadeia leve.

Primeiramente, o *locus* da cadeia leve kappa é rearranjado, sendo que o *locus* da cadeia leve lambda sofre rearranjo caso o primeiro não seja produtivo. Para a cadeia leve não existe o gene D, sendo a recombinação feita entre os genes V e J. O rearranjo produtivo da cadeia leve produzirá a cadeia que se associará à pesada μ para formar a molécula de IgM. Com isso, a célula passa a ser chamada de linfócito imaturo. Ocorre uma avaliação importante nessa etapa com a verificação do reconhecimento do anticorpo produzido contra antígenos próprios. Se isso ocorrer, o linfócito pode sofrer o processo de edição do receptor em que os genes das enzimas Rag são reativados para rearranjar novas cadeias leves e expressar um novo receptor que será testado novamente. Se não ocorrer reconhecimento de antígenos próprios, o linfócito sairá da medula óssea e completará sua maturação no baço.

Linfócitos B maduros expressão IgM e IgD que circulam por órgãos linfoides secundários a procura do antígeno reconhecido pela imunoglobulina ancorada em sua membrana. Células apresentadoras de antígeno nos órgãos linfoides exibem o antígeno na sua conformação nativa a linfócitos B. No caso de haver ligação do antígeno ao receptor de imunoglobulina, esses linfócitos serão ativados. A ativação promove a interação entre linfócitos B e T (ambos ativados) para culminar com a geração de plasmócitos secretores de anticorpos de vida curta. Isso ocorre em regiões extrafoliculares dos órgãos linfoides. Alguns linfócitos B ativados migram para o folículo onde interagem com linfócitos T *helper* foliculares, formando o centro germinativo, que é o local onde ocorre proliferação dos linfócitos B, conhecida como expansão clonal. É também nesse momento que ocorre a maturação da afinidade dos anticorpos através de troca de isotipo e hipermutação somática. Nesta etapa também são gerados os linfócitos B de memória e plasmócitos de vida longa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; KÜPPERS, 2005). A Figura 4 esquematiza o processo de desenvolvimento dos linfócitos B.

Os linfócitos B de memória são células que permanecem em estado de repouso e são reativados em um segundo encontro com o antígeno, sofrendo o mesmo processo descrito na figura acima, com a possibilidade de sofrer mais mutações que poderão aumentar ainda mais a afinidade ao antígeno. Os plasmócitos, citados como produto da diferenciação das células de memória, encontram-se na medula óssea. Um intermediário conhecido como plasmablasto é encontrado na corrente sanguínea por um período curto (pico de detecção 6-7 dias após exposição ao antígeno) antes de ser recrutado para a medula óssea ou tonsilas, onde se instalam em nichos que propiciam sua sobrevivência e diferenciação para plasmócitos de vida longa secretores de anticorpos (ARCE et al., 2004).

Figura 4 - Maturação dos linfócitos B



Linfócitos B maduros (*naive*) são direcionados aos folículos primários nos órgãos linfoides secundários como nódulos linfáticos, onde estabelecem os centros germinativos (CG). É possível distinguir duas regiões nos CG: a zona escura e clara (lado esquerdo e direito da figura, respectivamente). A zona escura contém principalmente células B em proliferação, enquanto que as células na zona clara estão principalmente em repouso. Nos linfócitos em proliferação, o processo de hipermutação somática é ativado, o que leva à indução de taxas elevadas de mutações, que na maioria dos casos não é benéfica, pois reduz a afinidade do receptor (BCR) ao antígeno, e as células são eliminadas por apoptose. Algumas mutações são benéficas e aumentam a afinidade do BCR, selecionando as células positivamente (na zona clara, com interação com células T CD4⁺ e células dendríticas foliculares (FDCs)). Algumas células sofrerão recombinação para mudança da classe das imunoglobulinas. Por fim, os linfócitos B do CG diferenciam-se em linfócitos B de memória ou plasmócitos.

Fonte: KÜPPERS (2005).

A diferenciação das células durante o desenvolvimento dos linfócitos pode ser avaliada pela expressão de alguns marcadores de superfície, que estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Marcadores de superfície durante o desenvolvimento de linfócitos B

Nome	Fenótipo	Função
Transicional	IgD ⁺ CD27 ^{neg} CD10 ⁺ CD24 ⁺⁺ CD38 ^{+/low}	Transição entre medula óssea e órgãos linfoides secundários.
Linf. B maduro/naive	IgD ⁺ CD27 ^{neg} CD10 ^{neg} CD24 ^{+/low} CD38 ^{+/low}	Precursor das células do centro germinativo, linf. B de memória e secretoras de anticorpos.
Linf. B de memória (após troca de classe)	IgM ^{neg} IgD ^{neg} CD27 ⁺ CD38 ^{neg}	Resposta rápida após reencontro com antígeno
Plasmablastos	IgD ^{neg} CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ CD138 ^{neg}	Secreção de anticorpos
Plasmócitos	IgD ^{neg} CD27 ⁺⁺ CD38 ⁺⁺ CD138 ⁺	Secreção de anticorpos.

As células descritas na tabela são CD19⁺.

Fonte: Adaptado de CARAUX et al. (2010); KAMINSKI et al., (2012)

1.4 Justificativa para este trabalho

A persistência de casos de tétano, quando já existe uma vacina eficiente, demanda alternativas para o tratamento. Em casos suspeitos, utiliza-se o soro antitetânico obtido de animais, em geral cavalos, composto de anticorpos policlonais. Sabe-se, porém, que o uso de proteínas heterólogas pode induzir a formação de anticorpos contra essas imunoglobulinas, o que limita sua utilização em uma dose e inviabiliza o possível tratamento em outras situações em que anticorpos heterólogos estão disponíveis. O uso da imunoglobulina humana hiperimune obtida de doadores humanos, apesar de ser uma alternativa eficaz, apresenta riscos em casos de transmissão de doenças e a produção dos lotes não é homogênea.

Portanto, torna-se importante a tentativa de obtenção de anticorpos antitetânicos monoclonais humanos como uma tendência atual de oferta de biológicos com consistência de lotes de produção e imunogenicidade nula ou baixa. O presente projeto representa inovação no uso de soroterapia contra doenças infecciosas (CASADEVALL; SCHARFF, 1994), que foi iniciada há mais de um século com o uso de soros hiperimunes de animais vacinados, e hoje pode contar com métodos de biotecnologia para a obtenção de imunobiológicos mais consistentes e seguros. A implantação da tecnologia para anticorpos monoclonais humanos demonstrada neste trabalho abrirá um caminho para o tratamento do tétano, e também de outras doenças infecciosas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

- os anticorpos monoclonais humanos antitetânicos foram obtidos com sucesso e foram capazes de reconhecer os antígenos tetânicos.

- a estratégia de marcação e separação dos linfócitos B deve ser adaptada para cada doença/vacina estudada para a obtenção dos anticorpos específicos.

- a situação vacinal do doador pode influenciar a obtenção das células B específicas.

- a combinação de anticorpos que ligam em diferentes epítomos da toxina foi capaz de neutralizar a toxina tetânica *in vivo*, atingindo o mesmo resultado do soro policlonal heterólogo. É esperado que misturas de anticorpos monoclonais neutralizem toxinas ou microorganismos de forma mais eficaz que AcMos isoladamente.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. 545 p.
- ABBVIE CORPORATION. **Humira - Product Monograph**: 132 p. 2004. Disponível em: http://www.abbvie.ca/content/dam/abbviecorp/ca/english/docs/HUMIRA_PM_EN.pdf. Acesso em 19/maio/2015.
- ALON, R.; BAYER, E.; WILCHEK, M. Cell-adhesive properties of streptavidin are mediated by the exposure of an RGD-lik RYD site. **European Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 271-279, 1992.
- _____. Cell adhesion to streptavidin via RGD-dependent integrins. **European Journal of Cell Biology**, v. 60, n. 1, p. 1-11, 1993.
- ALT, F. W.; BALTIMORE, D. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 79, n. 13, p. 4118-4122, 1982.
- AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Quantitation of rare memory B cell population by two independent and complementary approaches. **Journal of Immunological Methods**, v. 317, p. 175-185, 2006.
- ARCE, S. et al. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 6, p. 1022-1028, 2004.
- BIRLEA, M. et al. Human Anti-Varicella-Zoster Virus (VZV) Recombinant Monoclonal Antibody Produced after Zostavax Immunization Recognizes the gH/gL Complex and Neutralizes VZV Infection. **Journal of Virology**, v. 87, n. 1, p. 415-421, 2013.
- BIZZINI, B. Tetanus Toxin. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 224-240, 1979.
- BOSCARDIN, S. B. **Lista de Primers**: [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <eduardo.aliprandini@butantan.gov.br> em 18/set/2013. p. 2013.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Vol. 2. Brasília: Fiocruz, 2010. 904 p.
- CAMPEAU, E. Partial digestion protocol. 2009. Disponível em: <http://ericcampeau.com/images/Partial%20digestion%20protocol%20V1_0.pdf>. Acesso em 15/fev/2014.
- CAO, Y. et al. An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. **Journal of Immunological Methods**, v. 358, n. 1-2, p. 56-65, 2010.
- CARAU, A. et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138⁻ and CD138⁺ plasma cells. **Haematologica**, v. 95, n. 6, p. 1016-1020, 2010.
- CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1695-1702, 1994.

¹ De acordo com Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT). Disponível em <http://www.icb.usp.br/~sbibicb/images/diretrizesABNT2012sbibPDF/Manual%20ABNT%20Compacto.pdf>. Acesso em 10/06/2015.

CHEN, C. et al. Gangliosides as High Affinity Receptors for Tetanus Neurotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26569-26577, 2009.

COLE, S. P. C. et al. Human monoclonal antibodies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 62, p. 109-120, 1984.

COLLINGRIDGE, G. L.; DAVIES, J. The *in vitro* inhibition of GABA release by tetanus toxin. **Neuropharmacology**, v. 21, n. 9, p. 851-855, 1982.

COOK, G. P.; TOMLINSON, I. M. The human immunoglobulin VH repertoire. **Immunology Today**, v. 16, n. 5, p. 237-242, 1995.

DE KRUIF, J. et al. Human Immunoglobulin Repertoires against Tetanus Toxoid Contain a Large and Diverse Fraction of High-Affinity Promiscuous VH Genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 387, n. 3, p. 548-558, 2009.

DEFFAR, K. et al. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 2645-2652, 2009.

DIVINO-GOES, K. G. et al. Prevalence of diphtheria and tetanus antibodies and circulation of *Corynebacterium diphtheriae* in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1681-1687, 2007.

DOKMETJIAN, J. et al. A possible explanation for the discrepancy between ELISA and neutralising antibodies to tetanus toxin. **Vaccine**, v. 18, p. 2698-2703, 2000.

EVALUATE. Biotech set to dominate drug industry growth. 2015. Disponível em: <<http://www.evaluategroup.com/Universal/View.aspx?type=Story&id=188700§ionID=&isEPVantage=yes>>. Acesso em: 12/maio/2015.

FDA. **Drugs@FDA**. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Addlsearch_drug_name. Data de acesso: 05/05/2015. Palavra chave: mab - entre jan/2010 e abr/2015.

FITZSIMMONS, S. P. et al. Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside GT1b by monoclonal antibodies recognizing different epitopes. **Vaccine**, v. 19, p. 114-121, 2001.

FOTINOU, C. et al. The Crystal Structure of Tetanus Toxin Hc Fragment Complexed with a Synthetic GT1b Analogue Suggests Cross-linking between Ganglioside Receptors and the Toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32274-32281, 2001.

FRANZ, B. et al. Ex vivo characterization and isolation of rare memory B cells with antigen tetramers. **Blood**, v. 118, n. 2, p. 348-357, 2011.

FRÖLICH, D. et al. Secondary Immunization Generates Clonally Related Antigen-Specific Plasma Cells and Memory B Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 3103-3110, 2010.

FUNASA. Procedimentos para Administração de Soros. p. pág. 201-231, 2001. Disponível em: <http://xa.yimg.com/kq/groups/13844166/698847955/name/procedimentos_soros.pdf>. Acesso em: 26/maio/2015.

GODBEY, W. T.; WU, K. K.; MIKOS, A. G. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 27, n. 9, p. 5177-5181, 1999.

GREEN, L. L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 231, n. 1-2, p. 11-23, 1999.

HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Antibody Phage Display: Technique and Applications. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, p. e17.

HANSEL, T. T. et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 4, p. 325-338, 2010.

HUMEAU, Y. et al. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie**, v. 82, n. 5, p. 427-446, 2000.

JESSUP, C. F. et al. Preparation of human-mouse heterohybridomas against an immunising antigen. **Journal of Immunological Methods**, v. 246, p. 187-202, 2000.

JOURDAN, M. et al. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5173-5181, 2009.

KAMINSKI, D. A. et al. Advances in human B cell phenotypic profiling. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 302, 2012.

KAUR, K. et al. High Affinity Antibodies against Influenza Characterize the Plasmablast Response in SLE Patients After Vaccination. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125618, 2015.

KIM, J. S. et al. Changes of Tetanus Specific IgG, IgM and IgG Subclasses after DPT Vaccination. **Yonsei Medical Journal**, v. 30, n. 2, p. 158-163, 1989.

KIM, Y. H. et al. Clinical efficacy of zanolimumab (HuMax-CD4): two phase 2 studies in refractory cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4655-4662, 2007.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. **European Journal of Immunology**, v. 6, n. 7, p. 511-519, 1976.

KÜPPERS, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. **Nature Reviews**, v. 5, p. 251-262, 2005.

LAVINDER, J. J. et al. Identification and characterization of the constituent human serum antibodies elicited by vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, n. 6, p. 2259-2264, 2014.

LINDLEY-JONES, M.; LEWIS, D.; SOUTHGATE, J. L. Recurrent tetanus. **The Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2048-2048, 2004.

LISBOA, T. et al. Guidelines for the management of accidental tetanus in adult patients. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 4, p. 394-409, 2011.

LIST BIOLOGICAL LABORATORIES INC. Certificate of Analysis - Tetanus Toxoid. 2014. Disponível em: < http://www.listlabs.com/mediafiles/c_of_a/19122A1A-812.pdf >. Acesso em: 09/abril/2015.

MATSUDA, M. et al. Characteristics of Toxin-Neutralization by Anti-Tetanus Human Monoclonal Antibodies Directed Against the Three Functional Domains [A], [B] and [C] of the Tetanus Toxin Molecule and a Reliable Method for Evaluating the Protective Effects of Monoclonal Antibodies. . **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1992.

MATSUDA, M.; YONEDA, M. Dissociation of tetanus neurotoxin into two polypeptide fragments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 57, n. 4, p. 1257-1262, 1974.

MCBRIDE, O. W. et al. Chromosomal Location of Human Kappa and Lambda Immunoglobulin Light Chain Constant Region Genes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 1480-1490, 1982.

MCCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, n. 6301, p. 552-554, 1990.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Normas de Vacinação**. 3 ed. Vol. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional da Saúde, 2001. 72 p Disponível em: <
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_normas_vac.pdf>. Acesso em 21/ago/2015 >.

_____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 696-707 p. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3463ca004745920f9a61de3fbc4c6735/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 10/junho/2015 >.

_____. **Incidência de tétano neonatal**. Rede Interagencial de Informações para a Saúde - RIPSAs. Disponível em:
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tetanoacid/bases/tetacidbrnet.def>. Data de acesso: 19/maio/2015, 2015a.

_____. **Tétano Acidental**. Rede Interagencial de Informações para a Saúde - RIPSAs. Disponível em:
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tetanoacid/bases/tetacidbrnet.def>. Data de acesso: 30/julho/2015, 2015b.

MIYAJI, E. N. et al. Induction of Neutralizing Antibodies against Diphtheria Toxin by Priming with Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Expressing CRM₁₉₇, a Mutant Diphtheria Toxin. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 869-874, 2001.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 81, n. 21, p. 6851-6855, 1984.

MOUQUET, H. et al. Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterologation. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 591-595, 2010.

_____. Memory B Cell Antibodies to HIV-1 gp140 Cloned from Individuals Infected with Clade A and B Viruses. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24078, 2011.

MUELLENBECK, M. F. et al. Atypical and classical memory B cells produce Plasmodium falciparum neutralizing antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 389-399, 2013.

MURATA, V. M. et al. Anti-Digoxin Fab Variants Generated by Phage Display. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 269-277, 2013.

OETTINGER, M. A. et al. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. **Science**, v. 248, n. 4962, p. 1517-1523, 1990.

OSBOURN, J.; GROVES, M.; VAUGHAN, T. From rodent reagents to human therapeutics using antibody guided selection. **Methods**, v. 36, p. 61-68, 2005.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.

PRADO, S. M. A. **Aplicabilidade do Antígeno Tetânico Conjugado com Derivados do Monometoxi-polietilenoglicol**. 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RAPPUOLI, R. New and Improved Vaccines Against Diphtheria and Tetanus. In: LEVINE, M. M.; WOODROW, G. C., et al (Ed.). **New Generation Vaccines**. 2 rev e expandida. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

REICHERT, J. M. Marketed therapeutic antibodies compendium. **mAbs**, v. 4, n. 3, p. 413-415, 2012.

REUSCH, J. A. et al. Cellular Differentiation Regulator BLIMP1 Induces Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation in Epithelial and B Cells by Activating Transcription from both the R and Z Promoters. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1731-1743, 2015.

RIBAS, A. V. et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C–thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 91-94, 2000.

RODER, J. C.; COLE, S. P. C.; KOZBOR, D. The EBV - Hybridoma Technique. **Methods in Enzymology**, v. 121, p. 140-167, 1986.

RUULS, S. R. et al. Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 1157-1171, 2008.

SCHATZ, D. G.; OETTINGER, M. A.; BALTIMORE, D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1035-1048, 1989.

SCHAUER, U. et al. Levels of Antibodies Specific to Tetanus Toxoid, Haemophilus influenzae Type b, and Pneumococcal Capsular Polysaccharide in Healthy Children and Adults **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 10, n. 2, p. 202-207, 2003.

SCHEID, J. F. et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature**, v. 458, n. 7238, p. 636-640, 2009a.

_____. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 65-67, 2009b.

SCHIAVO, G. et al. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. **Nature** v. 359, p. 832-835, 1992a.

SCHIAVO, G. et al. Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3577-3583, 1992b.

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 2, p. 717-766, 2000.

SMITH, K. et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccination antigen. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 372-384, 2009.

_____. Human monoclonal antibodies generated following vaccination with AVA provide neutralization by blocking furin cleavage but not by preventing oligomerization. **Vaccine**, v. 30, n. 28, p. 4276-4283, 2012.

STUDNICKA, G. M. et al. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. **Protein Engineering**, v. 7, n. 6, p. 805-814, 1994.

STUPACK, D. et al. B lymphocyte fibronectin receptors: expression and utilization. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 34, n. 6, p. 761-9, 1991.

SWANN, P. G. et al. Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 493-499, 2008.

THROSBY, M. et al. Isolation and Characterization of Human Monoclonal Antibodies from Individuals Infected with West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6982-6992, 2006.

THAYSEN-ANDERSEN, M. et al. Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated toxin. **Vaccine**, v. 25, p. 2213-2227, 2007.

TILLER, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, p. 112-124, 2008.

TOWNSEND, S. E.; GOODNOW, C. C.; CORNALL, R. J. Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 249, n. 1-2, p. 137-146, 2001.

VOLK, W. A. et al. Neutralization of Tetanus Toxin by Distinct Monoclonal Antibodies Binding to Multiple Epitopes on the Toxin Molecule. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 3, p. 604-609, 1984.

VRZALIKOVA, K. et al. Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5907-5917, 2011.

WARDEMANN, H. et al. Predominant Autoantibody Production by Early Human B Cell Precursors. **Science**, v. 301, n. 5638, p. 1374-1377, 2003.

WARDEMANN, H.; KOFER, J. Expression Cloning of Human B Cell Immunoglobulins. In: KÜPPERS, R. (Ed.). **Lymphoma**. New York City: Humana Press, 2013. (Methods in Molecular Biology, v. 971, p. 93-111).

WECKX, L. Y. et al. Effect of a single tetanus-diphtheria vaccine dose on the immunity of elderly people in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 519-523, 2006.

WRAMMERT, J. et al. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 2911-2918, 2012.

YENAMANDRA, S. P. et al. Expression Profile of Nuclear Receptors upon Epstein-Barr Virus Induced B Cell Transformation. **Experimental Oncology**, v. 31, n. 2, p. 92-96, 2009.

YOUSEFI, M. et al. Comparative in vitro and in vivo assessment of toxin neutralization by anti-tetanus toxin monoclonal antibodies. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 2, p. 344-351, 2014.