

DANIELA YUMI TAKATA

Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para a obtenção de Título de Doutor em Biotecnologia.

**São Paulo - SP
2021**

DANIELA YUMI TAKATA

Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Ana Maria Moro

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo - SP
2021**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Takata, Daniela Yumi

Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos / Daniela Yumi Takata; orientadora Ana Maria Moro. -- São Paulo, 2021.

118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Anticorpos monoclonais humanos. 2. Toxina tetânica. 3. Tétano. 4. Neutralização da toxina tetânica. 5. Linhagem celular estável. I. Moro, Ana Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Daniela Yumi Takata

Título da Tese: Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Moro

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Obtenção de Anticorpos Monoclonais Humanos Neutralizantes Antitoxoide Tetânico", protocolado sob o CEUA nº 6203050416, sob a responsabilidade de **Ana Maria Moro e equipe; Giulia Emi de Oliveira Preto; Márcia de Moraes Rodrigues; Daniela Yumi Takata** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 15/06/2016.

We certify that the proposal "Neutralizing human anti-tetanus monoclonal antibodies", utilizing 1000 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6203050416, under the responsibility of **Ana Maria Moro and team; Giulia Emi de Oliveira Preto; Márcia de Moraes Rodrigues; Daniela Yumi Takata** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 06/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2016** a **12/2019**

Área: **Biofármacos Em Célula Animal**

Procedência: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **28 a 30 dias**

N: **1000**

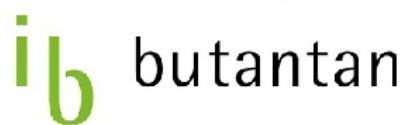
Linhagem: **Swiss**

Peso: **17 a 22 g**

Resumo: Através de imunofenotipagem, linfócitos B do sangue periférico de doadores são isolados por cell sorter. As células isoladas passam por PCR para amplificação dos genes de imunoglobulinas. Após sequenciamento, os genes das cadeias leve e pesada são clonados em vetores de expressão e utilizadas em transfecção de células de mamíferos. Os anticorpos humanos produzidos são purificados e utilizados em ensaios in vitro (ELISA, Western blotting, SPR) para avaliação de ligação ao antígeno e cinética. Anticorpos selecionados pela triagem in vitro são selecionados para ensaio de neutralização in vivo segundo a Farmacopeia Brasileira. Os anticorpos, principalmente os monoclonais, são importantes ferramentas para tratamento e diagnóstico, pois mostram alta especificidade de ligação ao antígeno. Com o desenvolvimento da técnica de produção de híbridoma na década de 70, houve grande aumento no estudo com anticorpos monoclonais e seu uso nas pesquisas relacionadas ao tratamento e diagnóstico de diversas patologias. Porém, em alguns casos, somente anticorpos policlonais obtidos pela imunização de animais estão disponíveis, caso dos anticorpos para imunoterapia passiva de pacientes com tétano, raiva, difteria, botulismo, etc.. Ainda que eficientes, sendo utilizados há mais de um século, os anticorpos policlonais são geralmente de origem animal, constando de proteínas heterólogas, as quais podem incitar a resposta imune do paciente, produzindo imunogenicidade, diminuindo a eficácia e comprometendo possíveis futuros tratamentos. O antígeno escolhido para este projeto é o toxoide tetânico. O tétano é uma doença neurológica causada pela toxina produzida pelo bacilo Clostridium tetani. O tratamento disponível para o tétano, além da profilaxia da vacina, é a utilização do soro hiperimune produzido em cavalos. Neste projeto vamos utilizar uma metodologia inovadora para gerar anticorpos monoclonais humanos a partir da identificação e seleção de linfócitos B humanos isolados de indivíduos que foram imunizados com a vacina antitetânica. As sequências das células B selecionadas serão amplificadas e clonadas em vetor para expressão em células HEK. Os variantes produzidos serão purificados e caracterizados por afinidade, especificidade e os melhores anticorpos serão testados in vivo quanto à capacidade de neutralização da toxina tetânica. Além da importância da obtenção de anticorpos monoclonais humanos contra tétano, proposta deste projeto, a metodologia desenvolvida poderá ser utilizada, no futuro, para geração de anticorpos humanos para outros antígenos.

Local do experimento: **Infectório do Controle de Qualidade Biológico do Instituto Butantan**

São Paulo, 23 de junho de 2016



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Ana Maria Moro
Área: Biofármacos Em Célula Animal

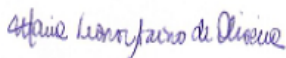
Título da proposta: "Obtenção de Anticorpos Monoclonais Humanos Neutralizantes Antitoxoide Tetânico".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 003332)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 26/junho/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Parcialmente Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Resp: Não utilizamos todos os animais solicitados porque não seriam suficientes para todo o estudo, tentamos validar um método in vitro prévio para utilizar os animais somente para comprovação. Ainda não chegamos nessa fase. 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Sim 6. Resultados já publicados? Resp: Sim".

Comentário da CEUA: "".



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais, Adilson e Marcia, e minha irmã, Isabela, por todo amor dedicado, por serem minha base e por me apoiarem incondicionalmente. Agradeço por me acolherem quando preciso, mas também me “empurrarem” quando necessário.

À minha cunhada, Mariah, por me mostrar que tudo pode ser mais leve e que família não necessariamente tem o mesmo sangue.

Aos meus eternos amigos, que se foram cedo demais, Caio e Ovelha, por terem me dado o privilégio de conviver, de amar e de aprender com vocês durante a breve jornada que tiveram aqui. Vocês eram bons demais para esse mundo.

À Prof. Dra. Ana Maria Moro, pelo acolhimento no seu laboratório, pela orientação científica, dedicação e motivação.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofármacos Carol Magalhães, João Batalha e Dra. Tânia Manieri, pela amizade, pelas risadas e pelos choros, pelo apoio dentro e fora do laboratório, pelas inúmeras discussões de protocolos experimentais e de resultados enlouquecedores; por tornarem a rotina mais leve em momentos difíceis.

A todos os colegas que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Biofármacos, pelo apoio, pelas conversas e pelos momentos de cafés, almoços e lanches que tivemos. Agradeço em especial Dra. Adriele de Oliveira, Ana Paula Lopes, Angélica Garbuio, Caio Irineu, Carla Mansueli, Fátima de Oliveira, Maria José da Silva, Dra. Mariana Curcio pela ajuda em experimentos e pela troca de conhecimento. Agradeço também ao André Inocencio, Camila da Silva e Juan Marinho, pelas purificações dos anticorpos. À Roselaine Targino, pelos ensinamentos, pela manutenção dos cultivos celulares e execução de transfecções. Ao Dr. Wagner Quintilio pela paciência, pela ajuda e pela execução dos experimentos de ressonância plasmônica de superfície. Agradeço também Cosminiana Ferreira e Rozelita do Nascimento, por realizarem uma parte importante do trabalho no laboratório e sempre com muita dedicação.

À Dra. Patrícia dos Santos Carneiro e à equipe do Infectório do Instituto Butantan, pela execução dos testes de neutralização *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Luiz Travassos e ao Prof. Dr. Enéas de Carvalho, pela oportunidade de discutir um pouco de ciência com vocês.

À Dra. Mickie Takagi, pela disponibilização dos reatores e auxílio nos experimentos.

À Prof. Dra Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, pela colaboração e disponibilização de equipamentos. Aos funcionários do CENTD, Carlos de Ocesano Pereira, Douglas Oliveira e Marcelo Medina de Souza, pela execução de experimentos e pelas discussões científicas.

Ao setor de Vacinas anaeróbicas do Instituto Butantan, pelo fornecimento de toxina para realização de experimentos.

Ao Instituto Butantan e à Universidade de São Paulo pelo espaço e suporte concedidos.

Ao programa de Pós-Graduação do Programa Interunidades em Biotecnologia pela oportunidade de formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários da Secretaria do programa de Pós-Graduação do Programa Interunidades em Biotecnologia pelo auxílio nos processos burocráticos.

A CAPES pelo suporte financeiro para realização deste trabalho e de tantos outros.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2016/08782-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa e pelo apoio à ciência, principalmente.

A todos que contribuíram para a realização este trabalho, de forma direta ou indireta.

A todos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Trabalho realizado no *Laboratório de Biofármacos* do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo nº2016-08782-6), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; cota institucional).

Você é forte por ser imperfeito.

Você é sábio por ter dúvidas.

E quem nunca muda de ideia, nunca mudará nada.

(Do filme O destino de uma nação)

RESUMO

Takata, D.Y. **Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos.** 2021. 118F. Tese (Doutorado em Interunidades em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Tétano é uma doença neuromuscular causada exclusivamente pela ação da exotoxina produzida pela bactéria *Clostridium tetani* (*C. tetani*). Apesar da existência de uma vacina segura e de baixo custo, a incidência e mortalidade do tétano ainda são preocupantes. Por isso, em casos com risco de tétano, a imunização passiva com soro contendo anticorpos antitetânicos equinos (SAT) ou com imunoglobulina humana hiperimmune antitetânica (IGHAT) é utilizada. Em busca de terapia baseada na biotecnologia moderna, nosso grupo obteve anteriormente anticorpos monoclonais (mAbs) humanos antitetânicos derivados de linfócitos B isolados por *single cell sorting*. O objetivo do trabalho atual foi ampliar o painel de mAbs antitetânicos e avaliá-los visando a proposta de candidatos promissores para um futuro uso na terapia. O painel de mAbs foi testado por ELISA, *Western Blot* e inibição à ligação da toxina tetânica (TeNT) ao receptor GT1b. Cinco mAbs foram analisados em *microarrays* para identificar seus epítomos, e em ensaio de neutralização da toxina *in vivo*, individualmente ou associados em dois ou três. A mistura de três mAbs que se ligam a diferentes domínios da TeNT foi neutralizante, demonstrando a importância do sinergismo para a ação neutralizante. A fim de diminuir o uso de animais, alguns testes foram realizados como forma de tentar triar os anticorpos a serem testados *in vivo*. Porém, a execução dos testes foi limitada pela baixa concentração dos mAbs expressos e disponibilidade de TeNT, além de outras limitações dos ensaios. Devido à dificuldade em analisar um painel grande de anticorpos, decidimos nos dedicar à obtenção de uma linhagem permanente de expressão dos mAbs que neutralizaram a toxina tetânica *in vivo*. Foi encomendada a síntese de vetores contendo sequências para a expressão das regiões constantes das cadeias pesada *gama* 1 e leve kappa humanas, permitindo a inserção de qualquer região variável, pesada e leve. Encomendamos também a síntese das sequências das regiões variáveis otimizadas de dois mAbs, para comparação com as sequências obtidas diretamente dos genes amplificados dos linfócitos B isolados por *sorting*. As sequências otimizadas dos dois

mAbs resultaram em maior produtividade em comparação com as sequências originais. Porém, como esperado, a otimização das sequências não alterou o aspecto funcional dos mAbs.

Palavras chave: Anticorpos monoclonais humanos. Toxina tetânica. Tétano. Neutralização da toxina tetânica. Linhagem celular estável.

ABSTRACT

Takata, D.Y. **Expressão, caracterização e avaliação funcional de anticorpos humanos antitetânicos.** 2021. 118113p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Tetanus is a neuromuscular disease caused exclusively by the action of the exotoxin produced by *Clostridium tetani* (*C. tetani*). Despite the existence of a safe and low-cost vaccine, the incidence and mortality rate of tetanus remain worrying. Therefore, in cases at risk of tetanus, passive immunization with equine anti-tetanus serum (ATS) or hyperimmune human tetanus immunoglobulin (TIG) is required. In search of a therapy based on modern biotechnology, our group had previously obtained human anti-tetanus monoclonal antibodies (mAbs) derived from B lymphocytes isolated by single cell sorting. The objective of this work was to expand the panel of anti-tetanus mAbs and evaluate it for the proposal of candidates for future use in therapy. The panel of mAbs was tested by ELISA, Western Blot, and tetanus toxin (TeNT) binding to ganglioside GT1b inhibition assay. Five mAbs were analyzed by TeNT peptide microarrays to identify their epitopes and by *in vivo* neutralization assay, individually or associated in two or three. Only the mixture of three mAbs that bind to different domains of TeNT was neutralizing, demonstrating the importance of synergism for the neutralizing action. In order to reduce animal testing, some alternatives have been tried to screen for candidate antibodies prior to the *in vivo* testing. However, the low concentration of TeNT e also of mAbs and among other assays specifications, limited these tests' execution. Due to the difficulty in analyzing a large panel of antibodies, we decided to focus on obtaining permanent cell lines to produce the mAbs that neutralized the TeNT *in vivo*. We ordered the synthesis of genes coding for the constant regions of human heavy *gamma* 1 and light kappa chains, that, when cloned into the expression vector, could allow the insertion of any heavy or light chain genes. We ordered also the sequences of the variable regions of two mAbs, codon-optimized, for comparison with the sequences amplified directly from sorted B cells. The optimized sequences resulted in higher expression yield, when compared to the original ones, without differences in their functional aspects.

Key words: Human monoclonal antibodies. Tetanus toxin. Tetanus. Tetanus toxin neutralization. Stable cell lines generation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da estrutura da toxina tetânica	24
Figura 2. Representação da mudança conformacional da TeNT.	25
Figura 3. Estrutura do anticorpo.	31
Figura 4. Fluxo experimental para obtenção de mAbs a partir de célula B.	43
Figura 5. Vetores de Expressão das cadeias pesada <i>gama</i> , leves <i>kappa</i> e <i>lambda</i>	47
Figura 6. Fluxo experimental para obtenção de linhagem permanente de expressão dos mAbs.	51
Figura 7. Vetores sintetizados pela GeneArt.	52
Figura 8. Gel de SDS-PAGE (A) e <i>Western Blot</i> (B) da expressão e purificação da Toxina Tetânica	63
Figura 9. Gel SDS-PAGE da expressão da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) com indução quando atingida Abs ₆₀₀ 1,0 (A) e 2,0 (B).	64
Figura 10. Gel SDS-PAGE da purificação da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) por coluna de níquel HisTrap.	65
Figura 11. Gel SDS-PAGE da purificação da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) por troca iônica.	65
Figura 12. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) da toxina tetânica atóxica TeNT(RY).	66
Figura 13. Gel SDS-PAGE da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) submetida à cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC).	66
Figura 14. Eletroforese dos produtos de digestão do vetor pAE-TeNT(RY).	67
Figura 15. Gel SDS PAGE da toxina tetânica comercial.	67
Figura 16. Gel representativo dos fragmentos obtidos a partir da RT-PCR.	68
Figura 17. Gel de agarose representativo dos fragmentos amplificados por PCR com oligonucleotídeos específicos.	69
Figura 18. Gel representativo dos fragmentos amplificados por PCR das colônias. ...	70
Figura 19. Cromatograma demonstrativo da purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade em resina de proteína A.	70
Figura 20. Gel de SDS-PAGE representativo dos anticorpos purificados.	71
Figura 21. Ligação dos anticorpos monoclonais por ELISA.	72
Figura 22. Filme representativo da ligação dos anticorpos à toxina e suas frações por <i>western blot</i>	73

Figura 23. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b pelo mAbs.....	74
Figura 24. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b pelos mAbs na concentração máxima obtida.	75
Figura 25. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b utilizando mistura dos anticorpos testados <i>in vivo</i>	75
Figura 26. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b com soro antitetânico equino (SAT).	76
Figura 27. Taxa de sobrevivência no ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	78
Figura 28. Gráfico da ligação dos mAbs aos peptídeos lineares da TeNT em <i>peptide array</i>	80
Figura 29. Representação da estrutura da TeNT com as regiões de epítomos identificados para cada mAb, após ensaio por <i>epitope array</i>	81
Figura 30. Gráfico da ligação do mAb BUT-TT-143-10 aos peptídeos circulares da TeNT em <i>epitope array</i>	82
Figura 31. Gráfico do teste de ligação dos mAbs antitetânicos e TeNT com captura.	83
Figura 32. Gel de imunodifusão.	85
Figura 33. Esquema da clonagem com vetores sintetizados.	87
Figura 34. Gel representativo dos fragmentos amplificados por PCR das colônias.	88
Figura 35. Gel representativo dos produtos de digestão dos vetores pCHO.	89
Figura 36. Gráficos da viabilidade celular dos cultivos.....	90
Figura 37. Gráfico da dosagem dos mAbs por ressonância plasmônica de superfície (SPR).....	91
Figura 38. Gráfico do título (mg/mL) x IVCC (<i>integral of viable cell concentration</i>). ...	92
Figura 39. Gráfico da produtividade específica.	93
Figura 40. Gel representativo dos anticorpos purificados.	94
Figura 41. Ligação dos anticorpos monoclonais em produção estável à toxina tetânica (TeNT) por ELISA.....	95
Figura 42. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT comercial) ao gangliosídeo GT1b.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema profilático	28
Tabela 2. Condições para expressão da toxina tetânica recombinante	39
Tabela 3. Relação de células obtidas por <i>single cell sorting</i>	44
Tabela 4. Placas de <i>single cell sorting</i> cujas sequências foram amplificadas.	68
Tabela 5. ELISA competitivo	83
Tabela 6. Valores Δ Captura, Δ TeNT e Δ TeNT/ Δ Captura obtidos por Ressonância Plasmônica de Superfície (BIAcore)	84
Tabela 7. K_D (M) calculado de cada mAb pelo ensaio de afinidade no estado estacionário.	96
Tabela 8. K_a , k_d e K_D (M) calculados de cada mAb pelo ensaio de afinidade cinética	97
Tabela 9. Oligonucleotídeos utilizados na <i>nested</i> PCR.....	117
Tabela 10. Oligonucleotídeos utilizados na PCR específica	118

LISTA DE ABREVIATURAS

BCR	<i>B-cell receptor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>C. tetani</i>	<i>Clostridium tetani</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CH	Região constante da cadeia pesada do anticorpo
CL	Região constante da cadeia leve do anticorpo
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HAMA	<i>Human anti-mouse antibodies</i>
HEPES	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Ig	Imunoglobulina
IgH	Cadeia pesada da imunoglobulina
IGHAT	Imunoglobulina humana antitetânica
IPTG	<i>Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside</i>
IVCC	<i>Integral of viable cell concentration</i>
kDa	Kilo Dalton
mAb	Anticorpo monoclonal (<i>monoclonal antibody</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEI	Polietilenimina
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
SAT	Soro antitetânico equino
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein</i>
TeNT	Toxina tetânica
TeNT(BUT)	Toxina tetânica produzida pelo Instituto Butantan
TeNT(RY)	Toxina tetânica atóxica
TMB	Tetrametilbenzidina
TT	Toxide tetânico

VAMP

Vesicle-associated membrane protein

VH

Região variável da cadeia pesada do anticorpo

VL

Região variável da cadeia leve do anticorpo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
<u>1.1 TOXINA TETÂNICA</u>	<u>24</u>
<u>1.2 FISIOPATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA</u>	<u>25</u>
<u>1.3 IMUNIZAÇÃO</u>	<u>26</u>
<u>1.4 PROFILAXIA</u>	<u>27</u>
<u>1.5 LINFÓCITOS B</u>	<u>28</u>
<u>1.6 ANTICORPOS</u>	<u>29</u>
<u>1.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS</u>	<u>31</u>
1.7.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS.....	32
1.7.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS ANTITETÂNICOS	33
2 OBJETIVOS	35
<u>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	<u>35</u>
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
<u>3.1 PREPARO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES UTILIZADAS NAS TRANSFORMAÇÕES</u>	<u>37</u>
<u>3.2 TOXINAS TETÂNICAS UTILIZADAS</u>	<u>37</u>
3.2.1 PROPAGAÇÃO DO VETOR PET28A/TENT R372A/Y375F	38
3.2.2 EXPRESSÃO DA TOXINA TETÂNICA ATÓXICA.....	38
3.2.3 PURIFICAÇÃO DA TOXINA TETÂNICA ATÓXICA	39
3.2.4 TROCA DE VETOR PET28A PARA PAE	40
3.2.5 ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA TENT(RY) RECOMBINANTE POR SDS-PAGE	40
<u>3.3 OBTENÇÃO DOS MABS ANTITETÂNICOS</u>	<u>41</u>
3.3.1 OBTENÇÃO DE MABS A PARTIR DE LINFÓCITOS B.....	41
3.3.1.1 LINFÓCITOS B DE MEMÓRIA OU PLASMABLASTOS	43
3.3.1.2 RT-PCR.....	44
3.3.1.3 SEQUENCIAMENTO	46
3.3.1.4 PCR ESPECÍFICA.....	46
3.3.1.5 VETORES	47
3.3.1.6 DIGESTÃO	47
3.3.1.7 LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO	48
3.3.1.8 PCR DE COLÔNIAS	48

3.3.1.9 ISOLAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES	49
3.3.1.10 TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA	49
3.3.2 OBTENÇÃO DE LINHAGEM PERMANENTE PARA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MABS	50
3.3.2.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES	51
3.3.2.2 DIGESTÃO	52
3.3.2.3 LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO	52
3.3.2.4 PCR DE COLÔNIAS	53
3.3.2.5 ISOLAMENTO DOS VETORES	54
3.3.2.6 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES pCHO COMPLETOS	54
3.3.2.7 DIGESTÃO DO VETOR pCHO PARA TRANSFEÇÃO.....	54
3.3.2.8 TRANSFEÇÃO ESTÁVEL	54
<u>3.3.2.8.1 Seleção das células CHO.....</u>	<u>55</u>
3.3.2.9 EXPRESSÃO DOS MABS	56
3.3.3 PURIFICAÇÃO DOS MABS	56
3.3.4 AVALIAÇÃO DOS MABS POR SDS-PAGE	56
3.3.5 ELISA	57
3.3.6 ELISA COMPETITIVO.....	57
3.3.7 WESTERN BLOT	57
3.3.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1B.....	58
3.3.9 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (<i>SURFACE PLASMON RESONANCE - SPR</i>).....	58
3.3.9.1 DOSAGEM DOS MABS EXPRESSOS	59
3.3.9.2 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO À TeNT	59
3.3.9.3 AFINIDADE NO ESTADO ESTACIONÁRIO	59
3.3.9.4 AFINIDADE CINÉTICA.....	60
3.3.10 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VIVO</i>	60
3.3.11 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS.....	60
3.3.12 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA (<i>TOXIN BINDING INHIBITION ASSAY - TOBI</i>).....	61
3.3.13 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE	62
4 RESULTADOS.....	63
<u>4.1 PRODUÇÃO TOXINA TETÂNICA ATÓXICA</u>	<u>63</u>

<u>4.2 SDS-PAGE DA TOXINA TETÂNICA COMERCIAL</u>	67
<u>4.3 RT-PCR</u>	68
<u>4.4 PCR ESPECÍFICA</u>	69
<u>4.5 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS</u>	69
<u>4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS MABS POR SDS-PAGE</u>	71
<u>4.7 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS MABS POR ELISA</u>	71
<u>4.8 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS MABS À TENT E ÀS SUAS FRAÇÕES POR WESTERN BLOT</u>	73
<u>4.9 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1B</u>	73
<u>4.10 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO <i>IN VIVO</i></u>	76
<u>4.11 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS</u>	79
<u>4.12 ELISA COMPETITIVO</u>	82
<u>4.13 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (<i>SURFACE PLASMON RESONANCE - SPR</i>)</u>	83
<u>4.14 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA (<i>TOXIN BINDING INHIBITION ASSAY - TOBI</i>)</u>	84
<u>4.15 IMUNODIFUSÃO</u>	84
<u>4.16 VETORES PARA OBTENÇÃO DE LINHAGENS PERMANENTES</u>	85
<u>4.17 GERAÇÃO DE LINHAGENS PERMANENTES</u>	89
<u>4.18 EXPRESSÃO DOS MABS EM LINHAGEM PERMANENTE</u>	89
<u>4.19 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS MABS POR ELISA</u>	94
<u>4.20 AFINIDADE NO ESTADO ESTACIONÁRIO</u>	96
<u>4.21 AFINIDADE CINÉTICA</u>	96
<u>4.22 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1B</u>	97
5 DISCUSSÃO	99
6 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	113
ANEXO A – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA TOXINA TETÂNICA	115
ANEXO B – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS	117

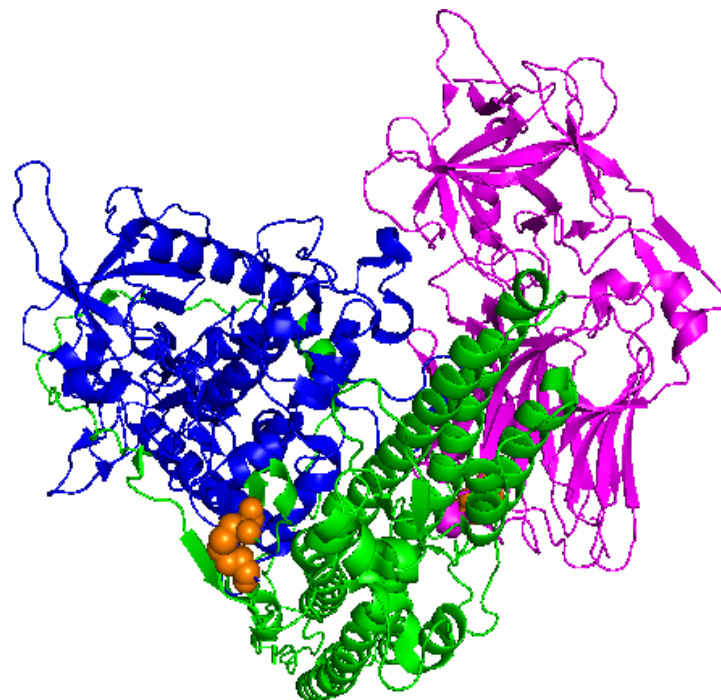
1 INTRODUÇÃO

Tétano é uma doença neuromuscular causada pela exotoxina produzida pela bactéria *Clostridium tetani* (*C. tetani*). *C. tetani* é um bacilo anaeróbio Gram-positivo, formador de esporos e pode ser amplamente encontrado no meio ambiente, principalmente no solo e na flora intestinal de animais (domésticos e silvestres) e humanos (FARRAR *et al.*, 2000; MALLICK; WINSLET, 2004). O esporo não é invasivo e requer uma lesão na pele, normalmente causada por ferimentos com objetos contaminados com os esporos. Os ferimentos, além de permitirem o contato do esporo com o hospedeiro, ao se fecharem, proporcionam um ambiente anóxico, condição obrigatória para a germinação dos esporos e produção da toxina (ERNST *et al.*, 1997; GIBSON *et al.*, 2009). A Toxina tetânica (TeNT) afeta o sistema nervoso, bloqueando o processo de liberação de neurotransmissores inibitórios nas fendas sinápticas, sendo, assim, classificada como uma neurotoxina (ROSSETTO *et al.*, 2013). Como o *C. tetani* pode ser amplamente encontrado no ambiente, a erradicação da doença não é possível e a vacinação é essencial para a prevenção da doença. A vacinação com toxoide tetânico (TT) é segura, de baixo custo e se mostrou eficaz. Porém, as taxas de incidência e mortalidade do tétano ainda são preocupantes. Isso porque o TT é um imunogênico fraco e exige doses de reforço vacinal frequentemente, prática ignorada pela maioria das pessoas. Por isso, a doença continua sendo considerada um problema de saúde pública. No mundo, foram notificados 14.757 casos de tétano em 2019 e estima-se que foi a causa de morte de 72.600 pessoas em um período de 5 anos. Em 2018, 25.000 neonatos (até 28 dias após o nascimento) morreram por tétano no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, a imunização contra tétano faz parte do calendário vacinal nacional, porém em 2019, 221 casos de tétano acidental foram notificados no país e a letalidade foi considerada alta (56%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). A baixa cobertura vacinal e a precariedade em condições de higiene no momento do parto, por exemplo, explicam a incidência da doença maior em países em desenvolvimento. Em países desenvolvidos há casos reportados em idosos, e usuários de drogas injetáveis. Em 2004, foram reportados 25 casos de tétano causados por contaminação no momento do uso drogas injetáveis e 2 deles resultaram em óbito (BEECHING; CROWCROFT, 2005).

1.1 TOXINA TETÂNICA

A toxina tetânica é uma das mais potentes neurotoxinas, associada à uma alta taxa de letalidade quando não há tratamento rápido e adequado. Trata-se de uma exotoxina de aproximadamente 150kDa (Figura 1). É sintetizada como uma cadeia única e, em seguida, clivada por proteases do *C. tetani*, tornando-se um polipeptídeo de duas cadeias - uma pesada (H - *Heavy*) de 100kDa e uma leve (L - *Light*) de 50kDa - unidas por ponte dissulfeto (EISEL *et al.*, 1986). Já foi demonstrado que a manutenção dessa ponte é essencial para a toxicidade da TeNT (SCHIAVO *et al.*, 1990). A cadeia H é subdividida em 2 domínios, C-terminal (HC ou Fragmento C) e N-terminal (HN), responsáveis pelas funções de ligação à superfície celular de neurônios e translocação na membrana neural, respectivamente. A cadeia L contém o motivo de ligação de zinco e é responsável pela ação proteolítica da toxina (SCHIAVO; BENFENATI; *et al.*, 1992; SCHIAVO; POULAIN; *et al.*, 1992; TURTON; CHADDOCK; ACHARYA, 2002).

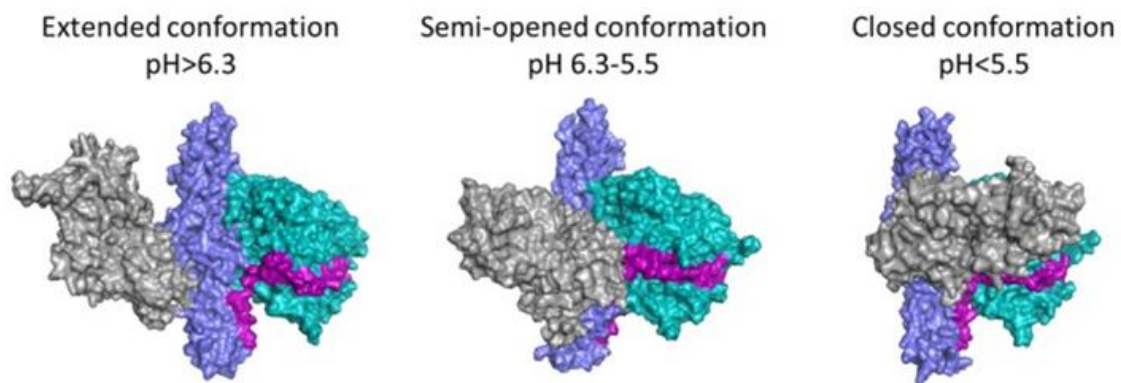
Figura 1. Representação da estrutura da toxina tetânica



Estrutura da toxina tetânica. Em azul, está a cadeia leve (região catalítica). A cadeia pesada está marcada em verde no domínio de translocação e em rosa no domínio de ligação, também chamado de Fragmento C. Em laranja, estão os aminoácidos que fazem a ponte dissulfeto, responsável por manter unidas as cadeias pesada e leve da toxina. Essa representação foi gerada a partir da estrutura cristalográfica da TeNT disponível em banco de dados (PDB: 5n0b).

Sabe-se que a conformação da TeNT é dependente de pH e, dessa forma, a toxina muda sua conformação ao longo do seu deslocamento pelos neurônios até o sistema nervoso central. Dentro das vesículas dos neurônios periféricos, o ambiente é ácido e a TeNT adquire uma conformação fechada; já no sistema nervoso central, o citosol é neutro e a TeNT apresenta estrutura aberta (Figura 2) (MASUYER; CONRAD; STENMARK, 2017).

Figura 2. Representação da mudança conformacional da TeNT.



Representação da conformação da estrutura da toxina tetânica no pH > 6,3; 6,3-5,5 e < 5,5. Fonte: MASUYER; CONRAD e STENMARK (2017)

1.2 FISIOPATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA

O Fragmento C da TeNT é responsável pela ligação da toxina à membrana dos neurônios periféricos. A ligação se dá através da interação de regiões do Fragmento C, denominadas *lactose-binding site* (“W” pocket) e *sialic acid-binding site* (“R” pocket), com os receptores presentes na membrana (EMSLEY *et al.*, 2000). Através da interação do Fragmento C da TeNT com gangliosídeos e com proteínas, como as proteínas ancoradas por GPI e nidogênio, presentes na superfície da membrana dos neurônios periféricos, a toxina é internalizada por endocitose (RUMMEL *et al.*, 2003; BERCSENYI *et al.*, 2014). A TeNT é, então, transportada por sistema axonal retrógrado para o sistema nervoso central (SCHWAB; SUDA; THOENEN, 1979; LALLI *et al.*, 2003; DEINHARDT; SCHIAVO, 2005; BLUM *et al.*, 2012). O pH das vesículas é ácido e a TeNT adquire sua conformação mais fechada (Figura 2), mantendo a ponte dissulfeto intacta, condição fundamental para que TeNT seja translocada ao citosol das células pré-sinápticas (PIRAZZINI *et al.*, 2011). Ao entrar no citosol, onde o pH é

neutro, a TeNT adquire conformação aberta, a ponte dissulfeto é reduzida e a cadeia L é liberada (ZUVERINK *et al.*, 2015). Essa cadeia é uma metaloprotease dependente de zinco que cliva a sinaptobrevina II ou VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), uma proteína presente nas vesículas (SCHIAVO; BENFENATI; *et al.*, 1992; HUMEAU *et al.*, 2000; LALLI *et al.*, 2003). Em condições fisiológicas, a VAMP se junta às proteínas de membrana plasmática SNAP-25 e a sintaxina, presentes nas membranas dos neurônios, formando um complexo. A formação desse complexo leva a um influxo de cálcio e formação de um poro e, posteriormente, a fusão de membranas das vesículas sinápticas às membranas pré-sinápticas (VARDJAN; JORGACEVSKI; ZOREC, 2013). Com a fusão das membranas, os neurotransmissores inibitórios GABA (ácido- γ -aminobutírico) e glicina presentes nas vesículas são liberados na fenda sináptica (CURTIS *et al.*, 1973; SCHIAVO; MATTEOLI; MONTECUCCO, 2000). Na presença da TeNT, há clivagem da VAMP, o que impede a liberação dos neurotransmissores inibitórios. Dessa forma, não há inibição e os músculos ficam em um estado hiperexcitado, levando aos efeitos como rigidez e espasmos. No tétano generalizado, os músculos do corpo todo são afetados, podendo causar falência respiratória, que é a causa mais comum de morte por tétano (FARRAR *et al.*, 2000; COOK; PROTHEROE; HANDEL, 2001; HASSEL, 2013).

1.3 IMUNIZAÇÃO

Os sinais clínicos do tétano são causados exclusivamente pela ação da TeNT e, por isso, é possível prevenir a doença com uma imunização ativa dos indivíduos, através da vacinação com toxoide tetânico (TT), resultante do tratamento da TeNT com formaldeído (GALAZKA; GASSE, 1995). Vacinas compostas por toxoides não são imunógenos fortes e, portanto, requerem um adjuvante (como hidróxido de alumínio) para aumentar sua imunogenicidade (LINDLEY-JONES; LEWIS; SOUTHGATE, 2004; BAXTER, 2007). Além disso, a vacinação exige doses de reforço para garantir uma contínua imunização da população. Dessa forma, a adesão das pessoas à vacinação é um dos fatores importantes para a eficiência da imunização. Outro fator é a da idade dos indivíduos vacinados. O título de anticorpos antitetânicos é maior em pessoas até 30 anos de idade e é mínimo em pessoas com mais de 50 anos (GALAZKA; GASSE, 1995). No Brasil, são recomendadas três doses iniciais

antes do primeiro ano de vida, um reforço aos 15 meses e outro aos 4 anos de idade, e, após, doses de reforço a cada 10 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

1.4 PROFILAXIA

O microrganismo *C. tetani* está amplamente presente no meio ambiente e apesar de existir um programa de vacinação, a taxa de incidência e de mortalidade são preocupantes. Como não há exames laboratoriais, os sinais clínicos devem ser considerados no diagnóstico. Em casos de acidentes com risco de tétano, uma terapia profilática é preconizada uma vez que a ligação da toxina aos neurônios é irreversível, ou seja, após a internalização da toxina no sistema nervoso, não há como neutralizá-la (ATARO; MUSHATT; AHSAN, 2011; RODRIGO; FERNANDO; RAJAPAKSE, 2014). O esquema profilático (Tabela 1) depende de fatores como o histórico de vacinação do paciente e o grau do risco de infecção pelo bacilo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Quando há alto risco e a história de vacinação contra tétano é incerta ou incompleta, utiliza-se, além da vacina, antibióticos, como metronidazol, para eliminação do microrganismo *C. tetani*. Além disso, recomenda-se o uso de soro contendo anticorpos antitetânicos, obtido pelo processamento do plasma de cavalos imunizados (SAT - soro antitetânico equino), ou imunoglobulina humana hiperimune antitetânica (IGHAT), obtida de doadores humanos com alto título de anticorpos antitetânicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Ambos são utilizados como recurso para a rápida neutralização da toxina livre. Porém ambas as terapias têm seus problemas, o SAT por ser de origem heteróloga, apresenta imunogenicidade alta. E por isso, normalmente a IGHAT é utilizada em casos de hipersensibilidade ao SAT (EDSALL, 1959; RODRIGO; FERNANDO; RAJAPAKSE, 2014). Porém, a IGHAT, por ser originada de doadores humanos, oferece risco de transmissão de doenças. Além disso, os dois soros não proporcionam homogeneidade nos lotes produzidos (STIEHM, 2013).

Tabela 1. Esquema profilático

História de vacinação prévia contra tétano	Ferimentos com risco mínimo de tétano ^a			Ferimentos com alto risco de tétano ^b		
	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas	Vacina	SAT/IGHAT	Outras condutas
Incerta ou menos de 3 doses	Sim ^c	Não	Limpeza e desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e desbridar o foco de infecção	Sim ^c	Sim	Desinfecção, lavar com soro fisiológico e substâncias oxidantes ou antissépticas e remover corpos estranhos e tecidos desvitalizados Desbridamento do ferimento e lavagem 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 ^d	
3 ou mais doses, sendo a última dose há 10 ou mais anos	Sim	Não		Sim (1 reforço)	Não ^d	
3 ou mais doses, sendo a última dose há 10 ou mais anos em situações especiais	Sim	Não		Sim (1 reforço)	Sim ^e	

^a Ferimentos superficiais, limpos, sem corpos estranhos ou tecidos desvitalizados.

^b 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.

^c Vacinar e aprazar as próximas doses, para complementar o esquema básico. Essa 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 (soro antitetânico) ou IGHAT (imunoglobulina humana antitetânica). Quando indicado o uso de vacina e SAT ou IGHAT, concomitantemente, devem ser aplicados em locais diferentes.

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

^e 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.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019)

Em vista das limitações na utilização dos soros, a biotecnologia pode prover alternativas terapêuticas mais seguras e precisas para serem utilizadas no caso de acidentes. Nos casos como o tétano, que requerem uma imunização passiva, a tendência atual é buscar tecnologias que possibilitem a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) humanos, que oferecem risco de imunogenicidade baixa ou nula e sua produção permite a padronização entre os lotes, além da pureza, alta especificidade e caracterização da afinidade de ligação ao antígeno.

1.5 LINFÓCITOS B

Linfócitos B são células de origem linfoide que, juntamente com os linfócitos T, são responsáveis pela imunidade adaptativa, gerando uma resposta específica ao antígeno e dando origem à memória imunológica (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos.

A maturação do linfócito B ocorre principalmente na medula óssea. O estágio inicial do linfócito B é a célula pró-B que já expressa moléculas de superfícies características do linfócito B, como CD19 e CD10, mas não produzem Imunoglobulina

(Ig). Ocorre uma recombinação gênica do *locus* gênico da cadeia pesada (IgH), aproximando um gene D a um gene J e posteriormente um gene V ao DJ, que origina uma proteína Ig μ , passando a ser chamada célula pré-B (HERZOG; RETH; JUMAA, 2009). Nessas células, a cadeia pesada μ se associa às proteínas chamadas de substitutos de cadeia leve e às proteínas de transdução de sinal Ig α e Ig β e formam o pré-receptor de antígenos, chamado receptor da célula pré-B (pré-BCR). Esse receptor inibe o rearranjo do locus gênico da cadeia pesada no outro cromossomo (exclusão alélica), evitando a produção de mais de um tipo de receptor por célula e garantindo a especificidade clonal. Caso o rearranjo não seja produtivo, o rearranjo pode ocorrer no alelo do outro cromossomo.

No próximo estágio, ocorre rearranjo dos genes da cadeia leve, aproximando um segmento de gene V a um segmento de gene J, produzindo uma cadeia κ que irá se associar à cadeia pesada para formar uma IgM completa. A célula passa a ser chamada de célula B imatura. Essas IgM são expressas na superfície celular associadas à Ig α e Ig β , formando um receptor específico para antígenos (MELCHERS, 2015). As células são testadas no reconhecimento de antígenos próprios, o qual pode resultar em edição do receptor, rearranjo de nova cadeia leve κ ou cadeia leve λ , ou morte celular, mecanismo chamado de seleção negativa.

As células B imaturas deixam a medula óssea, completando seu amadurecimento no baço. Ocorre a co-expressão de IgM e IgD de mesma especificidade ao antígeno. Essas células adquirem competência funcional e são chamadas de células B maduras e circulam entre os órgãos periféricos.

A ativação das células B maduras, através da ligação a antígenos exibidos por células apresentadoras de antígenos, leva à diferenciação dessas células em plasmócitos, produtores de anticorpos, e de linfócitos B de memória.

1.6 ANTICORPOS

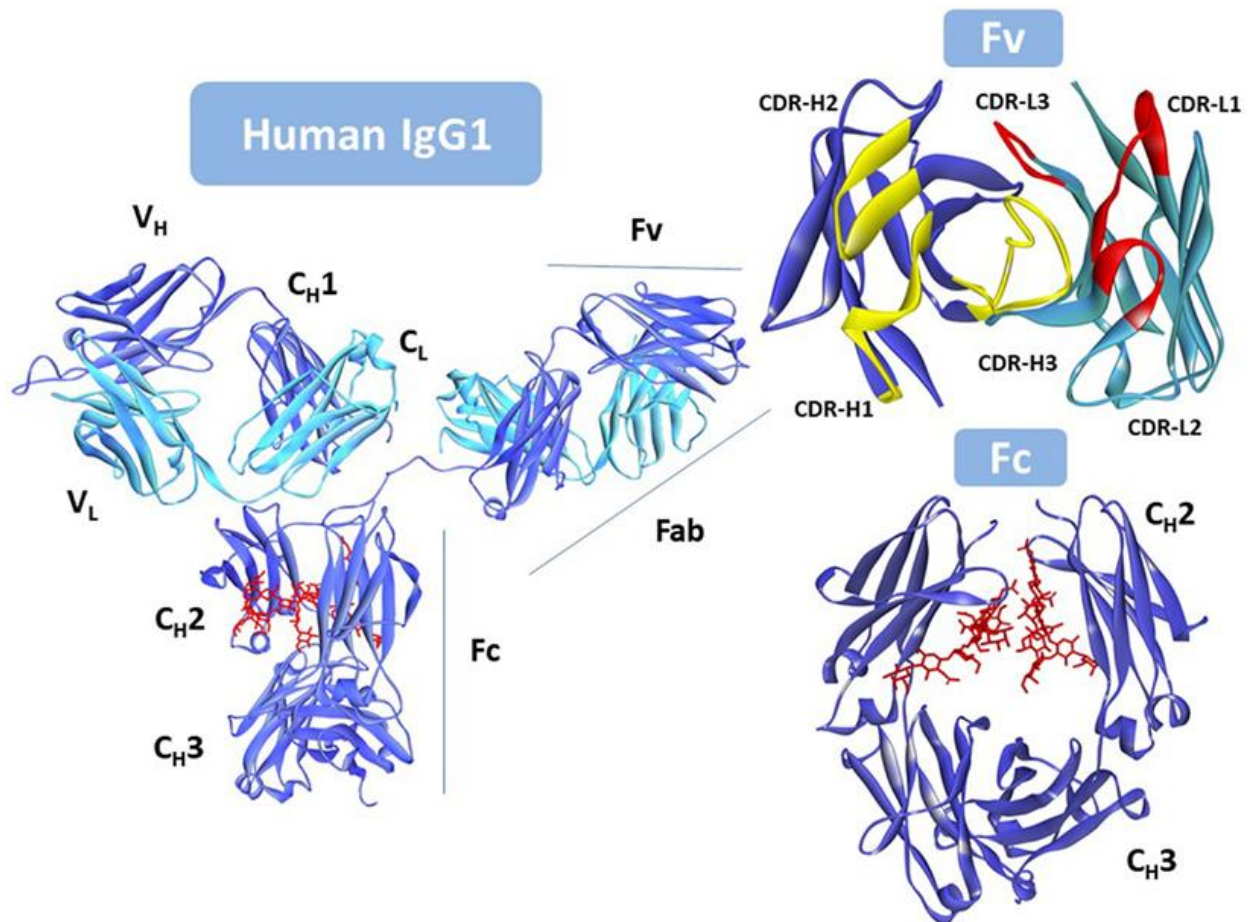
Os anticorpos são moléculas circulantes no sangue periférico, secretadas por linfócitos B estimulados, e que contém região de reconhecimento ao antígeno igual à do receptor de membrana BCR (B-cell receptor) (CALAME, 2001). São capazes de se ligar a antígenos com alta afinidade e especificidade, desempenhando papel importante como principais mediadores da imunidade humoral (BURTON, 1990).

Os anticorpos participam da neutralização de patógenos e do recrutamento de moléculas ou células citotóxicas, por opsonização, fixação do complemento ou ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), entre outras funções (DAVIES; METZGER, 1983; BURTON, 1990; KANEKO; NIWA, 2011).

Estruturalmente, os anticorpos são formados por 4 cadeias polipeptídicas: 2 cadeias pesadas idênticas e 2 leves também idênticas (Figura 3). Cada cadeia pesada é ligada a uma leve por uma ponte dissulfeto (PORTER, 1973). As cadeias são compostas por domínios denominados variáveis e constantes. As cadeias leves possuem um domínio variável (V_L) e um constante (C_L). Já as cadeias pesadas, possuem um domínio variável (V_H) e 3 ou 4 constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e/ou C_{H4}) (AMZEL; POLJAK, 1979; SCHROEDER; CAVACINI, 2010). A região constante da cadeia leve pode ser tipo kappa ou lambda. E a região constante da pesada pode ser α , μ , γ , δ e ϵ , determinando o isotipo da cadeia pesada. A classificação do isotipo da cadeia pesada, por sua vez, determina a classe do anticorpo, podendo ser IgA, IgM, IgG, IgD ou IgE (AMZEL; POLJAK, 1979).

Os anticorpos são divididos em duas regiões, Fab (*Fragment antigen-binding*) e Fc (*Fragment crystallizable*), responsáveis pela ligação ao antígeno e pela função efetora do anticorpo, respectivamente. Cada região variável (V_H e V_L) possui 3 regiões hipervariáveis, as quais, arranjadas em sua estrutura tridimensional, formam uma superfície de ligação ao antígeno, e assim, são denominadas regiões determinantes de complementariedade (*Complementarity Determining Regions - CDRs*). A diferença nessas regiões determina as diferenças de especificidade de cada molécula de anticorpo (WU; KABAT, 1970; KABAT; WU, 1971; KEHOE; CAPRA, 1971; PADLAN, 1994).

Figura 3. Estrutura do anticorpo.



Estrutura dos anticorpos. Em azul escuro, está representada a cadeia pesada (H) do anticorpo e em azul claro, a cadeia leve (L). As cadeias são constituídas por regiões variáveis (V_H ou V_L) e regiões constantes (C_H ou C_L). O anticorpo é dividido em duas partes: uma região de ligação antígeno Fab (*Fragment antigen binding*) e uma região efetora Fc (*Fragment crystallizable*). No destaque da região Fv (*Fragment variable*), as CDRs (*Complementarity Determining Regions*) da cadeia pesada estão em amarelo e as da cadeia leve em vermelho. Fonte: ALMAGRO *et al.* (2017)

1.7 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos monoclonais são originados por um único plasmócito e sua produção foi possível devido à técnica de produção de hibridomas, que consiste na fusão de células B com células de mieloma murino, em um processo de imortalização (KÖHLER; MILSTEIN, 1976). Esse processo garante especificidade e afinidade definidas. Por isso, os anticorpos monoclonais têm grande importância nas áreas de tratamento e diagnóstico de doenças (HANSEL *et al.*, 2010; WEINER, 2015).

Os hibridomas produzem anticorpos monoclonais de natureza murina, portanto heterólogos para os humanos, e podem levar ao desenvolvimento de anticorpos

humanos antimurinos (HAMA - *human anti-mouse antibodies*) (LEVY; MILLER, 1983; TJANDRA; RAMADI; MCKENZIE, 1990).

A fim de diminuir a imunogenicidade, estabeleceu-se a produção de anticorpos quiméricos, que possuem regiões variáveis murinas e constantes humanas (MORRISON *et al.*, 1984). Posteriormente, a evolução da tecnologia permitiu a produção de anticorpos humanizados através da inserção de CDRs de um anticorpo murino nas regiões variáveis de um anticorpo humano (JONES *et al.*, 1986; STUDNICKA *et al.*, 1994). Porém, essa técnica pode causar perda de afinidade ao antígeno, por gerar mudanças estruturais no arcabouço das regiões variáveis (RIECHMANN *et al.*, 1988).

1.7.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS

Visando uma maior segurança no uso terapêutico dos mAbs, iniciou-se uma busca por tecnologias que permitam a obtenção de mAb humanos. A técnica de *phage display* foi a primeira descoberta. Ela consiste na incorporação de genes das regiões variáveis dos anticorpos em bacteriófagos filamentosos, constituindo uma biblioteca. A partir da seleção, baseada na ligação com antígeno de interesse, esses genes são clonados em vetores para a expressão do anticorpo. A técnica permite a construção de biblioteca *naïve*, a partir pacientes imunizados ou pela construção sintética de sequências aleatórias de CDRs. Bibliotecas *naïve* e imunizadas, por serem derivadas de células B humanas, oferecem menor risco de imunogenicidade. As bibliotecas de doadores imunizados possuem a vantagem de obtenção de anticorpos que já passaram por maturação de afinidade e por isso são mais específicos, mas a sua desvantagem é a necessidade de montar uma biblioteca para cada fim terapêutico (LU *et al.*, 2020).

Uma segunda técnica é a utilização de camundongos transgênicos. Esses animais têm seus genes de IgH e IgL substituídos, por recombinação homóloga, por genes de IgH e IgL humanos. Dessa forma, quando imunizados, os camundongos são capazes de produzir anticorpos humanos. O custo de manutenção de animais transgênicos é muito alto e a produtividade é baixa. Ademais, não colabora com a tendência de diminuição do uso de animais (CHESTER; HAWKINS, 1995; REICHERT *et al.*, 2005).

Outra metodologia, desenvolvida por um grupo de pesquisa da Universidade Rockefeller (Nova York, EUA), permite a obtenção de anticorpos monoclonais humanos a partir de linfócitos B (TILLER *et al.*, 2008). A técnica consiste no isolamento de células B específicas por *single cell sorting*. Após a lise da célula, o cDNA é obtido e os genes dos domínios variáveis das imunoglobulinas são amplificados por PCR (*Polymerase chain reaction*). Esses fragmentos são clonados em vetores de expressão que contém o gene da região constante humana. Os vetores clonados são transfectados em célula animal para a expressão dos anticorpos monoclonais recombinantes. Essa técnica vem sendo utilizadas para produção de anticorpos anti-HIV (SCHEID *et al.*, 2009; MOUQUET *et al.*, 2010; SCHEID *et al.*, 2011) e anti-ZKV (ROBBIANI *et al.*, 2017), entre outros. Por serem obtidos a partir de células B humanas selecionadas, os mAbs são humanos e já passaram pelo processo de tolerância, o que diminui a imunogenicidade, tornando-os mais seguros. Além disso, por serem naturalmente gerados em resposta a um antígeno, já passaram pelo processo de maturação de afinidade e especificidade de ligação ao antígeno.

1.7.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS ANTITETÂNICOS

Visando uma maior segurança e eficácia no tratamento profilático em casos de acidentes com risco de infecção pelo agente *C. tetani*, a possibilidade de utilização de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos vem ganhando destaque. Nosso grupo obteve anticorpos monoclonais humanos antitetânicos, através da tecnologia de clonagem e expressão de genes de imunoglobulinas a partir de célula B humana descrita acima. Os anticorpos foram obtidos a partir de plasmablastos ou células B de memória isolados do sangue periférico de doadores voluntários adultos, que possuíam alto título de anticorpos antitetânicos ou que tomaram o reforço da vacina. Para a obtenção dessas células foi utilizada a TeNT ao invés do TT de forma a garantir a seleção de anticorpos que se liguem à TeNT natural. Já foi demonstrado que alguns dos mAbs produzidos pelas células de hibridoma obtidas após a imunização com o toxóide podem não se ligar à TeNT, apenas ao TT (SHEPPARD; CUSSELL; HUGHES, 1984; VOLK *et al.*, 1984). Além disso, a utilização de TeNT possibilita a obtenção de um repertório mais amplo de mAbs, que se ligam a qualquer região da toxina, não alterada pelo formaldeído utilizado para detoxificar a TeNT. Parte dos anticorpos gerados pelo grupo foi capaz de reconhecer tanto a TeNT quanto o TT e a

combinação oligoclonal de três anticorpos foi capaz de neutralizar a TeNT em estudos *in vivo* (ALIPRANDINI *et al.*, 2019). Esses resultados são promissores para o desenvolvimento da produção de anticorpos humanos antitetânicos para possível uso na clínica. Porém, restaram muitas células B isoladas com potencialidades variadas de ligação e afinidade pela TeNT, além do que existia a necessidade de se avaliar mais profundamente a capacidade neutralizante de anticorpos já avaliados e de novos que foram expressos neste trabalho.

Até o momento, há apenas outras duas publicações com anticorpos monoclonais humanos antitetânicos. Um grupo utilizou a mesma tecnologia utilizada nesse trabalho e obteve anticorpos monoclonais e seus fragmentos Fabs neutralizantes (ANDREANO *et al.*, 2021). A segunda obteve anticorpos monoclonais através do isolamento de PBMC e imortalização dos linfócitos B (MINAMITANI *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

- Avaliação da variedade de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos a partir de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos, do ponto de vista de potencial terapêutico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter variedade de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos a partir de linfócitos B produtores de anticorpos antitetânicos;

- Avaliar a especificidade e a afinidade da ligação dos anticorpos monoclonais humanos antitetânicos à toxina tetânica e/ou suas frações.

- Avaliar a inibição in vitro da ligação da toxina tetânica ao gangliosídeo GT1b pelos anticorpos monoclonais humanos antitetânicos.

- Avaliar a farmacocinética dos anticorpos monoclonais humanos antitetânicos;

- Avaliar a neutralização in vivo da toxina pelos anticorpos monoclonais humanos antitetânicos.

- Avaliar os anticorpos do ponto de vista físico-químico, visando futuro uso em ensaio clínico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos utilizados nesse trabalho estão detalhados nos itens a seguir.

3.1 PREPARO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES UTILIZADAS NAS TRANSFORMAÇÕES

Nas etapas de transformação (Itens 3.2.1, 3.3.1.7 e 3.3.2.3) foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* quimiocompetentes DH5 α ou TOP10 (Invitrogen, EUA). O preparo das bactérias foi realizado pelo plaqueamento de uma alíquota de bactéria em meio LB/Ágar (Tryptona 10g/L, Extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, Ágar 1,5%) e incubação a 37°C por 16-18 horas. Uma colônia foi inoculada em 10mL de meio LB e a cultura foi mantida a 37°C, 200rpm por 16-18 horas. O volume de 0,4mL dessa suspensão foi inoculado em 200mL de meio LB, com 40mM de Glicose e 10mM de MgCl₂ e mantido a 37°, 200rpm até Abs₆₀₀ atingir 0,8-0,9. A cultura foi, então, subdividida e mantida em gelo por 20 minutos. Após, foi centrifugada a 2500g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 50mL de MgCl₂ 0,1M estéril e gelado e incubadas em gelo por 20 minutos. Repetiu-se o processo de centrifugação e o sedimento foi ressuspenso em 25mL de CaCl₂ 0,1M estéril e gelado e mantido em gelo por 20 minutos. A suspensão foi novamente centrifugada e o sedimento foi ressuspenso em solução com 2,4mL de CaCl₂ 0,1M estéril e gelado e 0,6mL de Glicerol. A suspensão foi alíquotada em microtubos em banho de gelo/etanol e armazenada a -80°C até sua utilização. A eficiência de transformação foi determinada usando um plasmídeo controle.

3.2 TOXINAS TETÂNICAS UTILIZADAS

Foram utilizadas TeNTs de 3 origens diferentes. A primeira, denominada TeNT(BUT) foi gentilmente cedida pelo Setor de Vacinas Anaeróbias do Instituto Butantan e é resultante do cultivo do microrganismo *Clostridium tetani*. A TeNT(RY) é uma toxina recombinante expressa no laboratório a partir do vetor pET28a/TeNT R372A/Y375F, gentilmente cedido pelo Dr Stenmark (*Stockholm University*). A proteína expressa – TeNT(RY) - apresenta uma His6 na porção N terminal e é atóxica

devido a duas mutações pontuais (R372A e Y375F) (ROSSETTO *et al.*, 2001; BLUM *et al.*, 2014). A terceira TeNT, denominada TeNT comercial foi comprada da empresa List Biologicals Laboratories, EUA, e também é produzida através do cultivo bacteriano.

3.2.1 PROPAGAÇÃO DO VETOR PET28A/TENT R372A/Y375F

O vetor pET28a/TeNT R372A/Y375F codifica para expressão da Toxina Tetânica recombinante atóxica. A sequência do vetor foi confirmada por sequenciamento de DNA. Foram adicionados 2ng de vetor (2ng/μL) a 10μL da suspensão de bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes e a mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, 42°C por 45 segundos e novamente em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 100μL de meio SOC (Tryptona 20g/L, Extrato de levedura 5g/L, NaCl 500mg/L, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM e Glicose 20mM) à suspensão e incubou-se a 37°C, com agitação de 180rpm por 1 hora. Após esse período, a suspensão foi inoculada em uma placa de LB/Ágar com canamicina 50μg/mL e incubada a 37°C por 16-18 horas. A colônia foi inoculada em 4mL de meio TB (Tryptona 12g/L, Extrato de levedura 24g/L, Glicerol 4mL/L, KH₂PO₄ 17mM, KHPO₄ 72mM) com canamicina 50μg/mL e incubada a 37°C, 200rpm por 16-18 horas. O vetor recombinante foi isolado utilizando o kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification (Promega, EUA), segundo recomendação do fabricante. A concentração foi determinada através da leitura da absorbância a 260/280nm por espectrofotômetro.

3.2.2 EXPRESSÃO DA TOXINA TETÂNICA ATÓXICA

Uma suspensão de bactérias *E. coli* foi transformada com o vetor e plaqueada em placa LB/Ágar com canamicina 50μg/mL. A placa foi incubada a 37°C por 16-18 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em meio TB com canamicina. Esse pré-inóculo foi mantido a 37°C, 200rpm pelos tempos especificados na Tabela 2. Um volume de pré-inóculo foi inoculado em um reator com 1000 mL de meio TB com canamicina 50μg/mL para Abs₆₀₀ 0,1 e mantido a 37°C até Abs₆₀₀ desejada. Foi adicionado IPTG 1mM e a cultura nas diversas condições detalhadas na Tabela 2 para a expressão da TeNT. O sedimento do cultivo foi obtido, ressuspendido em tampão

HEPES 50mM, NaCl 200mM, Imidazol 40mM e lisado por sonicação. Após a centrifugação, o sobrenadante da lise foi purificado.

Tabela 2. Condições para expressão da toxina tetânica recombinante

Bactéria	Pré inóculo (h)	Abs ₆₀₀	Rotação (rpm)	Temperatura Expressão (°C)	Condição
BL21 pLysS	16 – 18	0,6	200	16	Erlenmeyer
BL21 pLysS	16 – 18	0,6	200	37	Erlenmeyer
BL21 DE3	16 – 18	0,6	200	16	Erlenmeyer
BL21 DE3	16 – 18	0,6	200	37	Erlenmeyer
BL21 DE3	16 – 18	0,8	200	16	Erlenmeyer
BL21 DE3	16 – 18	0,8	400	16	Erlenmeyer
BL21 DE3	6	0,6	200	16	Erlenmeyer
BL21 DE3	6	0,6	200	37	Erlenmeyer
BL21 DE3	16 – 18	0,8	700	16	Reator
BL21 DE3	16 – 18	1,0	700	16	Reator
BL21 DE3	16 – 18	2,0	700	16	Reator

3.2.3 PURIFICAÇÃO DA TOXINA TETÂNICA ATÓXICA

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade com coluna HisTrap (Cytiva, EUA). O sobrenadante do lisado foi aplicado na coluna em tampão HEPES 50mM, NaCl 200mM e Imidazol 40mM. A eluição da TeNT foi realizada com tampão HEPES 50mM, NaCl 200mM e Imidazol 500mM. A análise da purificação foi realizada por SDS-PAGE. A fração contendo a toxina expressa foi submetida à coluna de troca iônica Q-sepharose. A amostra foi aplicada em tampão Fosfato de Sódio 20mM pH7,5 com fluxo de 1,0mL/min. Os tampões utilizados para eluições foram tampão Fosfato de Sódio 20mM NaCl 200mM pH7,5 (eluição 1) e tampão Fosfato de Sódio 20mM NaCl 400mM pH7,5 (eluição 2). A regeneração foi realizada com tampão Fosfato de Sódio 20mM NaCl 1M pH7,5. Por último, a amostra contendo a toxina expressa foi analisada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC) em coluna TSK gel G3000 SWxL (Tosoh Bioscience, Alemanha).

3.2.4 TROCA DE VETOR pET28A PARA pAE

Foi realizada digestão dos vetores pET28a/TeNT R372A/Y375F e pAE (RAMOS *et al.*, 2004) com a finalidade de inserir a região codificadora da toxina atóxica TeNT(RY) no vetor pAE. A digestão foi realizada com 20µg do vetor dos vetores, 15µL do tampão CutSmart (NEB, EUA), 100U de cada enzima (NdeI e XhoI) e água ultrapura estéril q.s.p. 150µL, incubando a 37°C por 2 horas e a 65°C por 20 minutos. Os produtos da digestão foram aplicados em gel de agarose 0,8% e submetidos à eletroforese a 50V. As bandas correspondentes aos vetores digeridos foram purificadas por kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo recomendações do fabricante. Foi realizada a ligação do fragmento que codifica a TeNT(RY) aos vetores de expressão linearizados pAE. Para a ligação, foram adicionados a 90ng do fragmento, 20ng do vetor linearizado, 8µL do tampão da T4 DNA ligase (Invitrogen) e 1µL da T4 DNA ligase (Invitrogen), incubando a 23°C por 2 horas.

O vetor foi transformado em bactérias quimiocompetentes TOP-10 por choque térmico. Para isso, foram utilizados 4,5µL do produto de ligação a 10µL da suspensão de bactérias. O microtubo foi mantido em gelo por 30 minutos e, posteriormente, foi incubado a 42°C por 45 segundos e mantido novamente em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 100µL de meio SOC (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 500mg/L, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM e glucose 20mM) ao conteúdo da transformação, o qual foi incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação de 180rpm. Em seguida, a suspensão foi plaqueada em placa de LB ágar com ampicilina 100µg/mL e as placas foram mantidas a 37°C por 16-18 horas.

3.2.5 ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA TeNT(RY) RECOMBINANTE POR SDS-PAGE

A toxina recombinante TeNT(RY) foi submetida à eletroforese SDS apenas para avaliação de sua expressão. As amostras das etapas de expressão e purificação da TeNT(RY) foram aplicadas sem diluição em tampão de amostra com ou sem agente redutor β-mercaptoetanol.

A TeNT comercial (List Biologicals Laboratories, INC) foi submetida à eletroforese para verificar a integridade e pureza da toxina e de duas frações (cadeia

leve e pesada). Foi aplicado 1µg de toxina por poço, diluído em tampão de amostras com ou sem agente redutor. Dessa mesma maneira, foram realizadas as eletroforeses dessa toxina para os ensaios de *western blot*.

Os géis de poliacrilamida utilizados foram de 10%. As amostras com agente redutor foram previamente incubadas a 100°C por 5 minutos para redução. Foram utilizados os marcadores de alto peso molecular HMW-SDS Marker (Cytiva) e de baixo peso molecular LMW-SDS Marker (Cytiva). Em géis corados por nitrato de prata, HMW foi diluído 1:30 e LMW foi o diluído 1:20. Em géis corados por azul de *coomassie* 0,2%, HMW foi aplicado puro e LMW foi o diluído 1:10. A Eletroforese foi realizada a 80V por 20 minutos e, após, a 120V.

3.3 OBTENÇÃO DOS MABS ANTITETÂNICOS

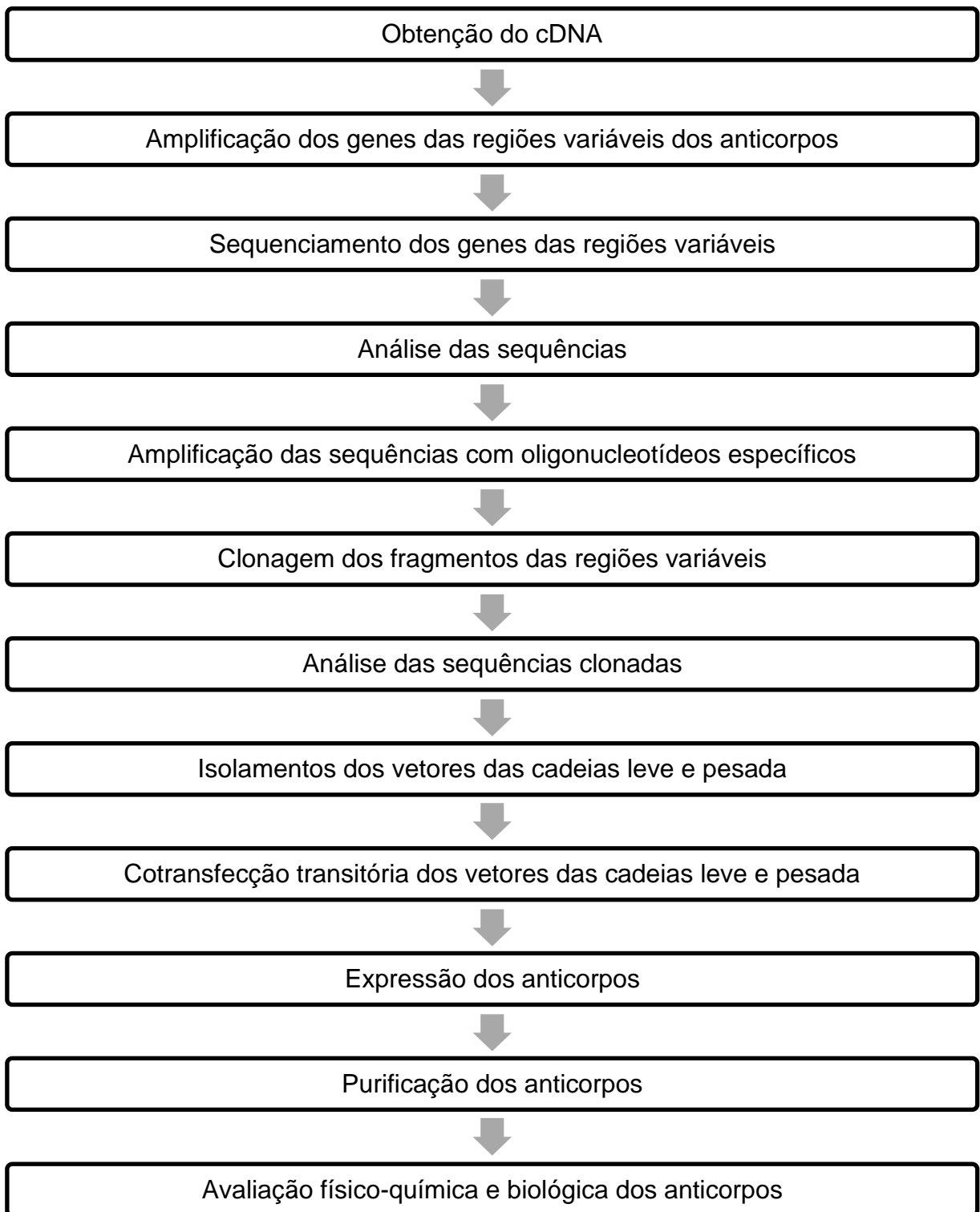
Os mAbs antitetânicos foram obtidos desde a identificação das sequencias gênicas presentes nas células B humanas até a geração de linhagens celulares produzindo os anticorpos por transfecção estável. As diversas etapas permitiram a seleção de genes das regiões variáveis e a produção dos respectivos anticorpos completos para a sua caracterização.

3.3.1 OBTENÇÃO DE mABS A PARTIR DE LINFÓCITOS B

A figura 4 demonstra o fluxo experimental para a obtenção de mAbs antitetânicos a partir de linfócitos B previamente isolados. Resumidamente, foi obtido o cDNA das células B de interesse que haviam sido isoladas (uma célula por poço) anteriormente. A partir de *nested* PCR, os genes das regiões variáveis das cadeias pesada e leves (κ e λ) dos anticorpos foram amplificados. Os genes amplificados foram sequenciados e analisados para determinação de grupos clonais (com mesma classificação V(D)J das cadeias e mesma sequência de aminoácidos na região CDR3). As sequências consideradas clonalmente relacionadas foram novamente amplificadas com a utilização de oligonucleotídeos específicos. Esses oligonucleotídeos foram escolhidos de acordo com a classificação V(D)J das cadeias e inseriam sítios de restrição nas sequências para serem clonadas em vetores que já continham os genes das regiões constantes das respectivas cadeias. Os vetores montados foram purificados e sequenciados novamente para verificar a integridade

das sequências. Após a análise, foi realizada co-transfecção do par de vetores das cadeias pesada e leve em células HEK (*Human Embryonic Kidney*) para a expressão dos anticorpos. Foi obtido um painel de mAbs purificados utilizado em ensaios de avaliação *in vitro* e *in vivo*. A metodologia utilizada nessa seção está detalhada nos itens a seguir.

Figura 4. Fluxo experimental para obtenção de mAbs a partir de célula B.



3.3.1.1 LINFÓCITOS B DE MEMÓRIA OU PLASMABLASTOS

A obtenção de anticorpos se iniciou a partir de células B previamente separadas em placas de 96 poços, contendo uma única célula B por poço (ALIPRANDINI, 2015).

Essas células foram separadas por *single cell sorting* usando citômetro de fluxo BD FACSAria II (BD Biosciences, EUA) instalado no Instituto de HPV da Santa Casa de São Paulo, por diferentes estratégias de marcação para a separação das células, sendo coletadas em poços com 4µL de solução contendo PBS 0,5X gelado, DTT 10mM e *RNAsin*[®] (Promega, EUA) 8U. Após a separação, as placas com as células B (Tabela 3) foram mantidas em freezer -80°C no laboratório de Biofármacos do Instituto Butantan.

Tabela 3. Relação de células obtidas por *single cell sorting*.

Sorting	Doador	Coleta de Sangue	Estratégia de Marcação	Nº de Células obtidas
A	I	6 dias após vacinação	Linfócitos B de Memória	59 (0,5 placa)
B	I	6 dias após vacinação	Linfócitos B de Memória	44 (0,5 placa)
C	I	6 dias após vacinação	Plasmablastos	184 (2 placas)
D	II	6 dias após vacinação	Plasmablastos	552 (6 placas)
E	III	14 dias após vacinação	Linfócitos B de Memória	460 (5 placas)
F	III	14 dias após vacinação	Plasmablastos	92 (1 placa)

3.3.1.2 RT-PCR

Células B isoladas previamente em placa de 96 poços por *single cell sorting* através de diferentes estratégias de marcação encontravam-se congeladas a -80°C. Cada placa continha 4 controles para as reações, dos quais 2 eram negativos, contendo água e o tampão utilizado no poço da placa de sorting; e dois positivos, contendo RNA HeLa (controle da transcrição reversa) e 1000 linfócitos B (controle da PCR). No descongelamento da placa, a cada poço foram adicionados 0,5µL de oligonucleotídeos hexaméricos 300ng/µL, 0,5µL de Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, EUA) 10%, 6U de *RNAsin*[®] e 3,5µL de água ultrapura estéril. A placa foi incubada a 68°C por 60 segundos em termociclador *Mastercycler Nexus Gradient* (Eppendorf, Alemanha). Posteriormente, foram adicionados 3µL de tampão 5x da *SuperScript*[®] III (Invitrogen), 12,5 nmol de cada dNTP (Invitrogen), 1µL de DTT 100mM (Invitrogen), 8U *RNAsin*[®], 50U da *SuperScript*[®] III (Invitrogen) e água ultrapura estéril q.s.p. 7µL.

A placa foi incubada a 42°C por 5 minutos, 25°C por 10 minutos, 50°C por 60 minutos e 94°C por 5 minutos. O volume da reação foi dividido em 4 placas, cada uma foi utilizada para a amplificação de regiões variáveis de uma das cadeias (pesada, leve κ e leve λ) e para o controle β -actina. As amplificações foram feitas com um protocolo *nested* PCR, utilizando um oligonucleotídeo 3' 50 μ M e um oligonucleotídeo 5' 50 μ M ou um mix de oligonucleotídeos 5' 50 μ M, diferentes para cada cadeia e para cada etapa da reação (WARDEMANN; KOFER, 2013). A primeira reação foi realizada com o cDNA aliquoteado nas placas e a segunda reação foi realizada a partir de 3,5 μ L do produto da primeira reação.

Para a primeira reação da cadeia pesada γ , foram adicionados 4 μ L de tampão 10x da *HotStarTaq® DNA polymerase* (Qiagen, Alemanha), 0,52 μ L do mix de oligonucleotídeos 5', 0,26 μ L do oligonucleotídeo 3', 2,9mM de MgCl₂ (Qiagen), 250 μ M de cada dNTP, 0,9U da enzima *HotStarTaq® DNA polimerase* e água ultrapura estéril q.s.p. 37 μ L. Para a segunda reação, foram utilizados 4 μ L de tampão da *HotStarTaq® DNA polimerase*, 0,13 μ L do oligonucleotídeo 5', 0,13 μ L do oligonucleotídeo 3', 2,9mM de MgCl₂, 250 μ M de cada dNTP, 0,9U da enzima *HotStarTaq® DNA polimerase* e água ultrapura estéril q.s.p. 36,5 μ L.

Para as primeiras reações das cadeias leves κ e λ e do controle β -actina, foram adicionados 4 μ L de tampão da *HotStarTaq® DNA polimerase*, 0,13 μ L do mix de oligonucleotídeos 5', 0,13 μ L do oligonucleotídeo 3', 250 μ M de cada dNTP, 0,9U da enzima *HotStarTaq® DNA polimerase* e água ultrapura estéril q.s.p. 37 μ L. E para as segundas reações das cadeias leves κ e λ , foram adicionados 4 μ L de tampão da *HotStarTaq® DNA polimerase*, 0,13 μ L do oligonucleotídeo 5' ou o mix de oligonucleotídeos 5', 0,13 μ L do oligonucleotídeo 3', 250 μ M de cada dNTP, 0,9U da enzima *HotStarTaq® DNA polimerase* e água ultrapura estéril q.s.p. 36,5 μ L.

As primeiras reações foram realizadas a 95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C (para Ig γ , Ig κ e β -actina) ou 60°C (para Ig λ) por 30 segundos e 72°C por 55 segundos e 72°C por 10 minutos. Já as segundas reações foram a 95°C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C (para Ig γ , Ig κ e β -actina) ou 60°C (para Ig λ) por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e 72°C por 10 minutos.

Após a segunda reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 2% para confirmar a amplificação. Os géis foram analisados por fotodocumentador Gel Logic 112 (Carestream).

3.3.1.3 SEQUENCIAMENTO

Foram sequenciadas as amostras da segunda PCR e as amostras da PCR de colônias. Para os sequenciamentos, as amostras foram previamente purificadas com *Illustra ExoProStar 1-Step* (Cytiva), conforme orientação do fabricante. Foram utilizados, para 200ng de DNA, 3 μ L de tampão do *BigDye v3.1* (Applied Biosystems, EUA), 3 μ L do *BigDye V3.1*, 3 μ L do oligonucleotídeo 3,2 μ mol/ μ L e água ultrapura estéril q.s.p. 15 μ L. As reações ocorreram a 96°C por 1 minuto e em seguida por 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Posteriormente, as amostras foram precipitadas com etanol e EDTA, conforme orientação do fabricante, e sequenciadas em ABI PRISM® 3130XL GeneticAnalyzer (Hitachi, Japão).

Para o sequenciamento dos produtos da segunda PCR das cadeias γ e κ , foram utilizados os mesmos oligonucleotídeos 3' da reação *nested* e para a cadeia λ utilizou-se um oligonucleotídeo específico (WARDEMANN; KOFER, 2013). A análise da sequência obtida no RT-PCR foi realizada com o auxílio da ferramenta IgBlast, que fornece a classificação dos segmentos V(D)J, o número e localização das mutações somáticas, além da sequência de resíduos de aminoácidos do CDR3. As sequências com a mesma classificação V(D)J e com a sequência de CDR3 semelhantes, pelo sistema KABAT (KABAT *et al.*, 1991), foram consideradas clonalmente relacionadas.

Para o sequenciamento das amostras da PCR colônias positivas, foi utilizado o oligonucleotídeo 5' que anela na região líder do vetor (WARDEMANN; KOFER, 2013). A análise comparativa para determinar qual a colônia com sequência variável idêntica à do produto da segunda PCR foi realizada com a ferramenta de alinhamento de sequências BLAST (*bl2seq Align Sequence Nucleotide* - BLAST).

3.3.1.4 PCR ESPECÍFICA

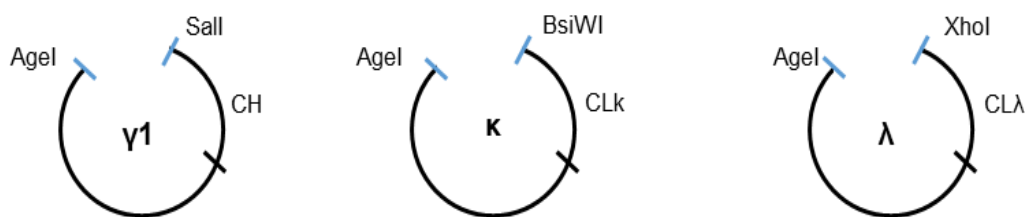
As amostras consideradas clonalmente relacionadas foram novamente amplificadas. Para a reação, denominada PCR específica, foram adicionados a 4,2 μ L do produto da primeira PCR, 4 μ L de tampão 10x da *HotStarTaq® DNA polimerase*, 250 μ M de cada dNTP, 0,9U da enzima *HotStarTaq® DNA polimerase*, água ultrapura estéril q.s.p. 31,8 μ L, 2 μ L do oligonucleotídeos 5' específico 5 μ M e 2 μ L do

oligonucleotídeo 3' específico 5 μ M. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose.

3.3.1.5 VETORES

Os vetores utilizados na transfecção transitória foram gentilmente cedidos pela Dra. Hedda Wardemann, do Instituto Max Plank, Heidelberg, Alemanha. Esses vetores contêm sequência que codifica a região constante das cadeias de imunoglobulina humana (γ 1, κ ou λ). O sítio de clonagem, onde será inserido a sequência codificadora da cadeia variável, fica à montante dessa região (Figura 5).

Figura 5. Vetores de Expressão das cadeias pesada *gama*, leves *kappa* e *lambda*.



3.3.1.6 DIGESTÃO

Os vetores de expressão das cadeias pesada *gama*, leves *kappa* e *lambda* dosados foram submetidos à digestão com enzimas de restrição para serem linearizados. Foram realizadas digestões sequenciais com cada enzima, utilizando 2U/ μ g de DNA para as enzimas Agel-HF e BsiWI (NEB) e 10U/ μ g para Sall-HF e XhoI (NEB). A primeira digestão foi realizada com Agel-HF para todos os vetores e a segunda digestão foi realizada com Sall-HF, BsiWI e XhoI para os vetores pl γ , pl κ e pl λ , respectivamente. A digestão procedeu por 4 horas a 37°C para Agel-HF, Sall e XhoI e a 55°C para BsiWI.

Os fragmentos purificados obtidos na reação de PCR específica foram digeridos por enzimas de restrição, cujos sítios de restrição foram inseridos a partir da utilização dos oligonucleotídeos específicos. As enzimas utilizadas para a digestão da cadeia pesada foram Agel-HF e Sall-HF; da cadeia leve κ , Agel-HF e BsiWI; e da cadeia leve λ Agel-HF e XhoI (NEB). A digestão das cadeias γ e λ foram realizadas a partir de 31,5 μ L do produto de PCR purificado, 4 μ L do NEBuffer 4 10x (NEB), 4 μ L de

BSA 100x (NEB), 1U de cada enzima e água ultrapura estéril q.s.p. 40µL, incubando a 37°C por 2 horas e a 65°C por 20 minutos. A digestão da cadeia κ foi realizada em duas etapas, primeiramente com a enzima AgeI-HF a 37°C por 2 horas e a 65°C por 20 minutos e posteriormente com a enzima BsiWI (1U da enzima, 0,2µL do NEBuffer 1 10x e água ultrapura estéril 2µL) a 55°C por 2 horas e a 80°C por 20 minutos.

As amostras de PCR foram purificadas antes e após a digestão com *kit QIAquick® 96 PCR Purification* (Qiagen), de acordo com a especificação do fabricante. Já os vetores linearizados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e purificados utilizando o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP system*.

3.3.1.7 LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO

Os produtos de PCR digeridos e purificados foram submetidos à ligação com os vetores de expressão linearizados, que codificam para a região constante de uma das cadeias de imunoglobulina humana. Para a ligação, foram adicionados a 8µL do produto digerido, 0,5µL do vetor linearizado 50ng/µL, 1µL do tampão da *T4 DNA ligase* (Invitrogen) e 200U da T4 DNA ligase (Invitrogen), e incubou-se a 23°C por 2 horas.

Os vetores foram transformados em bactérias quimiocompetentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Para isso, foram utilizados 4,5µL do produto de ligação a 10µL da suspensão de bactérias. O microtubo foi mantido em gelo por 30 minutos e, posteriormente, foi incubado a 42°C por 45 segundos e mantido novamente em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 100µL de meio SOC (Tryptona 20g/L, Extrato de levedura 5g/L, NaCl 500mg/L, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM e Glicose 20mM) ao conteúdo da transformação, o qual foi incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação de 180rpm. Em seguida, a suspensão foi plaqueada em placa de LB Ágar com ampicilina e as placas foram mantidas a 37°C por 16-18 horas.

3.3.1.8 PCR DE COLÔNIAS

Para a PCR das colônias, três colônias transformadas de cada placa (Item 3.3.1.7) foram escolhidas aleatoriamente para a verificação da presença do inserto, utilizando-se oligonucleotídeos que anelam na região líder e na região constante da respectiva cadeia de imunoglobulina (WARDEMANN; KOFER, 2013). Em cada poço de uma placa de PCR, foram adicionados 125µM de cada dNTP, 400nM do

oligonucleotídeo 5', 400nM do oligonucleotídeo 3', 1,5mM de MgCl₂ e 1U de *Taq DNA polimerase* (Invitrogen) e água ultrapura estéril q.s.p. 25µL. As colônias escolhidas foram transferidas a outra placa de LB ágar com Ampicilina 100µg/mL e posteriormente, adicionada à solução contida nos poços. A reação ocorreu a 94°C por 5 minutos, seguido de 27 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos e, por fim, 72°C por 10 minutos. A placa com as colônias transferidas foi incubada a 37°C por 16-18 horas. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corados com *SyBR Safe* (Invitrogen).

3.3.1.9 ISOLAMENTO DOS VETORES RECOMBINANTES

As colônias selecionadas na etapa de comparação das sequências foram inoculadas em 4mL de meio TB com Ampicilina 75µg/mL e incubadas a 37°C, 200rpm por 16-18 horas. Após a incubação, o volume do inóculo foi dividido em 2 alíquotas e submetido a centrifugação 4000g por 10 minutos. Os *pellets* foram utilizados para obtenção do vetor purificado com o uso do *kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification*, conforme orientação do fabricante. Uma alíquota do vetor purificado foi diluída 1:50 para a dosagem em espectrofotômetro a 260/280nm.

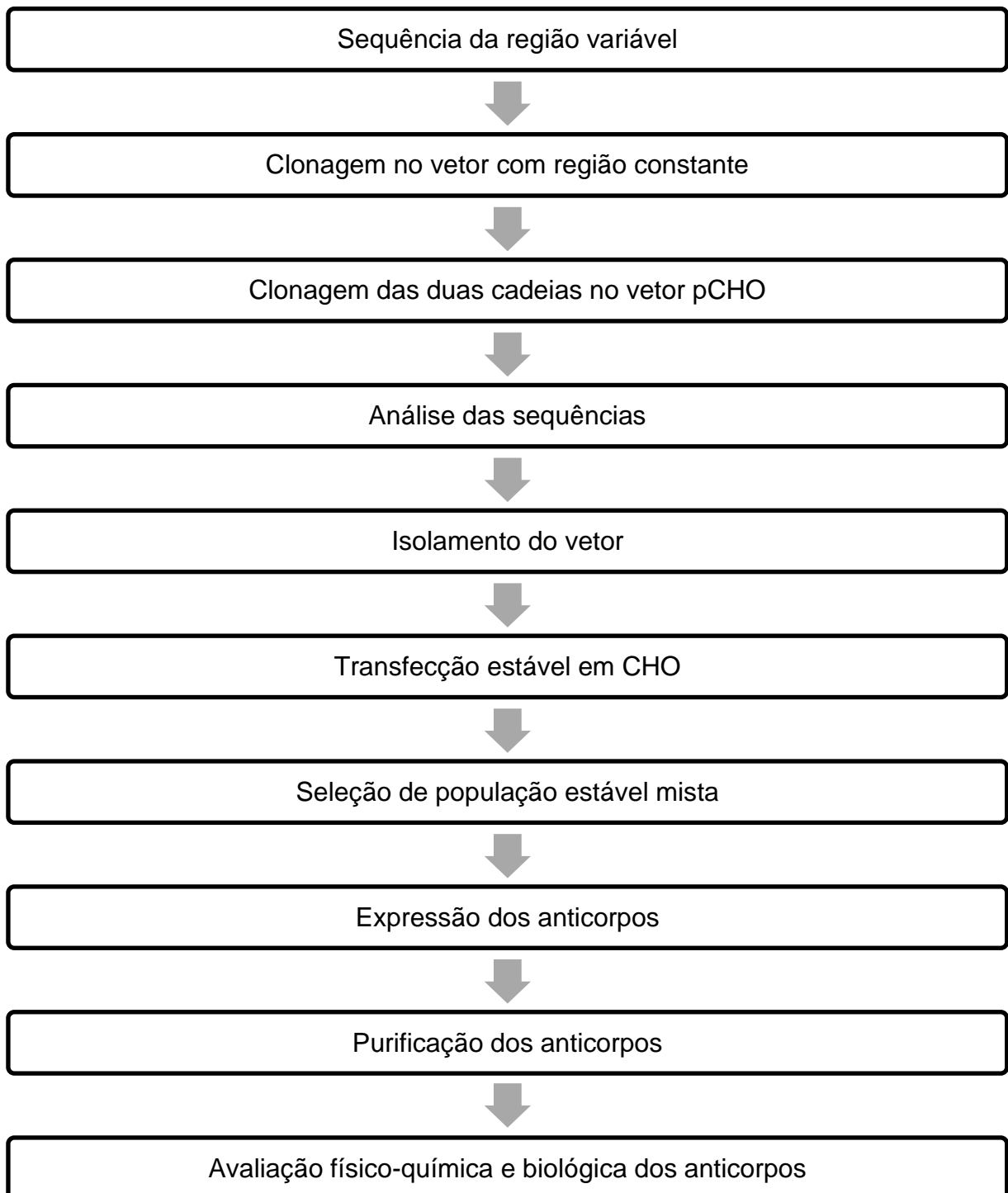
3.3.1.10 TRANSFEÇÃO TRANSITÓRIA

Foi realizada cotransfecção transitória dos vetores de cadeia leve e pesada correspondentes de cada amostra em células HEK (*Human Embryonic Kidney FreeStyle™ 293-F* (Invitrogen) cultivadas em meio *FreeStyle™ 293F* (Invitrogen). As células foram mantidas a 37°C, 8% de CO₂ e a 120rpm. Para a transfecção, foi utilizado 30mL de suspensão com concentração entre 0,9 e 1,1x10⁶células/mL. A solução de DNA foi preparada com 15µg de cada vetor (cadeia leve e pesada), 103µL de solução de Polietilenimina – PEI (Sigma-Aldrich) a 0,45mg/mL e PBS q.s.p. 1,5mL. Os vetores foram adicionados ao PBS 1x e a solução foi incubada por 5 minutos, quando foi adicionado o PEI e agitou-se em vortex por 15 segundos. A solução foi incubada por 10 minutos, protegida de luz. Por fim, a solução foi gotejada sobre a suspensão de células e o cultivo foi mantido por 72 horas para a expressão dos mAbs.

3.3.2 OBTENÇÃO DE LINHAGEM PERMANENTE PARA EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS mABS

A figura 6 demonstra o fluxo experimental para a obtenção de linhagem permanente para expressão e caracterização dos mAbs. A metodologia está descrita detalhadamente nos próximos itens. Resumidamente, foram sintetizados, pela GeneArt, vetores que contêm sequências codificadoras das regiões constantes das cadeias pesada *gama* 1 e leve Kappa humanas. Foram realizadas diversas etapas de digestão e ligação para montarmos sequências completas, contendo a região constante das cadeias pesada e leve e as respectivas regiões variáveis. Esses vetores foram submetidos novamente a etapas de digestão e para a montagem de um vetor de expressão Freedom™ pCHO 1.0 (Invitrogen) contendo as sequências tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada dos mAbs. Com os vetores completos, células CHO-S (Invitrogen) foram transfectadas para a expressão e avaliação dos anticorpos.

Figura 6. Fluxo experimental para obtenção de linhagem permanente de expressão dos mAbs.

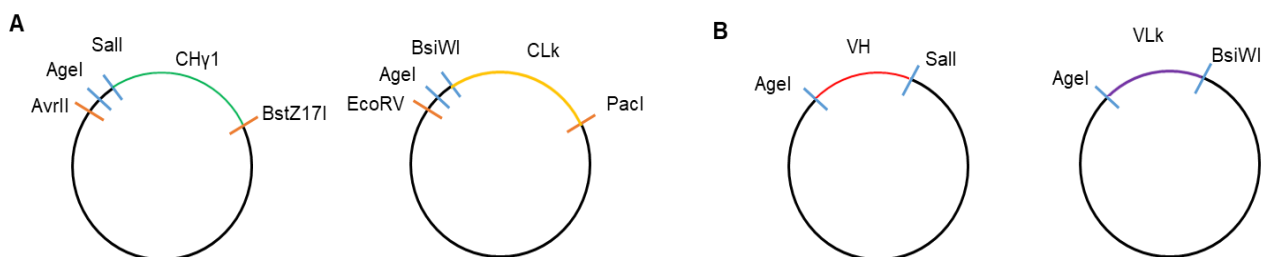


3.3.2.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES

Para a obtenção de linhagem permanente, foram sintetizados, pela GeneArt, vetores que contêm sequências codificadoras das regiões constantes das cadeias

pesada *gama* 1 e leve *kappa* humanas (Figura 7A). Também foi encomendada a síntese das regiões variáveis das cadeias pesada e leve de dois mAbs, BUT-TT-117-08 e BUT-TT-120-10, com otimização de códons (Figura 7B).

Figura 7. Vetores sintetizados pela GeneArt.



(A) Vetores de transporte contendo as sequências das regiões constantes das cadeias pesada *gama* 1 e leve *kappa* humanas e os sítios de restrição para clonagem. **(B)** Vetores com as sequências das regiões variáveis das cadeias pesada e leve.

3.3.2.2 DIGESTÃO

Para a montagem dos vetores para obtenção de linhagem permanente, foram realizadas digestões sequências com AgeI-HF e Sall-HF (cadeias pesadas) e AgeI-HF e BsiWI (cadeias leves) para o preparo dos insertos (regiões variáveis) e para a abertura do vetor de transporte contendo as regiões constantes. Digestões com AvrII e BstZ171 (NEB) foram realizadas para o preparo dos inserto com as cadeias completas pesadas e para a abertura do pCHO para a ligação dessas cadeias. Digestões com EcoRV e PacI (NEB) foram realizadas para o preparo dos insertos com as cadeias completas leves e para a abertura do pCHO. As digestões foram realizadas por 4 horas a 37°C para AgeI-HF, Sall-HF, AvrII, BstZ171, EcoRV e PacI e a 55°C para BsiWI. Os vetores foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a digestão e purificados utilizando o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP system*.

3.3.2.3 LIGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO

Para a montagem dos vetores pCHO, a ligação foi realizada com 25ng dos insertos, 75ng dos vetores linearizados purificados e 1µL da T4 DNA ligase. As reações foram incubadas a 23°C por 1 hora, com exceção da ligação da cadeia

pesada no sítio do pCHO (entre os sítios das enzimas AvrII e BstZ17I) que foi incubada a 14°C por 16 horas.

A etapa de transformação foi realizada com bactérias competentes One Shot™ TOP10 Chemically Competent (Invitrogen) por choque térmico. Para isso, foram utilizados 4µL do produto de ligação a 20µL da suspensão de bactérias. O microtubo foi mantido em gelo por 5 minutos e, posteriormente, foi incubado a 42°C por 45 segundos e mantido novamente em gelo por 2 minutos. Foram adicionados 100µL de meio SOC (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 500mg/L, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM e glucose 20mM) ao conteúdo da transformação, o qual foi incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação de 180rpm. Em seguida, a suspensão foi plaqueada em placa de LB ágar com canamicina e as placas foram mantidas a 37°C por 16-18 horas.

3.3.2.4 PCR DE COLÔNIAS

Para a PCR das colônias, três colônias transformadas de cada placa (Item 3.3.2.3) foram escolhidas aleatoriamente para a verificação da presença do inserto. Em cada poço de uma placa para PCR, foram adicionados 125µM de cada dNTP, 400nM do oligonucleotídeo 5', 400nM do oligonucleotídeo 3', 1,5mM de MgCl₂ e 1U de *Taq DNA polimerase* e água ultrapura estéril q.s.p. 25µL. As colônias escolhidas foram transferidas a outra placa de LB ágar com canamicina 50µg/mL e posteriormente, adicionada a solução contida nos poços. A reação ocorreu a 94°C por 5 minutos, seguido de 27 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos e, por fim, 72°C por 10 minutos. Para a verificação dos insertos no vetor de transporte (cadeia leve ou pesada completa) utilizou-se oligonucleotídeos que anelam na região líder e no final da região constante da respectiva cadeia de imunoglobulina. Para verificação da presença dos insertos no vetor pCHO, foram utilizados os oligonucleotídeos a seguir: 5'-GGTGTCGTGAGGAATTTTCAG-3' (~285pb a montante ao sítio EcoRV/PacI) e 5'-GGCAGCCGGATCATAATC-3' (~250pb a jusante ao sítio EcoRV/PacI); 5'-GAGCCTCCTTGTCTTG-3' (~270pb a montante ao sítio AvrII/BstZ17I) e 5'-AGAAGACACGGGAGACTTAG-3' (~90pb a jusante ao sítio AvrII/BstZ17I). A placa com as colônias selecionadas foi incubada a 37°C por 16-18 horas. A amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com *SyBR Safe*.

3.3.2.5 ISOLAMENTO DOS VETORES

As colônias com os vetores recombinantes foram inoculadas em 4mL de meio TB com canamicina 50µg/mL e incubadas a 37°C, 200rpm por 16-18 horas. Após a incubação, o volume do inóculo foi dividido em 2 alíquotas e submetido a centrifugação 4000xg por 10 minutos. Os *pellets* foram utilizados para obtenção do vetor purificado com o uso do *kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification*, conforme orientação do fabricante.

3.3.2.6 SEQUENCIAMENTO DOS VETORES pCHO COMPLETOS

Os vetores pCHO completos (com as cadeias leve e pesada dos mAbs) foram sequenciados. Para a reação, foram utilizados 600ng do vetor, 1µL de tampão do BigDye v3.1, 2µL do BigDye V3.1, 1µL do oligonucleotídeo 5µM e água ultrapura estéril q.s.p. 10µL. A reação ocorreu a 96°C por 1 minuto e em seguida por 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Posteriormente, as amostras foram precipitadas com etanol e EDTA, conforme orientação do fabricante. As sequências dos vetores pCHO foram comparadas às sequências sintetizadas a fim de garantir que não houve mutação ou a montagem incorreta dos vetores.

3.3.2.7 DIGESTÃO DO VETOR pCHO PARA TRANSFEÇÃO

Os vetores pCHO completos (com as cadeias leve e pesada dos mAbs) e analisados pelo sequenciamento foram digeridos para serem linearizados. As digestões foram realizadas com 15µL da enzima NruI (NEB) para 50µg de DNA. A digestão procedeu por 6 horas a 37°C.

3.3.2.8 TRANSFEÇÃO ESTÁVEL

Células CHO-S Cells (Gibco, EUA) foram transfectadas com os vetores para a expressão de anticorpos. O procedimento para a transfecção permanente foi realizado conforme orientações do fabricante. Em um tubo, foram adicionados 50µL do reagente FreeStyle Max (Gibco) e 1,45mL de OptiPro SFM (Gibco). Em outro tubo, foram

adicionados 50µg de DNA e OptiPro SFM qsp 1500µL. A mistura contendo FreeStyle Max foi adicionada ao tubo contendo o DNA e, então, foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, os 3mL do complexo reagente de transfecção/DNA foram adicionados às células em um *erlenmeyer* contendo 30mL com 1×10^6 cél/mL. O frasco de cultivo foi incubado a 37°C, 8% CO₂, 150rpm por 48 horas.

3.3.2.8.1 Seleção das células CHO

As etapas de seleção foram realizadas conforme orientação do fabricante do Kit de transfecção Freedom™ CHO-S™ Kit (Gibco). Ao final de cada etapa, algumas alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido.

Após 48 horas da transfecção, iniciou-se a fase 1 da seleção. A suspensão foi centrifugada e o sedimento ressuspense em 50 mL de meio Dynamis (Gibco) contendo glutamina 8mM e Anti-Clumping 1:100 (Gibco). O volume foi dividido em 2 frascos T-75, contendo os agentes de seleção Puromicina (Gibco) e Metotrexato (MTX) em duas condições:

1 - 10P/100M: Puromicina 10µg/mL + MTX 100nM

2 - 20P/200M: Puromicina 20µg/mL + MTX 200nM

Os cultivos foram incubados a 37°C, 8% CO₂, sem agitação por 7 dias. Posteriormente, os frascos foram mantidos em cultivo com troca de meio a cada 3 dias. Quando a viabilidade atingiu $\geq 30\%$, a suspensão foi centrifugada e ressuspensa em meio contendo os agentes de seleção nas mesmas condições anteriores. Os cultivos foram incubados em *erlenmeyer* a 37°C, 8% CO₂, 150rpm. Foi realizada a troca de meio a cada 3 dias até que a viabilidade atingisse $\geq 85\%$. A partir desse ponto, iniciou-se a fase 2 da seleção. Após a troca de meio, as células de cada condição da fase 1 foram divididas em dois novos frascos cada, com 30mL de cultivo com 4×10^5 cél/mL. Os agentes de seleção foram adicionados em duas condições:

A - 30P/500M: Puromicina 30µg/mL + MTX 500nM

B - 50P/1000M: Puromicina 50µg/mL + MTX 1000nM

Dessa forma, os 4 frascos de cada transfecção (1A, 1B, 2A e 2B) foram incubados a 37°C, 8% CO₂, 150rpm. Foi realizada a troca de meio a cada 3 dias até que a viabilidade atingisse $\geq 90\%$.

3.3.2.9 EXPRESSÃO DOS MABS

Para a expressão dos mAbs, as células foram mantidas em 30mL de meio Dynamis novo, contendo anti-clumping, na concentração de 3×10^5 cél/mL. As células foram incubadas a 37°C, 8% CO₂, 150rpm até que a viabilidade estivesse $\leq 50\%$ ou até o dia 14. Amostras foram coletadas nos dias 0, 3, 5, 7, 10 12 e 14 para contagem celular, viabilidade e avaliação de produtividade. Após a amostragem, glicose foi adicionada nos dias 3, 5 e 7 nas concentrações de 4g/L, 4g/L e 6g/L, respectivamente.

3.3.3 PURIFICAÇÃO DOS mABS

O sobrenadante dos cultivos foi coletado após centrifugação a 800xg por 10 minutos. Os anticorpos foram purificados com o sistema *ÄKTA Purifier* (Cytiva), por cromatografia de afinidade em resina de proteína A-sefarose (Cytiva) equilibrada com tampão fosfato 20mM pH 7. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio. A primeira eluição foi feita com tampão citrato de sódio 100mM pH 6 e a segunda, com tampão citrato de sódio 100mM pH 3,2. A recuperação dos anticorpos foi realizada nesse tampão e a amostra foi neutralizada com solução Tris 1M. Os anticorpos foram dialisados contra PBS, esterilizados por filtração e quantificados em espectrômetro a 280nm, usando o coeficiente $A_{0,1\%} = 1,4$.

3.3.4 AVALIAÇÃO DOS mABS POR SDS-PAGE

Para a eletroforese dos anticorpos purificados, as amostras foram aplicadas em quantidade equivalente a 0,6µg ou 1,0µg por poço, diluídas em tampão de amostra com ou sem agente redutor β -mercaptoetanol. As amostras com agente redutor foram previamente incubadas a 100°C por 5 minutos. Foram utilizados os marcadores de alto peso molecular HMW-SDS Marker e de baixo peso molecular LMW-SDS Marker. A Eletroforese foi executada a 80V por 20 minutos e, após, a 120V. Os géis foram corados por azul de *coomassie* 0,2% ou nitrato de prata.

3.3.5 ELISA

As placas foram revestidas com 100µl de TeNT(BUT) ou TT 5µg/mL em PBS (Dokmetjian, Della Valle et al. 2000) ou de Fragmento C 2µg/mL (doado pela Dra. Patrícia A. E. Abreu de Aniz do Instituto Butantan) em Tampão Carbonato 50mM (Ribas, Ho et al. 2000) a 4°C *por 16-18 horas*. O bloqueio foi realizado com solução BSA 1% em PBS a temperatura ambiente por 2 horas. Os anticorpos candidatos foram diluídos seriadamente em BSA 1% em PBS nas concentrações de 50ng/mL a 0,4ng/mL e incubados a 37°C por 1 hora. Os anticorpos não ligados foram lavados com *Tween 20* 0,05% em PBS (PBS-T) antes da incubação com anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Southern Biotech, EUA). A revelação foi realizada com TMB 100µg/mL em Tampão Acetato/Ácido cítrico 0,1M pH 6 e Peróxido de Hidrogênio 0,0045%. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4,7N e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. O soro de um doador vacinado foi utilizado como controle positivo. Esse soro havia sido coletado anteriormente (aprovação do CEP/ICB/USP pela Plataforma Brasil com número 1.515.313).

3.3.6 ELISA COMPETITIVO

O ensaio foi realizado de acordo com NAGATA *et al.* (2004). Resumidamente, as placas de ELISA foram revestidas com anti-IgG humana - Fc específica (Sigma-Aldrich). Após lavagem, a placa foi incubada com mAb#1 *por 16-18 horas* a 4°C. O MAb#2 (competidor) foi incubado com uma dose fixa de TeNT(BUT) em um tubo separado *por 16-18 horas* a 4°C. Esta mistura foi então adicionada à placa e incubada durante 45 minutos. Após a lavagem, a placa foi incubada com soro de cavalo anti-tetânico (SAT) conjugado com peroxidase e, em seguida, a revelação foi feita com TMB. Uma faixa de concentração de TeNT (1-75ng/ml) foi usada para a curva padrão.

3.3.7 WESTERN BLOT

A TeNT(BUT), nas formas não reduzida e reduzida com β-mercaptoetanol, foi submetida à eletroforese SDS-PAGE em géis de poli(acrilamida) 10%. As amostras foram transferidas para uma membrana PVDF (GE Lifesciences) e o bloqueio

realizado com BSA 3% em PBS-T. A membrana foi incubada com os anticorpos monoclonais humanos antitetânicos a 10ng/mL a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora e, após lavagem, com anticorpo de cabra anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Southern Biotech). A revelação foi feita, após lavagem da membrana, por quimiluminescência utilizando o kit Amersham *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Lifesciences) e a detecção por exposição em filme fotográfico *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Lifesciences). Os anticorpos foram diluídos em BSA 1% em PBS-T e as lavagens entre as incubações foram realizadas com PBS-T.

3.3.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1b

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µL de gangliosídeo GT1b 1µg/mL (Sigma-Aldrich) em metanol e mantidas em temperatura ambiente *por 16-18 horas* para a evaporação do metanol. O bloqueio foi realizado com 200µL de BSA 1% em PBS a temperatura ambiente por 2 horas. Em outra placa apenas bloqueada, foi realizada uma diluição seriada dos anticorpos (sozinhos ou em mistura) em BSA 1% em PBS e adicionada uma quantidade fixa de toxina (40µg/mL). Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, transferiu-se 100µL dessa mistura para a placa sensibilizada com GT1b. Após a incubação e lavagem, foi adicionado o soro antitetânico equino conjugado com peroxidase. A revelação foi feita com TMB 100µg/mL, peróxido de hidrogênio 0,0045% em tampão acetato/ácido cítrico 0,1M pH 6 a temperatura ambiente por 20 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4,7N e a leitura realizada a 450nm. Os anticorpos foram testados em duplicatas e o controle positivo foi realizado apenas com a toxina em BSA 1% em PBS. A média da absorbância lida nos poços com apenas a TeNT foi considerada como 100% de ligação.

3.3.9 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (SURFACE PLASMON RESONANCE - SPR)

Os ensaios para a dosagem e a afinidade dos mAbs expressos foram realizados pelo aparelho Biacore T200 (Cytiva).

3.3.9.1 DOSAGEM DOS MABS EXPRESSOS

Para a quantificação da expressão dos mAbs durante o cultivo em batelada após a transfecção e seleção das populações estáveis mistas, foram coletadas amostras nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14 do cultivo. As amostras do dia 0 foram utilizadas puras, as do dia 3 na diluição 1:10, as do dia 5 1:20, e as dos demais dias 1:200. Foi utilizado Sensor CM5 contendo proteína A imobilizada. Os anticorpos foram capturados a 10 μ L/min por 180 segundos. A dissociação foi realizada em 30 μ L/min por 60 segundos. Foi utilizada uma curva padrão com anticorpo anti-TNF α de concentração conhecida. A regeneração do sensor foi realizada com solução de glicina 10mM pH 1,7 a 30 μ L/min por 30 segundos.

3.3.9.2 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO À TeNT

Os ensaios de ligação dos mAbs expressos foram realizados pelo equipamento Biacore T200 (Cytiva). Para a realização do ensaio, foi utilizado um sensor chip CM5 (Cytiva) com Proteína A. Os anticorpos foram acoplados a 8 μ g/mL em um fluxo de 10 μ L/min por 60 segundos para a captura. Em seguida, a TeNT(BUT) foi injetada a 20 μ g/mL em um fluxo de 30 μ L/min por 60 segundos. A dissociação também foi realizada em 30L/min por 60 segundos. A regeneração do sensor foi feita com HCl 100mM a 30 μ l/min por 120 segundos, estabilização por 60 segundos e MgCL₂ 3M a 20 μ l/min por 60 segundos. O ensaio foi realizado pelo aparelho Biacore T200 (Cytiva).

3.3.9.3 AFINIDADE NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Para determinar a afinidade em estado estacionário da TeNT comercial pelos anticorpos imobilizados no sensor, a toxina foi diluída seriadamente 1:4, sendo testada entre as concentrações 100 μ g/mL a 1,5625 μ g/mL. O fluxo foi de 5 μ L/min e o tempo de contato com a toxina foi de 600 segundos. A dissociação foi realizada com o mesmo fluxo por 60 segundos. A regeneração do sensor foi realizada com solução de glicina 10mM pH 1,7 a 30 μ L/min por 30 segundos.

3.3.9.4 AFINIDADE CINÉTICA

A afinidade cinética foi determinada utilizando o sensor com os anticorpos imobilizados. A TeNT comercial foi diluída seriadamente 1:3, sendo testada entre as concentrações 100µg/mL a 11,1µg/mL. O fluxo foi de 30µL/min e o tempo de contato com a toxina foi de 90 segundos. A dissociação foi realizada com o mesmo fluxo pelo tempo máximo permitido pelo equipamento (36000 segundos). A regeneração do sensor foi realizada com solução de glicina 10mM pH 1,7 a 30µL/min por 30 segundos.

3.3.10 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

Para o ensaio de neutralização *in vivo* da TeNT(BUT), realizado de acordo com o método descrito pela Farmacopeia Brasileira (Brasil 2010), foram utilizados camundongos *Swiss* de ambos os sexos, entre 17g e 22g. Em cada grupo foi testada uma amostra (um anticorpo isoladamente ou uma combinação de anticorpos nos grupos testes ou SAT referência no grupo controle) em 5 concentrações diferentes. Cada diluição foi previamente misturada a uma dose fixa de toxina (determinada pelo Serviço de Controle de Qualidade do Instituto Butantan) e solução Salina Peptonada 1%, sendo o volume final de 2,4mL. A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora e inoculada por via subcutânea em 10 animais, 0,2mL por camundongo. A situação clínica dos animais (saudáveis, vivos com sintomas ou mortos) foi observada por 4 dias e utilizada para calcular a potência das amostras. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pela Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo nº6203050416).

3.3.11 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

Para os mapeamentos de epítomos lineares (realizado pela empresa PepPerPrint, Alemanha), a sequência da Toxina Tetânica (UniProt ID P04958) foi alongada por ligantes GSGSGSG neutros nos terminais C e N para evitar peptídeos truncados. A sequência foi traduzida em peptídeos lineares de 13 aminoácidos com uma sobreposição de 12 aminoácidos. Os *microarrays* continham 1.319 peptídeos

lineares diferentes em duplicata, que foram enquadrados por peptídeos controle adicionais de HA (YPYDVDPDYAG) e FLAG (DYKDDDDKAS). Para o mapeamento de epítipo conformacional, a sequência da TeNT foi traduzida em peptídeos de 7, 10 ou 13 aminoácidos com sobreposições de 6, 9 e 12 aminoácidos, respectivamente. Esses peptídeos foram ciclizados através de uma ligação tioéter entre uma cadeia lateral da cisteína C-terminal e um terminal N apropriadamente modificado. O *microarray* continha 3.966 peptídeos cíclicos diferentes em duplicata, que foram enquadrados por peptídeos controle adicionais de HA (YPYDVDPDYAG). Para o ensaio, amostras de mAbs antitetânicos foram incubadas a 1µg/ml, 10µg/ml e 30µg/ml para o mapeamento de epítipo linear, e a 0,1µg/ml e 1µg/ml para o mapeamento de epítipo conformacional a 4°C, 140rpm.por 16 horas. Após lavagem com PBS-T, os anticorpos foram revelados com um anticorpo de cabra anti IgG humano (H + L) DyLight680 e analisados pelo sistema de imagem LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences). Para o controle, foi utilizado um anticorpo murino monoclonal anti-HA (12CA5) DyLight800.

3.3.12 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA (TOXIN BINDING INHIBITION ASSAY - TOBI)

Em uma placa bloqueada com BSA1% em PBS foram adicionados os anticorpos com diluições 1:2. Os controles foram realizados com uma Antitoxina padrão e com PBS. Foi adicionada uma quantidade fixa de Anatoxina Tetânica (0,1 Lf/mL). A placa foi incubada a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Posteriormente, as misturas foram transferidas para outra placa, sensibilizada com soro antitetânico em Tampão Carbonato pH 9,6 e bloqueada com BSA1% em PBS, mantendo as posições dos poços. A placa foi incubada a 37°C em câmara úmida por 90 minutos. Após a lavagem, a placa foi incubada com soro antitetânico (SAT) conjugado com peroxidase a temperatura ambiente por 2 horas, protegido de luz. A revelação foi realizada com TMB 100µg/mL em Tampão Acetato/Ácido cítrico 0,1M pH 6 e Peróxido de Hidrogênio 0,0045%. A reação foi interrompida com Ácido Sulfúrico 4,7N e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. O cálculo do título dos anticorpos foi realizado conforme descrito por HENDRIKSEN *et al.* (1988).

3.3.13 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

A agarose foi dissolvida em PBS para a concentração de 1% e depositada sobre um filme para gel de agarose (*GelBond® Film*; Cytiva). Após a solidificação do gel, foi utilizado um perfurador hexagonal para a obtenção dos poços. No poço central foi adicionado 5µg de TeNT(BUT) e nos demais as amostras de anticorpos em um volume total de 10µL. O gel foi incubado a 37°C em câmara úmida por 18 horas. Após a secagem da agarose, o filme foi corado com *coomassie* 0,2%.

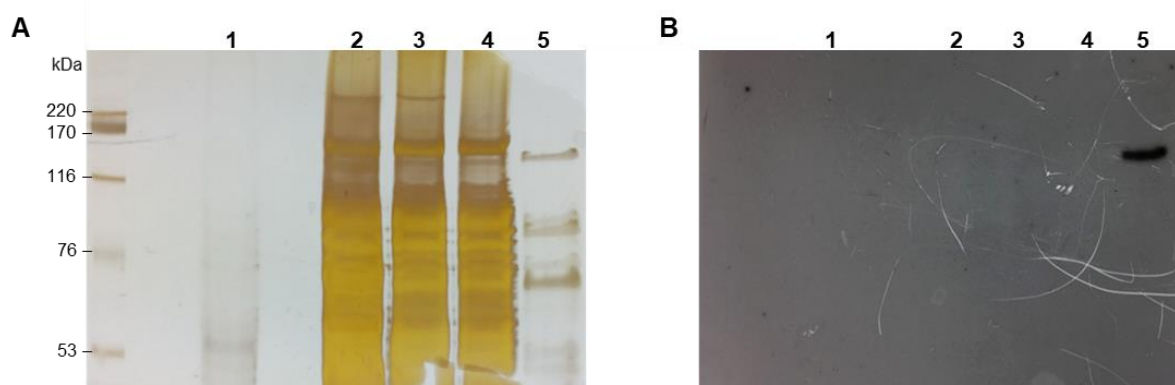
4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse trabalho estão descritos nos itens a seguir.

4.1 PRODUÇÃO TOXINA TETÂNICA ATÓXICA

Primeiramente, a expressão da TeNT(RY) foi realizada utilizando-se *erlenmeyer* e uma rotação de agitação de 200rpm, porém houve produção muito baixa da TeNT. No laboratório em que o vetor foi montado, o cultivo é realizado em fermentador, com alta aeração e agitação. Dessa forma, tentamos fazer a expressão em *erlenmeyer*, aumentando a rotação (400rpm) a fim de aumentar a oxigenação do cultivo. Realizamos também um experimento em reator com oxigenação controlada. A produção da TeNT (RY) foi realizada em reator no Laboratório de Desenvolvimento de Processos do Instituto Butantan, com o auxílio da Dra. Mickie Takagi. Observou-se um aumento relativo na expressão proteica quando comparado ao primeiro experimento, mas a expressão ainda era baixa. Essa comparação foi baseada na absorbância por UV (280nm) medida durante a cromatografia e volume dos eluatos. Foi possível verificar, por WB, que houve produção da TeNT (Figura 8).

Figura 8. Gel de SDS-PAGE (A) e *Western Blot* (B) da expressão e purificação da Toxina Tetânica

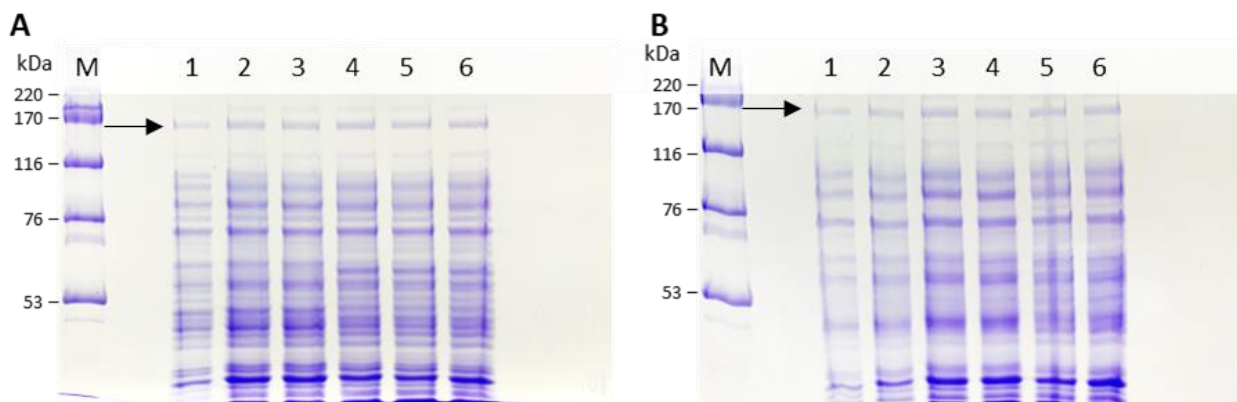


1: Sobrenadante do Cultivo; 2: BL21 DE3 controle; 3: BL21 DE3- TeNT induzido; 4: Fração não retida; 5: Eluato TeNT(RY). Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva).

Foi realizado mais um teste de expressão em reatores, adicionando IPTG 1mM quando atingida Abs_{600} 1,0 (reator A) ou 2,0 (reator B). A cultura foi mantida a 16°C

por 16-18 horas. Amostras de diferentes tempos após a indução foram coletadas (Figura 9).

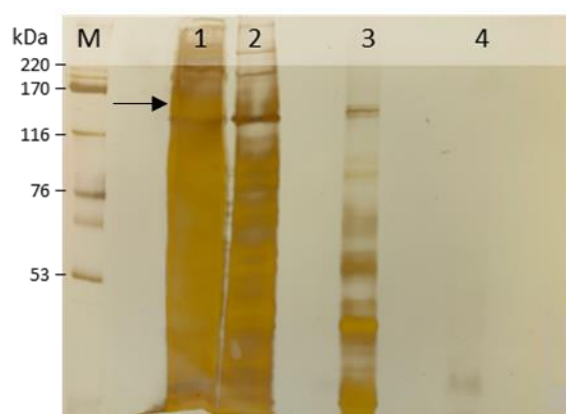
Figura 9. Gel SDS-PAGE da expressão da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) com indução quando atingida Abs_{600} 1,0 (A) e 2,0 (B).



Gel de poliacrilamida 7,5% corado por azul de *coomassie*. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva); 1: Pré-indução; 2: 1 hora após indução; 3: 2 horas após indução; 4: 3 horas após indução; 5: 17 horas após indução; 6: 18 horas após indução. A seta indica o tamanho de aproximadamente 150kDa, o que corresponde a toxina tetânica produzida.

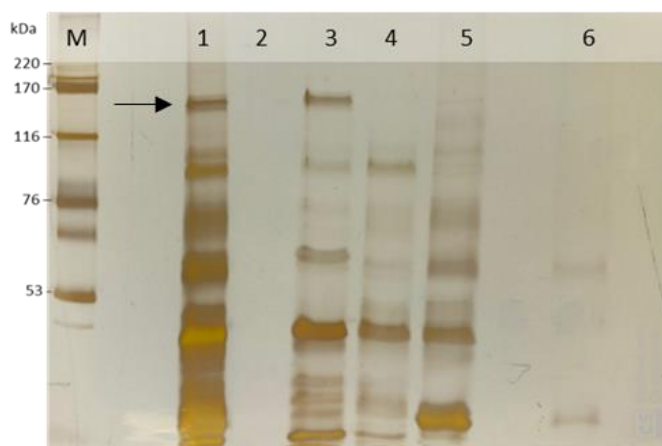
Após 18 horas de indução, o cultivo foi centrifugado e o sedimento obtido foi ressuspendido em tampão HEPES 50mM, NaCl 200mM, Imidazol 40mM e lisado por sonicação. O produto de sonicação foi centrifugado e o sobrenadante da lise foi purificado. Primeiramente, foi realizada uma cromatografia de afinidade com coluna HisTrap (Figura 10). O eluato contendo a toxina expressa foi submetido à coluna de troca iônica (Figura 11). Por último, a amostra da fração 2 do eluato 1, contendo a toxina expressa foi analisada por cromatografia de exclusão de tamanho - SEC-HPLC (Figura 12 e Figura 13).

Figura 10. Gel SDS-PAGE da purificação da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) por coluna de níquel HisTrap.



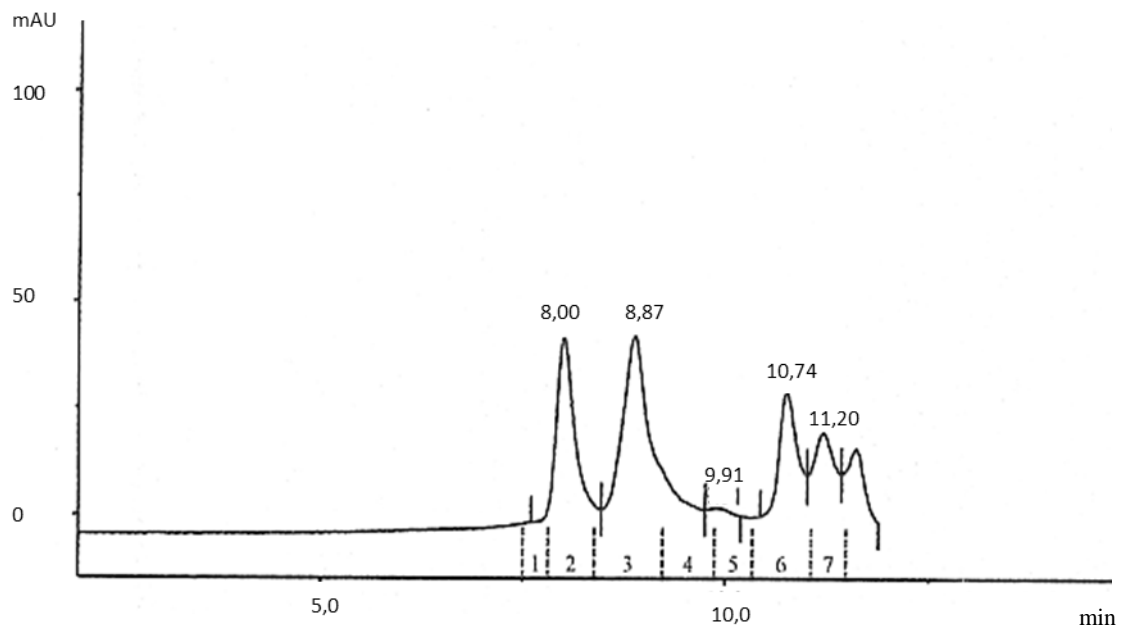
Gel de poliacrilamida 7,5% corado por nitrato de prata. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva); 1: Sobrenadante da lise; 2: Fração não retida; 3: Eluato 1; 4: Eluato 2. A seta indica o tamanho de aproximadamente 150kDa, o que corresponde a toxina tetânica produzida.

Figura 11. Gel SDS-PAGE da purificação da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) por troca iônica.



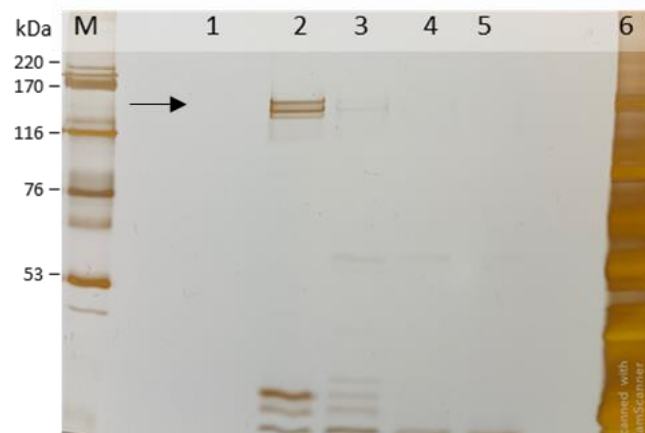
Gel de poliacrilamida 7,5% corado por nitrato de prata. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva); 1: Eluato 1 da cromatografia por coluna de níquel; 2: Eluato 1 Fração 1; 3: Eluato 1 Fração 2; 4: Eluato 1 Fração 3; 5: Eluato 2 Fração1; 6: Regeneração. A seta indica o tamanho de aproximadamente 150kDa, o que corresponde a toxina tetânica produzida.

Figura 12. Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) da toxina tetânica atóxica TeNT(RY).



Os números abaixo dos picos representam o número de cada Fração (Fr) e os acima dos picos os volumes de retenção de cada Fr.

Figura 13. Gel SDS-PAGE da toxina tetânica atóxica TeNT(RY) submetida à cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC).

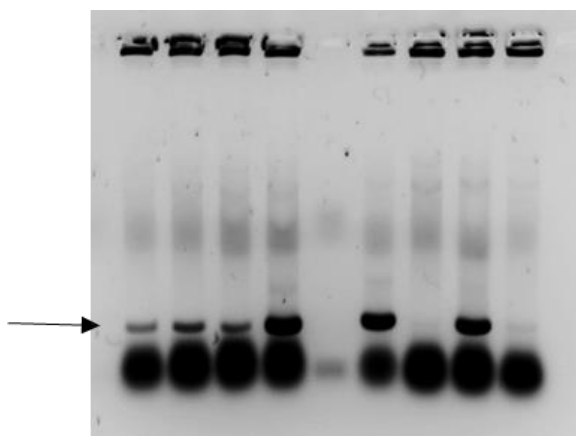


Gel de poliacrilamida 7,5% corado por nitrato de prata. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva); 1: Fração 2; 2: Fração 3; 3: Fração 5; 4: Fração 6; 5: Fração 7; 6: Amostra Eluato 1 Fração 2 da cromatografia por troca iônica. A seta indica o tamanho de aproximadamente 150kDa, o que corresponde a toxina tetânica produzida.

A amostra da Fr 2 foi quantificada por Bradford e a concentração dosada foi de 30 μ g/mL. Considerando que a alíquota tem 500 μ L, a produção foi de 15 μ g de TeNT(RY)/L de cultivo. Dessa maneira, a expressão continuou sendo muito baixa.

Fizemos a troca do vetor a fim de verificar se haveria melhora na expressão da TeNT(RY). A presença do inserto foi verificada através da digestão do vetor com as enzimas NdeI e XhoI (Figura 14). O protocolo de expressão da proteína foi realizado conforme já descrito. A troca de vetor de expressão não alterou o perfil ou a eficiência da expressão da toxina recombinante (Resultados não divulgados).

Figura 14. Eletroforese dos produtos de digestão do vetor pAE-TeNT(RY).

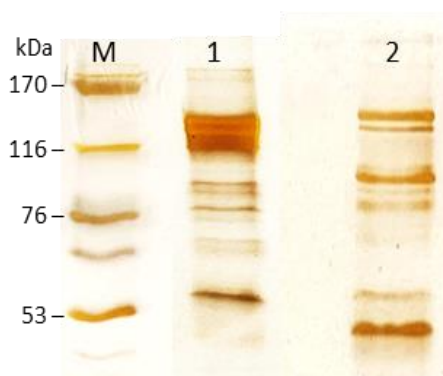


A presença de banda na altura determinada pela seta indica a presença de inserto. Gel de agarose 0,8% corado com SyBR Safe.

4.2 SDS-PAGE DA TOXINA TETÂNICA COMERCIAL

A toxina tetânica comercial foi comprada da empresa List Biologicals Laboratories. Realizamos uma eletroforese SDS-PAGE para verificar a integridade e pureza dessa toxina.

Figura 15. Gel SDS PAGE da toxina tetânica comercial.



Gel de poliacrilamida 10% corado por nitrato de prata. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva); 1: Toxina tetânica em condição não redutora; 2: Toxina tetânica em condição redutora.

4.3 RT-PCR

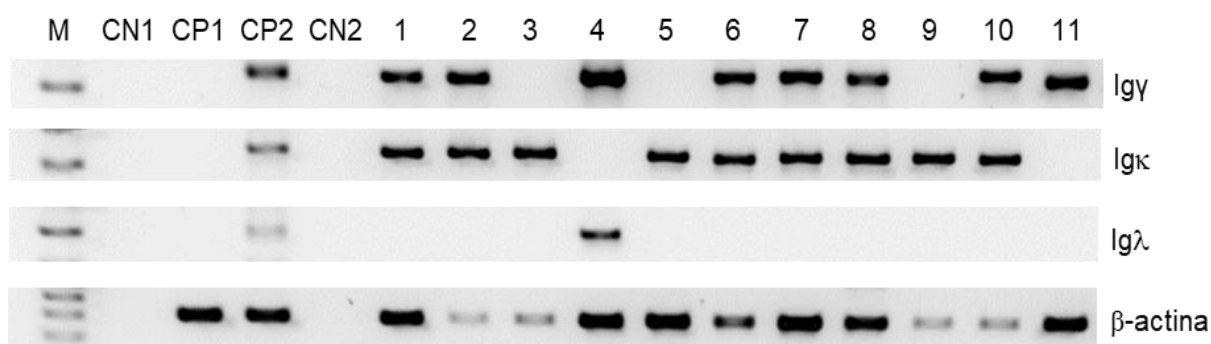
As placas com células B previamente individualizadas por *cell sorter* (Tabela 4) foram submetidas à RT-PCR para a obtenção do cDNA e PCR para amplificação dos genes das cadeias pesada γ e leves κ e λ , além do controle β -actina.

Tabela 4. Placas de *single cell sorting* cujas sequências foram amplificadas.

Sorting	Doador	Coleta de Sangue	Estratégia de Marcação	Nº de placas
D	II	6 dias após vacinação	Plasmablastos	1
E	III	14 dias após vacinação	Linfócitos B de Memória	1
F	III	14 dias após vacinação	Plasmablastos	1

A amplificação foi confirmada em eletroforese em gel de agarose e os tamanhos esperados dos fragmentos foram 450pb para $Ig\gamma$, 510pb para $Ig\kappa$, 405pb para $Ig\lambda$ e 302pb para β -actina (Figura 16).

Figura 16. Gel representativo dos fragmentos obtidos a partir da RT-PCR.



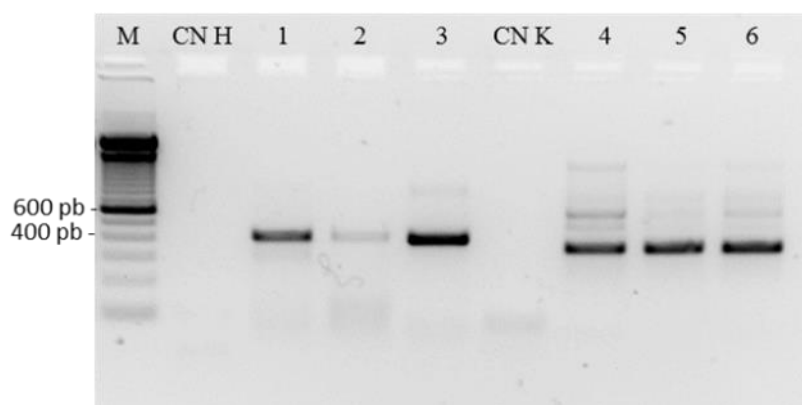
Gel de agarose 2% corado por SyBR Safe. M: Marcador de pares de bases 100bp *ladder* (Invitrogen); CN1: controle negativo 1 (tampão utilizado para o *single cell sorting*); CP1: controle positivo 1 (RNA HeLa); CP2: controle positivo 2 (1000 linfócitos B); CN2: controle negativo 2 (Água ultrapura estéril); 1-11: produtos de amplificação por *nested* PCR.

As 177 amostras cujo par cadeia pesada-leve foi amplificado tiveram suas cadeias sequenciadas separadamente e, após análise, 68 foram consideradas clonalmente relacionadas, ou seja, com a mesma classificação V(D)J e com a sequência de resíduos da CDR3 (determinada pelo sistema KABAT) semelhantes.

4.4 PCR ESPECÍFICA

As sequências das regiões variáveis das amostras consideradas clonalmente relacionadas foram novamente amplificadas por PCR, dessa vez utilizando oligonucleotídeos específicos de acordo com a classificação das cadeias obtidas pelo sequenciamento. Para confirmar a amplificação desses fragmentos, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Figura 17).

Figura 17. Gel de agarose representativo dos fragmentos amplificados por PCR com oligonucleotídeos específicos.



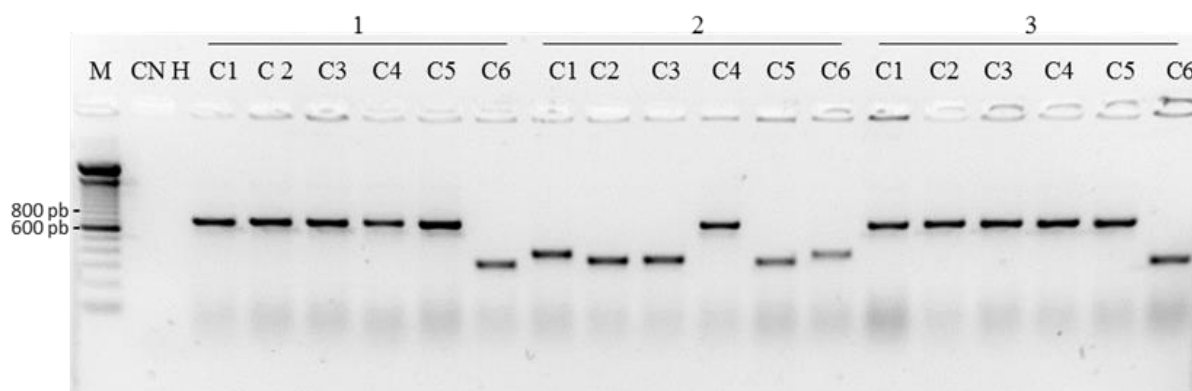
Gel de agarose 2% corado por SyBR Safe. M: marcador de pares de base 100bp *ladder* (Invitrogen); CN H: controle negativo para cadeia γ ; CN K: controle negativo para cadeia κ ; 1, 2 e 3: produtos de amplificação da cadeia γ ; 4, 5 e 6: produtos de amplificação da cadeia κ .

4.5 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

Os fragmentos obtidos pela amplificação das cadeias variáveis pesadas e leves foram purificadas e digeridas. Após a digestão, foram clonados em vetores linearizados que codificam para a cadeia constante e, posteriormente, utilizados para a transformação de bactérias quimiocompetentes. As colônias foram escolhidas aleatoriamente e submetidas à PCR e à eletroforese para verificar a presença do vetor. As amostras com fragmentos do tamanho esperado (650pb para Ig γ , 700pb para Ig κ e 590pb para Ig λ) indicam que os vetores foram clonados (Figura 18). Essas amostras foram sequenciadas e a colônia com sequência variável idêntica à do produto da segunda PCR foi inoculada em meio TB/Ampicilina 75 μ g/mL e incubadas a 37°C por 16-18 horas a 200rpm.

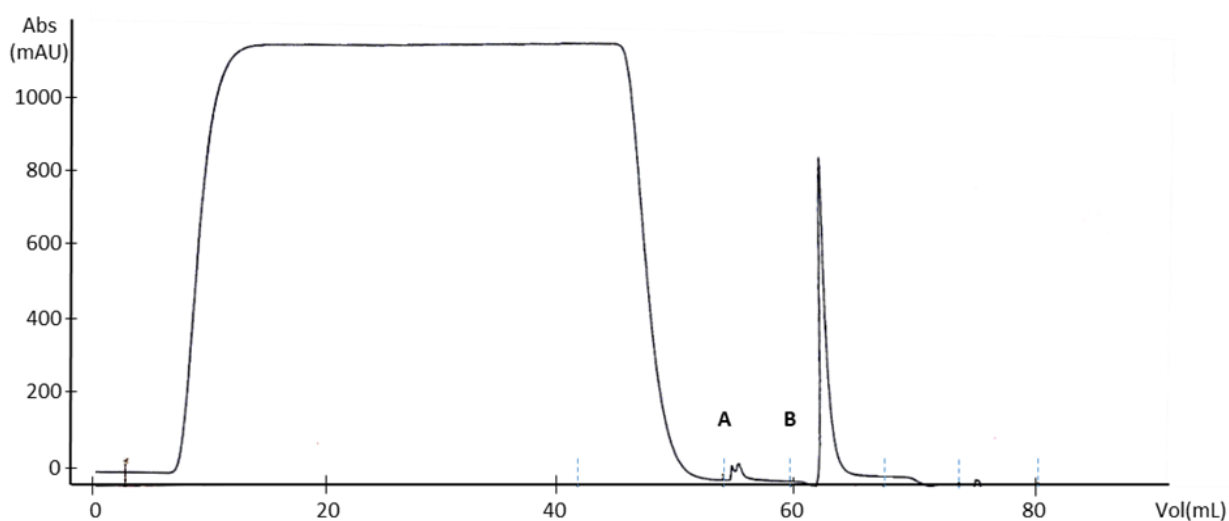
Após a obtenção dos vetores, foi realizada a cotransfecção transitória com os vetores do par cadeia pesada e leve em células *FreeStyle™ 293-F* para a obtenção de 23 anticorpos antitetânicos. Os sobrenadantes foram coletados e os anticorpos purificados por cromatografia de afinidade utilizando coluna com resina de proteína A (Figura 19).

Figura 18. Gel representativo dos fragmentos amplificados por PCR das colônias.



Gel de agarose 2% corado por SyBR Safe. M: marcador de pares de base 100bp *ladder* (Invitrogen); CN H: controle negativo para cadeia γ ; 1, 2 e 3: produtos de amplificação da cadeia γ ; C1 a C6: colônias 1 a 6 de cada amostra. Os tamanhos esperados para os fragmentos são 650pb para Ig γ , 700pb para Ig κ , 590pb para Ig λ .

Figura 19. Cromatograma demonstrativo da purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade em resina de proteína A.



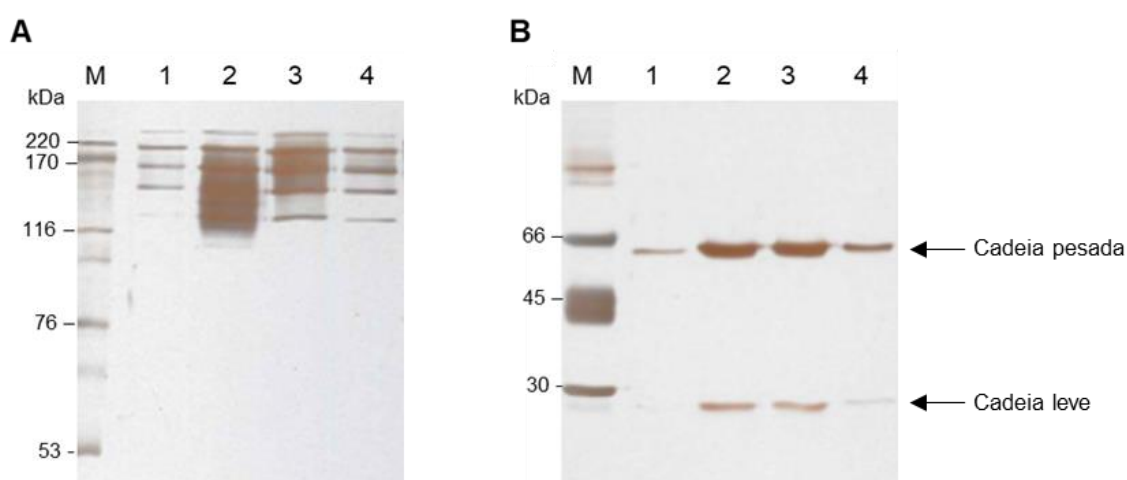
(A) Eluição 1 pH6,0. (B) Eluição 2 pH3,2. A recuperação dos anticorpos foi feita no tampão usado para a eluição 2.

4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS mABS POR SDS-PAGE

A fim de verificar a expressão dos anticorpos, estes foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE) em condições não redutoras e redutoras (

Figura 20).

Figura 20. Gel de SDS-PAGE representativo dos anticorpos purificados.



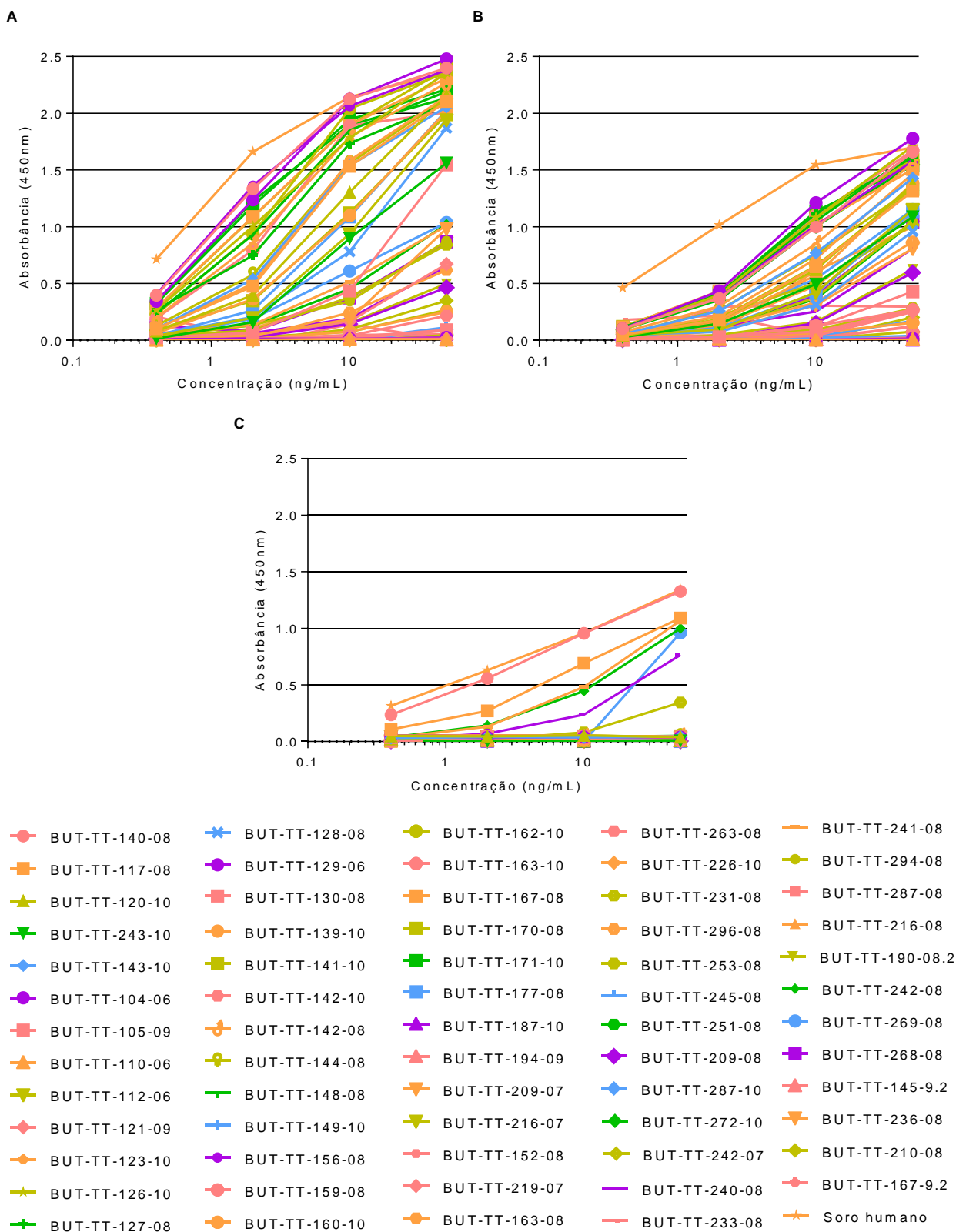
Gel de poliacrilamida 10% corado por nitrato de prata. **(A)** Amostas em condição não-redutora. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva). **(B)** Amostas em condição redutora com β -mercaptoetanol. M: Marcador de massa molecular LMW SDS Marker (Cytiva); 1-4: Anticorpos purificados.

4.7 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS mABS POR ELISA

Os anticorpos foram testados quanto à ligação à TeNT(BUT), à TT e ao Fragmento C. As concentrações testadas dos anticorpos foi de 0,4 a 50ng/mL e o soro de um doador vacinado foi utilizado como controle positivo.

Foram testados 64 anticorpos (41 obtidos no trabalho anterior e 23 obtidos nesse trabalho) dos quais 29 do trabalho anterior e 13 desse trabalho se ligaram à TeNT. Esses 42 mAbs também se ligaram ao TT (com menor intensidade) e 7 deles ao Fragmento C. Estes últimos foram testados no ensaio de inibição de ligação ao GT1b (Figura 21).

Figura 21. Ligação dos anticorpos monoclonais por ELISA.

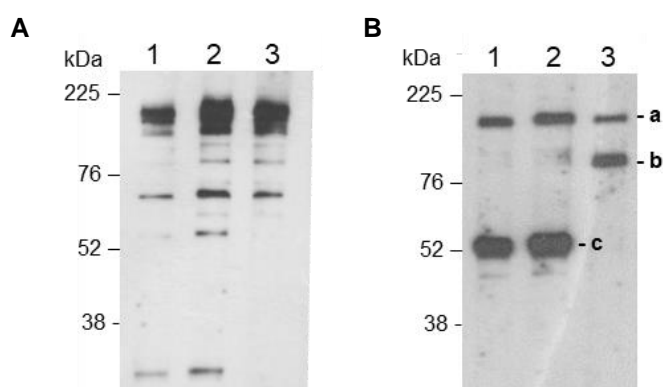


Placas sensibilizadas com **(A)** Toxina Tetânica 5µg/mL, **(B)** Anatoxina Tetânica 5µg/mL e **(C)** Fragmento C da Toxina Tetânica 2µg/mL. Os anticorpos foram testados nas concentrações de 0,4 a 50ng/mL.

4.8 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS mABS À TeNT E ÀS SUAS FRAÇÕES POR WESTERN BLOT

Todos os mAbs obtidos foram testados por *western blot* para verificar a ligação à TeNT(BUT) e às suas frações (Figura 22).

Figura 22. Filme representativo da ligação dos anticorpos à toxina e suas frações por *western blot*.



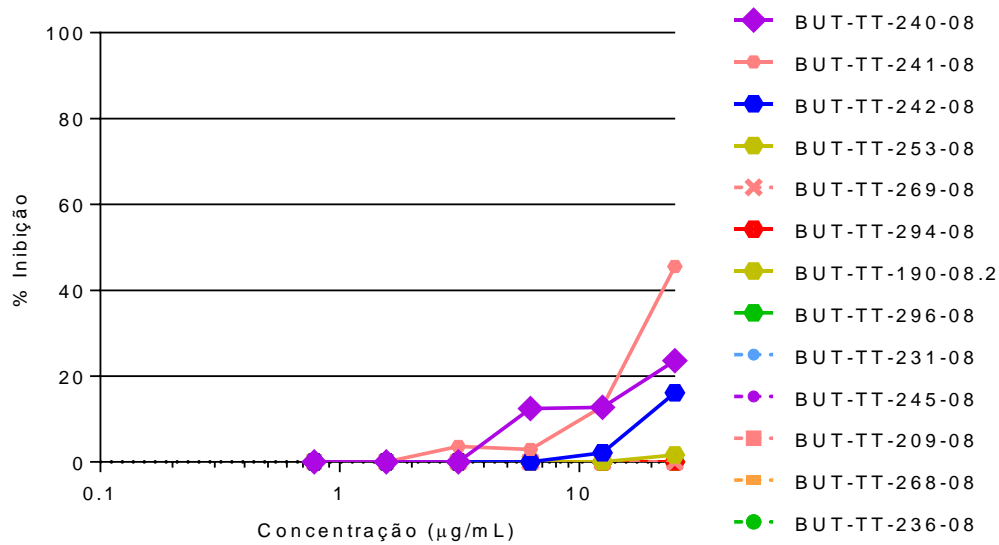
(A) Toxina Tetânica não reduzida. (B) Toxina Tetânica reduzida. a: TeNT íntegra; b: cadeia pesada; c: cadeia leve. Os anticorpos foram testados na concentração de 10ng/mL.

4.9 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1B

Os 13 anticorpos obtidos neste trabalho e que se ligaram à TeNT no teste de ELISA foram testados para avaliar a capacidade de inibição da ligação da TeNT ao gangliosídeo GT1b (Figura 23). A concentração inicial dos anticorpos foi de 25µg/mL. Como já esperado, apenas os mAbs que se ligam ao Fragmento C foram capazes de inibir, em diferentes níveis, a ligação ao GT1b. Nenhum anticorpo foi capaz de inibir 100% a ligação nas concentrações testadas. Dessa forma, os 7 anticorpos (2 obtidos no trabalho anterior e 5 obtidos nesse trabalho) que se ligam ao Fragmento C foram testados com a concentração máxima obtida. Foi possível observar um aumento da inibição em concentrações maiores, mas nenhum anticorpo foi capaz de inibir 100% a ligação da TeNT. Apenas o BUT-TT-140-08 parece ter chegado a um platô e, portanto, não podemos afirmar que esses são os valores máximos (Figura 24). O BUT-TT-117-08 não foi capaz de inibir a ligação neste ensaio, o que é inconsistente com o resultado obtido anteriormente (ALIPRANDINI, 2015). Como o mAb foi obtido por transfecção transitória e estava armazenado em geladeira, é possível que tenha

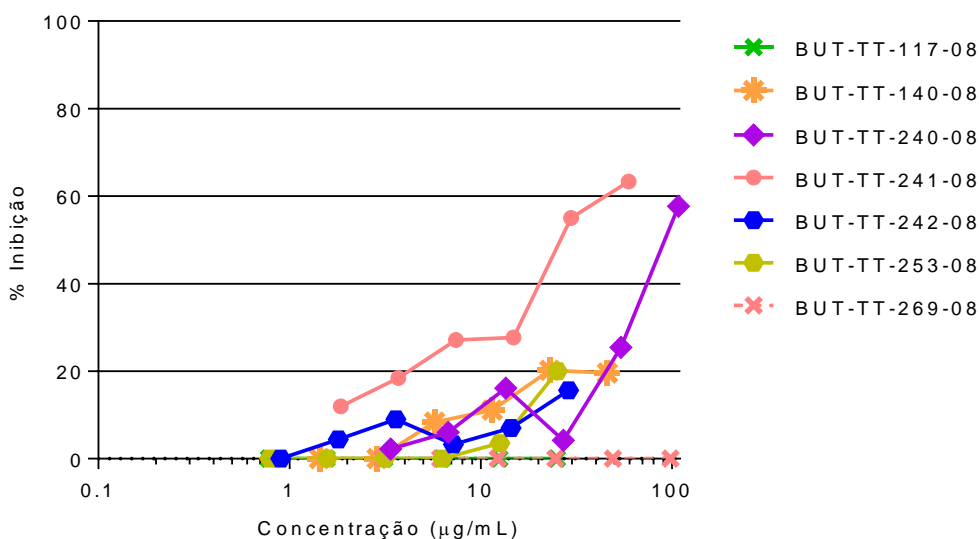
degradado. Foi realizado também o ensaio com misturas dos anticorpos utilizados no ensaio de neutralização. Apenas a mistura do BUT-TT-117-08 + BUT-TT-140-08 e BUT-TT-143-10 + BUT-TT-117-08 + BUT-TT-140-08 foram capazes de inibir parcialmente a ligação ao GT1b (Figura 25). O SAT foi utilizado como controle (Figura 26).

Figura 23. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b pelo mAbs.



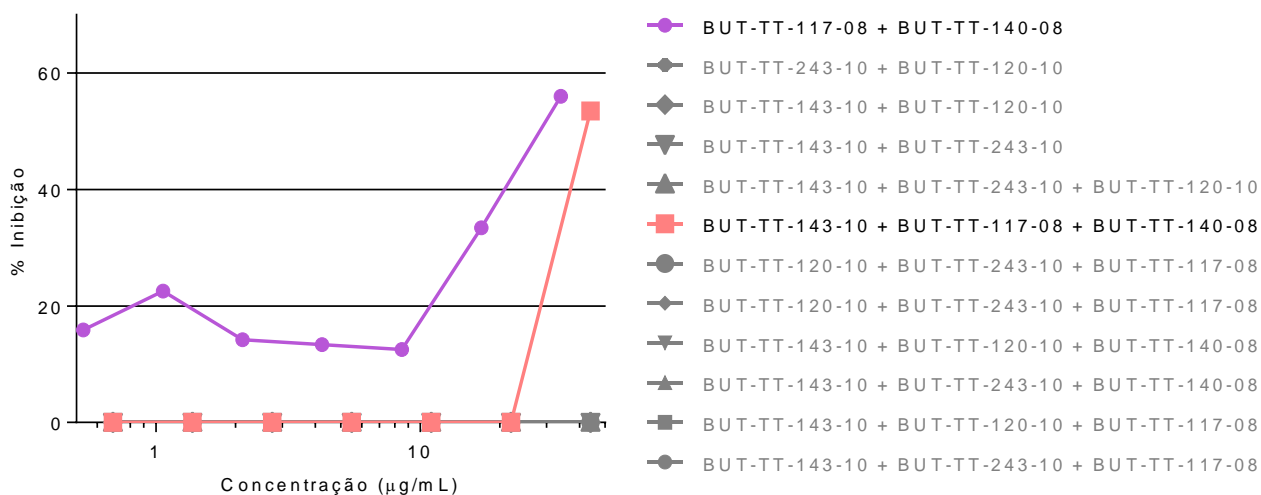
Os anticorpos monoclonais (mAbs) que se ligaram à TeNT no ELISA foram testados na concentração inicial de 25µg/mL. O ensaio foi realizado em duplicatas e em diluição seriada 1:2. O controle positivo foi realizado apenas com a TeNT.

Figura 24. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b pelos mAbs na concentração máxima obtida.



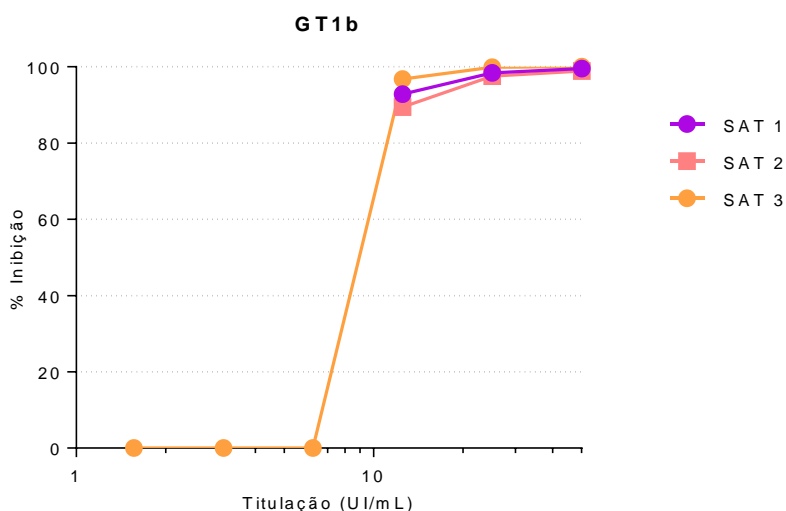
Os mAbs que se ligam ao Fragmento C foram testados na concentração máxima obtida pela purificação. O ensaio foi realizado em duplicatas e em diluição seriada 1:2. O controle positivo foi realizado apenas com a TeNT

Figura 25. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b utilizando mistura dos anticorpos testados *in vivo*.



A concentração inicial das misturas foi de 34µg/mL para a mistura BUT-TT-117-08 + BUT-TT-140-08 e de 44µg/mL para as demais misturas. As misturas de mAbs foram testadas em duplicatas e em diluição seriada 1:2. O controle positivo foi realizado apenas com a TeNT.

Figura 26. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT) ao gangliosídeo GT1b com soro antitetânico equino (SAT).



A concentração inicial do SAT foi de 50UI/mL e foi realizada diluição seriada 1:2. O controle positivo foi realizado apenas com a TeNT.

4.10 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO *IN VIVO*

O teste de neutralização foi realizado com 5 mAbs, conforme ensaio descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Esses mAbs foram escolhidos por se ligarem a diferentes regiões da toxina em ensaios de *western blot* e ELISA. Os mAbs BUT-TT-117-10 e BUT-TT-140-10 se ligam ao Fragmento C no ELISA, BUT-TT-143-08 se liga à toxina íntegra (sem agente redutor) e os mAbs BUT-TT-120-08 e BUT-TT-243-08 se ligam, respectivamente, às cadeias leve e pesada no *western blot*. Foram testados 10 grupos de anticorpos:

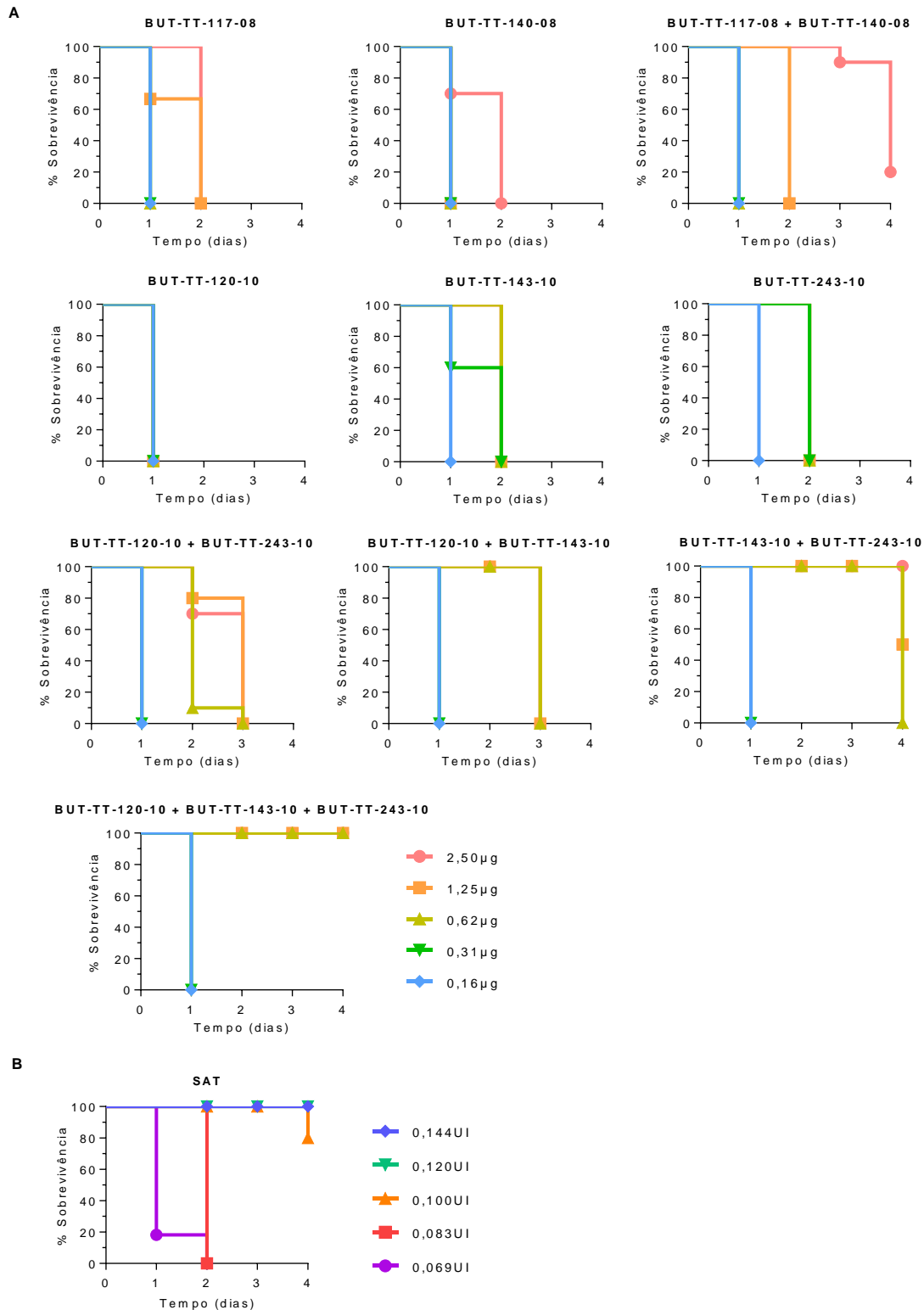
- Grupo 1: BUT-TT-117-10
- Grupo 2: BUT-TT-140-10
- Grupo 3: BUT-TT-117-10 + BUT-TT-140-10
- Grupo 4: BUT-TT-120
- Grupo 5: BUT-TT-143
- Grupo 6: BUT-TT-243
- Grupo 7: BUT-TT-120 + BUT-TT-243
- Grupo 8: BUT-TT-120 + BUT-TT-143
- Grupo 9: BUT-TT-143 + BUT-TT-243

-Grupo 10: BUT-TT-120 + BUT-TT-143 + BUT-TT-243

Em ensaio anterior (ALIPRANDINI *et al.*, 2019), a única mistura testada foi com os três anticorpos do grupo 10. Neste novo ensaio pré-clínico, buscou-se identificar a contribuição de cada um na neutralização da toxina, testados em duplas ou únicos.

Cada anticorpo ou mistura de anticorpos foi utilizado em cinco concentrações escalonadas, sendo 30µg/mL a concentração inicial. Foram incubadas misturas de concentrações seriadas 1:2 de cada anticorpo ou grupo de anticorpos com uma quantidade fixa de toxina, totalizando 2,4mL. Um volume de 0,2mL de cada mistura foi injetado subcutaneamente em 10 camundongos, totalizando 50 camundongos por grupo. Os animais foram observados por 96 horas para a verificação do número de mortos e cálculo da curva de sobrevivência (Figura 27).

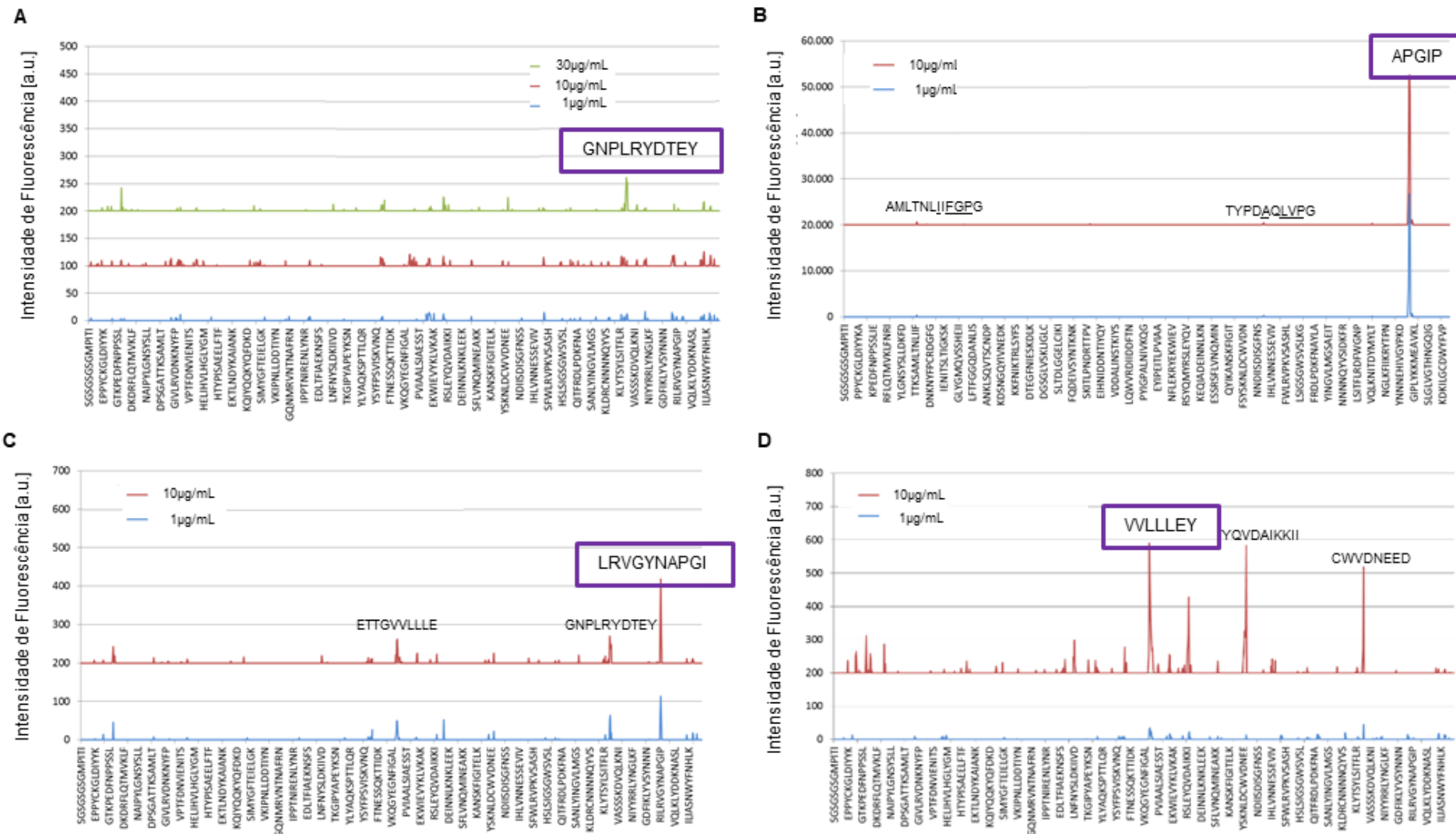
No grupo 10 (mistura dos três anticorpos), 100% dos animais que receberam 2,5µg e 1,25µg dos anticorpos sobreviveram. Já no grupo 9, com mistura de dois anticorpos (BUT-TT-143 + BUT-TT-243), houve 100% de sobrevivência na dose de 2,5µg por animal. Os demais grupos não foram capazes de neutralizar a ação da TeNT nos animais nas concentrações testadas, porém é possível que possam exercer alguma contribuição em outras composições.

Figura 27. Taxa de sobrevivência no ensaio de neutralização *in vivo*.

O ensaio foi realizado com camundongos Swiss de acordo com o teste de potência de soro hiperimune. **(A)** Uma quantidade fixa de toxina foi incubada com anticorpos e injetada subcutaneamente nos camundongos. Dessa forma, as quantidades de anticorpo injetadas em cada animal foram: 2,5 μg ; 1,25 μg ; 0,625 μg ; 0,3125 μg e 0,15625 μg . Os animais foram observados por 4 dias para a taxa de sobrevivência. **(B)** Um soro antitetânico de referência foi utilizado como controle e para cálculo da potência dos anticorpos.

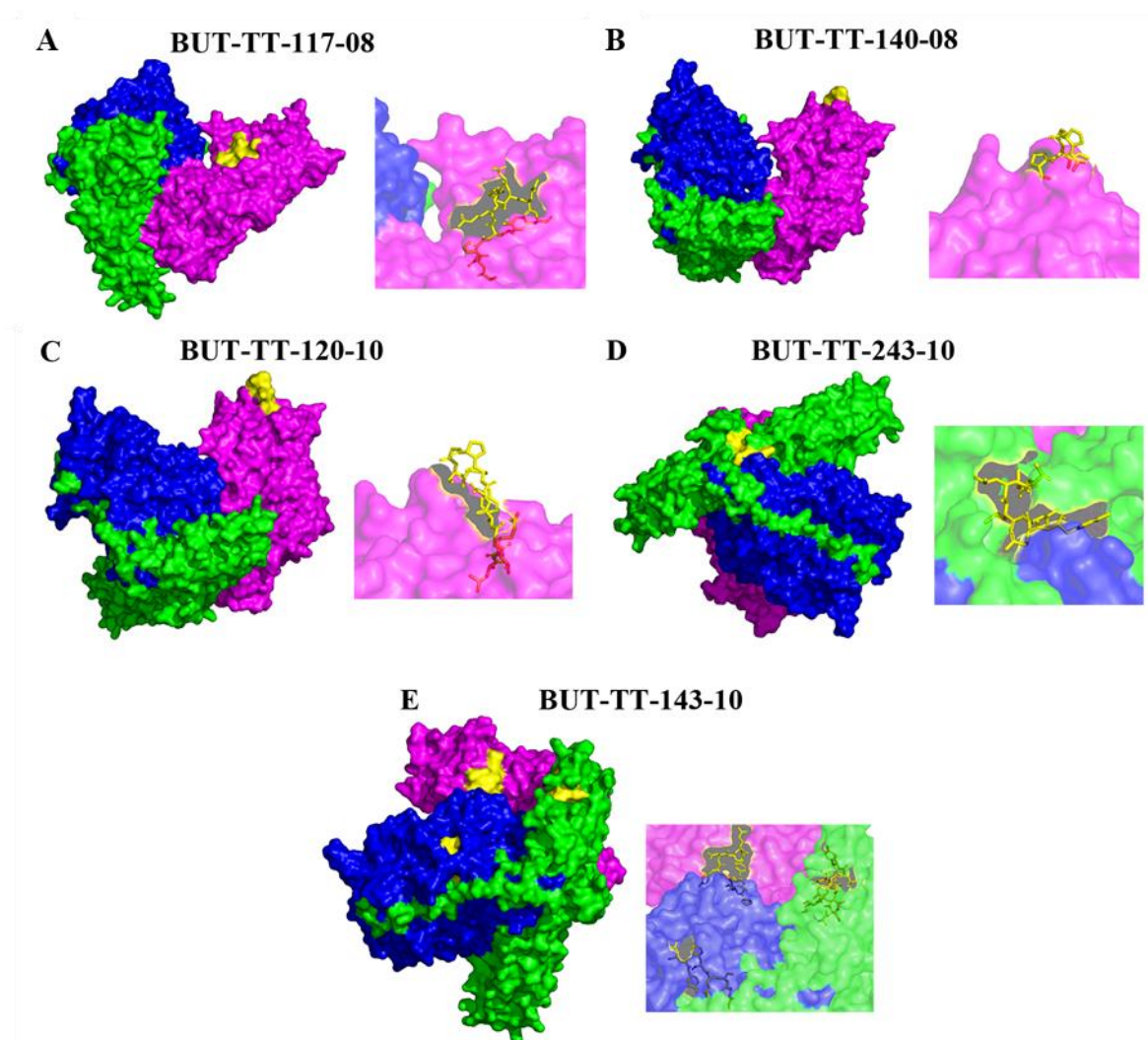
4.11 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

Cinco mAbs foram analisados por *microarray* de peptídeos da TeNT para identificar seus epítomos de ligação. Dos quatro mAbs testados em peptídeos lineares, o mAb BUT-TT-117-08 apresentou uma resposta muito fraca (260 a.u.) contra um único epítomo G¹¹¹⁹NPLRYDTEY (Figura 28A), que está presente no Fragmento C (Figura 29A). O mAb BUT-TT-140-08 respondeu fortemente (> 50.000 a.u.) a um único epítomo cujo motivo consenso é A¹²³¹PGIP (Figura 28B), que também está presente no Fragmento C (Figura 29B). O mAb BUT-TT-120-10 mostrou uma resposta fraca, mas clara (400 a.u.) contra o epítomo L¹²²⁵RVGYNAPGI (Figura 28C), que faz parte do local de ligação do ácido siálico (Figura 29C), e também apresentou uma ligação inespecífica com o motivo consenso E⁶⁶⁶TTGVVLLLE. A incubação com o mAb BUT-TT-243-10 mostrou uma resposta fraca (600 u) contra peptídeos adjacentes cujo motivo consenso é V⁶⁷¹LLEY (Figura 28D), que está localizado no domínio de translocação do TeNT (Figura 29D). A ligação ao Y⁷⁴⁷QVDAIKKII and C⁸⁶⁹WVDNEED parece ser inespecífica, já que os sinais, apesar de fortes, eram pontuais, ou seja, não foi observada uma curva ao mudar a sobreposição dos aminoácidos. O mAb BUT-TT-143-10 foi analisado com peptídeos cíclicos (Figura 30), uma vez que se esperava uma ligação de epítomo conformacional devido à sua ligação apenas ao TeNT não reduzido no *western blot*. Este mAb produziu uma resposta forte (15.000-20.000 a.u.) e complexa contra peptídeos adjacentes com motivos consenso EYYD ou DTEY. Os três epítomos reconhecidos, E⁶⁷GASEYYD, A⁷⁵¹IKYIDYEY e P¹¹²¹LRYDTEY estão localizados em diferentes domínios da toxina: domínio de ação proteolítica, translocação e ligação, respectivamente (Figura 29E). No ELISA, o mAb BUT-TT-143-10 não se ligou ao Fragmento C e, em WB, ligou-se apenas à toxina não reduzida.

Figura 28. Gráfico da ligação dos mAbs aos peptídeos lineares da TeNT em *peptide array*.

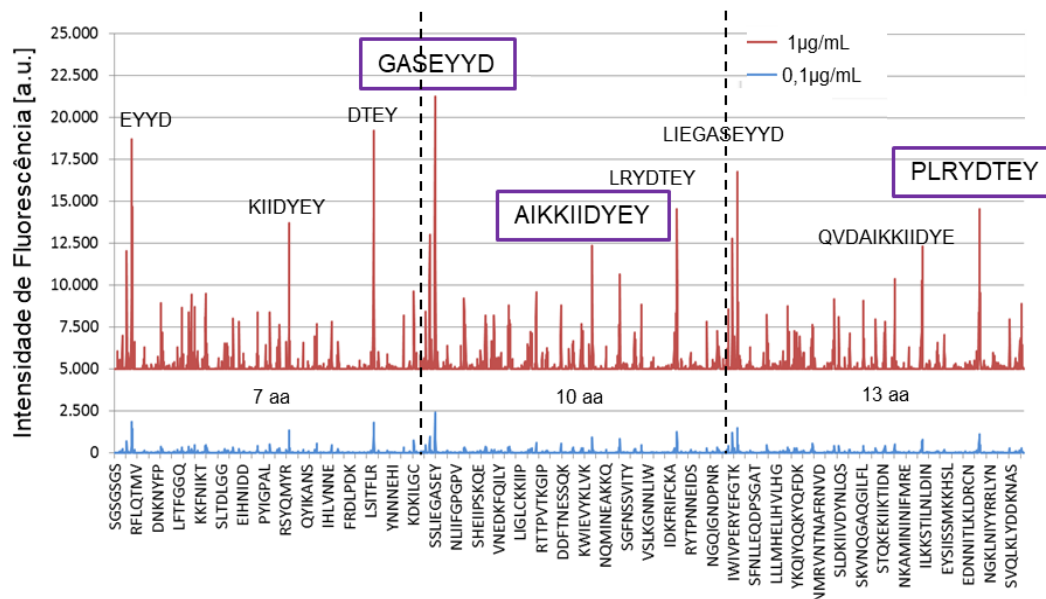
A TeNT foi traduzida em peptídeos de 13 aminoácidos com uma sobreposição de 12 aminoácidos. Os testes foram realizados com os mAbs nas concentrações de 30µg/mL e/ou 10µg/mL e 1 µg/mL. **(A)** BUT-TT-117-08; **(B)** BUT-TT-140-08; **(C)** BUT-TT-120-10; **(D)** BUT-TT-243-10.

Figura 29. Representação da estrutura da TeNT com as regiões de epítomos identificados para cada mAb, após ensaio por *epitope array*.



Em azul, está representada a cadeia leve (região catalítica) da toxina. Em verde, está representado o domínio de translocação e em rosa o Fragmento C, ambos formam a cadeia pesada da toxina. Em amarelo estão os epítomos reconhecidos por cada mAb, segundo o *peptide array*. Visão completa: representação em superfície, demonstrando a acessibilidade do epítopo. Zoom: representação em *stick*. Essas representações foram geradas a partir da estrutura cristalográfica da TeNT disponível em banco de dados (PDB: 5n0b). Fonte: (ALIPRANDINI *et al.*, 2019).

Figura 30. Gráfico da ligação do mAb BUT-TT-143-10 aos peptídeos circulares da TeNT em *epitope array*.



A TeNT foi traduzida em peptídeos de 7, 10 ou 13 aminoácidos com sobreposições de 6, 9 e 12 aminoácidos, respectivamente. Os testes foram realizados com o mAb nas concentrações de 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

4.12 ELISA COMPETITIVO

Os mAbs foram agrupados segundo seus epítomos topográficos. O princípio do ensaio é que se mAb#1 e mAb#2 se ligam ao mesmo epítomo, a TeNT do complexo mAb#2-TeNT não estará disponível para se ligar ao mAb#1. Dessa forma, os mAbs apresentarão valor de competição > 50% de maneira mútua, o que indica uma competição. A competição parcial e os valores negativos (aumento da ligação) podem ser por natureza alostérica ou mudança eletrostática após a ligação do competidor (NAGATA; NUMATA; ONDA; ISE *et al.*, 2004). Os três mAbs capazes de neutralizar a TeNT no teste *in vivo* reconheceram diferentes regiões da toxina por WB e este padrão foi confirmado pelo ensaio de competição (Tabela 5).

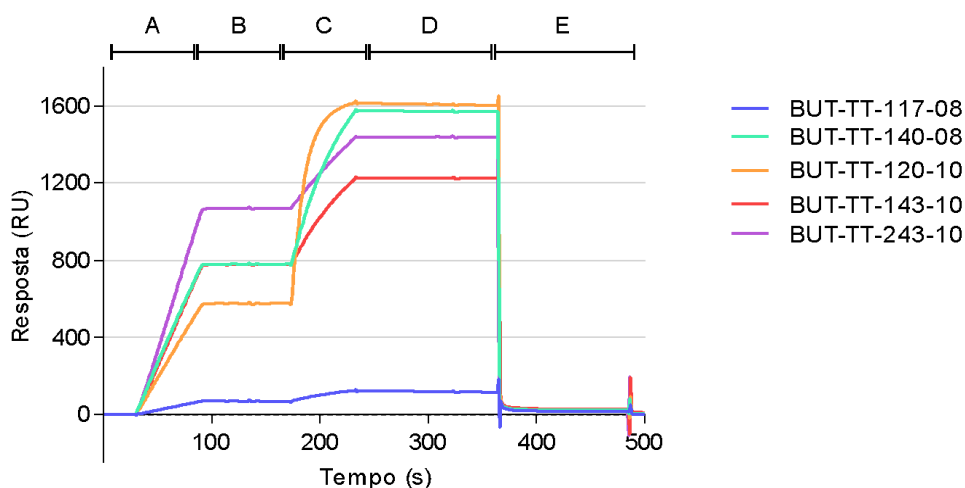
Tabela 5. ELISA competitivo

mAb#1	% de competição na presença do mAb#2 (competidor) indicado		
	BUT-TT-143-10	BUT-TT-243-10	BUT-TT-120-10
BUT-TT-143-10	99	42	16
BUT-TT-243-10	-20	100	-18
BUT-TT-120-10	11	48	101

4.13 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (*SURFACE PLASMON RESONANCE - SPR*)

Os anticorpos foram injetados a 8 μ g/mL para captura pela proteína A imobilizada no *sensor chip*. Em seguida, foi injetada a TeNT a 20 μ g/mL.

Figura 31. Gráfico do teste de ligação dos mAbs antitetânicos e TeNT com captura.



Os anticorpos testados *in vivo* foram injetados a 8 μ g/mL para a captura pela proteína A imobilizada no *sensor chip* (A). Posteriormente, foi realizada etapa para dissociação (B). A TeNT foi injetada a 20 μ g/mL (C) e depois dissociada (D). No final foi realizada a regeneração do *sensor chip* (E).

Os mAbs foram testados na mesma concentração, mas não apresentaram o mesmo perfil de captura (Tabela 6). A resposta de ligação à TeNT foi diferente para cada anticorpo, o que era esperado, já que são anticorpos distintos.

Tabela 6. Valores Δ Captura, Δ TeNT e Δ TeNT/ Δ Captura obtidos por Ressonância Plasmônica de Superfície (BIAcore)

mAb	Δ Captura	Δ TeNT	Δ TeNT/ Δ Captura
BUT-TT-117-08	69	53	0,77
BUT-TT-140-08	778	798	1,03
BUT-TT-120-10	574	1039	1,81
BUT-TT-143-10	778	448	0,58
BUT-TT-243-10	1067	373	0,35

4.14 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA (TOXIN BINDING INHIBITION ASSAY - TOBI)

Para a titulação *in vitro* dos anticorpos antitetânicos foi realizado o Ensaio de Inibição da Ligação da Toxina (ToBI). O teste é realizado para titulação de soros humanos ou equinos e foi validado para uso de titulação no Instituto Butantan (HENDRIKSEN *et al.*, 1988).

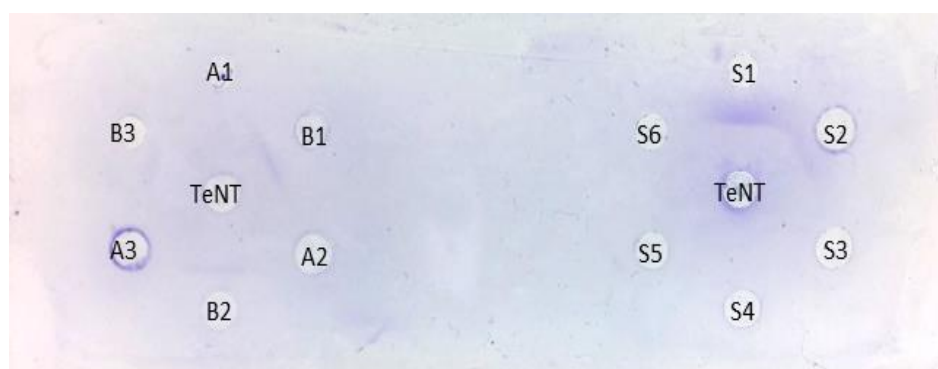
Os anticorpos testados pelo ensaio *in vivo* foram testados isoladamente e não foi possível calcular os títulos. É coerente que a ligação dos mAbs à TeNT pelos seus epítomos não impeça que outros epítomos fiquem disponíveis para a ligação ao soro antitetânico (policlonal) imobilizado na placa. Dessa forma, foram testadas misturas de anticorpos em diversas concentrações. Porém, mesmo em concentrações elevadas 192 μ g/mL (mistura de 3 anticorpos com concentração de 64 μ g/mL cada), não foi possível titular os anticorpos. Acredita-se que mesmo com três anticorpos, epítomos ficam disponíveis para ligação no soro antitetânico. Dessa forma, não seria possível a utilização desse ensaio para a titulação *in vitro* dos anticorpos monoclonais antitetânicos.

4.15 IMUNODIFUSÃO

Os anticorpos foram testados por ensaio de imunodifusão para avaliar a capacidade de precipitação. No poço central, 5 μ g de TeNT foi pipetado em um volume de 10 μ L. Os anticorpos foram pipetados nos demais poços. Não houve precipitação

quando os anticorpos foram testados isoladamente (Figura 32). Posteriormente, duplas aleatórias e o trio de mAbs BUT-TT-143-10 + BUT-TT-243-10 + BUT-TT-120-10 também foram testados. Os anticorpos em dupla ou trio foram pipetados de forma que os todos os mAbs da mistura tinham a mesma massa, em um volume total de 10 μ L. O controle foi realizado com soro antitetânico. Não foi possível observar precipitação nos poços com nenhuma dupla testada. O trio de anticorpos que foi capaz de neutralizar a toxina também apresentou precipitação quando a massa total aplicada foi de 1,95 μ g e 0,97 μ g. O teste se tornou complicado de executar, uma vez que o volume que cabia nos poços era de 10 μ L e os mAbs tinham como limitação a concentração obtida da purificação. Dessa forma, alguns poderiam não ter massa suficiente para precipitar.

Figura 32. Gel de imunodifusão.



A: BUT-TT-143-10, 1,95 μ g (A1), 0,97 μ g (A2), 0,49 μ g (A3); **B:** BUT-TT-143-10 + BUT-TT-243-10 + BUT-TT-120-10, 1,95 μ g (B1), 0,97 μ g (B2), 0,49 μ g (B3). **S:** Soro antitetânico (1000UI/mL), diluições 1:2, com diluição inicial (S1) 1:200.

4.16 VETORES PARA OBTENÇÃO DE LINHAGENS PERMANENTES

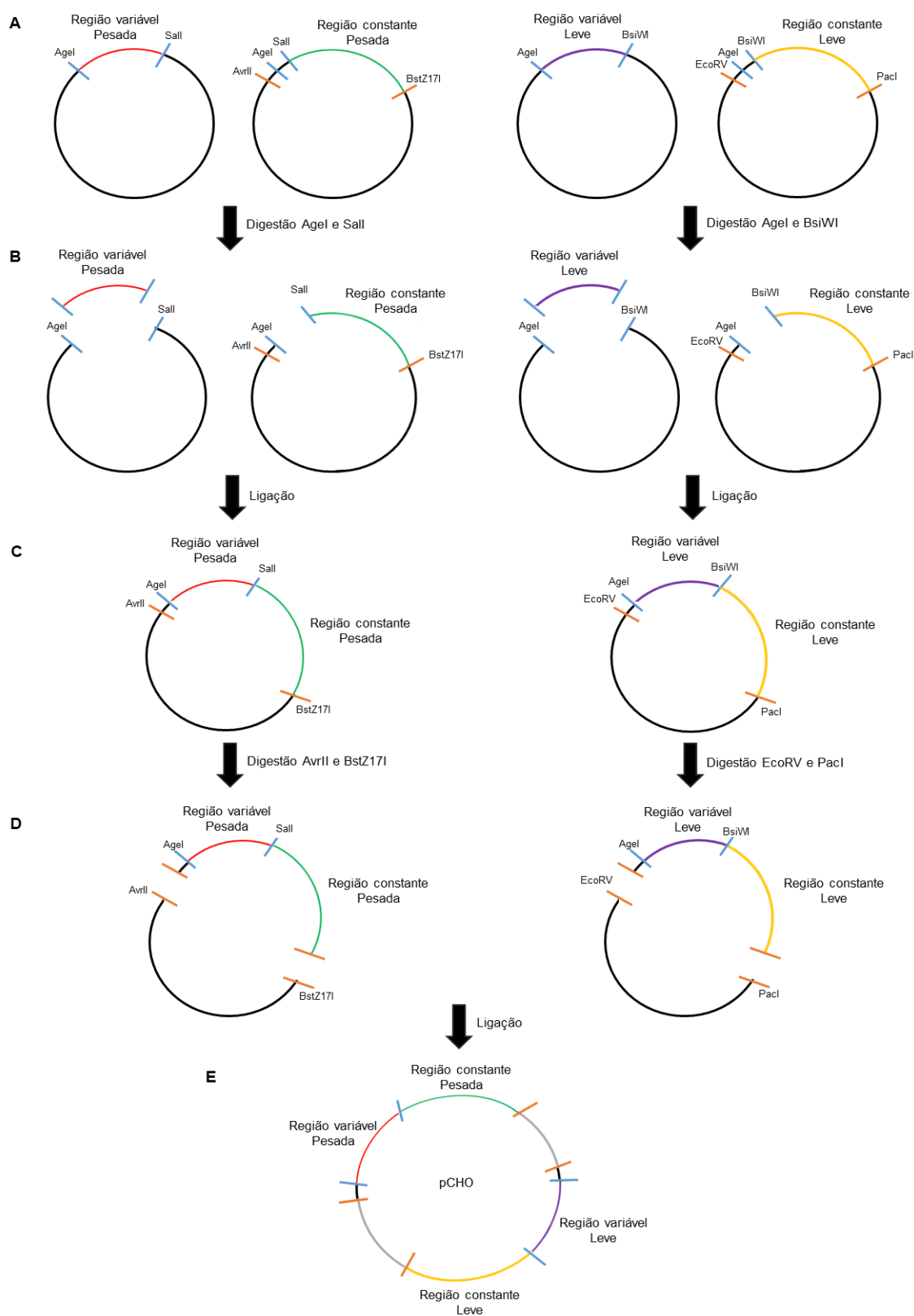
Para o processo de caracterização dos mAbs, as quantidades produzidas pela transfecção transitória eram insuficientes. Além disso, algumas diferenças nos resultados podem ser causadas por esse método de expressão transitória dos mAbs, em diferentes ocasiões. Para dar continuidade ao projeto, decidimos adotar a estratégia de obtenção de linhagem permanente de expressão dos mAbs utilizados no ensaio de neutralização *in vivo*.

Foi encomendada a síntese de vetores que contém sequências codificadoras das regiões constantes das cadeias pesada *gama* 1 e leve Kappa humanas.

Realizamos etapas consecutivas de digestão e ligação para montarmos sequências completas, contendo a região constante das cadeias pesada e leve (sequências sintetizadas) e as respectivas regiões variáveis originais, obtidas diretamente da sequência de linfócitos B humano (117O, 120O, 140O, 243O e 143O). Para comparação com essa estratégia, foi encomendada a síntese de vetores com região variável de dois mAbs, BUT-TT-117-08 e BUT-TT-120-10, com otimização de códons, identificados como 117T e 120T. Após a execução das mesmas etapas anteriormente descritas para as sequências originais, foram obtidos vetores contendo a região constante das cadeias pesada e leve e as respectivas regiões variáveis sintetizadas e com otimização de códons (117T e 120T).

Os vetores contendo as cadeias variáveis (sintetizados ou originais) foram digeridos para a liberação do inserto e os vetores com as cadeias constantes foram digeridos para a linearização (Figura 33B). Essas digestões foram realizadas com as enzimas de restrição AgeI-HF para todos os vetores, e com Sall-HF ou BsiWI para as cadeias pesada e leve, respectivamente. A ligação foi realizada e, dessa forma, cada vetor passou a conter uma cadeia completa - pesada ou leve (Figura 33C). Uma nova digestão foi realizada para liberar a região completa da cadeia leve e para linearizar o vetor pCHO entre os sítios das enzimas PacI e EcoRV (Figura 33D). A cadeia leve foi, então, inserida ao vetor pCHO. A mesma etapa foi realizada com a cadeia pesada, porém o vetor pCHO (já contendo a cadeia leve) foi linearizado entre os sítios das enzimas AvrII e BstZ17I (Figura 33E).

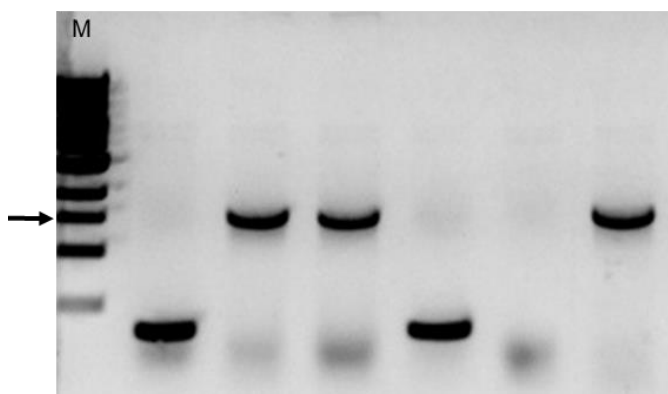
Figura 33. Esquema da clonagem com vetores sintetizados.



(A) Vetores sintetizados, contendo região constante ou variável de cada cadeia. **(B)** Digestão para a linearização do vetor contendo a região constante e para a retirada da sequência da região variável de cada cadeia. **(C)** Ligações do inserto (região variável) com o vetor com a região constante da cadeia correspondente. **(D)** Digestão para a retirada das sequências inteiras (variável e constante) de cada anticorpo. **(E)** Ligações de cada sequência em um sítio do vetor pCHO.

Após cada digestão, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados. Após cada etapa de ligação, bactérias competentes TOP-10 foram transformadas com os vetores por choque térmico e 5 colônias aleatórias foram submetidas à PCR de colônias para verificar a presença do inserto (Figura 34).

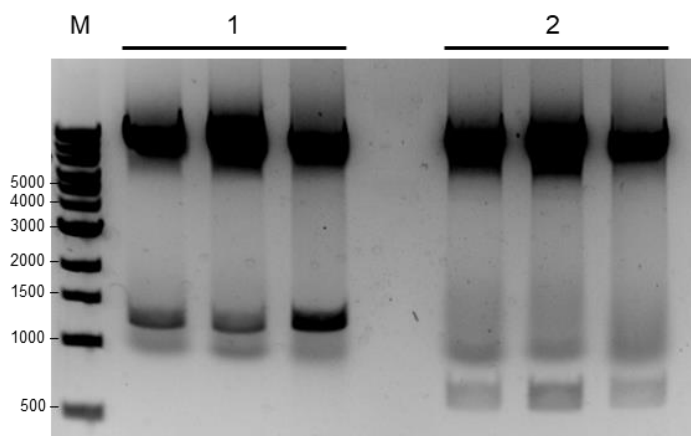
Figura 34. Gel representativo dos fragmentos amplificados por PCR das colônias.



Gel de agarose 0,8% corado com SyBR Safe. M: Marcador Quick-Load® 1 kb Extend DNA Ladder (NEB); As ampliações com o tamanho esperado de 1500pb (seta) indicam a presença do inserto na colônia testada.

Com o vetor completo, montado corretamente, foram realizadas as digestões com as enzimas AvrII e BstZ17I para a cadeia pesada e EcoRV e PaeI para a leve para confirmar a presença dos insertos das cadeias pesadas e leves no vetor pCHO (Figura 35). Os vetores foram sequenciados para verificar a ausência de mutações.

Figura 35. Gel representativo dos produtos de digestão dos vetores pCHO.



Gel de agarose 0,8% corado com SyBR Safe. M: Marcador Quick-Load 1 kb Extend DNA Ladder (NEB); 1: amostras digeridas com AvrII e BstZ17I para verificar a presença cadeia pesada; 2: amostras digeridas com EcoRV e PacI para verificar a presença cadeia leve.

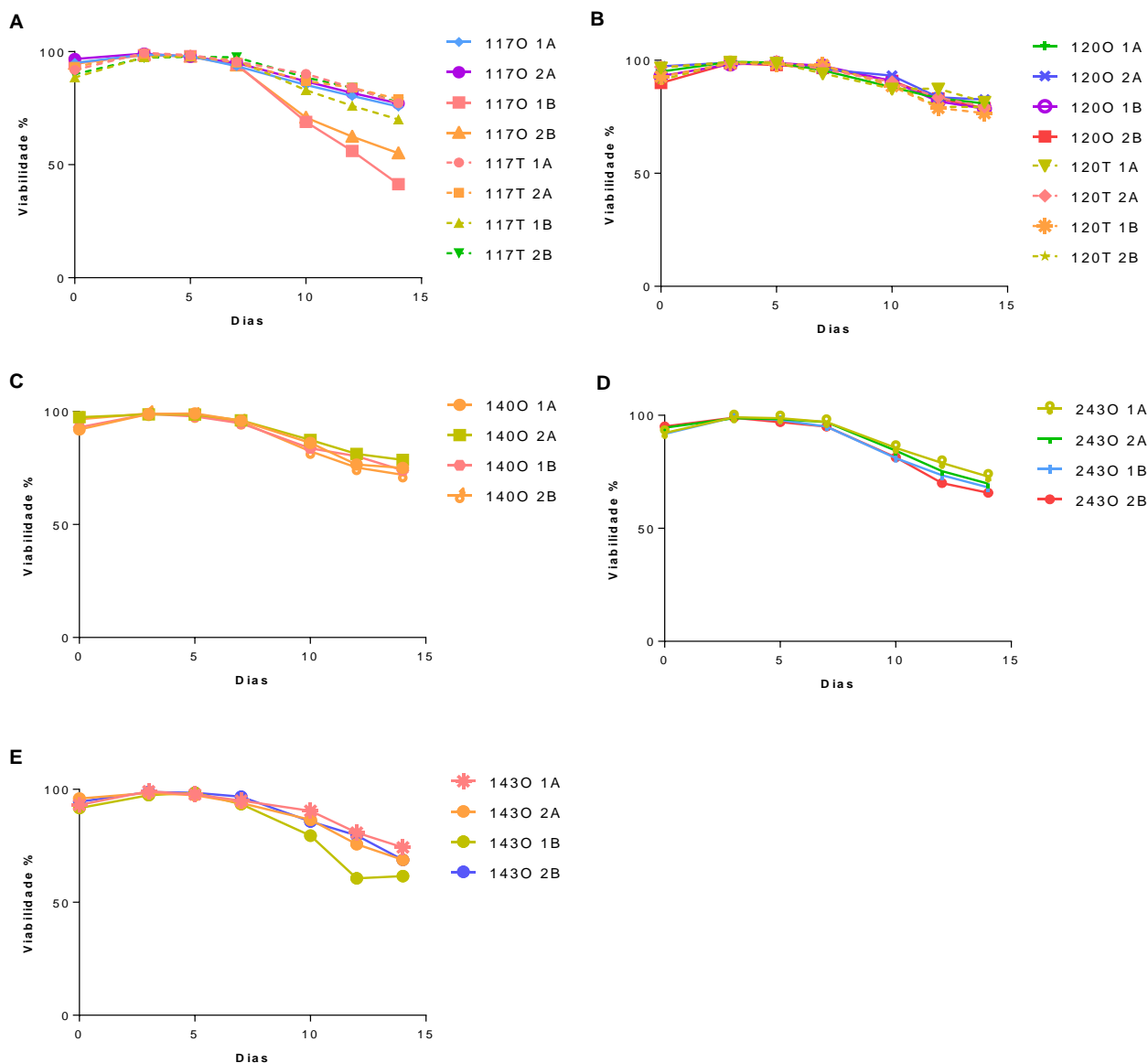
4.17 GERAÇÃO DE LINHAGENS PERMANENTES

Células CHO-S Cells (Gibco) foram transfectadas com cada vetor para a expressão dos cinco anticorpos com sequência original e dois com sequência otimizada. As etapas de seleção foram realizadas em duas etapas, conforme orientação do fabricante do Kit de transfecção Freedom™ CHO-S™ Kit (Gibco). A primeira etapa foi realizada com os agentes de seleção Puromicina e Metotrexato (MTX) em duas condições: 1 - 10P/100M: Puromicina 10µg/mL + MTX 100nM; 2 - 20P/200M: Puromicina 20µg/mL + MTX 200nM. Na segunda etapa, as condições foram: A - 30P/500M: Puromicina 30µg/mL + MTX 500nM; B - 50P/1000M: Puromicina 50µg/mL + MTX 1000nM

4.18 EXPRESSÃO DOS mABS EM LINHAGEM PERMANENTE

Após o processo de seleção, as populações estáveis mistas foram cultivadas em batelada por 14 dias. Amostras foram coletadas nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14 para avaliação da viabilidade celular (Figura 36) e expressão dos mAbs.

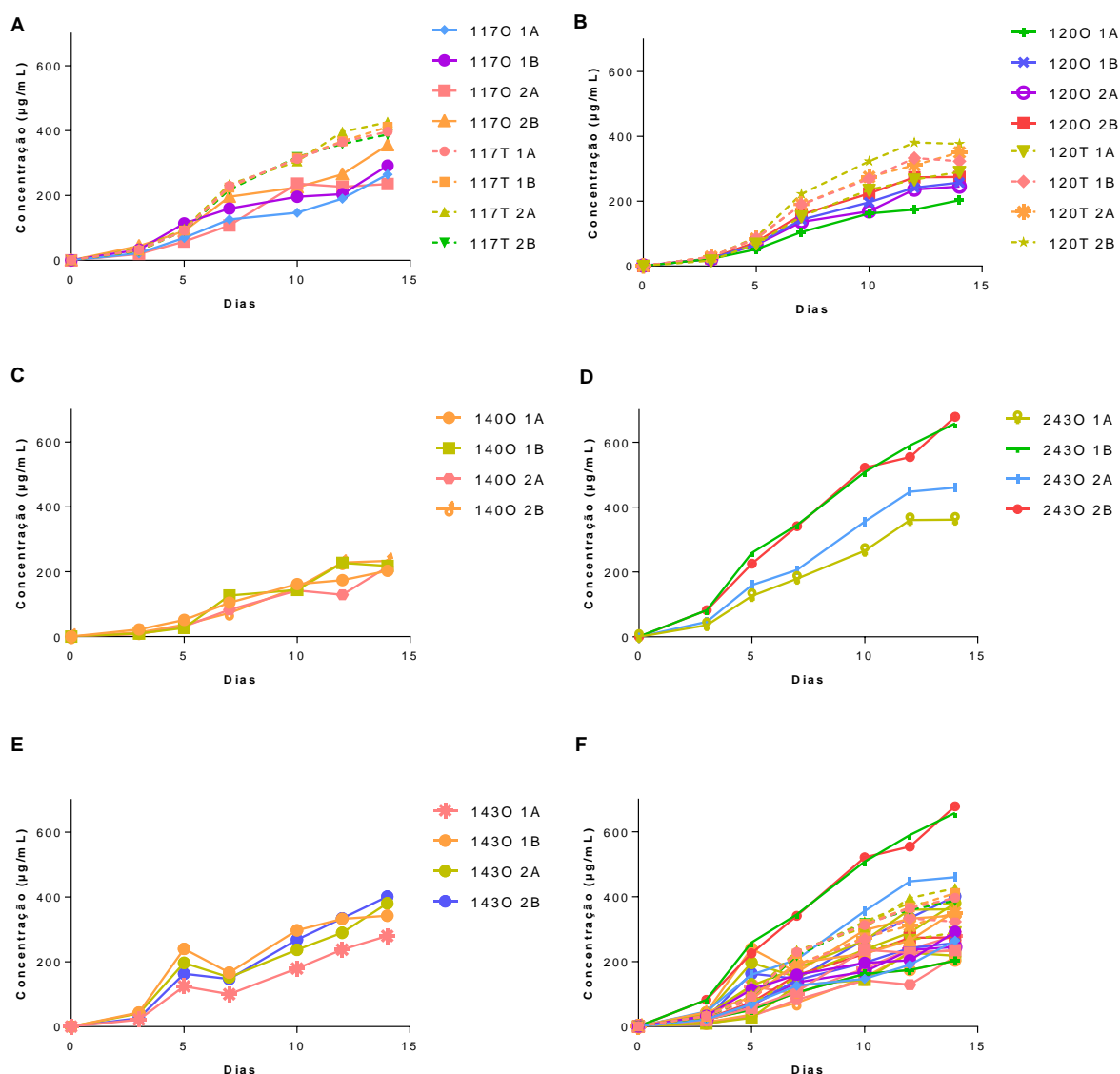
Figura 36. Gráficos da viabilidade celular dos cultivos.



Cada gráfico representa a viabilidade celular dos cultivos (1A, 1B, 2A e 2B) de um mAb nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14. As linhas contínuas representam os cultivos das transfeções com vetores com as sequências variáveis originais; e as linhas pontilhadas representam os cultivos das transfeções com vetores com as sequências variáveis sintetizadas e otimizadas (**A e B**).

Foi realizada a quantificação, por SPR, dos mAbs presentes no sobrenadante nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14 dos cultivos (Figura 37). Os anticorpos foram capturados pela proteína A imobilizada no sensor CM5 e titulados utilizando uma curva padrão com anti-TNF α de concentração conhecida. Foi possível verificar uma diferença na expressão dos anticorpos obtidos pela transfeção com vetores com as sequências original e dos obtidos pela transfeção com vetores com as sequências sintetizadas e otimizadas (Figura 37 A e B).

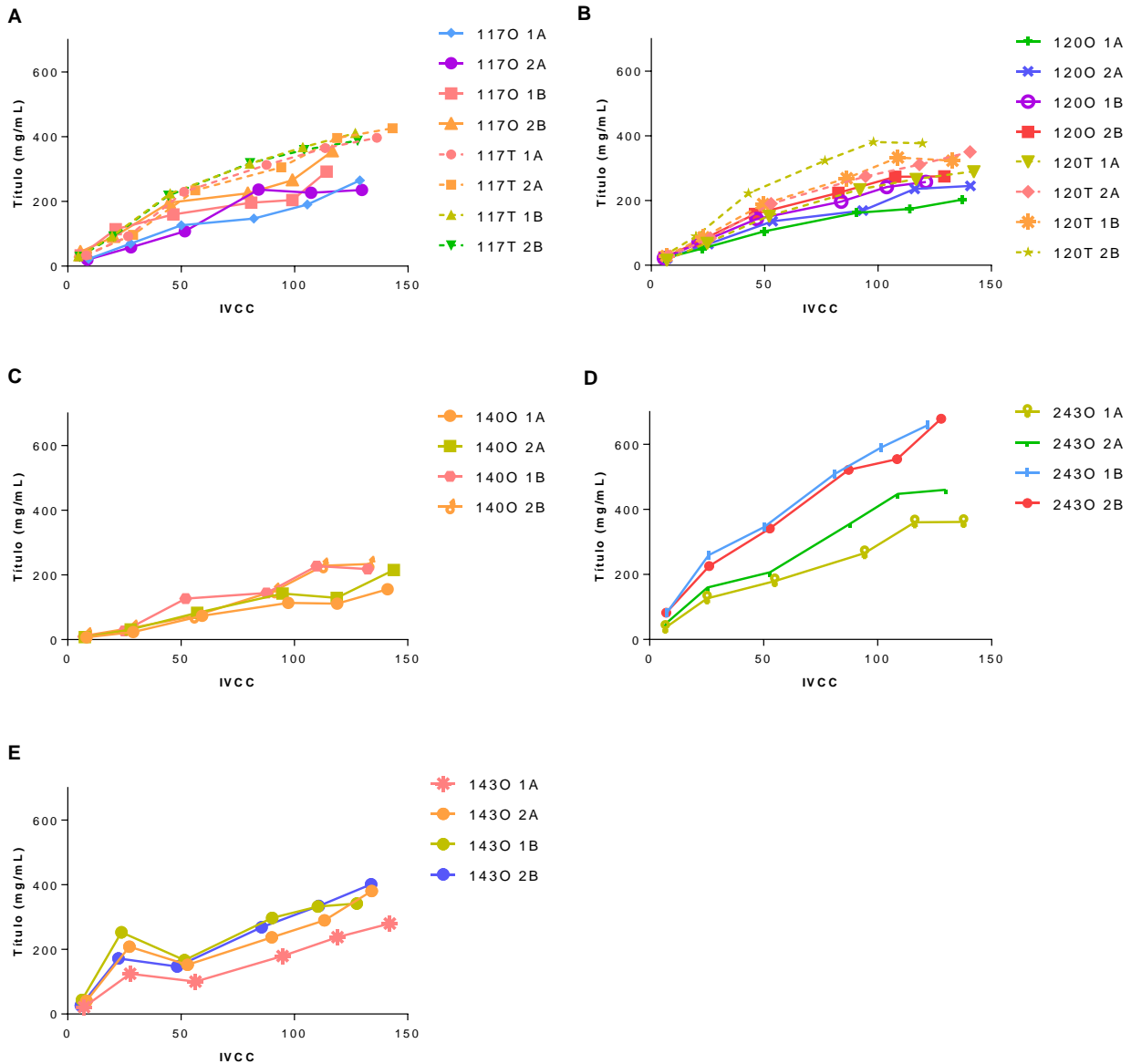
Figura 37. Gráfico da dosagem dos mAbs por ressonância plasmônica de superfície (SPR).



Foi utilizado sensor CM5 proteína A imobilizada. Cada gráfico representa a dosagem das amostras dos cultivos (1A, 1B, 2A e 2B) de um mAb nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14. O último gráfico contém todas as amostras. As linhas contínuas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis originais; e as linhas pontilhadas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis sintetizadas e otimizadas.

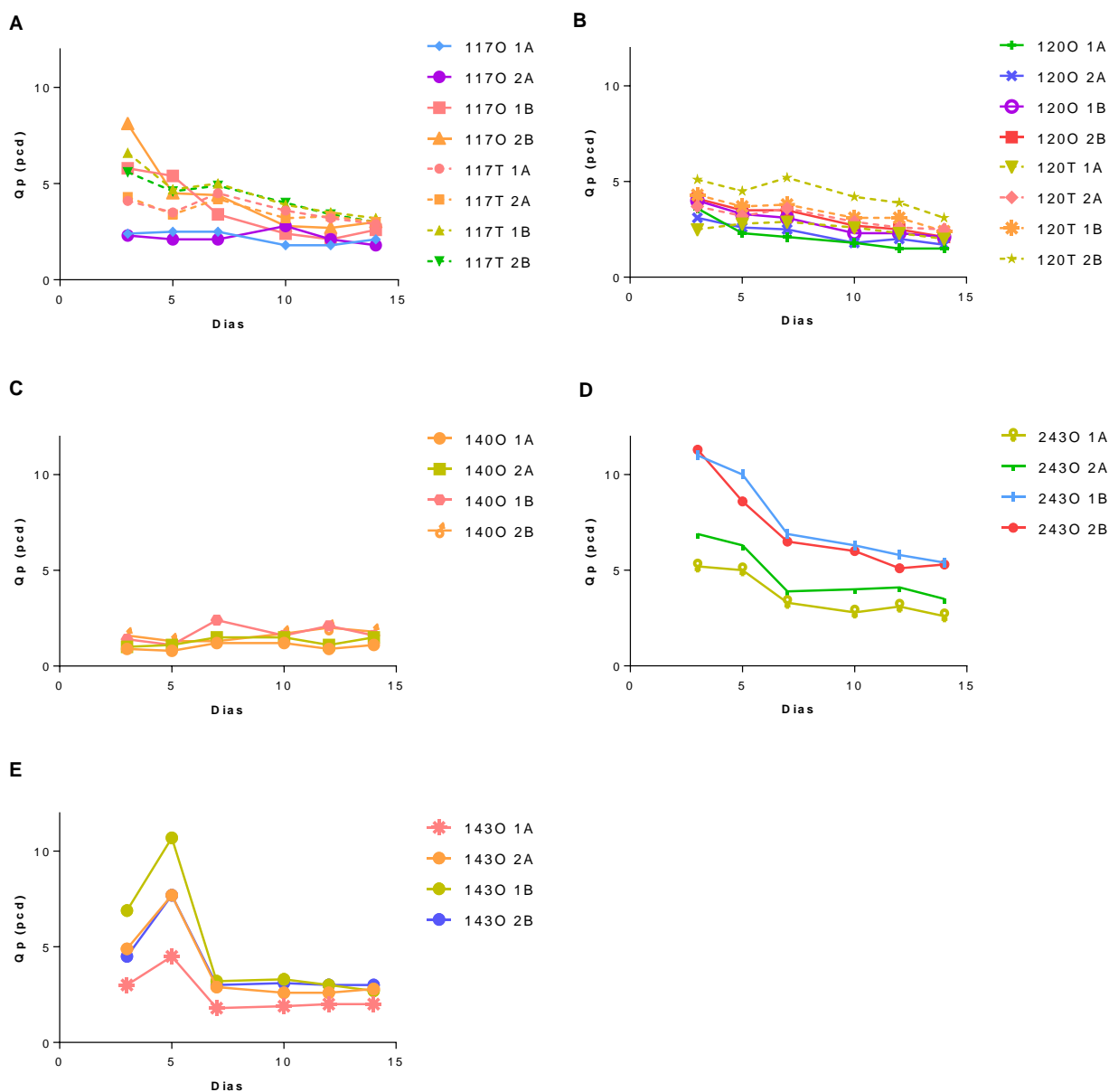
Foi calculada a integral da concentração de células viáveis (IVCC - *integral of viable cell concentration*). Na Figura 38, estão os gráficos que relacionam a expressão dos mAbs *versus* a integral da concentração de células viáveis. Foi também calculada a produtividade específica de cada cultivo nos dias de amostragem do cultivo (Figura 39).

Figura 38. Gráfico do título (mg/mL) x IVCC (*integral of viable cell concentration*).



Cada gráfico representa a relação entre a expressão de cada mAb pela integral de células viáveis dos cultivos (1A, 1B, 2A e 2B) nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14. As linhas contínuas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis originais; e as linhas pontilhadas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis sintetizadas e otimizadas.

Figura 39. Gráfico da produtividade específica.

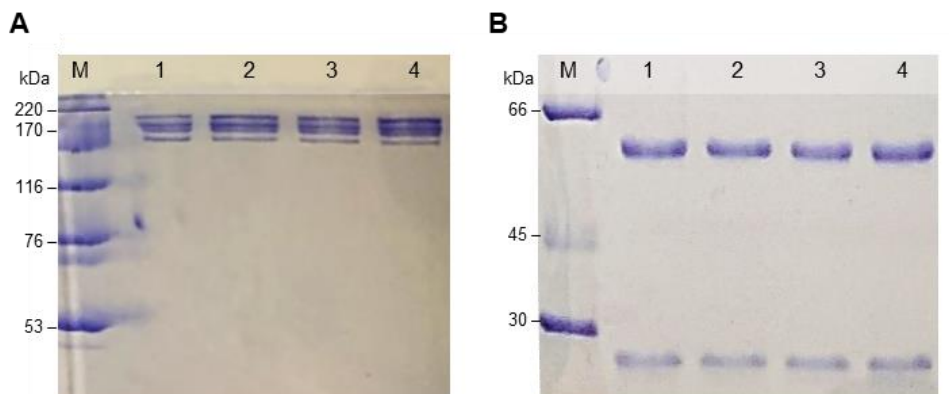


Cada gráfico representa a produtividade específica de cada cultivo (1A, 1B, 2A e 2B) nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14. As linhas contínuas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis originais; e as linhas pontilhadas representam os cultivos das transfecções com vetores com as sequências variáveis sintetizadas e otimizadas.

Após os 14 dias, o sobrenadante foi coletado e os anticorpos purificados por cromatografia de afinidade com resina de Proteína A.

Foi realizada SDS-PAGE em condições não redutoras (Figura 40A) e redutoras (Figura 40B) para avaliar a integridade dos anticorpos. O padrão de corrida dos mAbs é semelhante, independente da transfecção ter sido realizada com vetor com a sequência sintetizada e otimizada ou com a sequência original, obtida no laboratório.

Figura 40. Gel representativo dos anticorpos purificados.

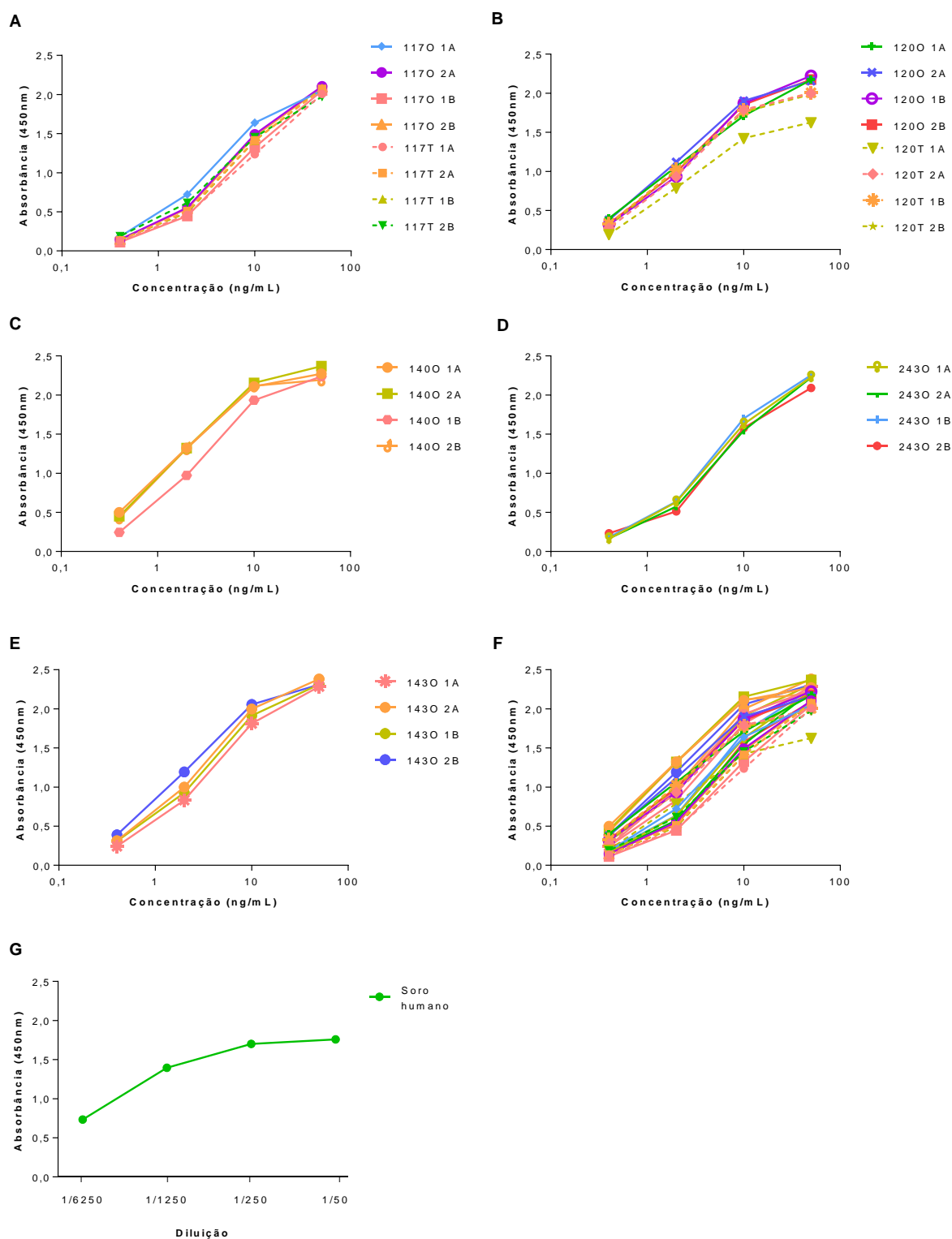


Géis de poliacrilamida 10% corados com azul de coomassie 0,2%. **(A)** Amostras em condição não-redutora. M: Marcador de massa molecular HMW SDS Marker (Cytiva) **(B)** Amostras em condição redutora. M: Marcador de massa molecular LMW SDS Marker (Cytiva); 1 e 2: Anticorpos purificados obtidos pela transfecção com vetores com as sequências original; 3 e 4 – Anticorpos purificados obtidos pela transfecção com vetores com as sequências sintetizadas e otimizadas.

4.19 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS mABS POR ELISA

A ligação dos anticorpos produzidos pelas células CHO à TeNT comercial foi testada por ELISA. Foram testados os mAbs purificados obtidos nos cultivos 1A, 1B, 2A e 2B. As placas foram sensibilizadas com TeNT comercial 2 μ g/mL. Os anticorpos foram diluídos seriadamente 1:5 nas concentrações de 50ng/mL a 4ng/mL O soro de um doador vacinado foi utilizado como controle positivo. O ensaio foi realizado apenas uma vez, mas pode indicar que não houve diferença entre os cultivos do mesmo mAb, ou seja, nem o tipo de sequência do vetor (sintetizado ou original) e nem as condições de seleção alteraram a ligação do mAb à TeNT (Figura 41).

Figura 41. Ligação dos anticorpos monoclonais em produção estável à toxina tetânica (TeNT) por ELISA.



Placa sensibilizada com TeNT 2µg/mL. Os anticorpos purificados de cada cultivo foram testados nas concentrações de 0,4 a 50ng/mL. O soro de um dador vacinado foi utilizado como controle positivo. As linhas contínuas representam os cultivos das transfecções com vetores com as seqüências variáveis originais; e as linhas pontilhadas representam os cultivos das transfecções com vetores com as seqüências variáveis sintetizadas e otimizadas.

4.20 AFINIDADE NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Foi realizado o ensaio de afinidade no estado estacionário dos anticorpos. O ensaio com a imobilização da TeNT no sensor não foi possível, provavelmente porque epítomos ficam indisponíveis no processo de imobilização. Assim, decidiu-se imobilizar os mAbs em sensor de proteína A, que direciona a imobilização ao Fc dos anticorpos e deixa livres as regiões Fab. A toxina foi testada em diluições seriadas 1:4 (100µg/mL a 1,5625µg/mL). A Tabela 7 contém os valores do $K_D(M)$ calculados.

Tabela 7. $K_D(M)$ calculado de cada mAb pelo ensaio de afinidade no estado estacionário.

mAb	$K_D(M)$	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
117O	$2,58 \times 10^{-7}$	135,3	3,03
117T	$1,61 \times 10^{-7}$	192,8	3,15
120O	$2,41 \times 10^{-8}$	539,1	75,6
120T	$2,23 \times 10^{-8}$	615	64,6
140O	$1,10 \times 10^{-7}$	93,4	0,59
143O	$2,45 \times 10^{-7}$	8,9	0,0211
243O	$6,08 \times 10^{-7}$	559,4	0,242

Como esperado, os valores de $K_D(M)$ dos mAbs 117T e 117O são bem próximos, e o mesmo acontece para o 120T e 120O.

4.21 AFINIDADE CINÉTICA

O ensaio de afinidade cinética foi realizado com os mAbs imobilizados no sensor com proteína A. O cálculo não foi possível porque não havia dissociação em tempos mais curtos. Dessa maneira, foi utilizado o tempo de 36000s, o máximo permitido pelo equipamento, para dissociação. Mesmo com o tempo extenso, o $K_D(M)$ dos mAbs 243O, 143O e 117O não foi calculado porque não houve dissociação.

Tabela 8. K_a , k_d e $K_D(M)$ calculados de cada mAb pelo ensaio de afinidade cinética

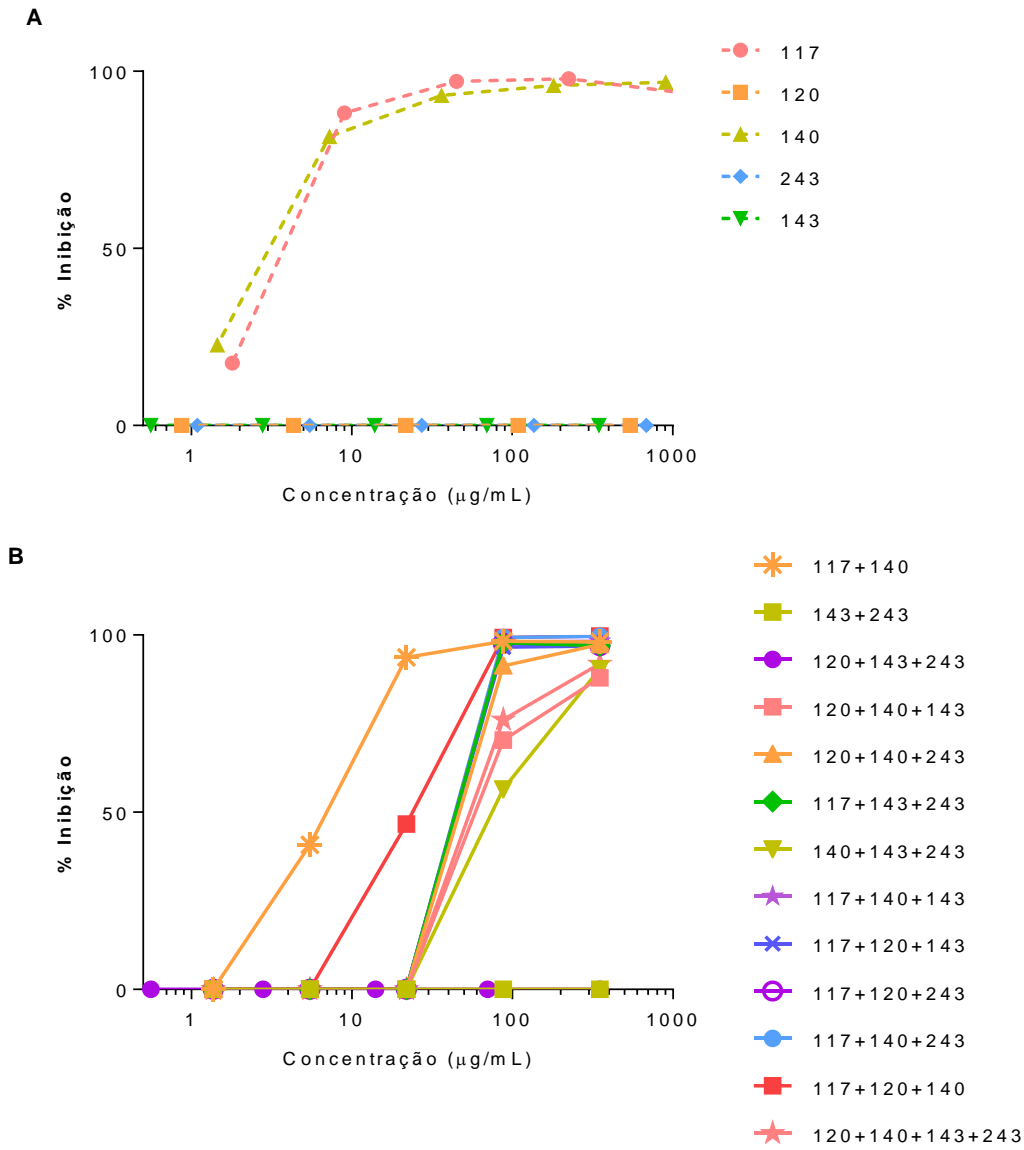
mAb	$k_a (M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (M)$
1200	$3,65 \times 10^5$	$7,70 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^{-10}$
1400	$8,65 \times 10^4$	$3,92 \times 10^{-5}$	$4,54 \times 10^{-10}$
2430	$7,68 \times 10^3$	ND	ND
1430	$6,61 \times 10^3$	ND	ND
1170	$6,33 \times 10^3$	ND	ND

ND = Não Determinado. Não houve dissociação no período de 36000s.

4.22 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA TOXINA AO GT1B

Os novos mAbs expressos foram avaliados quanto à capacidade de inibição da ligação da TeNT comercial ao gangliosídeo GT1b isoladamente (Figura 42A) e em misturas (Figura 42B). Quando realizamos esse ensaio anteriormente (item 4.9), a concentração dos mAbs foi o fator limitante no experimento. Além disso, o BUT-TT-117-08 apresentou sinais de degradação. Através da transfecção estável, foi possível a expressão de maiores quantidades dos mAbs. Dessa forma, repetimos o ensaio utilizando a concentração obtida na purificação dos mAbs. Confirmando os resultados anteriores, mesmo em maiores concentrações, apenas os mAbs que se ligam ao Fragmento C foram capazes de inibir a ligação ao GT1b quando utilizados isoladamente. Com a utilização de concentrações maiores, foi possível verificar uma inibição muito próxima de 100% pelos mAbs 1170 e 1400. Algumas misturas também foram capazes de inibir, em diferentes níveis, a ligação ao GT1b. Porém, essa resposta parece estar associada à presença do 1170 e/ou 1400 na mistura.

Figura 42. Gráfico do ensaio de inibição da ligação da Toxina (TeNT comercial) ao gangliosídeo GT1b.



As misturas foram testadas na concentração inicial de 350µg/mL, seguida de diluição seriada 1:4. Os mAbs das misturas tinham a mesma massa. O controle positivo foi realizado apenas com a TeNT.

5 DISCUSSÃO

Foram testados 64 anticorpos, dos quais 42 se ligaram à TeNT e ao TT. A entrada da TeNT nos neurônios é precedida pela ligação do Fragmento C da toxina aos gangliosídeos presentes na membrana dessas células e, como esperado, aqueles que se ligam ao Fragmento C da TeNT foram capazes de inibir a ligação da TeNT ao gangliosídeo GT1b. Porém, essa capacidade de bloqueio da ligação pelos mAbs BUT-TT-117-08 e BUT-TT-140-08 não foi suficiente, nas concentrações testadas no ensaio *in vivo*, para neutralização da toxina. A alta afinidade de ligação da toxina aos gangliosídeos depende da ocupação de dois sítios (R e W) do gangliosídeo (LUO *et al.*, 2012). Embora os mAbs BUT-TT-117-08 e BUT-TT-140-08 não se liguem a esses sítios, a inibição pode ocorrer pela alteração conformacional da toxina ou pelo impedimento estérico causado pela ligação com os mAbs (LUO *et al.*, 2012). A não ocupação desses locais pode explicar por que não houve proteção *in vivo*.

Para neutralizar a TeNT, é preciso bloquear múltiplos epítomos (WANG *et al.*, 2016). A combinação de mAbs tem um efeito sinérgico por três mecanismos: i) a ligação de um mAb pode aumentar a afinidade do outro mAb; ii) a formação de imunocomplexos maiores leva a uma eliminação mais rápida por fagocitose; iii) o bloqueio de múltiplos epítomos, aumenta a chance de bloquear múltiplas etapas de toxicidade da toxina, como ligação ao receptor, translocação, dissociação das cadeias (DIAMANT *et al.*, 2015). Dessa forma, é coerente que a mistura de três anticorpos tenha demonstrado capacidade de neutralizar a toxina em teste *in vivo*, mostrando que há um efeito sinérgico, causado pela ligação de cada anticorpo a uma região diferente da toxina. Quando dois mAbs foram combinados, tendo como alvo a cadeia pesada (BUT-TT-243-10) e a toxina inteira não clivada (BUT-TT-143-10), os animais não apresentaram os sintomas típicos da toxicidade causada pela TeNT, na maior concentração disponível de mAb (1,25 µg de cada). Apesar da análise estatística estabelecida na Farmacopeia para esse ensaio excluir a capacidade neutralizante dessa concentração, não exclui a possibilidade da dupla BUT-TT-143-10 + BUT-TT-243-10 em neutralizar a toxina em maiores concentrações (não testado). O controle positivo, realizado com soro antitetânico de referência, não se baseia em concentração de anticorpos específicos e sim U.I. de anticorpos com capacidade neutralizante, o que dificulta uma comparação direta. Nenhum desses mAbs se liga

ao Fragmento C no ELISA, portanto, o bloqueio da TeNT em outros domínios, além do domínio de ligação, parece pertinente para a neutralização da toxina.

O mAb BUT-TT-120-10 apresentou resultados conflitantes em WB, ELISA e mapeamento de epítomos. O mapeamento indica um epítopo na cadeia pesada da TeNT, porém este mAb liga-se à cadeia leve em WB e não reage ao Fragmento C por ELISA. O arranjo de epítomos foi construído com peptídeos lineares e fixos no *microarray*, que podem não representar a conformação real da TeNT. Provavelmente, este mAb reconhece um peptídeo presente na cadeia leve da toxina, como claramente demonstrado pelo WB. Além disso, um outro anticorpo, clonalmente relacionado ao BUT-TT-120-10, apresentou os mesmos resultados em WB e ELISA.

A metodologia para a obtenção dos anticorpos monoclonais humanos antitetânicos proposta por esse trabalho resulta em uma quantidade grande de anticorpos. Esses anticorpos precisam ser triados *in vitro* de forma a prever quais devem ser testados *in vivo*, para sua caracterização e também para classificação dos melhores candidatos para futuro uso terapêutico. No ensaio de neutralização *in vivo* proposto pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010), para o teste de cada amostra, é necessário um grupo com 50 animais e um grupo controle também com 50 animais. Visando o uso racional de animais, tentamos padronizar alguns testes como forma de classificar e triar os exemplares que realmente possuem potencial para o ensaio *in vivo*. O ToBI (HENDRIKSEN *et al.*, 1988) é utilizado para a titulação *in vitro* de soros policlonais, porém não funcionou a contento para os anticorpos monoclonais (isolados ou em duplas e trios) e, portanto, não é um preditor de neutralização de mAbs. Também realizamos teste de imunodifusão para verificar a capacidade de precipitação dos mAbs, isolados ou em grupos. Porém, com a concentração dos mAbs obtida pela transfecção transitória não permitia avaliar os mAbs adequadamente. Tentamos fazer uso da plataforma *zebrafish* para avaliar a capacidade de neutralização dos mAbs. Primeiramente, tentamos fazer os testes com os embriões, porém eles são muito sensíveis, o que dificulta a padronização do ensaio. Em seguida, decidiu-se testar a toxicidade da toxina com as larvas do *zebrafish*, mas também não foi possível seguir com os ensaios, pela dificuldade em estabelecer um corte confiável entre controle positivo e negativo, já que algumas larvas sem adição de TeNT também morreram. Iniciou-se uma tentativa de uso de *softwares online* para verificar a possibilidade de usar a análise *in silico* para triagem dos mAbs, mas os *softwares* utilizados eram gratuitos e demoravam para gerar resultados e quando geravam, a quantidade de

dados era imensa, principalmente pelo tamanho grande das duas proteínas analisadas (anticorpo e TeNT).

Devido à dificuldade em analisar um painel grande de anticorpos, somada à limitação na expressão dos mAbs, decidimos nos dedicar aos mAbs que neutralizam a toxina tetânica. Para a avaliação dos mAbs precisamos da TeNT como antígeno. Nos testes iniciais, utilizamos a TeNT(BUT) fornecida pelo Instituto Butantan, porém sua produção está suspensa e não há novos lotes. Recebemos algumas amostras estocadas, mas estavam degradadas. Como tentativa de obter o antígeno, recebemos o vetor pET28a/TeNT R372A/Y375F, gentilmente cedido pelo Dr Stenmark (Stockholm University), para expressarmos a toxina recombinante TeNT(RY). Essa toxina apresenta uma His6 na porção N terminal e, devido a duas mutações pontuais (R372A e Y375F), não tem atividade catalítica, ou seja, é atóxica (ROSSETTO *et al.*, 2001; BLUM *et al.*, 2014). Conseguimos expressar a toxina, porém a produção não teve alto rendimento, mesmo em fermentador com condições controladas. Além disso, a utilização da toxina recombinante atóxica é limitada para alguns ensaios porque se trata de cadeia única, enquanto a toxina nativa possui 2 cadeias ligadas por ponte S-S. Por fim, compramos a toxina de cultivo bacteriano produzida pela empresa List Biologicals Laboratories, INC.

Quando o problema do antígeno foi resolvido e realizamos os ensaios, percebemos alteração nas propriedades esperadas dos mAbs. Não foi realizado um estudo de estabilidade, mas é possível que os mAbs tenham sofrido uma certa degradação durante o período de espera para conseguir a TeNT. A administração do processo para termos mAbs recém-expressos e TeNT para realizar os ensaios ao mesmo tempo foi complicada porque são processos laboriosos. Para melhor caracterização dos mAbs, foi decidido partir para a obtenção de uma linhagem permanente de expressão desses mAbs. Para termos autonomia na geração de linhagens permanentes de mAbs, analisamos e montamos sequências para a síntese de vetores contendo sequências para a expressão das regiões constantes das cadeias pesada e leve humanas. Dessa forma, é possível clonar sequências de regiões variável, possibilitando a expressão de diversos mAbs no laboratório. Realizamos também a compra de vetores sintetizados pela GeneArt com as regiões variáveis otimizadas dos mAbs BUT-TT-117-08 e BUT-TT-120-10, para comparação com as sequências geradas no laboratório. Ou seja, expressamos os 117T e 120T através de vetores com as regiões variáveis sintetizadas e otimizadas e os 117O e 120O através de vetores

com as regiões variáveis originais. Após a montagem das sequências dos mAbs em vetor pCHO, a integridade das sequências foi checada por sequenciamento. A checagem correta confirmou que os vetores sintetizados possibilitam a clonagem de qualquer região variável de anticorpo que se queira expressar no laboratório.

A análise das amostras do cultivo em diferentes dias (0, 3, 5, 7, 10, 12 e 14) mostrou diferença na produção de mAbs obtidos com vetores com sequências sintetizadas e otimizadas (117T e 120T) e sequências originais (117O e 120O). A diferença na produção não parece estar relacionada à IVCC e sim à produtividade específica das células. Portanto, o processo de otimização de códons aumentou a produção dos mAbs enquanto população estável mista. É possível que a clonagem das populações mistas resultantes das sequências originais resulte na seleção de clones mais produtivos.

Nos ensaios de ligação e de afinidade a utilização da sequência otimizada ou original não apresentou mudanças no resultado. Esse é um ponto importante já que se espera que a otimização da sequência altere apenas o processo de expressão do mAb e não a sua funcionalidade.

Todos os mAbs testados no ensaio de afinidade cinética apresentaram baixa dissociação. E os mAbs 243O, 143O e 117O não dissociaram no intervalo de 36000 segundos. Considerando que a TeNT é capaz de se ligar aos receptores e ser internalizada pelos neurônios, e que, após a internalização, não é possível a neutralização da TeNT, é importante que os anticorpos antitetânicos se liguem à TeNT e permaneçam ligados para conseguirem neutralizar a ação da toxina.

6 CONCLUSÕES

-Os anticorpos que se ligam à TeNT também reconhecem o TT.

-No ensaio *in vivo*, a capacidade de bloqueio parcial da ligação da TeNT ao Fragmento C não foi suficiente, nas concentrações testadas, para neutralização da toxina *in vivo*.

-Nas condições testadas, somente a mistura de três mAbs que se ligam a diferentes domínios da TeNT foi neutralizante.

- A ligação a diferentes domínios da TeNT foi importante para a neutralização verificada no ensaio *in vivo*, demonstrando a importância do sinergismo para a ação neutralizante da toxina.

-É possível neutralizar a TeNT bloqueando domínios que não sejam o de ligação aos receptores de membrana.

-O ensaio ToBI, que é utilizado para a titulação *in vitro* de soros policlonais, não funcionou para a titulação dos anticorpos monoclonais (isolados ou em duplas e trios).

-Os mAbs BUT-TT-117-08 e BUT-TT-140-08 foram capazes de inibir próximo de 100% a ligação da TeNT ao GT1b.

-Houve diferença na produtividade específica dos mAbs obtidos com vetores com sequências com códons otimizados e sequências originais.

- Os mAbs apresentaram baixa ou nenhuma dissociação, no tempo de 36000s, no ensaio de Afinidade cinética, sugerindo afeidade alta dos mAbs e farmacocinética favorável para anticorpos com potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIPRANDINI, E. **Obtenção de anticorpos monoclonais humanos antitetânicos**. 2015. (Tese) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo.
- ALIPRANDINI, E.; TAKATA, D. Y.; LEPIQUE, A.; KALIL, J. *et al.* An oligoclonal combination of human monoclonal antibodies able to neutralize tetanus toxin in vivo. **Toxicon X**, 2, p. 100006, Apr 2019.
- ALMAGRO, J. C.; DANIELS-WELLS, T. R.; PEREZ-TAPIA, S. M.; PENICHER, M. L. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. **Front Immunol**, 8, p. 1751, 2017.
- AMZEL, L. M.; POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of immunoglobulins. **Annu Rev Biochem**, 48, p. 961-997, 1979.
- ANDREANO, E.; NICASTRI, E.; PACIELLO, I.; PILERI, P. *et al.* Extremely potent human monoclonal antibodies from COVID-19 convalescent patients. **Cell**, 184, n. 7, p. 1821-1835 e1816, Apr 1 2021.
- ATARO, P.; MUSHATT, D.; AHSAN, S. Tetanus: a review. **South Med J**, 104, n. 8, p. 613-617, Aug 2011.
- BAXTER, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. **Occup Med (Lond)**, 57, n. 8, p. 552-556, Dec 2007.
- BEECHING, N. J.; CROWCROFT, N. S. Tetanus in injecting drug users. **BMJ**, 330, n. 7485, p. 208-209, Jan 29 2005.
- BERCSENYI, K.; SCHMIEG, N.; BRYSON, J. B.; WALLACE, M. *et al.* Tetanus toxin entry. Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus. **Science**, 346, n. 6213, p. 1118-1123, Nov 28 2014.
- BLUM, F. C.; CHEN, C.; KROKEN, A. R.; BARBIERI, J. T. Tetanus toxin and botulinum toxin utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system. **Infect Immun**, 80, n. 5, p. 1662-1669, May 2012.
- BLUM, F. C.; PRZEDPELSKI, A.; TEPP, W. H.; JOHNSON, E. A. *et al.* Entry of a recombinant, full-length, atoxic tetanus neurotoxin into Neuro-2a cells. **Infect Immun**, 82, n. 2, p. 873-881, Feb 2014.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BURTON, D. R. Antibody: the flexible adaptor molecule. **Trends Biochem Sci**, 15, n. 2, p. 64-69, Feb 1990.

CALAME, K. L. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. **Nat Immunol**, 2, n. 12, p. 1103-1108, Dec 2001.

CHESTER, K. A.; HAWKINS, R. E. Clinical issues in antibody design. **Trends Biotechnol**, 13, n. 8, p. 294-300, Aug 1995.

COOK, T. M.; PROTHEROE, R. T.; HANDEL, J. M. Tetanus: a review of the literature. **Br J Anaesth**, 87, n. 3, p. 477-487, Sep 2001.

CURTIS, D. R.; FELIX, D.; GAME, C. J.; MCCULLOCH, R. M. Tetanus toxin and the synaptic release of GABA. **Brain Res**, 51, p. 358-362, Mar 15 1973.

DAVIES, D. R.; METZGER, H. Structural basis of antibody function. **Annu Rev Immunol**, 1, p. 87-117, 1983.

DEINHARDT, K.; SCHIAVO, G. Endocytosis and retrograde axonal traffic in motor neurons. **Biochem Soc Symp**, n. 72, p. 139-150, 2005.

DIAMANT, E.; TORGEMAN, A.; OZERI, E.; ZICHEL, R. Monoclonal Antibody Combinations that Present Synergistic Neutralizing Activity: A Platform for Next-Generation Anti-Toxin Drugs. **Toxins (Basel)**, 7, n. 6, p. 1854-1881, May 29 2015.

EDSALL, G. Specific prophylaxis of tetanus. **J Am Med Assoc**, 171, p. 417-427, Sep 26 1959.

EISEL, U.; JARAUSCH, W.; GORETZKI, K.; HENSCHEN, A. *et al.* Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. **EMBO J**, 5, n. 10, p. 2495-2502, Oct 1986.

EMSLEY, P.; FOTINO, C.; BLACK, I.; FAIRWEATHER, N. F. *et al.* The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding. **J Biol Chem**, 275, n. 12, p. 8889-8894, Mar 24 2000.

ERNST, M. E.; KLEPSE, M. E.; FOUTS, M.; MARANGOS, M. N. Tetanus: pathophysiology and management. **Ann Pharmacother**, 31, n. 12, p. 1507-1513, Dec 1997.

FARRAR, J. J.; YEN, L. M.; COOK, T.; FAIRWEATHER, N. *et al.* Tetanus. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 69, n. 3, p. 292-301, Sep 2000.

GALAZKA, A.; GASSE, F. The present status of tetanus and tetanus vaccination. **Curr Top Microbiol Immunol**, 195, p. 31-53, 1995.

GIBSON, K.; BONAVENTURE UWINEZA, J.; KIVIRI, W.; PARLOW, J. Tetanus in developing countries: a case series and review. **Can J Anaesth**, 56, n. 4, p. 307-315, Apr 2009.

HANSEL, T. T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, T.; MITCHELL, J. A. *et al.* The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nat Rev Drug Discov**, 9, n. 4, p. 325-338, Apr 2010.

HASSEL, B. Tetanus: pathophysiology, treatment, and the possibility of using botulinum toxin against tetanus-induced rigidity and spasms. **Toxins (Basel)**, 5, n. 1, p. 73-83, Jan 08 2013.

HENDRIKSEN, C. F.; VD GUN, J. W.; NAGEL, J.; KREEFTENBERG, J. G. The toxin binding inhibition test as a reliable in vitro alternative to the toxin neutralization test in mice for the estimation of tetanus antitoxin in human sera. **J Biol Stand**, 16, n. 4, p. 287-297, Oct 1988.

HERZOG, S.; RETH, M.; JUMAA, H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, 9, n. 3, p. 195-205, Mar 2009.

HUMEAU, Y.; DOUSSAU, F.; GRANT, N. J.; POULAIN, B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. **Biochimie**, 82, n. 5, p. 427-446, May 2000.

JONES, P. T.; DEAR, P. H.; FOOTE, J.; NEUBERGER, M. S. *et al.* Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, 321, n. 6069, p. 522-525, May 29-Jun 4 1986.

KABAT, E. A.; WU, T. T. Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. **Ann N Y Acad Sci**, 190, p. 382-393, Dec 31 1971.

KABAT, E. A.; WU, T. T.; PERRY, H. M.; GOTTESMAN, K. S. *et al.* **Sequences of Proteins of Immunological Interest**. 5TH ed. National Institutes of Health Publication, 1991.

KANEKO, E.; NIWA, R. Optimizing therapeutic antibody function: progress with Fc domain engineering. **BioDrugs**, 25, n. 1, p. 1-11, Feb 1 2011.

KEHOE, J. M.; CAPRA, J. D. Localization of two additional hypervariable regions in immunoglobulin heavy chains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 68, n. 9, p. 2019-2021, Sep 1971.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. **Eur J Immunol**, 6, n. 7, p. 511-519, Jul 1976.

LALLI, G.; BOHNERT, S.; DEINHARDT, K.; VERASTEGUI, C. *et al.* The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. **Trends Microbiol**, 11, n. 9, p. 431-437, Sep 2003.

LEVY, R.; MILLER, R. A. Biological and clinical implications of lymphocyte hybridomas: tumor therapy with monoclonal antibodies. **Annu Rev Med**, 34, p. 107-116, 1983.

LINDLEY-JONES, M.; LEWIS, D.; SOUTHGATE, J. L. Recurrent tetanus. **Lancet**, 363, n. 9426, p. 2048, Jun 19 2004.

LU, R. M.; HWANG, Y. C.; LIU, I. J.; LEE, C. C. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **J Biomed Sci**, 27, n. 1, p. 1, Jan 2020.

LUO, P.; QIN, L.; MAO, X.; CHEN, L. *et al.* Identification of a novel linear epitope in tetanus toxin recognized by a protective monoclonal antibody: implications for vaccine design. **Vaccine**, 30, n. 45, p. 6449-6455, Oct 5 2012.

MALLICK, I. H.; WINSLET, M. C. A review of the epidemiology, pathogenesis and management of tetanus. **Int J Surg**, 2, n. 2, p. 109-112, 2004.

MASUYER, G.; CONRAD, J.; STENMARK, P. The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics. **EMBO Rep**, 18, n. 8, p. 1306-1317, Aug 2017.

MELCHERS, F. Checkpoints that control B cell development. **J Clin Invest**, 125, n. 6, p. 2203-2210, Jun 2015.

MINAMITANI, T.; KIYOSE, K.; OTSUBO, R.; ITO, T. *et al.* Novel neutralizing human monoclonal antibodies against tetanus neurotoxin. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 12134, Jun 9 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. *In*, 2019. p. 169-179.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica - Dados**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/t/tetano-acidental>. Acesso em: 25/05/21.

MORRISON, S. L.; JOHNSON, M. J.; HERZENBERG, L. A.; OI, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 81, n. 21, p. 6851-6855, Nov 1984.

MOUQUET, H.; SCHEID, J. F.; ZOLLER, M. J.; KROGSGAARD, M. *et al.* Polyreactivity increases the apparent affinity of anti-HIV antibodies by heterooligation. **Nature**, 467, n. 7315, p. 591-595, Sep 30 2010.

NAGATA, S.; NUMATA, Y.; ONDA, M.; ISE, T. *et al.* Rapid grouping of monoclonal antibodies based on their topographical epitopes by a label-free competitive immunoassay. **J Immunol Methods**, 292, n. 1-2, p. 141-155, Sep 2004.

PADLAN, E. A. Anatomy of the antibody molecule. **Mol Immunol**, 31, n. 3, p. 169-217, Feb 1994.

PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **J Allergy Clin Immunol**, 131, n. 4, p. 959-971, Apr 2013.

PIRAZZINI, M.; ROSSETTO, O.; BOLOGNESE, P.; SHONE, C. C. *et al.* Double anchorage to the membrane and intact inter-chain disulfide bond are required for the low pH induced entry of tetanus and botulinum neurotoxins into neurons. **Cell Microbiol**, 13, n. 11, p. 1731-1743, Nov 2011.

- PORTER, R. R. Structural studies of immunoglobulins. **Science**, 180, n. 4087, p. 713-716, May 18 1973.
- RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 8, p. 1103-1109, Aug 2004.
- REICHERT, J. M.; ROSENSWEIG, C. J.; FADEN, L. B.; DEWITZ, M. C. Monoclonal antibody successes in the clinic. **Nat Biotechnol**, 23, n. 9, p. 1073-1078, Sep 2005.
- RIECHMANN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H.; WINTER, G. Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**, 332, n. 6162, p. 323-327, Mar 24 1988.
- ROBBIANI, D. F.; BOZZACCO, L.; KEEFFE, J. R.; KHOURI, R. *et al.* Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. **Cell**, 169, n. 4, p. 597-609 e511, May 4 2017.
- RODRIGO, C.; FERNANDO, D.; RAJAPAKSE, S. Pharmacological management of tetanus: an evidence-based review. **Crit Care**, 18, n. 2, p. 217, Mar 26 2014.
- ROSSETTO, O.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; TONELLO, F. *et al.* Active-site mutagenesis of tetanus neurotoxin implicates TYR-375 and GLU-271 in metalloproteolytic activity. **Toxicon**, 39, n. 8, p. 1151-1159, Aug 2001.
- ROSSETTO, O.; SCORZETO, M.; MEGIGHIAN, A.; MONTECUCCO, C. Tetanus neurotoxin. **Toxicon**, 66, p. 59-63, May 2013.
- RUMMEL, A.; BADE, S.; ALVES, J.; BIGALKE, H. *et al.* Two carbohydrate binding sites in the H(CC)-domain of tetanus neurotoxin are required for toxicity. **J Mol Biol**, 326, n. 3, p. 835-847, Feb 21 2003.
- SCHEID, J. F.; MOUQUET, H.; FELDHahn, N.; SEAMAN, M. S. *et al.* Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. **Nature**, 458, n. 7238, p. 636-640, Apr 02 2009.
- SCHEID, J. F.; MOUQUET, H.; UEBERHEIDE, B.; DISKIN, R. *et al.* Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. **Science**, 333, n. 6049, p. 1633-1637, Sep 16 2011.
- SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSSETTO, O. *et al.* Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. **Nature**, 359, n. 6398, p. 832-835, Oct 29 1992.
- SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiol Rev**, 80, n. 2, p. 717-766, Apr 2000.
- SCHIAVO, G.; PAPINI, E.; GENNA, G.; MONTECUCCO, C. An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin. **Infect Immun**, 58, n. 12, p. 4136-4141, Dec 1990.

SCHIAVO, G.; POULAIN, B.; ROSSETTO, O.; BENFENATI, F. *et al.* Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. **EMBO J**, 11, n. 10, p. 3577-3583, Oct 1992.

SCHROEDER, H. W., JR.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol**, 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-52, Feb 2010.

SCHWAB, M. E.; SUDA, K.; THOENEN, H. Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport. **J Cell Biol**, 82, n. 3, p. 798-810, Sep 1979.

SHEPPARD, A. J.; CUSSELL, D.; HUGHES, M. Production and characterization of monoclonal antibodies to tetanus toxin. **Infect Immun**, 43, n. 2, p. 710-714, Feb 1984.

STIEHM, E. R. Adverse effects of human immunoglobulin therapy. **Transfus Med Rev**, 27, n. 3, p. 171-178, Jul 2013.

STUDNICKA, G. M.; SOARES, S.; BETTER, M.; WILLIAMS, R. E. *et al.* Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. **Protein Eng**, 7, n. 6, p. 805-814, Jun 1994.

TILLER, T.; MEFFRE, E.; YURASOV, S.; TSUIJI, M. *et al.* Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **J Immunol Methods**, 329, n. 1-2, p. 112-124, Jan 01 2008.

TJANDRA, J. J.; RAMADI, L.; MCKENZIE, I. F. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. **Immunol Cell Biol**, 68 (Pt 6), p. 367-376, Dec 1990.

TURTON, K.; CHADDOCK, J. A.; ACHARYA, K. R. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. **Trends Biochem Sci**, 27, n. 11, p. 552-558, Nov 2002.

VARDJAN, N.; JORGACEVSKI, J.; ZOREC, R. Fusion pores, SNAREs, and exocytosis. **Neuroscientist**, 19, n. 2, p. 160-174, Apr 2013.

VOLK, W. A.; BIZZINI, B.; SNYDER, R. M.; BERNHARD, E. *et al.* Neutralization of tetanus toxin by distinct monoclonal antibodies binding to multiple epitopes on the toxin molecule. **Infect Immun**, 45, n. 3, p. 604-609, Sep 1984.

WANG, H.; YU, R.; FANG, T.; YU, T. *et al.* Tetanus Neurotoxin Neutralizing Antibodies Screened from a Human Immune scFv Antibody Phage Display Library. **Toxins (Basel)**, 8, n. 9, Sep 11 2016.

WARDEMANN, H.; KOFER, J. Expression cloning of human B cell immunoglobulins. **Methods Mol Biol**, 971, p. 93-111, 2013.

WEINER, G. J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 6, p. 361-370, Jun 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO vaccine-preventable disease monitoring system, 2020 global summary**. 2020. Disponível em: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/tetanus/en/. Acesso em: 25/05/21.

WU, T. T.; KABAT, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. **J Exp Med**, 132, n. 2, p. 211-250, Aug 1 1970.

ZUVERINK, M.; CHEN, C.; PRZEDPELSKI, A.; BLUM, F. C. *et al.* A Heterologous Reporter Defines the Role of the Tetanus Toxin Interchain Disulfide in Light-Chain Translocation. **Infect Immun**, 83, n. 7, p. 2714-2724, Jul 2015.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

- Oliveira, R. E. M.; Franco, L. J.; **Takata, D. Y.**; Carbi, A. D. O.; Cavalheiro, S. F. L.; Ueta, J. (2018). "Perfil da prescrição de medicamentos para o diabetes mellitus tipo 2 de um município paulista". DOI: <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2018.2.29288>

- Aliprandini, E.; **Takata, D.Y.**; Lepique, A.; Kalil, J.; Boscardin, S. B.; Moro, A. M. (2018). "An oligoclonal combination of human mabs needed to neutralize the tetanus toxin *in vivo*". *Toxicon X*, 2, p. 100006, Apr 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxcx.2019.100006>

Quintilio, W.; Kapronezai, J.; **Takata, D.Y.**; Marcelino, J.R.; Moro, A.M. (2019). "Tetanus antitoxin potency assessment by surface plasmon resonance and ToBI test". *Biologicals*, 62, p. 107, ISSN 1045-1056, Sep 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.005>

- Tania M. Manieri, Carolina G. Magalhaes, Daniela Y. Takata, João V. Batalha-Carvalho and Ana M. Moro (November 2nd 2020). In silico Techniques for Prospecting and Characterizing Monoclonal Antibodies [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.94366. Disponível em <https://www.intechopen.com/online-first/in-silico-techniques-for-prospecting-and-characterizing-monoclonal-antibodies>

ANEXO A – SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA TOXINA TETÂNICA

UniProtKB- P04958 (TETX_CLOTE):

MPITINNFYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDF
NPPSSLIEGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYL
GNSYSLLDKFDTNSNSVSFNLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVL
RVDNKNYFPCRDGFGSIMQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLTIGKSKYFQDPALLLMH
ELIHVLHGLYGMQVSSHEIIPSKQEIYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYE
KTLNDYKAIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQIYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILY
NSIMYGFTIEELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESKDLKSE
YKGQNM RVNTNAFRNVDGSGLVSKLIGLCKKIIPPTNIRENLYNRTASLTDLGCEL
KIKNEDLTFIAEKNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITLPNDR
TTPVTKGIPYAPEYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALIN
STKIYSYFPSVISKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGP
ALNIVKQGYEGNFIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEK
RYEKWIEVYKLVKAKWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEYKIYSGPD
KEQIADEINNLKNKLEEKANKAMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSK
NILMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKVFSTPIPFSSYKNLDCWVDNEEDIDVILKKSTI
LNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGKAIHLVNNESSEVIVHKAMDIEYNDM
FNNFTVSFWLRVPKVSASHLEQYGTNEYSIISSMKKHLSLSIGSGWSVSLKGNLIWT
LKDSAGEVRQITFRDLPDKFNAYLANKWVFITITNDRLSSANLYINGVLMGSAEITGL
GAIREDNITLKLDRCNNNNQYVSIDKFRIFCKALNPKEIEKLYTSYLSITFLRDFWGN
PLRYDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMYLTNAPS YTNGLNIYYRRLYNGLKFKIIKR
YTPNNEIDSFVKSGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPKDGNAFNNLDRILRVGYNAPGIPLY
KKMEAVKLRDLKTYSVQLKLYDDKNASLGLVGTHNGQIGNDPNRDILIASNWFNHL
KDKILGCDWYFVPTDEGWTND

ANEXO B – OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOSTabela 9. Oligonucleotídeos utilizados na *nested* PCR

		Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'
1ª Reação - Cadeia γ	F	5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
		5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
		5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAG
		5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
		IGHV1,7-X1	ATGGACTGGACCTGGAG
		IGHV1-X1-041	TCCTCTTTGTGGTGGCAGCAGC
		IGHV2-X1-036	TCCACGCTCCTGCTRCTGAC
		VH3 Leader-A	TAAAAGGTGTCCAGTGT
		RM-IGHV4-X1	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCC
	R	3' Cgama CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC
2ª Reação - Cadeia γ	F	RMX2-A	AGGTGCAGCTGCTGGAGTCKGG
	R	3' IgG (internal)	GTTCCGGGAAGTAGTCCTTGAC
1ª Reação - Cadeia κ	F	5' L Vk ½	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
		5' L Vk 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
		5' L Vk 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
	R	3' Ck 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA
2ª Reação - Cadeia κ	F	5' Pan Vk	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG
	R	3' Ck 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
1ª Reação - Cadeia λ	F	5' L Vlambda 1	GGTCTGGGCCCAGTCTGTGCTG
		5' L Vlambda 2	GGTCTGGGCCCAGTCTGCCCTG
		5' L Vlambda 3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG
		5' L Vlambda 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTG
		5' L Vlambda 6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG
		5' L Vlambda 7	GGTCCAATTCYCAGGCTGTGGTG
		5' L Vlambda 8	GAGTGGATTCTCAGACTGTGGTG
		R	3' Clambda
2ª Reação - Cadeia λ	F	5' Agel Vlambda 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGTGCTGACKCAG
		5' Agel Vlambda 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCCAGTCTGCCCTGACTCAG
		5' Agel Vlambda 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
		5' Agel Vlambda 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCTCSCAGCYTGTGCTGACTCA
		5' Agel Vlambda 6	CTGCTACCGGTTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
		5' Agel Vlambda 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYAGRCTGTGGTGACYCAG

	R	3' XhoI Clambda	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG
1ª Reação - β actina	F	5' h b-actin	GAACCCCAAGGCCAACCGCGA
	R	3' h b-actin	CACGCACGATTTCCCGCTC

Fonte: (Wardemann and Kofer 2013)

Tabela 10. Oligonucleotídeos utilizados na PCR específica

	Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'
Cadeia γ	5' Agel VH 1/4/6	CTGCA <u>ACCGG</u> TGTACATTCC[FWR1]
	5' Agel VH 3/7	CTGCA <u>ACCGG</u> TGTACATTCT[FWR1]
	3' Sall JH 1/2/4/5	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCAG
	3' Sall JH 3	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAAGAGACGGTGACCATTG
	3' Sall JH 6	TGCGAAGT <u>CGACG</u> CTGAGGAGACGGTGACCCTG
	Cadeia κ	5' Agel Vk
3' BsiWI Jk ¼		GCCAC <u>CGTACG</u> TTTGATYCCACCTTGGTG
3' BsiWI Jk 2		GCCAC <u>CGTACG</u> TTTGATCTCCAGCTTGGTG
3' BsiWI Jk 3		GCCAC <u>CGTACG</u> TTTGATATCCACTTTGGT
3' Bsi WI Jk 5		GCCAC <u>CGTACG</u> TTTAATCTCCAGTCGTGTC
Cadeia λ	5' Agel Vλ 1	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCTGGGCCAGTCTGTGCTGACKCAG
	5' Agel Vλ 2	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCTGGGCCAGTCTGCCCTGACTCAG
	5' Agel Vλ 3	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCTGTGACCTCCTATGAGCTGACWCAG
	5' Agel Vλ 4/5	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCTCTCTCSCAGCYGTGCTGACTCA
	5' Agel Vλ 6	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCTTGGGCCAATTTTATGCTGACTCAG
	5' Agel Vλ 7/8	CTGCT <u>ACCGG</u> TTCCAATTCYCAGRCTGTGGTGACYCAG
	3' XhoI Cλ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAGAGTG

Fonte: (Wardemann and Kofer 2013)