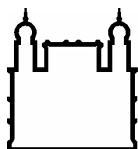


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**METODOLOGIAS INICIAIS PARA IMPLEMENTAÇÃO DE UM ELISA
PARA DETECÇÃO DO INTERFERON BETA HUMANO
RECOMBINANTE (1A) COM APLICAÇÃO NO CONTROLE DE
QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS**

CARINA CANTELLI PACHECO DE OLIVEIRA

**RIO DE JANEIRO
2009**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARINA CANTELLI PACHECO DE OLIVEIRA

**METODOLOGIAS INICIAIS PARA IMPLEMENTAÇÃO DE UM ELISA
PARA DETECÇÃO DO INTERFERON BETA HUMANO RECOMBINANTE
(1A) COM APLICAÇÃO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE BIO-
MANGUINHOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O48

Oliveira, Carina Cantelli Pacheco de

Metodologias iniciais para implementação de um ELISA para detecção do interferon beta humano recombinante (1a) com aplicação no controle de qualidade de Bio-Manguinhos / Carina Cantelli Pacheco de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2009.

xii, 71 f. : il. ; 30 cm.

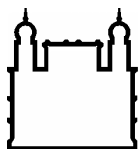
Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 57-64

1. Anticorpos Monoclonais. 2. Interferon-Beta. 3. Vacinas de DNA. 4. Imunização Genética. I. Título.

CDD 591.293

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia de Recombinantes - LATER, sob a orientação da Prof^a Dr^a Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza e da Prof^a Dr^a Maria da Glória Martins Teixeira.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARINA CANTELLI PACHECO DE OLIVEIRA

**METODOLOGIAS INICIAIS PARA IMPLEMENTAÇÃO DE UM ELISA
PARA DETECÇÃO DO INTERFERON BETA HUMANO
RECOMBINANTE (1A) COM APLICAÇÃO NO CONTROLE DE
QUALIDADE DE BIO-MANGUINHOS.**

Orientadoras: Prof^a Dr^a Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza
Prof^a Dr^a Maria da Glória Martins Teixeira

Dissertação aprovada em 28/01/2009.

Examinadores:

Prof^o Dr José Procópio Moreno Senna
Bio-Manguinhos/Fiocruz
Presidente

Prof^o Dr José Mauro Peralta
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^o Dr Walter Martin Roland Oelemann
Universidade Federal do Rio de Janeiro

RIO DE JANEIRO
2009

Aos meus queridos pais Ricardo Luís Pacheco de Oliveira e Elfrida Cantelli Pacheco de Oliveira dedico esta tese e todas as vitórias em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida, pelos estudos, pelas grandes oportunidades que planejaste em meu caminho e pelas pessoas admiráveis com quem pude conviver e aprender.

À FIOCRUZ, Bio-Manguinhos, FIOTEC, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico por eles dispensados.

Ao diretor de Bio-Manguinhos Dr^o Akira Homma e aos coordenadores do mestrado Dr^a Sheila Farage e ao Dr^o Ricardo Galler, pela oportunidade da realização desta tese de mestrado.

Às minhas orientadoras, Dr^a Márcia Terezinha Baroni e Dr^a Maria da Glória Teixeira, pelo aceite em me orientarem e pelo grande carinho, amizade, paciência e grandes incentivos dispensados durante todos os momentos da realização desta tese.

Ao Dr^o Geraldo Armoa, Dr^o Marcos Alberto Medeiros e à Nádia Batureu pelo aceite de minha permanência às dependências do Laboratório de Tecnologia de Recombinantes, no Pavilhão Rocha Lima/Bio-Manguinhos.

Aos meus maravilhosos pais, Ricardo Luís Pacheco de Oliveira e Elfrida Cantelli Pacheco de Oliveira, pelo demasiado amor, carinho, educação, cuidados, grandes incentivos, conselhos e por toda paciência que sempre dispensaram a mim.

Ao Dr^o José Procópio pelas valiosas sugestões ao ministrar sua disciplina e pelo trabalho de revisão desta dissertação assim como das preciosas avaliações e sugestões dos examinadores Dr^o Walter Martin Roland Oelemann e Dr^o José Mauro Peralta.

Ao meu grande amigo e futuro Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos Álvaro Jorge Velloso, que se mostrou um grande irmão nos momentos em que mais precisei de seu apoio e amizade.

Às secretárias Zaíra Antunes e Andrea Ayrosa pela amizade, competência, dedicação e carinho em todos os momentos.

Ao meu querido grupo de trabalho do LATER: Sérgio Mouta, Leonora Vieira, Eneida Silva, Natália Plínio, Eliane Baroni, Haroldo Cid, Carlos Vianna, Ana Carolina Magalhães e aos demais colaboradores Marcia Arissawa, Márcia Pimenta, João Queiroz, Márcia Leite, Messias da Silva, Rodrigo Muller, Luiz Cavalcanti e Fernanda Rimolli.

Aos queridos amigos Carla Wolanski, Aline Zagnata, Ricardo Brum, Daniel Arêas, Roberto Calado, Luciana Almeida e demais colegas de mestrado, por toda ajuda, amizade, companheirismo e paciência em todos os momentos.

Aos meus primeiros orientadores de Iniciação Científica Dr^o Angelo da Cunha Pinto e Dr^o Alexandre Pyrho, pelos ensinamentos, incentivos e amizade conquistada.

Ao meu namorado, Paulo Rabha, pelo seu amor, incentivo, carinho e amizade ao longo destes últimos anos.

Aos meus grandes amigos Lívia Honório, Natália Segreto, Marcela Coutinho, Diogo Dibo, Antony Barbosa por toda amizade e companheirismo ao longo destes últimos anos.

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OS INTERFERONS	1
1.1.1. O Interferon Beta (IFN- β).....	4
1.1.2. Aplicação Clínica do Interferon Beta	5
1.1.3. A Esclerose Múltipla	7
1.2. O ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO	8
1.2.1. Controle de Qualidade do IFN- β utilizando o Ensaio Imunoenzimático.....	9
1.3. OS ANTICORPOS	10
1.3.1. Mudança de Isotipo (Classe) da Cadeia Pesada da Imunoglobulina.....	12
1.3.2. Anticorpos Policlonais.....	14
1.3.3. Anticorpos Monoclonais	14
1.3.4. Obtenção de Anticorpos a partir de Imunizações Genéticas (GI)	15
1.3.4.1. Mecanismo de Ação e Indução da Resposta Imune pela Imunização Genética (GI)	16
1.3.4.2. Adjuvantes para Imunização Genética e seu Papel na Imunidade Inata	19
1.3.4.3. Vias de Administração das Vacinas de DNA.....	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. OBTENÇÃO DE MABS ANTI-IFN-B ATRAVÉS DE IMUNIZAÇÃO GENÉTICA	23
3.1.1. Construção dos vetores plasmidiais pZeoSV2 ⁺ IFN- β e pcDNA3.1 IFN- β	23
3.1.2. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as construções plasmidiais.....	23
3.1.3. Imunização Genética em camundongos BALB/c	24
3.1.4. Obtenção dos MAb's	24
3.2. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS MABS ANTI-IFN-B	25
3.2.1. Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAb's anti-IFN- β	25
3.2.2. Subclonagem dos clones de hibridomas por diluição limitante	26
3.2.3. Confirmação da Isotipagem através da Reação da Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)	27
3.2.4. Produção de Fluídos Ascíticos de MAb's anti-IFN- β	27
3.2.5. Purificação de Fluídos Ascíticos contendo MAb's anti-IFN- β	28
3.2.6. Ensaio imunoenzimático comercial adaptado para detecção de MAb's anti-IFN- β	28
3.2.7. Ensaio de Western-blot dos MAb's anti-IFN- β	29
3.3. OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-IFN-B ATRAVÉS DE IMUNIZAÇÃO GENÉTICA.....	30
3.3.1. Construção do Vetor Plasmidial pCINeo IFN- β	30
3.3.2. Transformação Bacteriana com a Construção Plasmidial pCINeo IFN- β e obtenção de Clones Plasmidiais Recombinantes	30
3.3.3. Gigapreparações Plasmidiais das Construções contendo o gene do IFN- β e controles	31
3.3.4. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as Construções Plasmidiais.....	35
3.3.5. Ensaio imunoenzimático para detecção da proteína do IFN- β , utilizando as Construções Plasmidiais	35
3.3.6. Inoculação das Construções Plasmidiais em Modelo Coelhos Nova Zelândia	35
3.3.7. Western-blot do Soro Imune de Coelhos Nova Zelândia Inoculados com as Construções Plasmidiais	36
4. RESULTADOS	37
4.1. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS MABS ANTI-IFN-B	37
4.1.1. Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAb's anti-IFN- β	37
4.1.2. Subclonagem e Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAb's anti-IFN- β	39
4.1.3. Reação da Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR) para confirmação dos resultados da Isotipagem.....	40
4.1.4. Purificação dos Fluídos Ascíticos contendo MAb's anti-IFN- β	42

4.1.5. Ensaio Imunoenzimático comercial adaptado	43
4.1.5.1. ELISA dos fluídos ascíticos para detecção dos MAbs anti-IFN-β	43
4.1.5.2. ELISA com o MAb clone 89-CC6 AA11 IgG2a anti-IFN-β	44
4.1.6. Ensaio de Western blot dos MAbs IgG2a anti-IFN- β	44
4.2. OBTENÇÃO DE SORO POLICLONAL ANTI-IFN-B ATRAVÉS DA IMUNIZAÇÃO GENÉTICA	45
4.2.1. Obtenção da construção plasmidial pCINeo IFN- β	45
4.2.2. Gigapreparações Plasmidiais das Construções contendo o gene do IFN- β e controles	47
4.2.3. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as construções plasmidiais analisados por ELISA	48
4.2.4. Avaliação do soro imune dos coelhos Nova Zelândia inoculados com as construções plasmidiais..	49
5. DISCUSSÃO	52
6. PERSPECTIVAS.....	56
7. REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	65

Lista de Siglas e Abreviaturas

anti-IFN- β - anti-interferon beta

APCs - Do termo em inglês *Antigen Presenting Cells* (células apresentadoras de antígenos)

BSA - Do termo inglês *Bovine Serum Albumin* (albumina de soro bovina)

°C - graus Celsius ou centígrados

CEUA - Comitê de Ética para Uso de Animais

CHO - Do termo inglês *Chinese Hamster Ovary Cells* (células de ovário de hamster chinês)

CsCl - cloreto de céscio

DMEM - Do termo inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de cultura celular Dulbecco's modificado)

DNA - Do termo inglês *Dexoribonucleic Acid* (ácido dexoribonucléico)

DO - densidade óptica

CpG - Do termo inglês *Cytosine-phosphate-Guanosine* (motivo Citosina-fosfato-guanosina)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

EM - Esclerose Múltipla

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GAF - Do termo inglês *Gamma Activated Factor* (fator ativador gama)

GI - Do termo inglês *Genetic Immunization* (Imunização Genética)

GlcNAc - N-acetilglicosamina

HAT - Hipoxantina-Aminopterina-Timidina

HBsAg - Do termo inglês *Hepatitis B surface Antigen* (antígeno de superfície do vírus da hepatite B)

HEK-293-T - Do termo inglês *Human Embryonic Kidney 293 cells (SV40 Large T-antigen)* (Linhagem de células renais embrionárias humanas, contendo o antígeno T do símio vírus 40)

HC - Do termo inglês *Heavy Chain* (cadeia pesada da imunoglobulina)

HCMV - Do termo inglês *Human Cytomegalovirus* (citomegalovírus humano)

HRP - Do termo inglês *Horseradish Peroxidase* (peroxidase do rábano silvestre)

HSA - Do termo inglês *Human Serum Albumin* (albumina de soro humana)

IEF - Do termo inglês *Isoelectric Focussing* (focalizador isoelétrico)

IFNAR - Do termo inglês *Interferon N (alpha, beta and omega) Receptor* (receptor de interferon N - alfa, beta e gama)

IFNGR - Do termo inglês *Interferon Gamma Receptor* (receptor de interferon gama)

IFNs ($\alpha/\beta/\gamma/\omega$) - interferons alfa/beta/gama/ômega

Ig - Imunoglobulina

IL - interleucina

IRF - Do termo inglês *Interferon Regulatory Factor* (fator regulatório de interferon)

ISGF-3 - Do termo inglês *Interferon-Stimulated Gene Factor 3* (fator estimulador 3 do gene do interferon)

ISRE - Do termo inglês *Interferon Stimulated Response Element* (elemento responsivo estimulado por interferon)

JAK - Do termo inglês *Janus Kinase* (janus quinase)

KDa - KiloDaltons

LAEAN - Laboratório de Experimentação Animal

LATAM - Laboratório de Anticorpos Monoclonais

LATER - Laboratório de Tecnologias de Recombinantes

LB - Meio de cultivo Luria Bertani

LC - Do termo inglês *Light Chain* (cadeia leve da imunoglobulina)

MAbs - Do termo inglês *Monoclonal Antibodies* (anticorpos monoclonais)

MBP - Do termo inglês *Myelin Basic Protein* (proteína básica da mielina)

MGMT - Metilguanina-DNA metiltransferase

MHC - Do termo inglês *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

MMPs - Do termo inglês *Matrix MetalloProteinases* (metaloproteinases de matriz)

MOG - Do termo inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (glicoproteína oligodentrócita da mielina)

MPTI - Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

NK - Do termo inglês *Natural Killer* (células matadoras naturais)

OGMs - Organismos Geneticamente Modificados

pb - pares de bases de nucleotídeos

PBS - Do termo inglês *Phosphate Buffered Saline* (salina tamponada com fosfato)

PBS-T - Do termo inglês *Phosphate Buffered Saline-Tween* (salina tamponada com fosfato/detergente *Tween*)

pH - concentração de hidrogênio iônico

PLP - Do termo inglês *Proteolipid Protein* (proteína proteolipídica)

POP - Procedimento Operacional Padrão

RNA - Do termo inglês *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RT-PCR - Do termo inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa)

S - Do termo inglês *Switch* (mudança de subclasse de imunoglobulina)

SAP - Do termo inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão)

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio)

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

STAT - Do termo inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription* (sinais transdutores e ativadores da transcrição)

SV40 - Do termo inglês *Simian Virus 40* (símio vírus 40)

TGF- β - Do termo inglês *Tumor Growth Factor Beta* (fator de crescimento tumoral beta)

T_H1 - Linfócitos T *helper* 1

T_H2 - Linfócitos T *helper* 2

TMZ - Temozolomida

TNF- α - Do termo inglês *Tumor Necrosis Factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

TYK2 - Do termo inglês *Tyrosine Kinase 2* (tirosina quinase 2)

VDJ - Variável/Diversidade/Junção

RESUMO

O interferon beta (IFN- β) é uma proteína globular consistindo de cinco cadeias α -helicais e como biofármaco é principalmente utilizado para o tratamento da esclerose múltipla (EM). A EM é uma doença até o momento sem cura e das terapias imunomodulatórias disponíveis para melhoria do quadro da EM, o IFN- β é o biofármaco disponível mais bem caracterizado. Duas formas do IFN- β humano recombinante são clinicamente utilizadas: IFN- β -1a, produzida em células de ovários de hamster chinês (CHO), similar ao IFN- β nativo; e a forma IFN- β -1b, produzida em sistema de *Escherichia coli*, não possuindo moléculas de açúcar na cadeia polipeptídica expressa.

Testes para detecção e quantificação dos IFNs são principalmente do tipo ELISA sendo cruciais nos processos de desenvolvimento, monitoramento e no controle de qualidade, devido principalmente a relação sensibilidade/especificidade necessária. Os anticorpos monoclonais (Mabs) de alta afinidade, produzidos para estes testes são extremamente sensíveis e específicos e representam uma forma adequada de padronização de um ELISA para detecção e quantificação do IFN- β .

Neste estudo, quatorze MAb anti-IFN- β foram obtidos através da imunização genética e parcialmente caracterizados. Todos reconheceram no ELISA o IFN- β humano recombinante. Os MAb anti-IFN- β identificados como AE9, AG8, AE6, AH7, AA11, AB1 e AA4 foram os mais reativos. Todos os quatorze MAb foram isotipados e apresentaram um perfil com simultânea expressão tanto de IgM quanto de IgG2a. Este perfil não-usual foi confirmado pela reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa específica para IgG e IgM. Somente um MAb denominado AG8 reagiu em *Western-blot* com a isoforma monomérica de 18 KDa do IFN- β . Este estudo representou o primeiro passo em direção ao propósito de obtenção do ELISA descrito acima.

ABSTRACT

Beta interferon (IFN- β) is a globular protein consisting of five α -helical chains. As biopharmaceutical product it is mainly used for treatment of multiple sclerosis (MS). MS is a health disorder with no cure available so far. Its symptoms can be alleviated with immunomodulatory drugs. IFN- β is the most well characterized biopharmaceutical product in terms of structure and side effects. Two forms of human recombinant IFN- β are used in the treatment of MS: IFN- β -1a, expressed in Chinese hamster ovary cells, is similar to native IFN- β ; and IFN- β -1b expressed in the *Escherichia coli* expression system. IFN- β -1b does not present glycosylation and therefore differs from native IFN- β .

Tests to detect and to quantify IFNs are mainly enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). These tests are reliable and can be used in biopharmaceutical product development processes. Monitoring and quality control of IFN- β are quite important, mainly because of the physical and chemical nature of IFN- β as well the necessary sensitivity and specificity that allow for a precise characterization of the final product. Monoclonal antibodies (MAbs) used in ELISA to detect and quantify IFN- β usually present high affinity and specificity.

In this study, fourteen MAbs against human recombinant IFN- β were obtained by genetic immunization and partially characterized. All antibodies recognized human IFN- β . The anti-IFN- β MAbs AE9, AG8, AE6, AH7, AA11, AB1 and AA4 were the most reactives. All fourteen MAbs were subjected to antibody isotype characterization and presented a simultaneous expression of both IgM and IgG2a. This unusual profile was confirmed by specific reverse transcription polymerase chain reaction for IgG and IgM messenger RNA. Only MAb AG8 recognized the 18 KDa isoform of IFN- β . This study represents the first step towards the development of the ELISA described above.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os Interferons

Os Interferons (IFNs) são proteínas de uma família multigênica de citocinas altamente pleiotrópicas, sendo descobertas primeiramente por Isaacs e Lindenmann em 1957. Originalmente descritas por 'interferirem' na replicação viral de cultura de células, estas citocinas são produzidas por quase todas as células de vertebrados. Os IFNs medeiam atividades antivirais, atividades antiproliferativas contra células malignas e imunomodulatórias em resposta a um estímulo químico e/ou biológico. O IFN foi a primeira citocina a ser purificada, seqüenciada e seu gene clonado para obtenção de IFN produzido pela tecnologia do DNA recombinante (Karpusas *et al.*, 1998; Pfeffer *et al.*, 1998; Arduini *et al.*, 1999; Tilbery *et al.*, 2000; Harle *et al.*, 2001; Zarrin *et al.*, 2006; Billiau, 2006a; Javed & Reder, 2006; Nakatsuji *et al.*, 2007).

Os IFNs são agrupados em dois tipos: Tipo I – conhecidos como IFNs anti-virais resistentes ao tratamento ácido e representados pelos IFN- α (produzido por leucócitos), IFN- β (produzido por fibroblastos) (figura 1) e IFN- ω ; e Tipo II, também conhecido como IFN imune (IFN- γ), o qual é sensível ao pH mais baixo. Os IFNs tipo I são induzidos por infecções virais, enquanto o IFN Tipo II por estímulo antigênico ou mitogênico (Brown *et al.*, 1998b; Samuel, 2001).

Muitas linhagens celulares infectadas por vírus são capazes de sintetizar IFN- α/β . No entanto, o IFN- γ é sintetizado apenas por certos tipos celulares do sistema imune incluindo as células matadoras naturais (NK), células T_H1 CD4⁺ e células supressoras T CD8⁺ citotóxicas (Samuel, 2001).

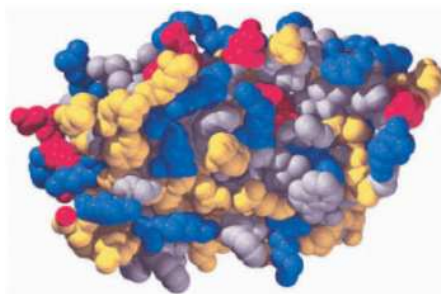


Figura 1: Estrutura do IFN- β

<http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf>

Após a infecção viral, praticamente todas as células nucleadas respondem pelo aumento da síntese de IFNs, os quais estimulam a transcrição de múltiplos genes, impedindo a replicação viral. Os IFNs do tipo I e, em menor grau o IFN- γ , inibem a replicação viral nas células infectadas, sendo requeridos para sua atividade a transcrição e síntese de diversas proteínas e fatores (Karpusas *et al.*, 1998; Harle *et al.*, 2001; Samuel, 2001; Billiau, 2006a; Javed & Reder, 2006).

Embora alguns IFNs sofram modificações pós-traducionais por N- e O-glicosilações (proteína do IFN sendo glicosilada nos resíduos de asparagina e serina/treonina, respectivamente), os subtipos de IFN- α humanos não são proteínas glicosiladas. A molécula do IFN- α parece funcional em sua forma monomérica, enquanto o IFN- β e o IFN- γ parecem funcionais como homodímeros. Quando um simples gene do IFN- β é deletado do cromossoma 4 do camundongo, o camundongo resultante torna-se altamente suscetível à infecção viral. As subespécies de IFN- α não compensam a perda de IFN- β , sugerindo um papel essencial para a efetiva resposta antiviral do IFN- β (Samuel, 2001).

Os efeitos mediados pelos IFNs ocorrem através da ativação de receptores transmembranares os quais conduzem, via proteínas JAK-STAT (JAK – janus-quinase; STAT – sinais transdutores e ativadores da transcrição) a regulação de genes alvos. Os IFNs tipo I possuem receptores que consistem de duas cadeias, IFNAR-1 e IFNAR-2 (receptores de interferon N - alfa, beta e ômega), e sub-variantes, enquanto os IFNs tipo II possuem receptores com as cadeias IFNGR-1 e IFNGR-2 (receptores de interferon gama 1 e 2).

Quando o IFN- β (e outros IFNs tipo I) se ligam ao domínio extracelular do receptor, induzem a transdução de sinais intracelulares da cascata (Figura 2), que envolvem os seguintes mecanismos:

- (1) recrutamento e ativação de tirosina-quinase 2 (TYK2) citoplasmática por IFNAR-1, e janus-quinase 1 (JAK1) por IFNAR-2;
- (2) subsequente fosforilação mediada pelas TYK2 e JAK1, recrutamento de sinais transdutores e ativadores de transcrição (STAT1 e STAT2) para formar o heterodímero STAT1-STAT2;
- (3) associação das proteínas STAT1-STAT2 fosforiladas com a proteína p48 (IRF9 – fator regulador 9 do interferon), formando um complexo ativo trimérico ativador da transcrição denominado ISGF-3 (fator estimulador 3 do gene do interferon);
- (4) o complexo ISGF-3 se transloca para o núcleo e se liga à elementos responsivos de múltiplos genes na região promotora, estimulados por IFN (ISRE – elemento responsivo estimulado por interferon), sinalizando a transcrição de genes alvos.

Ao contrário, em resposta ao IFN tipo II (IFN- γ), o complexo ativador de transcrição denominado fator ativador gama (GAF), um homodímero STAT-1 tirosina fosforilado, se liga ao sítio ativado para IFN- γ . As variações em algumas destas etapas da transdução do sinal, conduzem a diferentes efeitos dos IFNs em diferentes alvos celulares, os quais ainda não estão bem compreendidos (Karpusas *et al.*, 1998; Samuel, 2001; Neuhaus *et al.*, 2003; Javed & Reder, 2006, Chelbi-Alix & Wietzerbin, 2007; Nakatsuji *et al.*, 2007; Neuhaus *et al.*, 2007; Weber & Haller, 2007).

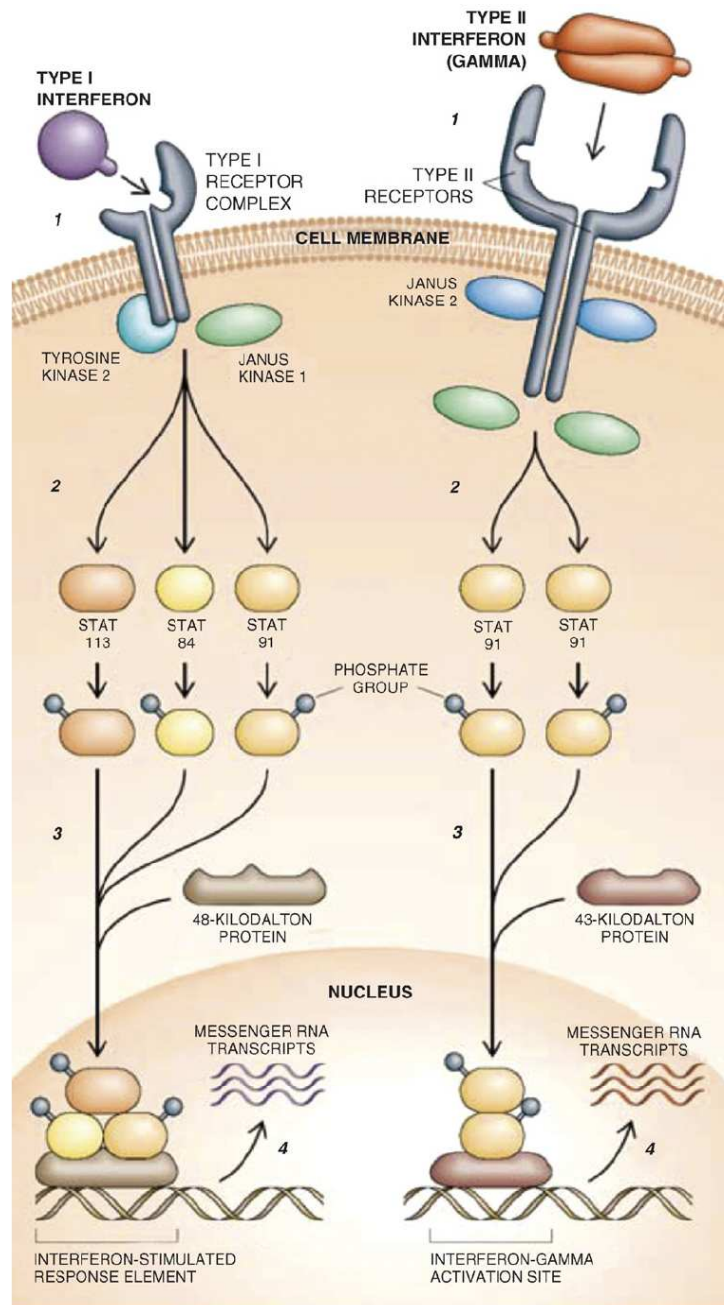


Figura 2: Eventos moleculares na transdução do sinal dos IFNs (Billiau, 2006a).

1.1.1. O Interferon Beta (IFN- β)

O IFN- β é uma proteína globular consistindo de cinco cadeias polipeptídicas α -helicais (figura 3). Sob visualização em eletroforese de gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) apresenta uma massa molar de aproximadamente 18-22,5 Kilodaltons (KDa), devido a ausência ou presença de glicosilação, respectivamente. Os glicosídeos possuem um importante papel na facilitação da secreção do IFN- β pelas células produtoras, aumentando a estabilidade e solubilidade. A forma não-glicosilada do IFN- β é produzida por engenharia genética em sistema procarioto (*Escherichia coli*), retendo esta proteína atividade biológica, embora com menor atividade específica do que a forma glicosilada do IFN- β (forma hidrofílica) produzida por fibroblastos humanos ou em sistemas de expressão em células de mamíferos (Karpusas *et al.*, 1998; Meager & Das, 2005).

O IFN- β recombinante glicosilado possui como maior cadeia polipeptídica um complexo tipo biantenário (bi-ramificado) contendo um resíduo de fucose em ligação α 1-6 ao resíduo *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) em proximidade ao peptídeo e dois resíduos de ácido siálico ligados α 2-3 ao resíduo de galactose terminal (Karpusas *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2005).

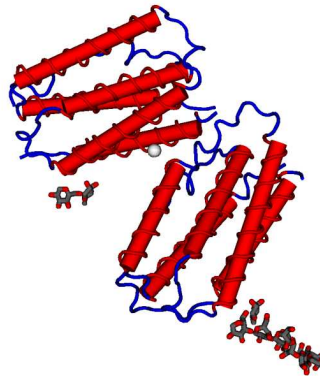


Figura 3: Estrutura tridimensional do homodímero de IFN- β humano.
http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:1AU1_Human_Interferon-Beta.png

Diversos efeitos imunológicos são atribuídos ao IFN- β , tais como: a supressão da proliferação de células T; diminuição da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II induzidas pelo IFN- γ e moléculas coestimulatórias como a B7-1; indução da produção de citocinas tipo T_H2 e redução da síntese de citocinas tipo T_H1, havendo desta forma um balanço em favor da resposta anti-inflamatória; e a inibição da

ativação de monócitos. Além disso, o IFN- β regula negativamente as metaloproteinases de matriz (MMPs), diminuindo a expressão de moléculas de adesão de superfície, aumentando a liberação de moléculas de adesão solúveis, as quais se combinam para reduzir a migração potencial de células T, como também diminuindo a permeabilidade da barreira hematoencefálica à estas células (Yong *et al.*, 1998; Dhib-Jalbut, 2002; Neuhaus *et al.*, 2003; Billiau, 2006b; Sattler *et al.*, 2006; Nakatsuji *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007).

1.1.2. Aplicação Clínica do Interferon Beta

O IFN- β como medicamento terapêutico é principalmente utilizado para o tratamento da esclerose múltipla (EM), doença autoimune que afeta populações de diversos países. Entretanto, no Japão o IFN- β tem sido utilizado como terapia adjuvante em alguns pacientes com glioma maligno, diminuindo a atividade da O-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), enzima responsável pelo efeito de resistência do agente quimioterápico temozolomida (TMZ). Assim, o IFN- β suprime a expressão da enzima MGMT pelo tumor, rendendo então sensibilidade do glioma ao tratamento quimioterápico com o agente TMZ (Fujimaki *et al.*, 2007).

Atualmente duas formas de IFN- β humano recombinante são clinicamente utilizadas. A primeira, IFN- β -1a (Avonex[®], Biogen; Rebif IFN[®], Serono), é produzida em células de ovários de hamster chinês (CHO), similar ao IFN- β nativo (figura 4). No entanto, como a expressão ocorre em células de mamíferos, o perfil de glicosilação é apropriado para cada tipo celular animal. Até mesmo entre diferentes linhagens de células CHO podem ocorrer variações do perfil de glicosilação. Essa complexidade pode explicar as diferenças na resposta dos pacientes aos diferentes IFN- β -1a comerciais (Jacobs *et al.*, 1996).

O segundo tipo de IFN- β humano recombinante (IFN- β -1b: Betaseron[®], Berlex; Betaferon[®], Schering) é produzido em sistema procarioto - *Escherichia coli* (Jacobs *et al.*, 1996; Reder, 2000). Como o sistema procarioto em questão não confere glicosilação às proteínas recombinantes produzidas, esse tipo de IFN não possui nenhuma molécula de açúcar na sua cadeia polipeptídica. Para evitar uma incorreta formação de ponte dissulfeto no final da cadeia, existe uma substituição, na posição 17 de uma cisteína por uma serina. Também na posição 1 da cadeia (porção N-terminal), uma metionina foi removida, possuindo desta forma uma cadeia polipeptídica de 165 aminoácidos e peso molecular de 18 KDa (figura 4) (Brown *et al.*, 1998b; Neuhaus *et al.*, 2007).

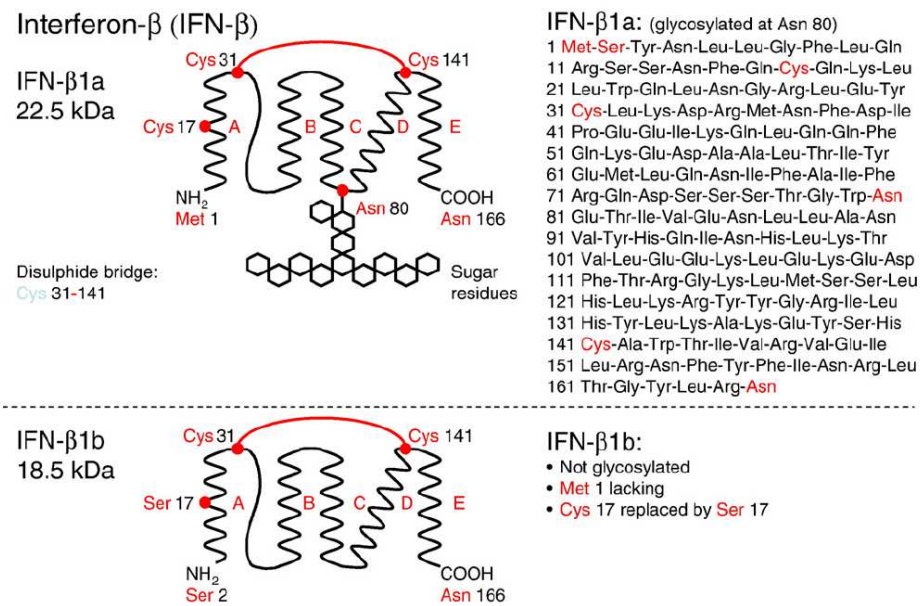


Figura 4: IFN- β -1a e IFN- β -1b (Neuhaus *et al.*, 2007).

As diferenças químicas entre os dois tipos de IFN- β humano recombinante têm conseqüências. A ausência da glicosilação tem sido correlacionada com reduzida atividade e solubilidade, aumentos da agregação (alterando assim a farmacocinética da molécula) e sensibilidade da proteína à desnaturação térmica (esta última *in vitro*), bem como aumentos da produção de anticorpos neutralizantes *in vivo*. A estabilidade influenciada pelo carboidrato é provavelmente devido a um efeito protetor da conformação da proteína, minimizando a exposição da área superficial contendo um grande número de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ao solvente e a ação de proteases (Karpusas *et al.*, 1997; Karpusas *et al.*, 1998; Lipscomb *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2005; Spearman *et al.*, 2005; Walsh & Jefferis, 2006). Como exemplo, o IFN- β -1b quando combinado com a albumina do soro humano (HSA) possui somente 10% da potência relativa quando comparado com IFN- β -1a. *In vitro* é necessário um aumento considerável da dose de IFN- β -1b para alcançar a mesma ação observada com o IFN- β -1a. Mas *in vivo*, não existe nenhum consenso, uma vez que ambos os tipos recombinantes exercem o mesmo papel na redução de surtos em pacientes apresentando EM; ou seja, ainda existe uma grande discussão (Paty & Li, 1993; MS/MRI Analysis Group, 1995; MS/MRI Analysis Group, 1996; Brown *et al.*, 1998b; European Study Group, 1998; PRISMS, 1998; Simon *et al.*, 1998; Li & Paty, 1999; OWIMS, 1999; Rice *et al.*, 1999; Sturzebecher *et al.*, 1999; PRISMS, 2001; SPECTRIMS, 2001; Li *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002; Goodin *et al.*, 2002; Panitch *et al.*, 2004; Neuhaus *et al.*, 2007).

1.1.3. A Esclerose Múltipla

A EM é uma doença inflamatória e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC). Admite-se que células T ativadas por autoantígenos ainda não determinados passam da periferia para o SNC pela barreira hematoencefálica, evento considerado essencial na patogênese da desmielinização. O processo autoimune na EM implica na ativação de células T por um ou mais antígenos da mielina, como exemplos a proteína básica da mielina (MBP), a proteína proteolipídica (PLP) e a glicoproteína mielina oligodentrócita (MOG) apresentados por moléculas do MHC de classe II na superfície de astrócitos, células da micróglia e endoteliais no SNC (Tilbery *et al.*, 2005; Javed & Reder, 2006).

O IFN- γ é o maior regulador da expressão do MHC de classe II e ativador das células macrófagas ou gliais na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que tem efeito citotóxico aos oligodendrócitos, bem como causando ativação e proliferação de células T autorreativas. O mecanismo de ação proposto para o IFN- β é de que possua efeito anti-inflamatório por reduzir a expressão de moléculas do MHC de classe II induzidas pelo IFN- γ antagonizando desta forma os efeitos desta citocina, inclusive por diminuir sua secreção pelas células T e estimular a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4 e 10 (IL-4 e IL-10) (Yong *et al.*, 1998; Tilbery *et al.*, 2005; Billiau, 2006b; Javed & Reder, 2006; Nakatsuji *et al.*, 2007).

Os IFNs estimulam sua própria secreção, e existem evidências de que a sinalização dos IFNs tipo I está sub-ótima na EM, estando os níveis de IFN- β induzidos por IFN- β também mais baixos nesta patologia. Níveis diminuídos de IFN- α e IFN- β são liberados por células do sistema imune de pacientes com EM em resposta ao desafio mitogênico ou viral *in vitro*, existindo também baixa estimulação da expressão dos produtos pelos IFNs, como a 2',5'oligoadenilato sintetase, proteína Mx, IRF-1 e IRF-2 (fatores regulatórios 1 (positivo) e 2 (negativo) dos genes dos IFNs) (Javed & Reder, 2006).

Não existe cura para a EM, mas terapias imunomodulatórias estão disponíveis para melhoria do quadro da doença, que incluem os fármacos sintéticos acetato de glatiramer e mitoxantrona, sendo o IFN- β o medicamento disponível mais bem caracterizado para a EM (Javed & Reder, 2006).

1.2. O Ensaio Imunoenzimático

Entre os métodos disponíveis para diagnóstico, o ensaio imunoenzimático é o mais utilizado. O advento desta poderosa ferramenta veio revolucionar a pesquisa e detecção de várias enfermidades. O teste imunoenzimático (ELISA) foi desenvolvido por Peter Perlmann e Eva Engvall em 1971 como uma alternativa ao radioensaio para a detecção de antígenos e anticorpos, com características de ser uma técnica mais rápida e relativamente barata. O princípio básico do teste ELISA é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunologia do anticorpo. O teste imunoenzimático permite a detecção de quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. O objetivo do ensaio é a quantificação ou verificação da presença de um antígeno ou anticorpo (Sanchez, 1996; Lequin, 2005).

Como variações do ELISA podemos citar o método de ELISA Indireto, que é comumente empregado para a pesquisa de anticorpos, bem como o ELISA Sanduíche (figura 5) com excesso de anticorpos marcados, sendo o mais utilizado para antígenos polivalentes. Neste último teste, a fase sólida é sensibilizada com anticorpo específico. A amostra em teste (onde se vai pesquisar o antígeno), é incubada com a fase sólida e, a seguir, incuba-se com excesso de anticorpo específico marcado com enzima (geralmente a enzima peroxidase). A reação é revelada pela adição de substrato, medindo-se a intensidade da cor com a utilização de uma leitora automática de microplacas, onde são obtidos os valores de absorvância com alta precisão, que poderão ser submetidos aos cálculos necessários para a correta obtenção dos resultados, sendo a taxa de degradação do substrato pela enzima proporcional à concentração do antígeno. No caso de antígenos bem definidos, são possíveis as quantificações de suas concentrações. A principal vantagem deste método é que permite incubar a amostra com antígeno e o conjugado ao mesmo tempo, tornando o ensaio mais rápido (Sanchez, 1996).

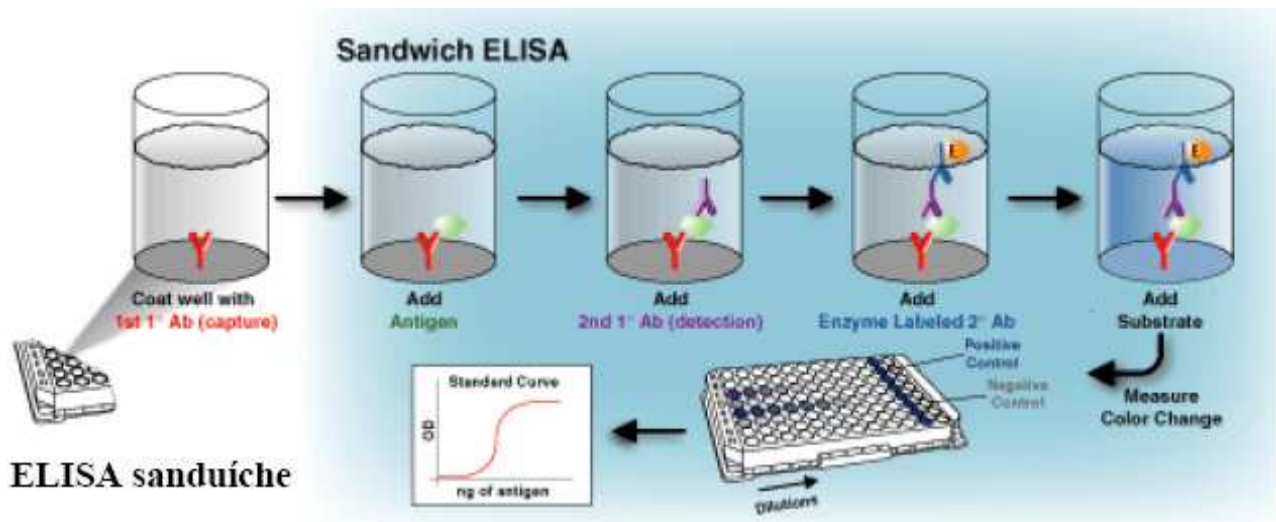


Figura 5: Método ELISA Sanduíche
<http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2C.asp>

1.2.1. Controle de Qualidade do IFN- β utilizando o Ensaio Imunoenzimático

A disponibilidade de simples métodos de ensaios de confiança para detecção e quantificação de IFNs em matrizes farmacêuticas torna-se um papel crucial nos processos de desenvolvimento, monitoramento e no controle de qualidade dos IFNs, devido principalmente a sua natureza físico-química e a relação sensibilidade/especificidade. A maioria dos métodos de análises comumente usados para os IFNs, como exemplo para o IFN- α 2b, incluem bioensaios, focalização isoeletrica (IEF) e análises por SDS-PAGE, sendo altamente sensíveis e sofisticados, e por vezes sofrem de limitada popularidade principalmente pelo seu alto custo, limitada disponibilidade, longos tempos de análises, perdas de especificidades e interferências externas (Zarrin *et al.*, 2006).

Atualmente, testes para detecção e quantificação dos IFNs são principalmente do tipo ELISA. Os anticorpos monoclonais (MAbs) de alta afinidade produzidos para estes testes são extremamente sensíveis e específicos, sendo necessários para a realização destes ensaios procedimentos e condições fidedignos de reprodutibilidade e de repetibilidade padronizados (Billiau, 2006a).

Potência é a habilidade ou capacidade específica de um produto em alcançar o efeito desejado. Isto é baseado na medida de algum atributo do produto e é determinado por um método quantitativo adequado (Brown *et al.*, 1998a). Em geral, potências de produtos

biológicos/biotecnológicos testados por diferentes laboratórios, podem ser comparados através de métodos apenas se expressos em relação a um apropriado material de referência. Desta forma, adequados procedimentos de controle de qualidade, como o método de ELISA Sanduíche quantitativo, tornam-se necessários para confirmação dos requeridos parâmetros exigidos, como potência, pureza e qualidade do produto final, do IFN- β humano recombinante (Brown *et al.*, 1998a; Akers, 2006).

1.3. Os Anticorpos

Os anticorpos são glicoproteínas, também chamadas de imunoglobulinas (Ig), produzidas por linfócitos B, encontradas no sangue ou fluídos do corpo e destinadas a intervirem nos processos de defesa imunitária dos organismos superiores, reconhecendo o antígeno com alto grau de especificidade e afinidade. Os anticorpos podem exercer diversas funções efetoras, incluindo neutralização de antígenos, ativação do sistema complemento e promoção da destruição de micro-organismos dependentes de leucócitos (Abbas *et al.*, 2008).

Os anticorpos são compostos por estruturas básicas: duas cadeias pesadas (HC) e duas cadeias leves (LC) (figura 6). Determinadas regiões (chamadas de domínios) das cadeias leves são altamente variáveis podendo ligar-se a diferentes epítopos em um determinado antígeno. Tais variações permitem ao sistema imune, através dos anticorpos, reconhecer uma variedade de antígenos (Abbas *et al.*, 2008). Existem cinco tipos de classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) podendo apresentar ou não diferentes subclasses (Tabela 1).

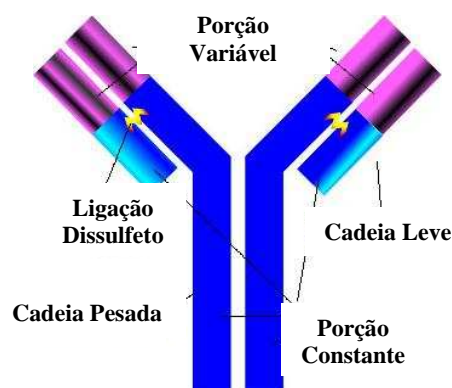


Figura 6: Estrutura de um anticorpo
http://www.jdaross.cwc.net/humoral_immunity.htm

Tabela 1: Anticorpos de mamíferos e suas características.

Anticorpos de Mamíferos		
Anticorpos	Isotipos	Descrição
IgA	IgA1, IgA2	Encontrado em áreas de mucosas, como os intestinos, o trato respiratório e trato urogenital, prevenindo sua colonização por patógenos.
IgD	Somente um	Funciona principalmente como um receptor de antígeno nas células B. Suas funções são menos definidas do que as dos outros isotipos de anticorpos.
IgE	Somente um	Liga-se a alérgenos e desencadeia a liberação de histaminas dos mastócitos, também estando envolvido na alergia. Também protege contra vermes parasitas.
IgG	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Em suas quatro formas, proporcionam a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo. É o único tipo de Ig que o bebê recebe da mãe.
IgM	Somente um	Expressa na superfície das células B. Elimina patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B antes que haja IgG suficiente.

A descoberta dos mecanismos de produção de anticorpos foi uma das grandes vitórias das ciências biológicas neste último século, devido a sua complexidade, mas principalmente pelos benefícios que representa para a humanidade. A produção de anticorpos tornou-se comum e essencial na pesquisa e biotecnologia, com várias aplicações. Como ferramenta de pesquisa, podemos citar a utilização dos anticorpos em testes do tipo *Western-blot*, imunohistoquímicos, imuno-citoquímicos, ELISA, imuno-precipitação e de citometria de fluxo. Anticorpos também possuem papel fundamental nas aplicações terapêuticas, que incluem supressão do sistema imune após transplantes de órgãos, tratamentos dos diferentes tipos de câncer, como leucemias, bem como inibição da angiogênese e para o tratamento de doenças infecciosas (Miller & Leary, 2007).

1.3.1. Mudança de Isotipo (Classe) da Cadeia Pesada da Imunoglobulina

Durante o desenvolvimento, células linfóides sob uma série de programados rearranjos genéticos resultam na expressão de anticorpos. Ambos os genes de cadeias leves e pesadas destes anticorpos contêm um segmento genético de região variável (V), formado por rearranjo somático do DNA durante o desenvolvimento das células B, as quais conferem especificidade de ligação ao antígeno, e um segmento genético de região constante (C), para os quais a cadeia pesada confere funções efetoras biológicas (Purkerson & Isakson, 1992). A capacidade dos linfócitos B de produzir diferentes isotipos de anticorpos proporciona uma plasticidade marcante nas respostas imunes humorais, pois são gerados anticorpos que desempenham funções efetoras diferentes e estão envolvidos na defesa contra diferentes tipos de agentes infecciosos (Abbas *et al.*, 2008).

A IgM é o isotipo predominantemente expresso durante a resposta imune primária humoral bem como nas respostas de células T antígeno-independentes. Embora antígenos T-dependentes usualmente promovam a produção de todas as subclasses de IgGs, é claro que certos tipos de estímulos antigênicos favoreçam predominantemente a produção de isotipos particulares, como por exemplo viroses estimulando preferencialmente a produção do isotipo IgG2a ou como helmintos resultando em altos níveis de IgE (Purkerson & Isakson, 1992).

O principal mecanismo molecular de mudança de isotipo das imunoglobulinas é um processo chamado de recombinação de mudança (*Switch Recombination*), no qual o segmento gênico VDJ (Variável/Diversidade/Junção) rearranjado em uma célula B recombina-se com um gene de região constante (C) localizado posteriormente, e o DNA flanqueado por estas regiões é excluído através de um mecanismo de *looping* intramolecular gerando um DNA circular excisado. A mudança de isotipo é controlada por citocinas derivadas de linfócitos T, tais como a IL-4, TGF- β (fator de crescimento tumoral beta) e IFN- γ , importantes para a indução de fatores de transcrição que identificam quais os *loci* de cadeia pesada da imunoglobulina serão alvos da mudança de isotipo bem como regulando a acessibilidade de recombinases à regiões de *Switch* (S) específicas (figura 7). O sinal providenciado pelo contato físico com células T ativadas poderia ser mediado por moléculas CD40, as quais induzem o gene da desaminase induzida pela ativação, enzima crucial para mudança de isotipo e para hipermutação somática, esta última relacionada à maturação da afinidade (Shimizu *et al.*, 1991; Purkerson & Isakson, 1992; Edry & Melamed, 2007; Abbas *et al.*, 2008).

Foi proposto que a acumulação de transcritos de linhagem germinativa poderiam permitir a expressão de isotipos não-IgM antes da recombinação de mudança. De acordo com este modelo, éxons da região constante de transcritos primários de linhagem germinativa são processados em *trans* (*trans-spliced*) para os segmentos genéticos VDJ derivados de transcritos de cadeia pesada μ . *Trans-splicing* de éxons de transcritos de cadeia pesada μ e transcritos de linhagem germinativa $\gamma 1$, por exemplo, resultam em expressão simultânea de IgM e IgG1, e poderia representar um estágio intermediário na mudança de isotipo antes do rearranjo do DNA (Esser & Radbruch, 1990; Shimizu *et al.*, 1991; Purkerson & Isakson, 1992; Popov *et al.*, 1995).

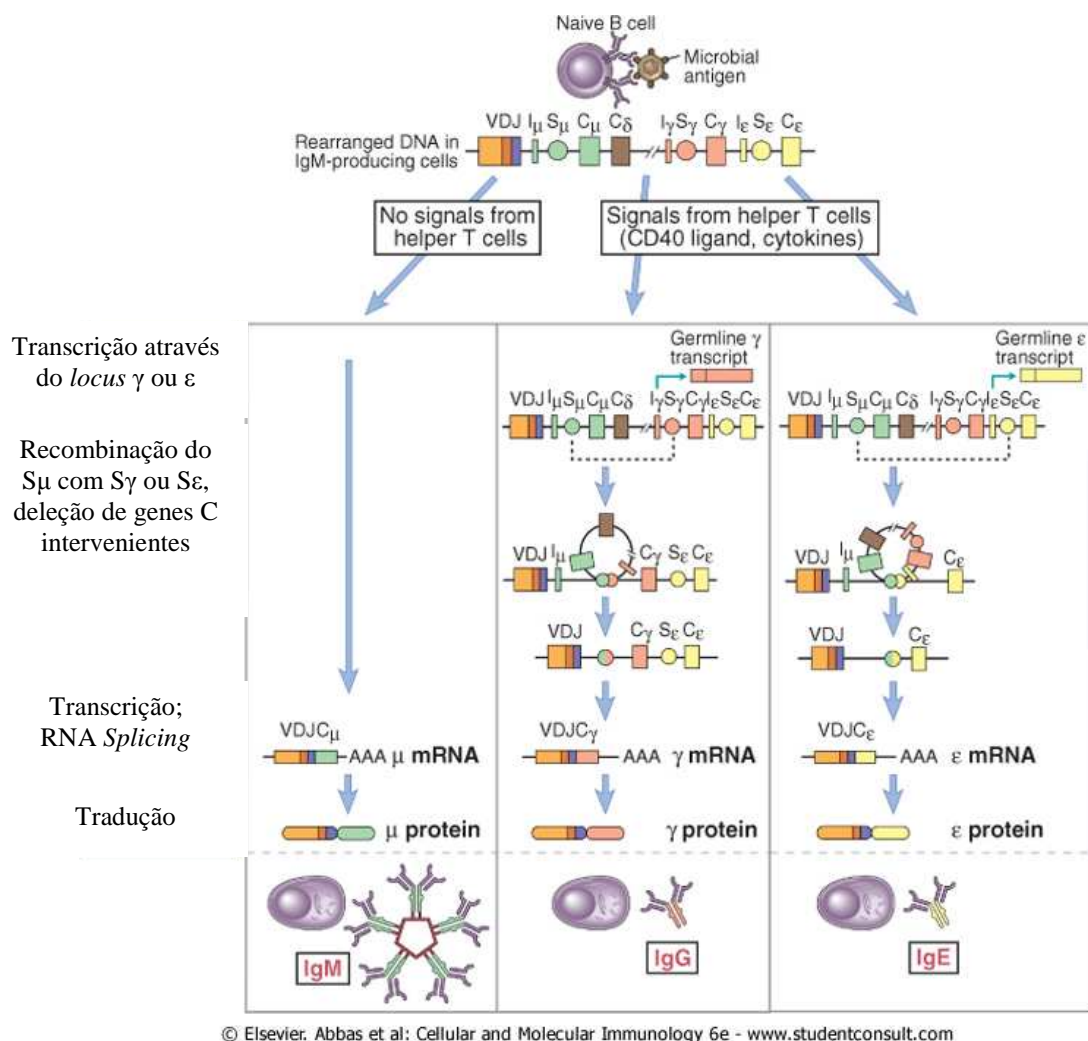


Figura 7: Mecanismos moleculares da mudança de isotipo da cadeia pesada (adaptado de Abbas *et al.*, 2008).

1.3.2. Anticorpos Policlonais

Os anticorpos contidos no soro policlonal se originam de diferentes linfócitos B, o que significa que reagem com vários epítomos de um mesmo antígeno. Isso faz com que sejam mais robustos e tolerantes a mudanças que alteram regiões de reconhecimento por um determinado anticorpo, mantendo então a reatividade a um determinado antígeno mutado. Por esta razão, anticorpos policlonais são preferidos para detecção de proteínas desnaturadas ou variantes antigênicas.

Os anticorpos policlonais são obtidos pela injeção de um determinado antígeno (para o qual espera-se obter o anticorpo em questão) em um animal e com a posterior coleta do soro após um determinado período de tempo. Este é um processo rápido e relativamente barato e pode ser produzido em uma variedade de espécies animais incluindo coelho, cabra, carneiro, mula, galinhas, entre outros. A desvantagem da produção do soro policlonal é que no soro os anticorpos com determinada especificidade são encontrados em quantidade limitada. Além disso, os anticorpos policlonais apresentam especificidades variadas e por isso podem produzir reatividade não desejada.

1.3.3. Anticorpos Monoclonais

Em 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein descobriram e empregaram a primeira técnica para produzir anticorpos monoclonais de especificidade conhecida. Esta técnica é baseada no fato de que cada linfócito B produz anticorpos de uma única especificidade. Como os linfócitos B normais não podem crescer indefinidamente, é necessário imortalizar as células B que produzem um anticorpo específico. Isto é obtido pela fusão celular, ou hibridização somática, entre uma célula B normal produtora de anticorpos, com uma célula de mieloma (formando o híbrido). Em seguida há a seleção *in vitro* em meio seletivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) dos híbridos, seguida da técnica de ‘diluição limitada’ (clonagem) das células fusionadas que secretam anticorpos de especificidade única (clones de hibridomas específicos) e pré-determinada (ligando-se somente a um único epítopo), realizando-se a triagem destes. Posteriormente é realizada a produção em grande escala, deixando-se os hibridomas crescerem em grandes volumes ou em tumores ascíticos de

animais singênicos para obtenção dos MAbs de interesse (Leenaars & Hendriksen, 2005; Abbas *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, este procedimento ocorre em duas fases que são baseadas no uso de animais de laboratório: a primeira sendo a geração de células B, e a segunda fase a produção ‘em massa’ de MAbs geralmente pelo método de indução de ascite (Leenaars & Hendriksen, 2005).

O advento dos MAbs proporcionou um grande avanço na imunologia e demais áreas afins, pela possibilidade de produção de grande quantidade de anticorpos homogêneos e totalmente caracterizáveis. Esses anticorpos são altamente específicos, sendo uma ferramenta para vários testes de pesquisa, caracterização e quantificação de antígenos em pesquisas imunológicas, imuno-histoquímicas, diagnóstico, terapia e sendo muito útil no controle de qualidade de diversas vacinas e biofármacos (imunobiológicos) (Dewar *et al.*, 2005).

1.3.4. Obtenção de Anticorpos a partir de Imunizações Genéticas (GI)

Em 1990, a transferência direta de DNA plasmidial no músculo de um animal (modelo murino) foi demonstrada (Wolff *et al.*, 1990). Desde este estudo inicial, muitos estudos têm sido conduzidos utilizando a imunização a partir de DNA plasmidial contendo um gene de interesse visando obter uma resposta imune para a proteína que este gene codifica. Imunização com vetores plasmidiais que codificam proteínas antigênicas derivadas de patógenos ou células tumorais, denominadas de vacinas de DNA têm sido relatadas para indução da imunidade protetora em diversos modelos animais, como camundongos e coelhos (Moonsom *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2004; Garmory *et al.*, 2003).

Uma importante consideração quando otimizamos a eficácia das vacinas de DNA está na apropriada escolha do vetor plasmidial. As propriedades de promotores celulares e derivados de vírus como o citomegalovírus humano (HCMV) e o símio vírus 40 (SV40) e sequências *enhancers* têm sido intensamente investigadas na pesquisa de promotores com alto nível de expressão, tempo de duração e regulação da expressão do gene heterólogo. O promotor/*enhancer* de HCMV providencia altos níveis de expressão em múltiplos tipos celulares após ambas transfecções transitórias e estáveis, e é o promotor mais largamente utilizado em vacinas de DNA quando comparado com outros promotores (Garmory *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2005).

A expressão eficaz da proteína através da imunização genética também é dependente da presença do plasmídeo no núcleo celular. Sequências específicas presentes no DNA plasmidial são reconhecidas por determinadas proteínas intracelulares, com as quais formam complexos que são endereçados ao núcleo celular. Como importante exemplo, tem-se uma sequência de DNA efetivamente reconhecida que está localizada dentro da região inicial do promotor/*enhancer* do SV40, mostrando-se eficaz no transporte do plasmídeo para dentro do núcleo (Beláková *et al.*, 2007).

As vantagens teóricas das vacinas de DNA em relação às vacinas convencionais incluem: (i) indução de ambas as respostas imunes humoral (anticorpos) e mediada por células; (ii) ser relativamente fácil sua produção; (iii) capacidade de expressar proteínas intracelularmente para a indução de respostas de células T citotóxicas; (iv) capacidade de expressar proteínas *in vivo* com conformação nativa e modificações pós-traducionais parecidas com as que ocorrem na infecção natural (Shedlock & Weiner, 2000; Ni *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, vários autores têm divulgado a produção de anticorpos policlonais utilizando a imunização por DNA plasmidial especialmente para proteínas de difícil purificação. Os métodos para produção tanto de anticorpos policlonais como dos MAbs têm sido na maioria da vezes através da inoculação de alta concentração plasmidial pela via intramuscular (Yeung *et al.*, 1997; Gardsvoll *et al.*, 2000; Moonsom *et al.*, 2001; Tymeiu *et al.*, 2002; Puttikhunt *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2004).

1.3.4.1. Mecanismo de Ação e Indução da Resposta Imune pela Imunização Genética (GI)

Segundo Kano e colaboradores (2007, p.713) “inicialmente os mecanismos de processamento e apresentação de antígenos em miócitos foram questionados, uma vez que estas células não expressam antígenos associados às moléculas do MHC de classe II”, nem moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86, respectivamente) presentes em células especializadas em apresentação de antígenos (APCs), como exemplo as células dendríticas. Neste modelo, após a inoculação intramuscular, o DNA é incorporado aos miócitos e/ou APCs; os miócitos provavelmente sintetizam e liberam antígenos localmente, os quais são processados pelas APCs. O DNA que é endocitado pelas células no sítio de inoculação permanece no núcleo celular sem ocorrer integração ao genoma da célula

hospedeira. As vias metabólicas da célula hospedeira são utilizadas para os processos de transcrição e tradução, resultando na expressão do antígeno protéico (Wahren, 1996; Davis, 1997; Yeung *et al.*, 1997; Srivastava & Liu, 2003; Kano *et al.*, 2007).

Os antígenos expressos são processados pelas APCs e os fragmentos resultantes complexados com moléculas do MHC de classe I. Em seguida, estes peptídeos são apresentados na superfície celular para o reconhecimento e ativação específica de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (figura 8). Alguns dos antígenos produzidos pelos miócitos são secretados para o espaço extracelular, onde podem tanto estimular linfócitos B a produzirem anticorpos específicos quanto ser endocitados por outras APCs. O evento pelo qual o antígeno é processado por miócitos e entregue às APCs é denominado de *Cross-Priming*, favorecendo a ativação de linfócitos T CD4⁺ auxiliares. Através da endocitose, os antígenos passam do compartimento extracelular para o interior das APCs, os quais são considerados antígenos exógenos e desta forma processados em compartimentos celulares distintos daqueles quando o antígeno é originado intracelularmente. Os fragmentos protéicos exógenos são complexados com moléculas do MHC de classe II e apresentados pelas APCs aos linfócitos T CD4⁺ auxiliares, ativando-os (Davis, 1997; Yeung *et al.*, 1997; Srivastava & Liu, 2003; Donnelly *et al.*, 2005; Kano *et al.*, 2007).

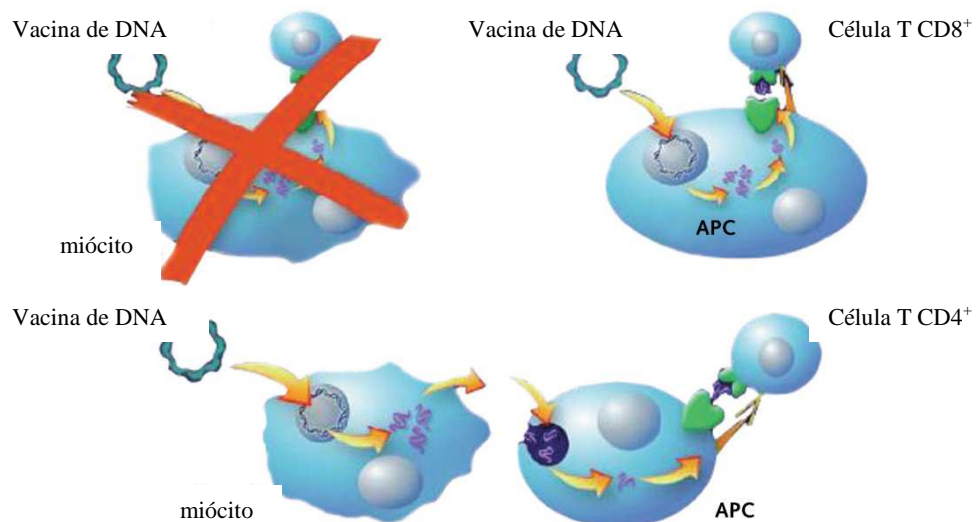


Figura 8: Ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por APCs via mecanismos distintos de processamento do antígeno (Adaptado de Srivastava & Liu, 2003).

A imunização genética desta forma resulta na indução de ambas respostas imunes humoral e mediada por células, com a estimulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ simultaneamente (figuras 8 e 9). Alguns autores afirmam que a imunidade adquirida pela

imunização genética pode persistir por um prolongado período, devido provavelmente à constante expressão endógena do antígeno pela célula hospedeira e à capacidade destes antígenos estimularem linfócitos de memória, presumivelmente em linfonodos locais. A imunidade humoral é responsável por uma significativa resposta profilática nas infecções e a IgG2a tem sido a subclasse de imunoglobulina predominantemente induzida pela imunização genética (Vercammen *et al.*, 2000; Beláková *et al.*, 2007). O IFN- γ produzido pelo linfócito perfil T_H1 é uma importante citocina moduladora de linfócitos B, por possuir função de estimular a secreção de IgG2a antígeno-específica (estando relacionada com o *Switch Recombination* da cadeia pesada da imunoglobulina) (Purkerson & Isakson, 1992; Barry & Johnston, 1996; Wahren, 1996; Chattergoon *et al.*, 1997; Moonsom *et al.*, 2001; Henke, 2002; Ni *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004; Kano *et al.*, 2007).

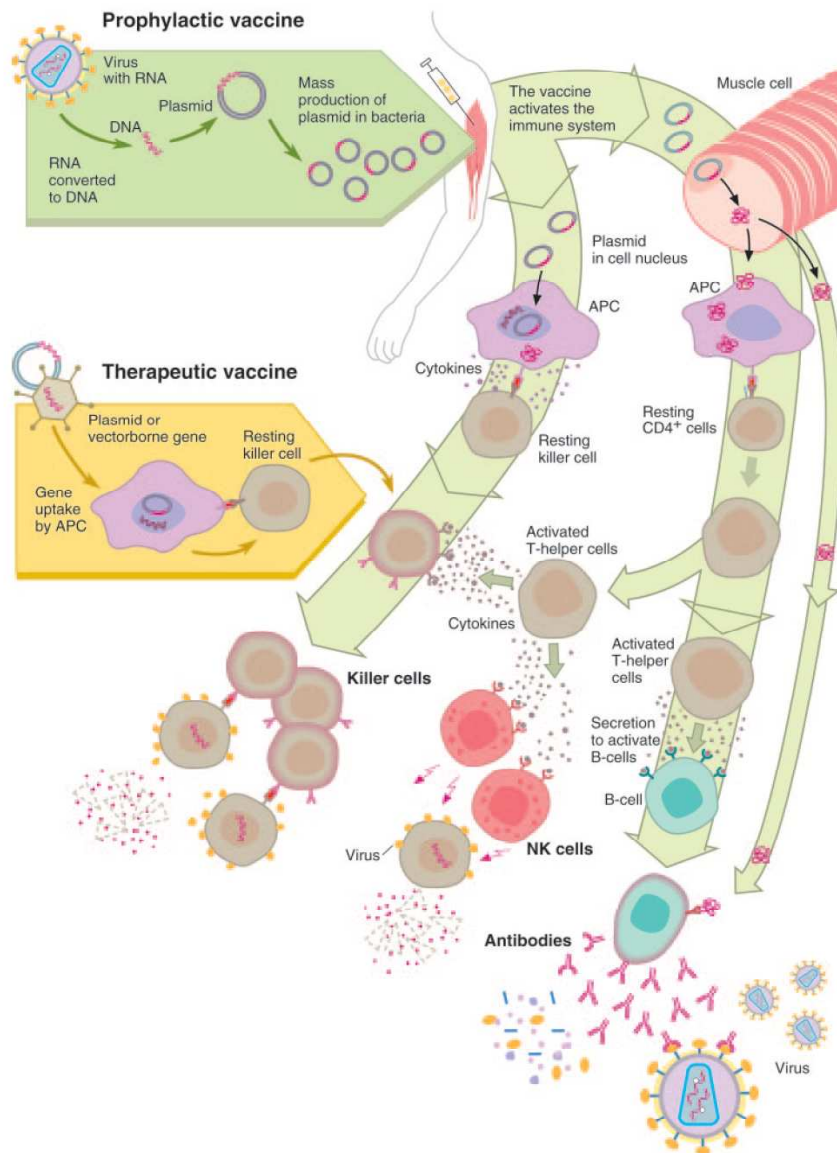


Figura 9: Imunização genética (Donnelly *et al.*, 2005).

1.3.4.2. Adjuvantes para Imunização Genética e seu Papel na Imunidade Inata

Conforme descrito por Kano e colaboradores (2007), nas vacinas de subunidade, como exemplo as vacinas constituídas por proteínas recombinantes, freqüentemente há necessidade da utilização de adjuvantes para aumentar a imunogenicidade da proteína heteróloga. Os adjuvantes podem ser moléculas derivadas de patógenos como o lipídeo monofosforilado; agentes químicos como o anestésico bupivacaína; e seqüências CpGs (Citosina-fosfato-Guanosina) que ativam células do sistema imune inato, podendo desta forma direcionar para uma resposta imune adaptativa (Davis, 1997; Henke, 2002; Donnelly *et al.*, 2005; Kano *et al.*, 2007).

As vacinas de DNA são desenhadas para conter seqüências específicas de nucleotídeos que possuem papel crucial na imunogenicidade destas vacinas. Estes motivos específicos consistem de dinucleotídeos de CpGs com regiões flanqueadas compostas de duas purinas 5' e duas pirimidinas 3'. Tais motivos (seqüências) são não-metilados e cerca de vinte vezes mais comuns no DNA de micro-organismos do que de mamíferos. Funcionalmente, estes motivos podem diretamente estimular múltiplos tipos de células imunes incluindo monócitos/macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T. O sistema imune de vertebrados detecta a presença do DNA CpG estranho pela ligação com receptores do tipo *Toll-like 5* das células APCs, induzindo-as a secretarem citocinas tais como IL-2, TNF- α e IFN- α , críticas nas respostas imunes celulares (Hasan *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000; Henke, 2002; Garmory *et al.*, 2003). De acordo com Kano e colaboradores (2007, p.715), “existem controvérsias sobre o efeito adjuvante das seqüências CpGs porque nem sempre a incorporação em plasmídeo demonstrou melhora na resposta imune; entretanto, há resultados que demonstram o aumento da imunogenicidade da vacina”.

Dano ou irritação tecidual levando à regeneração de miócitos poderia ser importante para o aumento da resposta imune por vacinas de DNA, bem com aumentos da transfecção *in vivo*. Estudos iniciais sugeriram que agentes que causassem necrose muscular, tais como a cardiotoxina ou o anestésico bupivacaína, aumentariam a resposta imune para vacinas de DNA administradas enquanto o músculo estivesse se regenerando. Isto poderia ser devido ao aumento da expressão da proteína em miócitos em regeneração, mas o recrutamento de APCs através das respostas inflamatórias poderia também possuir papel importante (Wahren, 1996; Donnelly *et al.*, 2005).

1.3.4.3. Vias de Administração das Vacinas de DNA

Inoculações intramusculares de plasmídios de DNA em soluções aquosas são relativamente simples e tratam-se de uma via efetiva para a administração da vacina, resultando em transfecção direta de algumas células e recaptação por outras na vizinhança do local de inoculação. Injeção intradérmica ou subcutânea resultam em transfecção principalmente em fibroblastos e queratinócitos, enquanto injeções intramusculares transfectam grande quantidade de miócitos (Shedlock & Weiner, 2000).

Diferentemente, o sistema *Gene Gun* libera o DNA através do bombardeamento (biobalística) de partículas de ouro aderidas com moléculas de DNA plasmidial à altas pressões por gás hélio ou dióxido de carbono para dentro das células. Isto favorece a penetração direta de muitas partículas plasmidiais para dentro das APCs, amenizando desta forma a perda inicial do DNA. Nos trabalhos iniciais avaliando as vias de administração, foi necessária uma concentração de DNA pela via intramuscular cerca de cem vezes maior em relação ao sistema *Gene Gun* para proporcionar uma resposta imune semelhante. Assim, a eficácia da vacina de DNA varia devido aos vários fatores que podem influenciar nestas vias de administração, como dose, vetor, adsorção às partículas, espécie animal e antígeno (Barry & Johnston, 1997; Davis, 1997; Shedlock & Weiner, 2000; Donnelly *et al.*, 2005; Beláková *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2007).

A localização celular da proteína, influenciada pela via de administração, é importante no tipo de resposta imune gerada (celular ou humoral). A imunização pela via intramuscular resulta preferencialmente na indução de forte resposta mediada por células (perfil T_H1), sendo estas células os linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos e associados com a produção de anticorpos do isotipo IgG2a; enquanto que o sistema *Gene Gun* administrado na derme, geralmente estimula uma resposta primária humoral, caracterizada por uma rápida progressão do perfil T_H2 (Barry & Johnston, 1997; Shedlock & Weiner, 2000; Morel *et al.*, 2004; Beláková *et al.*, 2007; Kano *et al.*, 2007).

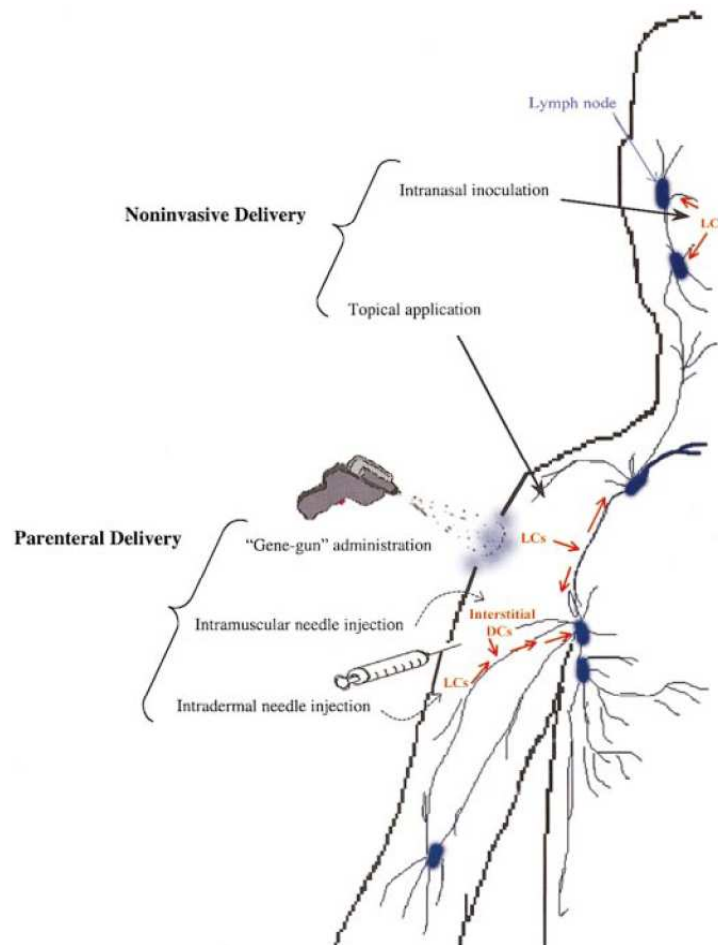


Figura 10: Vias de administração das vacinas de DNA (Shedlock & Weiner, 2000).

2. OBJETIVOS

Geral

Estabelecer metodologias iniciais adequadas à implementação de um ensaio imunoenzimático para detecção e quantificação de moléculas recombinantes do IFN- β humano.

Específicos

1. Iniciar a caracterização parcial de um painel de quatorze MAbs anti-IFN- β humano recombinante utilizando metodologias imunológicas tais como ELISA e *Western-blot*.
2. Estabelecer um protocolo de obtenção de anticorpos policlonais anti-IFN- β humano utilizando vacinação por DNA plasmidial em coelhos machos Nova Zelândia;
3. Avaliar a expressão do gene do IFN- β humano utilizando três vetores plasmidiais previamente construídos quanto à habilidade destes vetores em induzir anticorpos policlonais em modelo animal - coelhos machos Nova Zelândia;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de MAb anti-IFN- β através de Imunização Genética

3.1.1. Construção dos vetores plasmidiais pZeoSV2⁺ IFN- β e pcDNA3.1 IFN- β

Os MAb anti-IFN- β caracterizados neste trabalho foram obtidos em um estudo prévio. Primeiramente, para construção dos vetores plasmidiais contendo o gene do IFN- β humano utilizados na imunização genética, o RNA total de células mononucleares da circulação periférica (PBMC) de um doador humano saudável foi extraído utilizando-se o *kit mini-RNeasy* (Qiagen, USA). Este RNA foi utilizado como molde para obtenção do gene do IFN- β humano através da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), utilizando-se o *kit Superscript III one-step RT-PCR* (Invitrogen, USA). Os *primers* utilizados foram: de sentido 5' (*sense* posição 17-42 5' CTTCgCCATggAggTTCTgTACTCAC 3') e outro no sentido 3' (*antisense* posição 730-757 5' gTCgCgCCATCggCCgAATTAATTACTC 3'). O fragmento obtido do PCR foi clonado em ambos vetores plasmidiais pcDNA3.1 V5 topo e pCR2.1 topo (Invitrogen, USA). A construção pZeoSV2⁺ IFN- β foi obtida através da realização de subclonagem com a construção pCR2.1 topo IFN- β , sendo clonado o gene do IFN- β no sítio *EcoRI* do vetor plasmidial pZeoSV2⁺(Invitrogen, USA).

3.1.2. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as construções plasmidiais

Ensaios de transfecção transitória foram conduzidos utilizando o método de lipossomo não-catiônico e o reagente de transfecção *Fugene 6* (Roche, USA), conforme instruções do fabricante. Células HEK-293-T obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, USA) foram previamente mantidas em meio DMEM (Gibco, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 40 μ g/mL de gentamicina e preparadas em placas de seis cavidades com confluência de aproximadamente 80%. Cerca de 1 μ g de ambos vetores de expressão em células de mamíferos pZeoSV2⁺ IFN- β e pcDNA3.1 IFN- β , purificados com o *kit Pure Link*

HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen, USA), foram utilizados para o ensaio de transfecção. Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante foi retirado e testado por ELISA para detecção da expressão da proteína do IFN- β através do *kit* comercial *Beta Interferon Assay* (R&D, USA).

3.1.3. Imunização Genética em camundongos BALB/c

Para a imunização genética, um protocolo utilizando camundongos adultos BALB/c mediante aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Vice-Presidência de Desenvolvimento Tecnológico da FIOCRUZ sob o número de licença L-0022/08 (ANEXO I) foi utilizado. Os camundongos foram anestesiados e no músculo quadríceps foi injetado o agente químico bupivacaína (Pfizer) (0,25 μ L/g de peso do animal). Após 24 horas, no mesmo sítio de administração da bupivacaína, foram inoculados 100 μ g de ambos vetores pZeoSV2⁺ IFN- β ou pcDNA3.1 IFN- β previamente purificados por gradiente de cloreto de cério (CsCl), de acordo com Sambrook e colaboradores (2001). Foram realizadas outras três inoculações com intervalos quinzenais, seguindo-se o mesmo procedimento. Após 30 dias da última inoculação, amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso oftálmico dos camundongos para avaliação da produção de anticorpos anti-IFN- β , através do ELISA comercial adaptado *Beta Interferon Assay* (R&D, USA).

3.1.4. Obtenção dos MAb

Um mês após a última inoculação em camundongos BALB/c com a construção plasmidial pZeoSV2⁺ IFN- β , estes camundongos foram sacrificados e os esplenócitos foram coletados e fusionados com a linhagem celular de mielomas Sp2/0 murina (CRL-1581, ATCC), de acordo com Harlow & Lane (1988). Hibridomas secretores de MAb foram identificados por ELISA comercial adaptado *Beta Interferon Assay* (R&D, USA) e clonados por diluição limitante.

3.2. Caracterização Parcial dos MAbs anti-IFN- β

3.2.1. Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAbs anti-IFN- β

Para isotipagem dos MAbs anti-IFN- β obtidos, foi utilizado o *kit* comercial *Mouse Mono AB ID* (Zymed Laboratories, USA) seguindo-se as instruções do fabricante. Inicialmente, para a etapa de sensibilização foram adicionados 50 μ L de anticorpo de captura (cabra anti-IgG, IgA e IgM de camundongo na concentração de 0,5mg/mL em PBS pH 7,4 contendo 10% de glicerol e 0,05% de azida sódica - NaN₃) em todos os poços de uma placa de microtitulação *Maxisorp* (96 poços) (figura 11). A placa foi incubada a 4°C durante aproximadamente 16 horas. Para a etapa seguinte de bloqueio, foram adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (BSA 1% em PBS pH 7,4) em todos os poços e a placa foi incubada a 37°C por 1 hora. Os MAbs anti-IFN- β foram adicionados em volume de 50 μ L não-diluídos e diluídos 1/10. O controle positivo foi também incluído (anticorpo monoclonal de camundongo da classe IgG1 em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal Bovino - SFB). A placa foi novamente incubada a 37°C por 30 minutos e após o tempo de incubação foi lavada (4X de 200 μ L/poço) com PBS-T (PBS pH 7,4 contendo Tween 20 0,05%) em lavadora automática (BioRad, USA). Na etapa seguinte foi adicionado 50 μ L de PBS-T (controle negativo), de soro normal de coelho (controle negativo), anti-IgG1 (isotipos pré-diluídos em PBS pH 7,4, contendo 1% BSA e 0,05% de azida sódica) nos respectivos poços (conforme esquematizado na figura 11) e a placa mais uma vez foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após a etapa de lavagem (4X de 200 μ L/poço) com PBS-T, foram adicionados 50 μ L do conjugado (cabra anti-coelho - HRP diluído 1/50) em todos os poços e a placa foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para revelação, após lavagem com PBS-T, foram adicionados 100 μ L do substrato pronto para uso em todos os poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente e monitorada por 30 minutos, realizando-se posteriormente a leitura a 405 nm em leitora de microplacas modelo 680 (BioRad, USA).

AMOSTRA MAbs	PBS-T	S.coelho	IgG 1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	κ	λ	C +
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A não diluído											IgG 1
B 1/10											IgG2a
C não diluído											IgG2b
D 1/10											IgG3
E não diluído											IgA
F 1/10											IgM
G não diluído											κ
H 1/10											λ

Figura 11: Esquema do ELISA de Captura realizado para a Isotipagem dos MAbs.

3.2.2. Subclonagem dos clones de hibridomas por diluição limitante

A subclonagem dos clones de hibridomas secretores de MAbs anti-IFN- β foi realizada através da técnica por diluição limitante em placas de cultura de 96 cavidades, utilizando como camada alimentadora, células obtidas da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Os clones selecionados para subclonagem (clones escolhidos 89-CC6 AH7, 89-CC6 AA11 e 89-CC6 BA11) foram coletados, contados (em câmara de Neubauer) e diluídos em meio de clonagem (50% de meio de cultura + 50% de meio metabolizado por 24 horas) nas concentrações de 3, 1 e 0,5 células por mL. A partir destas diluições, alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas em cada cavidade das placas. Estas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono. Após 5 dias de cultivo, 50 μ L de meio de clonagem foram adicionados e as cavidades foram observadas, com ajuda do microscópio óptico invertido, a fim de detectar aquelas que possuíam, aparentemente, um único clone. A partir do 9º dia, foi iniciada a troca do meio a cada 2 dias. Ao redor do 20º dia muitos clones já apresentavam bom crescimento e os sobrenadantes foram recolhidos para a pesquisa de anticorpos específicos e realização da isotipagem, como descrito em 3.2.1 de Material e Métodos.

3.2.3. Confirmação da Isotipagem através da Reação da Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR)

Com o propósito de confirmar os resultados obtidos da isotipagem, o RNA total extraído dos quatorze clones de hibridomas secretores de cada um dos MAbs anti-IFN- β (conforme descrito em 3.1 de Material e Métodos) foi obtido através do *kit mini-RNeasy* (Qiagen, USA). Este RNA foi utilizado como molde para definição dos isotipos IgG, conforme descrito por Popov e colaboradores (1995), e IgM, através da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), utilizando-se o *kit Superscript III one-step RT-PCR* (Invitrogen, USA). Foram utilizados os pares de *primers* para o domínio CH1 da Ig (*primers* degenerados para a região de éxon das quatro subclasses de IgG - IgU *sense*, 5' ACA(G/C)CCCCATC(A/G/T)GTCTATCC 3' - e IgRT *antisense*, 5' ATGGTT(T/C)TCTCGAT 3'), conforme Popov e colaboradores (1995) e o domínio CH4 da Ig (éxon contido somente na cadeia pesada da IgM - *sense* 5' CCCTGCCACACCTGGTGACC 3' e *antisense* 5' CCTGGTTGAGCGCTAGCATGGTC 3', obtidos pelo *National Center for Biotechnology Information*/nº acesso GI 52358). Como controle de extração de RNA, utilizou-se pares de *primers* específicos para replicação do gene da β -actina.

3.2.4. Produção de Fluidos Ascíticos de MAbs anti-IFN- β

Os clones de hibridomas produtores de MAbs anti-IFN- β congelados em nitrogênio líquido foram descongelados e as células produtoras foram injetadas na cavidade peritoneal de camundongos com 3-4 semanas de idade. Todo o procedimento em questão foi conduzido por profissionais qualificados e treinados nas técnicas e protocolos específicos (POP: 105040.509 – Formação de Ascite) e lotados no Laboratório de Anticorpos Monoclonais/LATAM e no Laboratório de Experimentação Animal/LAEAN ambos do Instituto de Tecnologias em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos.

3.2.5. Purificação de Fluidos Ascíticos contendo MAbs anti-IFN- β

Volumes de aproximadamente 4mL de cada fluido ascítico correspondente a cada um dos MAbs anti-IFN- β foram purificados utilizando o *kit Affi-Gel Protein A MAPS II* (BioRad, USA) de acordo com recomendações do fabricante, com pequenas modificações (Mouta *et al.*, 2003). Para cada fluido ascítico, o seguinte procedimento foi seguido: o fluido foi diluído 1/2 em tampão *Binding Buffer MAPS II* (BioRad, USA) e filtrado em mini-filtro de 0,45 μ m *Millex-HA* (Millipore, USA). Um volume de aproximadamente 1,2mL de resina de cromatografia de afinidade contendo proteína A (volume calculado de acordo com a concentração protéica total de cada fluido ascítico) foi empacotado em uma mini-coluna, que foi então lavada e equilibrada com o tampão *Binding Buffer MAPS II*. O fluido ascítico foi aplicado na coluna e um fluxo de pressão, utilizando bomba peristáltica (BioRad, USA) foi mantido correspondendo a 1,5mL/min. A coluna foi lavada com *Binding Buffer MAPS II* e a seguir 15 frações de 1,0mL foram coletadas. Cada fração foi avaliada em espectrofotômetro medindo-se a densidade óptica (DO) a 280 nm. A pureza das frações foi avaliada em gel SDS-PAGE aplicando cerca de 5 μ L de cada fração com DO alta (acima de 1,5 de DO) e os géis foram corados utilizando o corante *Coomassie Blue* preparado conforme instruções do fabricante (BioRad, USA). Cada alíquota de anticorpo purificado foi diluída 1/2 em glicerol e estocada a -20°C.

3.2.6. Ensaio imunoenzimático comercial adaptado para detecção de MAbs anti-IFN- β

Para detecção dos MAbs anti-IFN- β foi realizado um ensaio ELISA comercial adaptado, utilizando-se o *kit Beta Interferon Assay* (R&D, USA) seguindo-se as instruções do fabricante com modificações. Inicialmente, para a etapa de sensibilização foram adicionados 100 μ L de anticorpo comercial policlonal anti-IFN- β -1b de cabra (R&D Systems, USA) na concentração de 2,5ng/ μ L. A placa foi incubada a 4°C durante aproximadamente 16 horas. Após este intervalo, lavou-se a placa 3X em lavadora de microplacas automática (Immunowash modelo 1575, BioRad, USA) com tampão de lavagem do *kit*. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L em cada cavidade do antígeno padrão IFN- β do *kit* na concentração de 2pg/ μ L e para o controle negativo utilizou-se diluente de amostra do *kit* (*Sample Diluent*).

A placa foi novamente incubada por 1 hora e após esse tempo foi lavada conforme descrito anteriormente. Na etapa seguinte foram adicionados 100µL dos MAbs anti-IFN-β previamente purificados dos fluídos ascíticos produzidos, não-diluídos e diluídos 1/2, 1/5, 1/20 e 1/50, e em paralelo 100µL do MAb comercial anti-IFN-β humano do *kit* (controle positivo) na concentração de 1,0ng/µL, sendo a placa mais uma vez incubada por 1 hora. Após a etapa de lavagem, foram adicionados 100µL do conjugado de peroxidase com imunoglobulinas anti-mouse polivalentes (IgG, IgA e IgM – Imunoglobulina total) (Sigma, USA) diluídos 1/2500 em todos os poços e a placa foi incubada por 1 hora. Para revelação, após lavagem, foram adicionados 100µL do substrato pronto para uso do *kit* em todos os poços. A placa foi incubada a temperatura ambiente e monitorada por 15 minutos, adicionando-se a solução *stop* do *kit* e posteriormente realizando-se a leitura a 450nm em leitora de microplacas *Thermo Plate Reader*.

3.2.7. Ensaio de *Western-blot* dos MAbs anti-IFN-β

Sobrenadantes de cultura de células HEK-293-T expressando transitoriamente a proteína recombinante do IFN-β, purificados e concentrados ou não, e/ou IFN-β recombinante (controle comercial R&D, USA) foram submetidos à eletroforese de SDS-PAGE. Para a realização da eletroforese foi utilizado o sistema *Miniprotean III* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. A seguir os géis foram transferidos para membrana Hybond-P PVDF (Amersham, USA) por 30 minutos a 20V, utilizando o equipamento *Semi-dry* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. Membranas com proteínas transferidas foram coradas com solução de *Ponceau* preparada conforme instruções do fabricante (BioRad, USA) e submetidas à reação de *Western-blot*, seguindo protocolos padrões (Vianna *et al.*, 2006). Os MAbs previamente purificados (e quantificados) a partir de cada fluído ascítico, diluídos 1/200 foram avaliados pela reação de *Western-blot* utilizando-se o conjugado HRP anti-mouse (Promega, USA) diluído 1/3000 e o conjugado HRP anti-cabra (BioRad, USA) diluído 1/1000 para análise do anticorpo policlonal comercial anti-IFNβ-1b humano recombinante (R&D Systems, USA) (controle positivo), por revelação com quimioluminescência, utilizando o *kit* ECL (GE-Healthcare), conforme instruções do fabricante.

3.3. Obtenção de Soro Policlonal anti-IFN- β através de Imunização Genética

3.3.1. Construção do Vetor Plasmidial pCINeo IFN- β

A clonagem do gene do IFN- β no vetor plasmidial pCINeo (Promega, USA) foi realizada por subclonagem a partir da construção plasmidial pZeoSV2⁺ IFN- β . Para isso o plasmídeo pZeoSV2⁺ IFN- β previamente purificado foi clivado com as endonucleases de restrição *HincII* e *DraI* seguindo instruções do fabricante (Invitrogen, USA). De acordo com o mapa de restrição, a dupla clivagem enzimática deu origem ao fragmento de 768 pares de bases (pb) que corresponde ao gene do IFN- β isolado. O fragmento foi purificado após toda a clivagem ter sido aplicada em um gel de agarose de 0,8% e isolado o fragmento desejado por purificação do gel utilizando o *kit Wizard PCR Clean Up* (Promega, USA). A seguir o vetor plasmidial pCINeo foi clivado com a endonuclease de restrição *SmaI* (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante; uma vez linearizado, foi desfosforilado utilizando a enzima fosfatase alcalina obtida de camarão (SAP), conforme instruções do fabricante (Promega, USA). Para realização da subclonagem utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante, o vetor desfosforilado e o inserto purificado foram quantificados utilizando a plataforma de quantificação *Qubit* (Invitrogen, USA). A ligação foi realizada com base em uma proporção entre vetor (0,1 μ g) e inserto (1 μ g) de 1:10 (Sambrook *et al.*, 2001). Para visualização dos plasmídios clivados ou não com a endonuclease de restrição *NdeI* (New England, BioLabs), foi utilizada eletroforese em gel de agarose 0,8% ou 1% e os géis corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) sendo visualizados sob luz ultravioleta utilizando um transiluminador, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001).

3.3.2. Transformação Bacteriana com a Construção Plasmidial pCINeo IFN- β e obtenção de Clones Plasmidiais Recombinantes

Cerca de 10% do volume da ligação descrita no item 3.3.1 foi utilizada para transformar células bacterianas cepa TOP 10 (Invitrogen, USA) previamente preparadas para competência por choque térmico conforme protocolo clássico descrito por Sambrook e

colaboradores (2001). Após transformação, cerca de 10 colônias bacterianas crescidas em placa de *Petri* contendo meio de cultivo Luria Bertani (LB) sólido (meio LB líquido contendo 15g/L de Agar – ver meio LB líquido) resistentes ao antibiótico ampicilina (100µg/mL) foram selecionadas e passadas cada uma separadamente para 5mL de meio LB líquido (10g/L de triptona; 5g/L de extrato de levedura; 10g/L de NaCl) contendo 50µg/mL de ampicilina. Os tubos foram incubados por aproximadamente 16 horas a 37°C e processados para minipreparação plasmidial rápida conforme descrito por Rezende e colaboradores (2005) e/ou utilizando o *kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation* (Roche, USA). Plasmídios recombinantes (contendo o gene do IFN-β) foram confirmados por clivagem com a endonuclease de restrição *NdeI* (New England, BioLabs), conforme descrito no item anterior. Os clones recombinantes foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,8% ou 1% foi utilizada e os géis corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) foram visualizados sob luz ultravioleta utilizando um transiluminador, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001). Estoques de glicerol das culturas de bactérias contendo plasmídios recombinantes foram obtidos e mantidos a -70°C, também conforme descrito por Sambrook e colaboradores (2001).

3.3.3. Gigapreparações Plasmidiais das Construções contendo o gene do IFN-β e controles

As figuras 12A, 12B e 12C ilustram os mapas dos plasmídios de expressão em células de mamíferos utilizados neste projeto. As construções plasmidiais contendo o gene do IFN-β e referentes aos plasmídios 12A e 12B foram obtidos previamente ao início deste trabalho. Cada construção plasmidial correspondendo aos clones recombinantes (contendo o gene IFN-β) cresceu em volumes de 2,5 litros de meio de crescimento, sendo purificadas utilizando o *kit* comercial *QIAfilter Plasmid Giga* (Qiagen, USA), conforme instruções do fabricante. Após purificação, os plasmídios foram quantificados utilizando a plataforma de quantificação *Qubit* (Invitrogen, USA).

12A

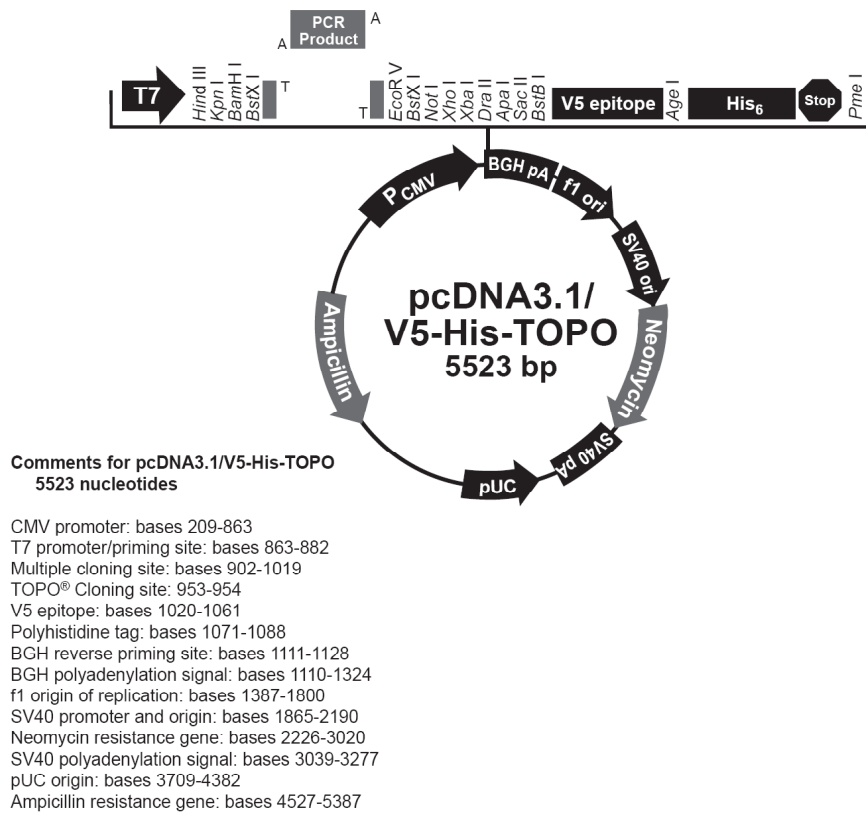


Figura 12A: Mapa do plasmídio comercial pcDNA3.1 utilizado neste trabalho, obtido da Invitrogen, USA (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf).

12B

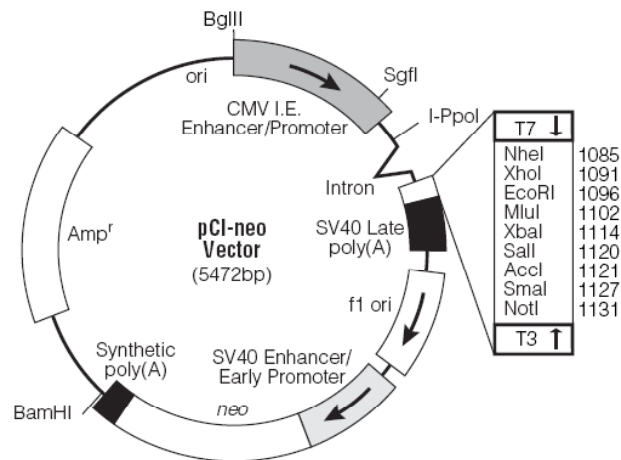


**Comments for pZeoSV2
3515 nucleotides**

SV40 promoter: bases 10-356
 T7 promoter/primer: bases 401-420
 Multiple Cloning Site: bases 433-548
 BGH reverse priming site: bases 560-577
 BGH polyA: bases 560-773
 pUC origin: bases 814-1487
 f1 origin: bases 1780-2290
 CMV promoter: bases 2304-2930
 EM-7 promoter: bases 2931-2997
 Zeocin resistance gene: 2998-3372
 SV40 polyA: bases 3380-3515

Figura 12B: Mapa do plasmídio comercial pZeoSV2 utilizado neste trabalho, obtido da Invitrogen, USA (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pzeosv2_man.pdf).

12C



pCI-neo Sequence Reference Points:

CMV immediate-early enhancer/promoter region	1-750
Chimeric intron	890-1022
T7-EEV sequencing primer binding region	1053-1074
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +2)	1067-1085
Multiple cloning region	1085-1137
T3 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	1140-1158
SV40 late polyadenylation signal	1167-1388
Phage f1 region	1483-1938
SV40 enhancer and early promoter	2000-2418
SV40 minimum origin of replication	2316-2381
Coding region of neomycin phosphotransferase	2463-3257
Synthetic polyadenylation signal	3321-3369
β -lactamase (Amp^r) coding region	3780-4640

Figura 12C: Mapa do plasmídeo comercial pCINeo utilizado neste trabalho, obtido da Promega, USA (<http://www.promega.com/tbs/tb215/tb215.pdf>).

3.3.4. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as Construções Plasmidiais

Ensaios de transfecção transitória foram conduzidos utilizando o método de lipossomo não-catiônico e o reagente de transfecção *Fugene 6* (Roche, USA), conforme instruções do fabricante. Células HEK-293-T previamente mantidas em meio DMEM (Gibco, USA) contendo antibióticos, glicose 4,5% e preparadas em placas de seis cavidades foram utilizadas nestes ensaios. Para controle da transfecção, além dos plasmídios controles, foi utilizado o plasmídio repórter pDM14, o qual expressa o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), conforme descrito por Mouta e colaboradores (2003). Quarenta e oito horas após a transfecção, o sobrenadante foi retirado e testado para detecção da expressão da proteína do IFN- β ou da proteína repórter.

3.3.5. Ensaio imunoenzimático para detecção da proteína do IFN- β , utilizando as Construções Plasmidiais

Os *kits* de detecção das proteínas expressas no ensaio de transfecção transitória em sobrenadantes conforme descrito no item 3.3.4, diluídos ou não, foram respectivamente, o *Beta Interferon Assay* (R&D, USA) para detecção da proteína do IFN- β recombinante e *Bioelisa HBsAg* (Biokit, Espanha) para detecção da proteína repórter (HBsAg).

3.3.6. Inoculação das Construções Plasmidiais em Modelo Coelhos Nova Zelândia

Um protocolo de inoculação utilizando o modelo experimental coelhos machos Nova Zelândia e diferentes plasmídios de expressão em células de mamíferos (descritos acima) foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) na Vice-Presidência de Desenvolvimento Tecnológico da FIOCRUZ sob o número de licença L-0022/08 (ANEXO I). Em linhas gerais, vinte quatro horas previamente a cada primeira inoculação plasmidial foi administrado subcutaneamente no dorso do animal o agente químico bupivacaína (Pfizer) (2,5 μ L/g de peso do animal), visando a sensibilização local. Cada construção plasmidial

previamente purificada, conforme descrito no item 3.3.3, foi inoculada intramuscularmente (500µg/mL cada dose) perfazendo um total de cinco inoculações/doses, com intervalos de aproximadamente 7-10 dias. Ao final do experimento, o soro total obtido através da realização da punção cardíaca de cada animal inoculado foi testado pela técnica de *Western-blot* por revelação com quimioluminescência.

3.3.7. *Western-blot* do Soro Imune de Coelhos Nova Zelândia Inoculados com as Construções Plasmidiais

Sobrenadantes de cultura de células HEK-293-T expressando transitoriamente a proteína recombinante do IFN-β, purificados e concentrados ou não, e/ou IFN-β recombinante (controle comercial R&D, USA) foram submetidos à eletroforese de SDS-PAGE. Para a realização da eletroforese foi utilizado o sistema *Miniprotean III* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. A seguir os géis foram transferidos para membrana Hybond-P PVDF (Amersham, USA) por 30 minutos a 20V, utilizando o equipamento *Semi-dry* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. Membranas com proteínas transferidas foram coradas com solução de *Ponceau* preparada conforme instruções do fabricante (BioRad, USA) e submetidas à reação de *Western-blot* por revelação com quimioluminescência, seguindo protocolos padrões (Vianna *et al.*, 2006). Os soros pré-ímmunes e ímmunes diluídos 1/2 foram avaliados pela reação de *Western-blot* utilizando-se o conjugado HRP anti-coelho (Sigma, USA) diluído 1/3000 e o conjugado HRP anti-cabra (BioRad, USA) diluído 1/1000 foi utilizado para análise do anticorpo policlonal comercial anti-IFNβ-1b humano recombinante (R&D Systems, USA) (controle positivo), por revelação com quimioluminescência, utilizando o *kit* ECL (GE-Healthcare), conforme instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização parcial dos MAbs anti-IFN- β

4.1.1. Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAbs anti-IFN- β

Dos 94 hibridomas produzidos, à princípio dezoito mostraram-se positivos para anticorpos anti-IFN- β . Cada sobrenadante dos clones de hibridomas contendo MAbs anti-IFN- β humano foi submetido a caracterização quanto ao isotipo, conforme descrito anteriormente. Os gráficos a seguir (4.1.1A, 4.1.1B, 4.1.1C e 4.1.1D) mostram os resultados obtidos após a isotipagem. Quatro MAbs (89-CC6 BA12, 89-CC6 AA12, 89-CC6 CC2 e 89-CC6 AD2) foram negativos no teste posterior (não-diluído ou diluído 1/10), por isso sendo desconsiderados neste estudo. Os quatorze MAbs restantes foram positivos para as imunoglobulinas do subtipo IgG2a e IgM simultaneamente e também reagiram positivamente para a cadeia leve *Kappa*.

4.1.1A

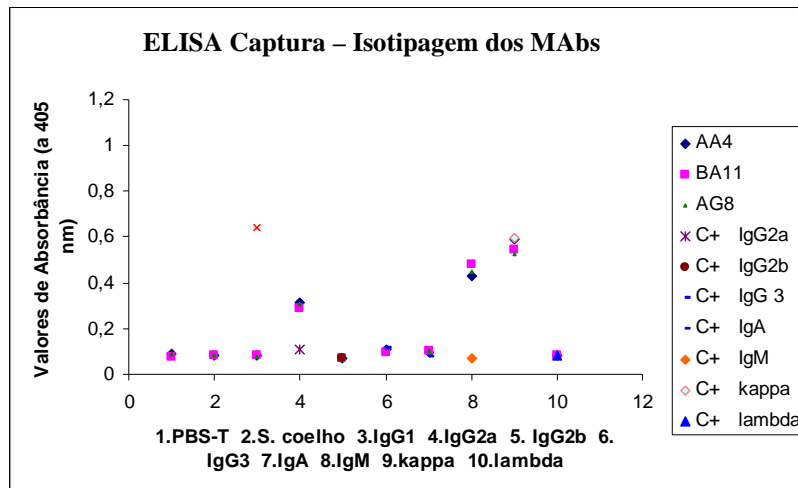
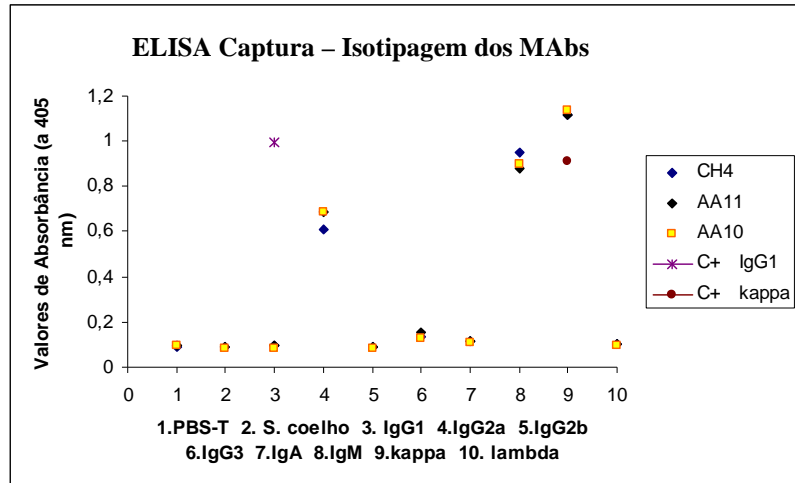
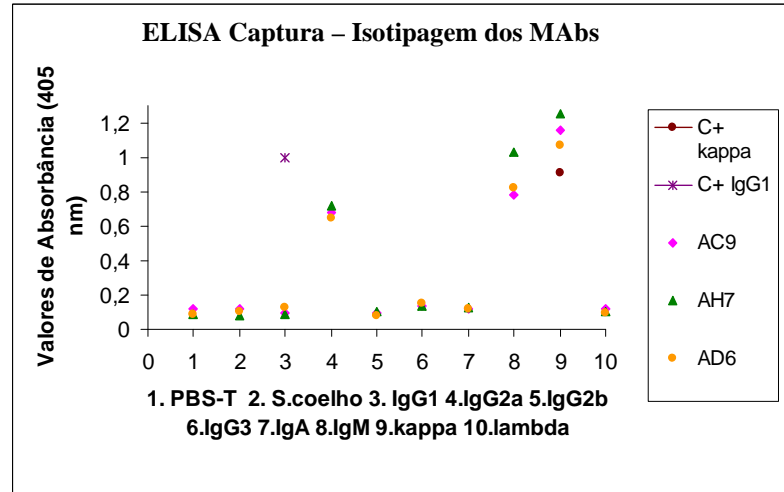


Gráfico 4.1.1A: Resultados de absorvância obtidos no ELISA para isotipagem dos sobrenadantes dos clones de hibridomas com/e sem MAbs anti-IFN- β .

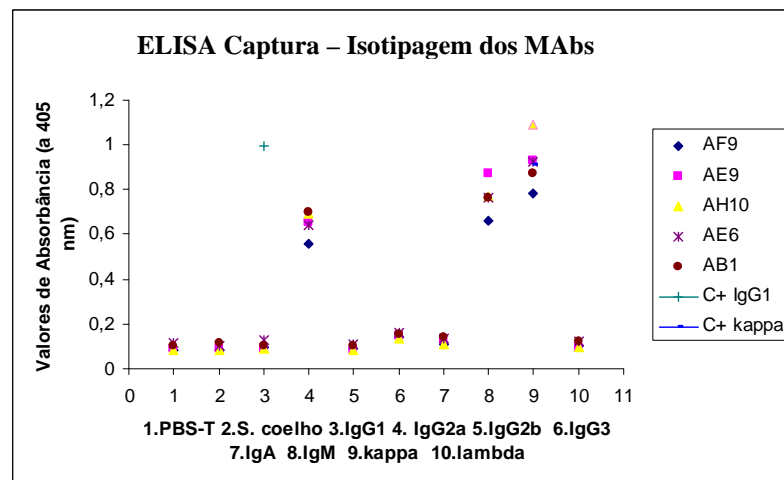
4.1.1B



4.1.1C



4.1.1D

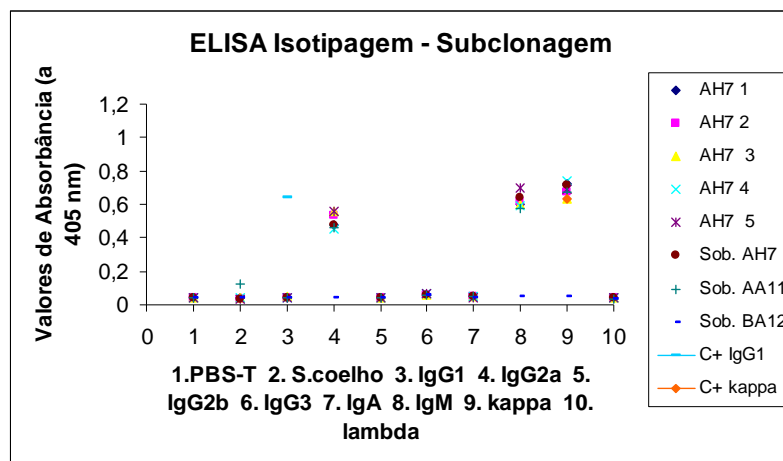


Gráficos 4.1.1B, C e D: Resultados de absorbância obtidos no ELISA para isotipagem dos sobrenadantes dos clones de hibridomas com/e sem MAbs anti-IFN- β .

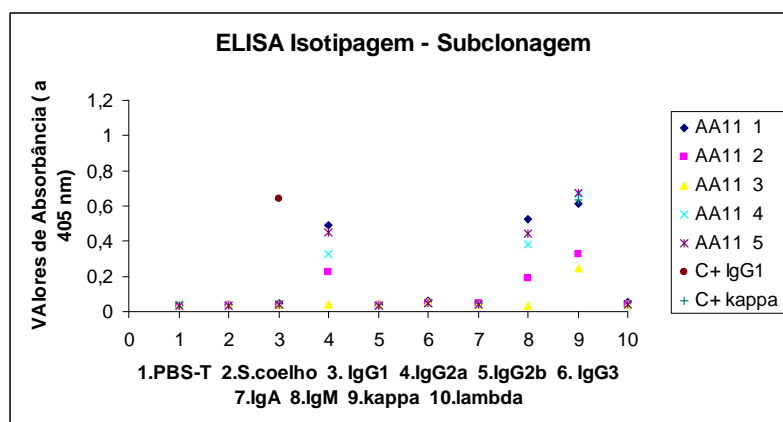
4.1.2. Subclonagem e Ensaio Imunoenzimático para Isotipagem dos MAb's anti-IFN- β

Após realização da subclonagem por diluição limitante dos clones MAb's 89-CC6 AH7, 89-CC6 AA11 e 89-CC6 BA12, um novo teste de isotipagem foi realizado (gráfico 4.1.2A e 4.1.2B) e os clones MAb's 89-CC6 AH7 e 89-CC6 AA11 continuaram expressando simultaneamente os subtipos IgG2a e IgM de cadeia pesada e cadeia leve *kappa*, enquanto o clone 89-CC6 BA12 confirmou o resultado negativo previamente apresentado.

4.1.2A



4.1.2B



Gráficos 4.1.2A e B: Resultados de absorbância obtidos no ELISA para isotipagem da etapa de subclonagem dos sobrenadantes dos clones de hibridomas com/e sem MAb's anti-IFN- β .

4.1.3. Reação da Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (RT-PCR) para confirmação dos resultados da Isotipagem

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos da isotipagem, o RNA total extraído dos clones de hibridomas secretores de cada um dos diferentes MAbs anti-IFN- β (conforme descrito em 3.1 de Material e Métodos) foi utilizado como molde na reação da cadeia da polimerase/RT-PCR para definição das classes dos MAbs, conforme descrito por Popov e colaboradores (1995). Através de pares de *primers* específicos para os domínios CH1 (*primers* degenerados para a região de éxon das quatro subclasses de IgG) e CH4 (éxon contido somente na cadeia pesada da IgM), confirmou-se através dos perfis eletroforéticos (figura 13) a expressão simultânea das classes de IgG e IgM pelos clones de hibridomas secretores MAbs anti-IFN- β humano recombinante.

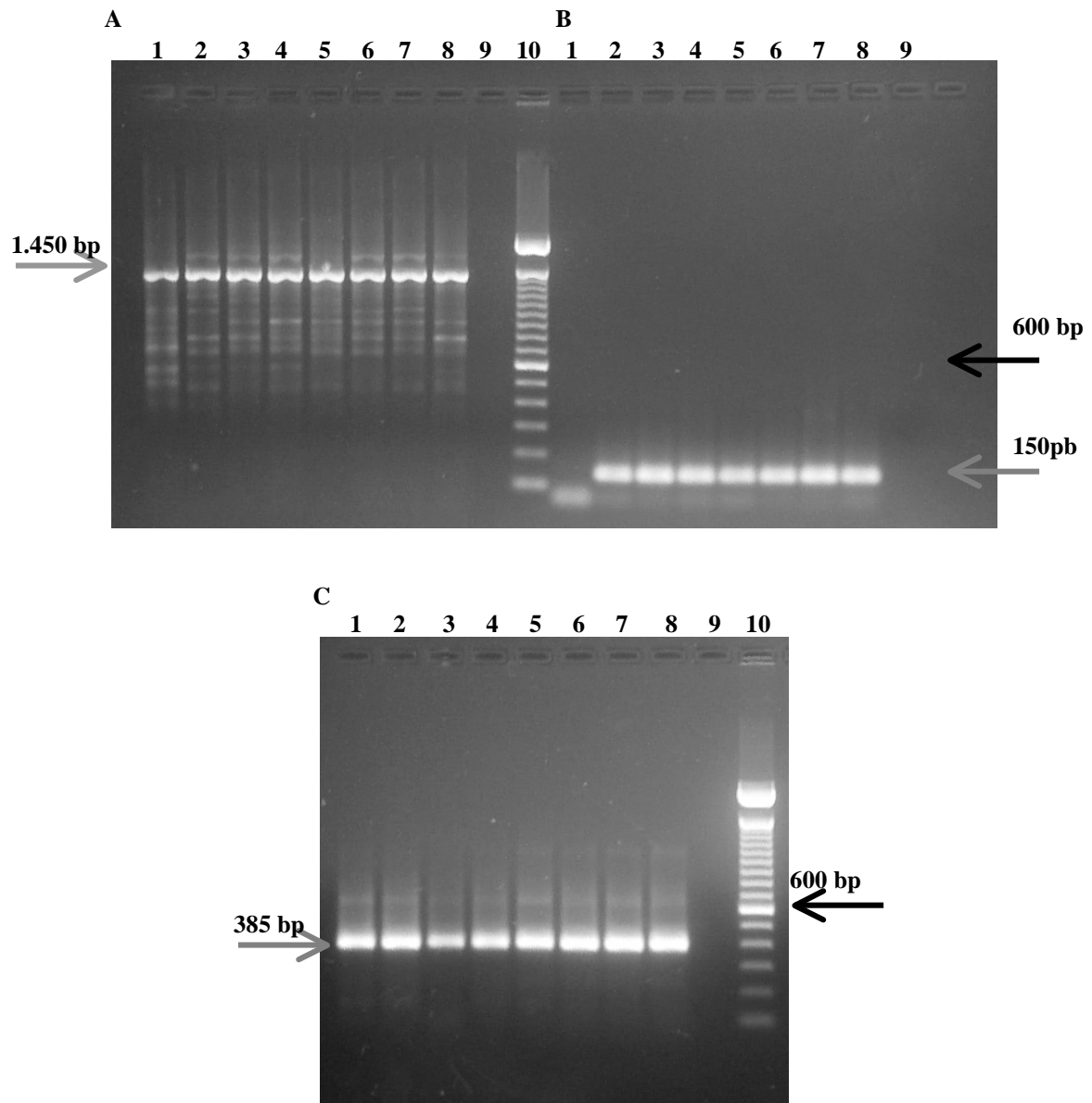


Figura 13: Análise eletroforética dos produtos da RT-PCR dos clones de hibridomas. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da RT-PCR utilizando *primers* específicos para amplificar o RNA mensageiro das IgG (A), IgM (B) ou β -actina (controle) (C) contido no RNA total extraído de clones de hibridomas secretores dos MAbs anti-IFN- β humano recombinante (A, B e C – canaletas de 3 à 8) ou de clones de hibridomas secretores de anticorpos IgG ou IgM utilizados como controles positivos (A, B e C - canaleta 1: controle positivo IgG; canaleta 2: controle positivo IgM). Em A, B e C a canaleta 9 corresponde ao controle de *mix* da RT-PCR e a canaleta 10 em A, B e C corresponde ao marcador de 100bp DNA *Ladder* (Invitrogen, USA). As bandas positivas para IgG, IgM e β -actina correspondem respectivamente a 1.450 pb, 150 pb e 385 pb.

4.1.4. Purificação dos Fluidos Ascíticos contendo MAb anti-IFN- β

A pureza das frações de cada fluido ascítico purificado utilizando o *kit Affi-Gel Protein A MAPS II* (BioRad, USA), referente a cada um dos quatorze MAb, foi avaliada em gel SDS-PAGE.

A análise em SDS-PAGE (figura 14) evidenciou duas bandas que apresentaram massas molares de aproximadamente 25 e 55 KDa, sendo esta separação eletroforética equivalente ao padrão de migração observado para as proteínas de cadeias leves e pesadas de IgG, respectivamente (neste caso, a IgG2a).

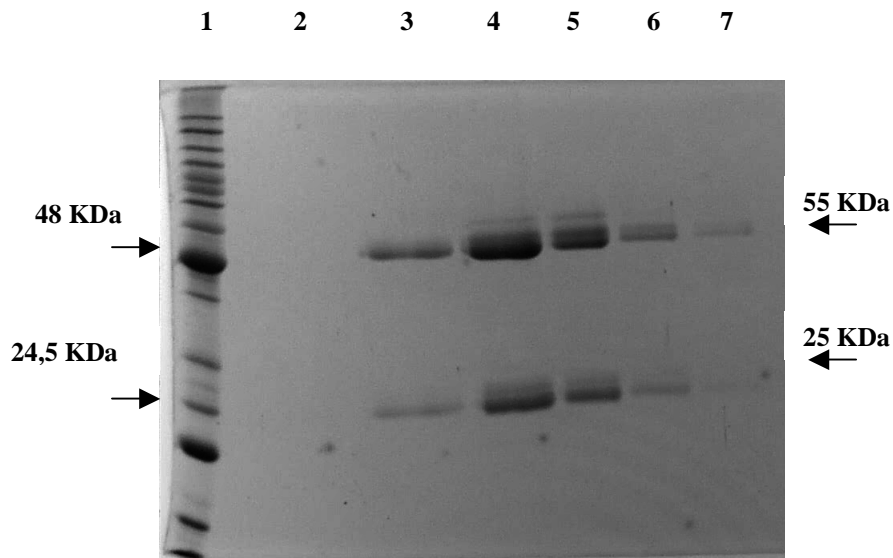


Figura 14: Gel SDS-PAGE para a análise das frações coletadas da purificação do fluido ascítico referente ao clone 89-CC6 AA11 utilizando o *kit Affi-Gel Protein A MAPS II* (BioRad, USA) de acordo com recomendações do fabricante, com pequenas modificações (Mouta *et al.*, 2003). Canaleta 1: Marcador *BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder*; Canaleta 2: vazio; Canaletas de 3 à 7: frações coletadas da purificação do fluido ascítico clone 89-CC6 AA11 (MAb IgG2a anti-IFN- β).

4.1.5. Ensaio Imunoenzimático comercial adaptado

4.1.5.1. ELISA dos fluídos ascíticos para detecção dos MAb anti-IFN- β

O ELISA comercial adaptado foi realizado para análise dos fluídos ascíticos dos quatorze clones de hibridomas secretores de MAb anti-IFN- β . Através do gráfico dos valores obtidos de absorvância (gráfico 4.1.5.1), podemos verificar que os fluídos ascíticos referentes aos clones denominados 89-CC6 AG8, 89-CC6 AE6, 89-CC6 AE9, 89-CC6 AH7, 89-CC6 AA11, 89-CC6 AB1 e 89-CC6 AA4 apresentaram maiores reatividades à proteína do INF- β (com valores de absorvância acima 1,0), na diluição de 1/50 em comparação aos controles positivos.

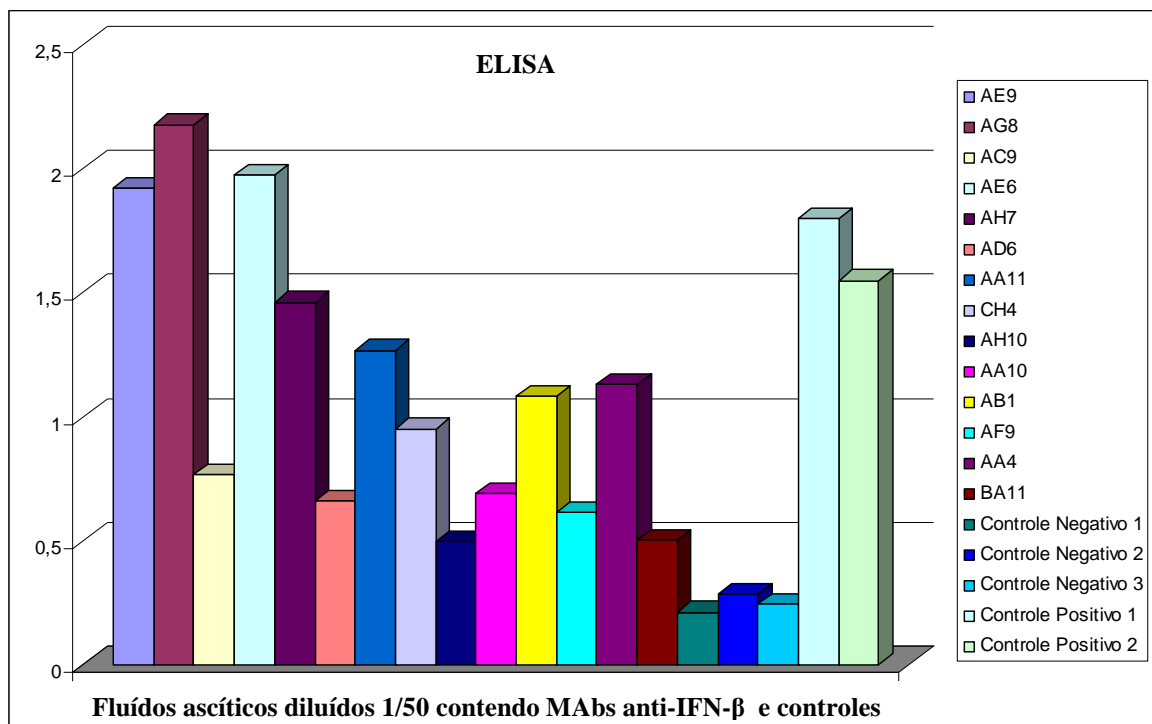


Gráfico 4.1.5.1: Detecção dos MAb anti-IFN- β humano recombinante nos fluídos ascíticos. Os clones MAb denominados 89-CC6 AE9, 89-CC6 AG8, 89-CC6 AC9, 89-CC6 AE6, 89-CC6 AH7, 89-CC6 AD6, 89-CC6 AA11, 89-CC6 CH4, 89-CC6 AH10, 89-CC6 AA10, 89-CC6 AB1, 89-CC6 AF9, 89-CC6 AA4 e 89-CC6 BA11 foram avaliados em relação a sua reatividade, sendo medida através do ELISA comercial adaptado. Foram testados 100 μ L de cada fluído ascítico diluído 1/50 em PBS. Os valores de absorvância foram medidos a 450nm. Foram incluídos MAb anti-IFN- β humano (controles positivos 1 e 2), sobrenadantes de mielomas murinos Sp2/0 (controles negativos 1 e 3) e fluídos ascíticos não-secretores de anti-IFN- β humano recombinante (controle negativo 2).

4.1.5.2. ELISA com o MAb clone 89-CC6 AA11 IgG2a anti-IFN- β

O ELISA comercial adaptado foi realizado para análise do MAb clone 89-CC6 AA11 purificado. O resultado é apresentado no gráfico 4.1.5.2, mostrando positividade do MAb nas diluições de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{20}$ e $\frac{1}{50}$.

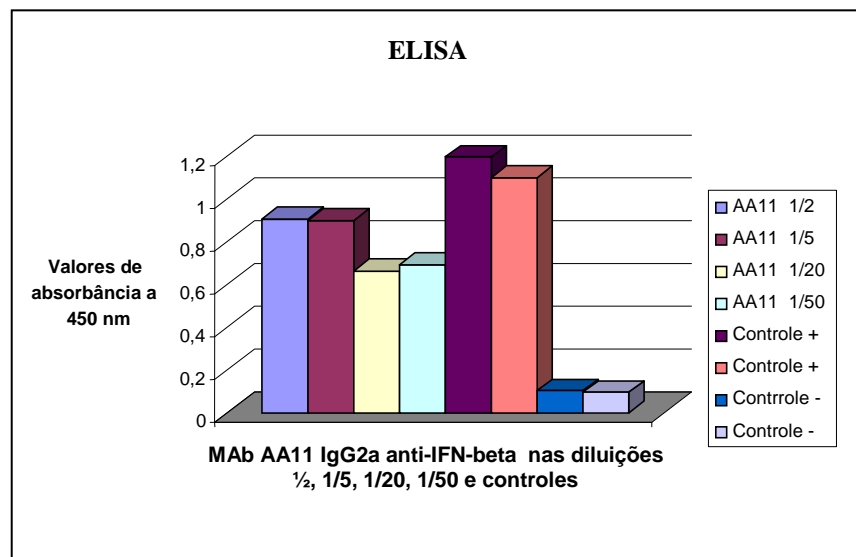


Gráfico 4.1.5.2: Resultado do ELISA comercial adaptado do MAb clone 89-CC6 AA11 IgG2a anti-IFN- β nas diluições $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{5}$, $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{50}$ e controles positivos e negativos.

4.1.6. Ensaio de *Western blot* dos MAbs IgG2a anti-IFN- β

O ensaio de *Western-blot* foi realizado para os MAbs IgG2a anti-IFN- β clones 89-CC6 CH4, 89-CC6 BA11 e 89-CC6 AG8. Analisando-se a figura 15 (A e B), podemos observar que o MAb IgG2a 89-CC6 AG8 apresentou reatividade à duas isoformas para a proteína do IFN- β , uma de 16KDa e outra de 18KDa. Os clones 89-CC6 CH4 e 89-CC6 BA11 apresentaram somente reatividade para a isoforma da proteína de 16KDa, conforme analisados em relação ao controle positivo comercial.

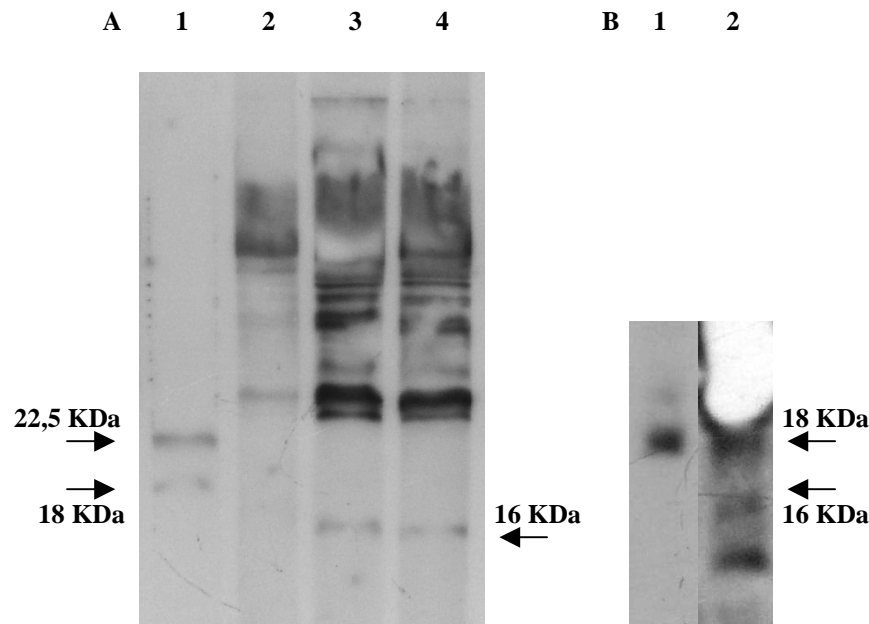


Figura 15: Reatividade do MAb anti-IFN- β no ensaio de *Western-blot*.

A. Reatividade do anticorpo policlonal comercial anti-IFN β -1b humano recombinante - controle positivo (canaleta 1) com sobrenadantes de célula HEK-293-T transfectada com pcDNA3.1 IFN- β , expressando o IFN- β humano recombinante. MAb IgG2a anti-IFN- β purificado com proteína A e diluído 1/60 (clone 89-CC6 CH4 - canaleta 2) reagindo com sobrenadantes de célula HEK-293-T não-transfectada (controle negativo). MAb IgG2a anti-IFN- β clone 89-CC6 CH4 (canaleta 3) reagindo com o IFN- β contido em sobrenadantes de célula HEK-293-T transfectada com pcDNA3.1 IFN- β , expressando o IFN- β humano recombinante. MAb IgG2a anti-IFN- β clone 89-CC6 BA11 (canaleta 4) reagindo com o IFN- β contido com sobrenadantes de célula HEK-293-T transfectada com pcDNA3.1 IFN- β , expressando o IFN- β humano recombinante

B. Reatividade do anticorpo policlonal comercial anti-IFN- β -1b - controle positivo (canaleta 1) com IFN- β comercial; MAb IgG2a anti-IFN- β purificado com proteína A e diluído 1/60 (clone 89-CC6 AG8 - canaleta 2) com IFN- β comercial. As setas em negrito apresentam as formas monoméricas do IFN- β com 16, 18 e 22,5 KDa.

4.2. Obtenção de soro policlonal anti-IFN- β através da Imunização Genética

4.2.1. Obtenção da construção plasmidial pCINeo IFN- β

O vetor plasmidial pCINeo e o inserto IFN- β foram preparados e submetidos à ligação conforme descrito no item 3.3.1. de Material e Métodos. Após transformação bacteriana com a construção plasmidial pCINeo IFN- β , a clivagem com a endonuclease de restrição *NdeI* confirmou a presença do gene do IFN- β clonado no plasmídeo pCINeo. A figura 16.2

apresenta o resultado obtido e a liberação de um fragmento com aproximadamente 1.500 pb, que através do mapa dos sítios de restrição em relação ao gene do IFN- β recombinante humano (figura 16.1), confirma que este inserto foi clonado na orientação correta.

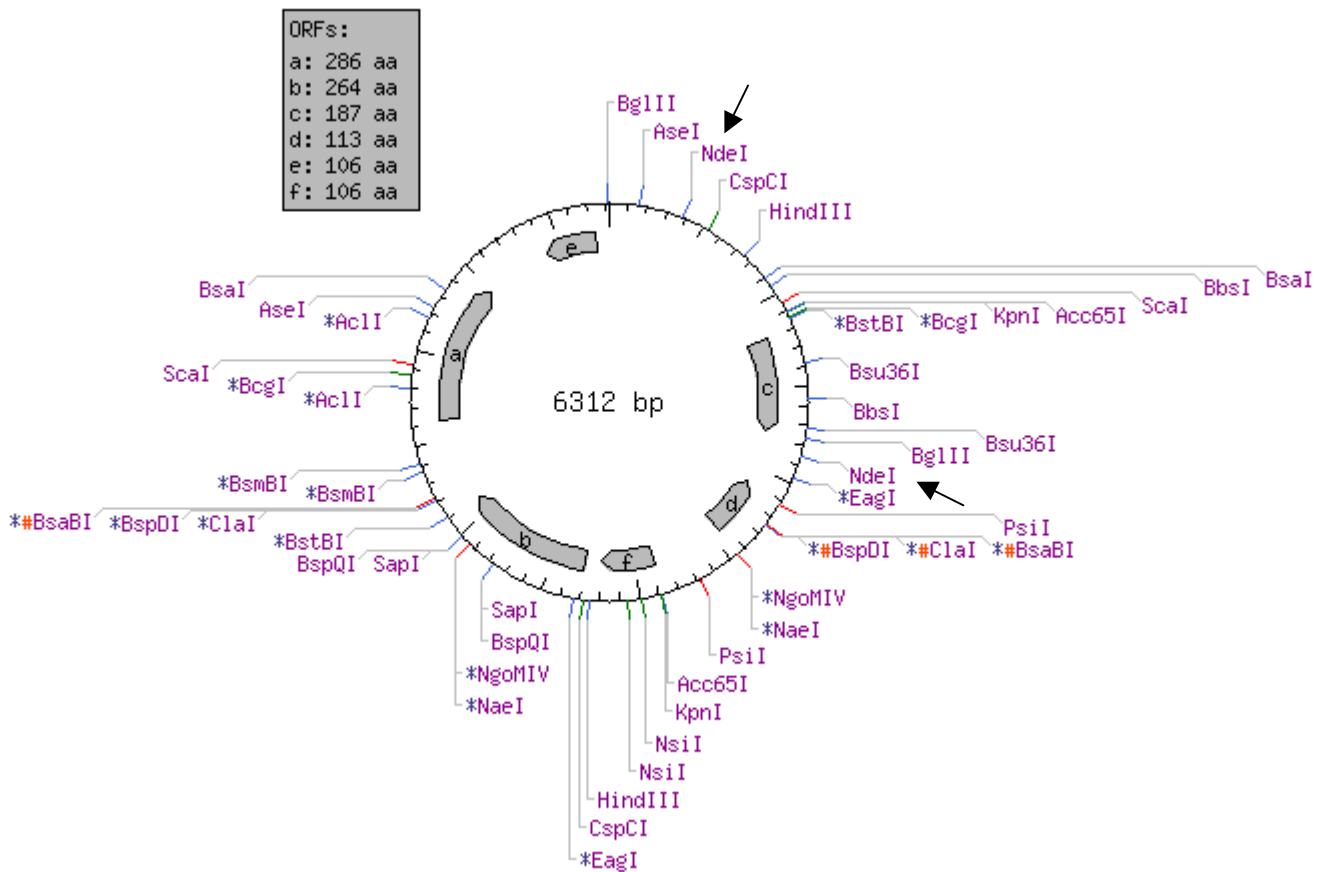


Figura 16.1: Mapa dos sítios de restrição da construção plasmidial pCINEo estando com o gene do IFN- β humano inserido na orientação correta e os sítios de restrição para a endonuclease *NdeI* (intervalo entre os sítios de restrição *NdeI* de aproximadamente 1.500pb – conforme setas em negro) (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/cutshow.php?name=b7072c87>).

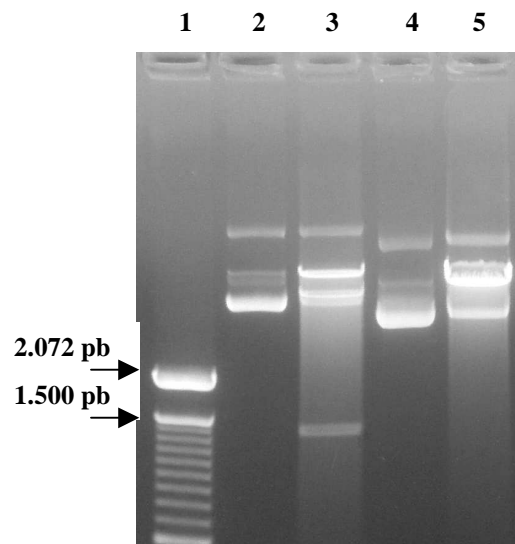


Figura 16.2: Eletroforese em gel de agarose a 1,0% da clivagem da construção plasmidial pCINeo-IFN- β com a endonuclease *NdeI*. Canaletas: (1): Marcador 100pb DNA *Ladder* (Invitrogen, USA); (2): pCINeo IFN- β não-clivado (8 μ L), (3) pCINeo IFN- β clivado (23 μ L), sendo a banda com aproximadamente 1.500 pb a do fragmento do gene do IFN- β recombinante humano; (4): pCINeo controle não-clivado (8 μ L); e (5) pCINeo controle clivado (23 μ L).

4.2.2. Gigapreparações Plasmidiais das Construções contendo o gene do IFN- β e controles

A figura 17 apresenta a análise de alíquotas preparadas das fases (1-4) do processo de purificação da construção plasmidial pCINeo IFN- β e o plasmídeo controle negativo sem inserto, utilizando o *kit* de gigapreparação plasmidial *QIAfilter Plasmid Giga* (Qiagen, USA).

Através das gigapreparações, foram obtidos os rendimentos de 6,2mg/mL de pZeoSV2⁺ IFN- β , 8,5mg/mL de pZeoSV2⁺, 12,6mg/mL de pcDNA3.1 IFN- β , 8,7mg/mL de pcDNA3.1, 8,4mg/mL de pCINeo IFN- β e 1,8mg/mL de pCINeo, estando somente mais baixos os rendimentos para os plasmídios pZeoSV2⁺ IFN- β e pCINeo em relação aos rendimentos esperados entre 7,5-10mg para o *kit QIAfilter Plasmid Giga* (Qiagen, USA).

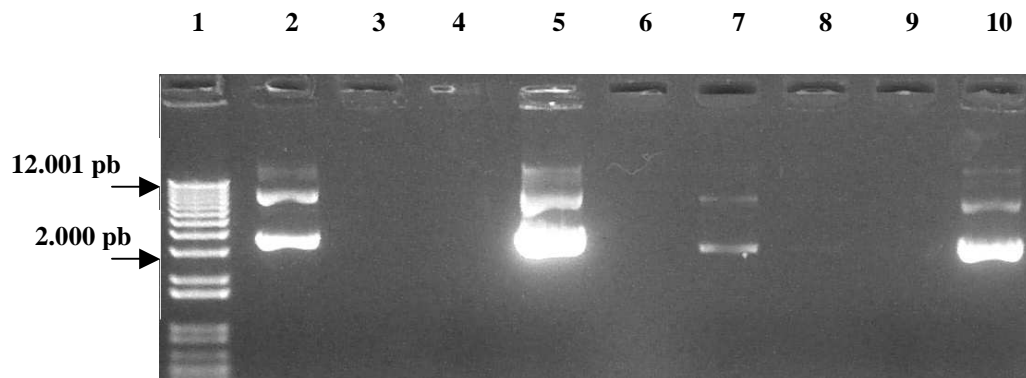


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das alíquotas das frações das etapas de purificação com o kit *QIAFilter Plasmid Giga* (1): Marcador 1Kb *Plus Ladder* (Invitrogen, USA); (2): pCINeo IFN- β - Fase 1: lisado de bactérias antes de ser purificado (3) e (4) pCINeo IFN- β - Fases 2 e 3 da purificação; (5) pCINeo IFN- β - Fase 4: plasmídeo eluído da coluna purificado; (6) vazio; (7) pCINeo controle - Fase 1: antes de ser purificado na coluna (8) e (9) pCINeo controle - Fases 2 e 3 da purificação; (10) pCINeo controle - Fase 4: plasmídeo eluído da coluna, purificado.

4.2.3. Ensaios de Transfecção Transitória em células HEK-293-T utilizando as construções plasmidiais analisados por ELISA

Ensaios de transfecção transitória foram conduzidos para as construções pcDNA3.1 IFN- β , pZeoSV2⁺ IFN- β e pCINeo IFN- β e seus respectivos controles. O gráfico 4.2.3 apresentou resultados positivos uma vez que foi possível detectar a proteína do IFN- β para as três construções plasmidiais. A absorvância foi maior para a construção pcDNA3.1 IFN- β do que para as construções pCINeo IFN- β e pZeoSV2⁺ IFN- β na diluição de 1/5.

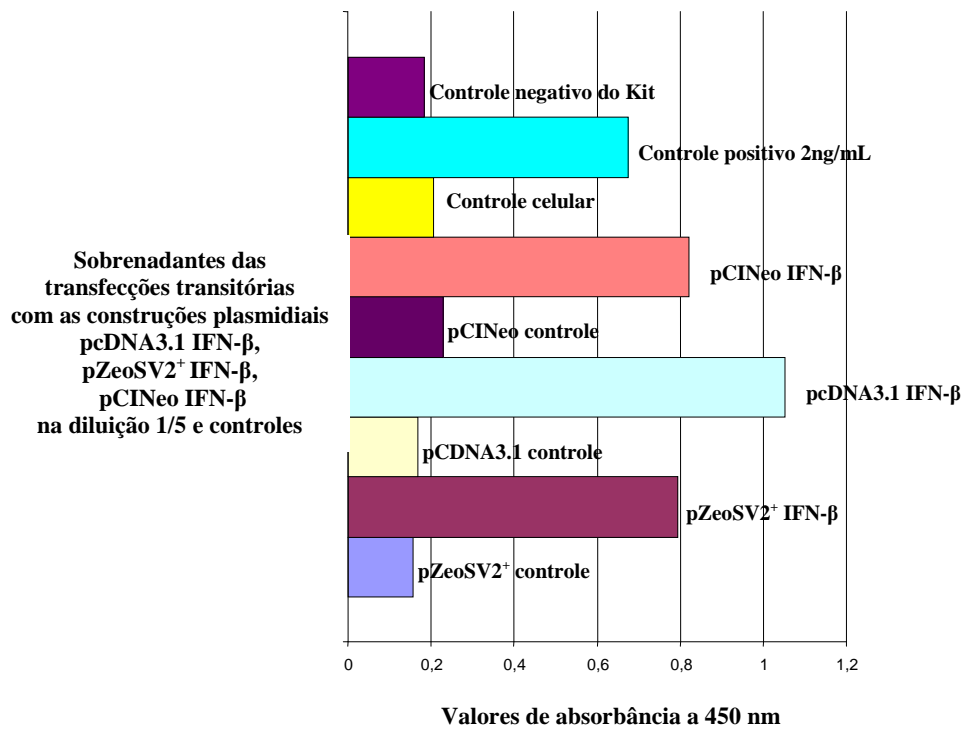


Gráfico 4.2.3: Resultados do ELISA para o ensaio dos sobrenadantes das transfecções transitórias realizadas com as células HEK-293-T e as construções plasmidiais pcDNA3.1 IFN-β, pZeoSV2⁺ IFN-β e pCINeo IFN-β e seus respectivos controles, na diluição de 1/5.

4.2.4. Avaliação do soro imune dos coelhos Nova Zelândia inoculados com as construções plasmidiais

A realização do protocolo de experimentação com coelhos Nova Zelândia conduzida no Laboratório de Experimentação Animal – LAEAN foi realizada em duas etapas (Tabela 2), devido às condições físicas da área laboratorial. Na primeira etapa, inocularam-se intramuscularmente três coelhos, cada um utilizando 500μg/mL de plasmídeo purificado. O primeiro coelho recebeu o plasmídeo pcDNA3.1 IFN-β, o segundo coelho recebeu o plasmídeo pcDNA3.1 sem inserto (controle plasmidial) e o terceiro coelho recebeu solução tampão fosfato - PBS (controle).

Tabela 2: Dados do experimento em modelo animal coelhos machos Nova Zelândia.

Etapas do experimento	Nº do Coelho	Plasmídeo inoculado
1	1	pcDNA 3.1 IFN- β
	2	pcDNA 3.1 controle
	3	PBS (controle)
2	4	pCINeo IFN- β
	5	pCINeo controle
	6	pZeoSV2 ⁺ IFN- β
	7	pZeoSV2 ⁺ controle
	8	pcDNA 3.1 IFN- β

O sangue coletado e processado para obtenção do soro policlonal foi obtido do primeiro coelho somente até a segunda sangria (um total previsto de cinco inoculações conforme descrito no item 3.3.6 de Material e Métodos), devido este coelho adquirir uma protozoose conduzindo-o a óbito, antes que o experimento pudesse ser concluído. Os demais soros coletados dos outros dois coelhos controles foram obtidos até a quinta sangria (sangria total), realizando-se posteriormente a avaliação por *Western-blot*.

Conforme analisado na figura 18, os soros coletados do coelho inoculado com plasmídeo pcDNA3.1 IFN- β , avaliados desde a pré-sangria até a segunda sangria não apresentaram perfis diferentes no ensaio de *Western-blot*, inclusive apresentando uma reatividade inespecífica com alguma proteína encontrada na faixa de 20 KDa, bem como os controles apresentaram-se semelhantes, não aparecendo nenhuma banda com massas moleculares de 18 e/ou 22,5 KDa (massas molares da proteína do IFN- β).

A segunda fase do protocolo experimental (inoculação dos plasmídios pZeoSV2⁺, pZeoSV2⁺ sem inserto/controle, pCINeo IFN- β e pCINeo sem inserto/controle) foi conduzida a intervalos entre as inoculações e sangrias de três semanas, afim de obtermos resultados para futuras avaliações e comparações em relação a primeira etapa da experimentação e repetindo-se a inoculação com plasmídeo pcDNA3.1 IFN- β , para avaliação até a quinta sangria (sangria total).

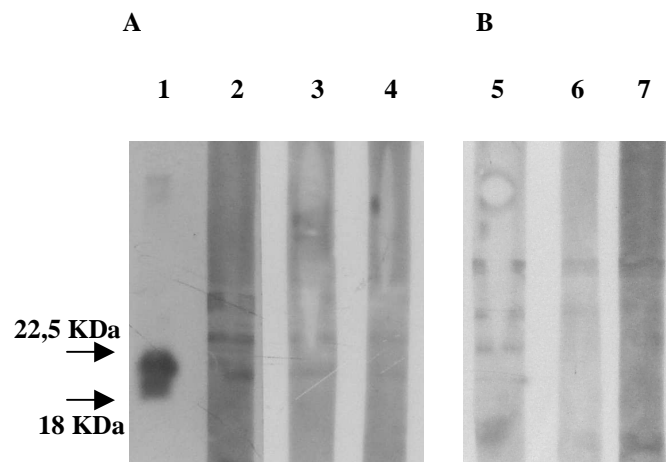


Figura 18: Análise dos soros dos coelhos machos Nova Zelândia por *Western blot*.

A. Reatividade do anticorpo policlonal comercial anti-IFN β -1b humano recombinante – controle positivo (canaleta 1) com IFN- β comercial; Soros pré-sangria (canaleta 2), primeira sangria (canaleta 3) e segunda sangria (canaleta 4) do coelho inoculado com o plasmídeo pcDNA3.1 IFN- β incubado com sobrenadantes de célula HEK-293-T transfectada com pcDNA3.1 IFN- β expressando o IFN- β humano recombinante.

B. Soros pré-sangria (canaleta 5), segunda sangria (canaleta 6) e sangria total (canaleta 7) do coelho inoculado com o plasmídeo pcDNA3.1 controle reagindo com sobrenadantes de célula HEK-293-T transfectada com pcDNA3.1 IFN- β , expressando o IFN- β humano recombinante. As setas mostram a formas monoméricas do IFN- β com 18 e 22,5 KDa de massas moleculares.

5. DISCUSSÃO

A inoculação de plasmídios contendo genes de interesse possibilita a expressão de proteínas heterólogas *in vivo* com estruturas similares às nativas e a geração de respostas imunes celulares e humorais específicas frente a estes antígenos protéicos. Esta estratégia é uma técnica atrativa e eficaz para geração de anticorpos específicos para proteínas de difícil purificação (Davis, 1997; Yeung *et al.*, 1997; Gardsvoll *et al.*, 2000; Shedlock & Weiner, 2000; Moonsom *et al.*, 2001; Tymeiu *et al.*, 2002; Puttikhunt *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2006; Beláková *et al.*, 2007; Chiarella & Fazio, 2008).

Os MAbs anti-IFN- β analisados neste trabalho foram obtidos por imunização genética utilizando a construção plasmidial pZeoSV2⁺ IFN- β . Conforme descrito por Beláková e colaboradores (2007), o sucesso da resposta imune gerada por este tipo de imunização, poderia ser justificado pela presença de seqüências gênicas contidas dentro da região inicial do promotor/*enhancer* do SV40 deste plasmídio. Estas sequências são importantes no transporte do plasmídio para dentro do núcleo da célula e pela adequada expressão do IFN- β humano recombinante e conseqüentemente pela geração de anticorpos anti-IFN- β . Podemos atribuir também este sucesso ao protocolo experimental murino empregado, o qual utilizou-se previamente o agente químico bupivacaína à cada primeira inoculação, buscando-se aumentar o recrutamento de APCs ao local da inoculação visando aumentar a resposta imune da imunização genética (Wahren, 1996; Donnelly *et al.*, 2005), bem como a utilização de intervalos quinzenais entre as inoculações.

Devido à falta no mercado de *kits* de detecção de anticorpos anti-IFN- β , foi necessário o estabelecimento de um ELISA comercial adaptado para a seleção dos MAbs anti-IFN- β . Este ELISA constou de uma adaptação do *kit Beta Interferon Assay* (R&D, USA), para que o mesmo pudesse detectar os MAbs anti-IFN- β . A reatividade dos MAbs foi avaliada com base na utilização do controle positivo comercial e de controles negativos. Nenhum ajuste foi realizado quanto à avaliação de diferentes tampões de bloqueios, concentrações de anticorpos captura, detector e conjugado. Para avaliar a positividade dos MAbs anti-IFN- β , foi utilizado preferencialmente o fluído ascítico e sobrenadantes dos clones de hibridomas relativos a cada um dos quatorze MAbs anti-IFN- β , porque tais fontes de MAbs continham as duas classes de imunoglobulinas (IgM e IgG2a).

Uma vez purificado o fluído ascítico, devido a seletividade da resina de purificação a qual é específica para IgG (por possuir grande afinidade pela região constante das subclasses

de IgG, particularmente IgG2a de camundongo) (Harlow & Lane, 1988), o mesmo poderia apresentar resultados de falsa negatividade, uma vez que a isotipagem revelou a presença de grande quantidade de IgM em relação a IgG2a pelos MAbs obtidos.

O ELISA comercial adaptado realizado para análise dos fluídos ascíticos dos quatorze hibridomas secretores de MAbs anti-IFN- β apresentou resultados positivos, sendo que os clones denominados 89-CC6 AG8, 89-CC6 AE6, 89-CC6 AE9, 89-CC6 AH7, 89-CC6 AA11, 89-CC6 BA11 e 89-CC6 AA4 demonstraram maiores reatividades à proteína do INF- β , na diluição de 1/50 em comparação aos controles positivos. Em relação aos ensaios para os MAbs IgG2a purificados, podemos concluir que o MAb denominado 89-CC6 AA11 no ensaio ELISA comercial adaptado apresentou positividade até a diluição de 1/50, desempenho comparável com os controles.

Quatro dos dezoito MAbs avaliados no ensaio ELISA para isotipagem foram negativos e não expressaram nenhum tipo de imunoglobulina. O *kit* comercial de isotipagem *Mouse Mono AB ID* (Zymed Laboratories, USA) detectou ambas as classes IgM e IgG2a, demonstrando que os quatorze clones de hibridomas secretavam simultaneamente ambos isotipos. Este resultado foi confirmado com a etapa de subclonagem por diluição limitante e posterior confirmação com RT-PCR. Somente poucos autores têm relatado esta simultânea secreção de IgM e IgG de um mesmo clone de hibridoma (Pachmann & Killander, 1986; Strelkauskas *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1991; Popov *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

A mudança de isotipo das imunoglobulinas pelos linfócitos B é um evento de recombinação genética altamente regulado (Purkerson & Isakson, 1992; Edry & Melamed, 2007; Abbas *et al.*, 2008), e os linfócitos geralmente expressam e secretam um isotipo por vez; desta forma, o que poderia explicar a simultânea expressão de duas classes, possivelmente tratou-se da resposta gerada pela imunização genética, podendo providenciar uma série de estímulos que resultariam em diversas informações convergindo para a mudança de classe.

A presença de IgM em maior título poderia ser explicada pela resposta inicial a imunização plasmidial. Quatro inoculações foram conduzidas no experimento com camundongos para obtenção dos MAbs em questão; talvez fosse necessário prolongar o período de inoculações e o número de doses para uma resposta a nível de IgG para este tipo de imunização.

Em relação ao fato do aparecimento também do isotipo IgG2a, cabe ressaltar que este isotipo é geralmente relacionado com este tipo de imunização (genética) e com a via de administração (principalmente a via intramuscular), resultando em indução de resposta mediada por células e estímulo através de citocinas, como o IFN- γ , para geração de anticorpos

do subtipo IgG2a (Barry & Johnston, 1997; Yeung *et al.*, 1997; Moonsom *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2004; Kano *et al.*, 2007; Beláková *et al.*, 2007). Um mecanismo proposto na literatura para o IFN- β é de este antagonizaria a síntese do IFN- γ pelos linfócitos T (Tilbery *et al.*, 2005); este fato poderia explicar em parte os níveis reduzidos de IgG2a verificados nos ensaios de ELISA de isotipagem, devido a um possível efeito de diminuição da expressão desta subclasse pelos reduzidos níveis de IFN- γ .

Os resultados obtidos por *Western-blot* demonstraram que o MAb IgG2a denominado 89-CC6 AG8 apresentou-se reativo à duas isoformas para a proteína do IFN- β , uma não-usual de 16 KDa e outra comum, a forma monomérica não-glicosilada de 18 KDa, podendo ser justificadas essas massas molares através da expressão transitória da molécula do IFN- β por cultura de células HEK-293-T, onde poderiam ser liberadas nos sobrenadantes ambas as formas (glicosiladas e não-glicosiladas) bem como outras formas, devido a rápida síntese e expressão de proteínas heterólogas. Já os MAbs 89-CC6 CH4 e 89-CC6 BA11 somente reconheceram a isoforma não-usual da proteína de 16 KDa.

Uma das propostas desta dissertação tratou da avaliação de três construções plasmidiais contendo o gene IFN- β humano recombinante quanto à expressão em sistema *in vivo* (modelo animal/coelhos machos Nova Zelândia) da indução e produção de anticorpos policlonais. Destas, duas construções embora possuam o mesmo promotor do HCMV, apresentam *enhancers* e estruturas diferentes (pcDNA3.1 IFN- β e pCINeo-IFN- β). Uma das construções (pZeoSV2⁺ IFN- β) diferiu principalmente em relação às duas primeiras quanto ao promotor, que nesta última foi a do SV-40. Tem-se relatado na literatura que o promotor do HCMV demonstrou ser ‘mais forte’ e mais eficiente na expressão de um determinado gene heterólogo (Garmory *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2005). Podemos confirmar esta afirmação pelo resultado que foi obtido no ensaio de transfecção transitória onde os resultados de absorvância foram maiores para as construções pcDNA3.1 IFN- β e pCINeo IFN- β em relação a construção pZeoSV2⁺ IFN- β .

Até o fechamento deste trabalho somente foi obtido resultados preliminares por *Western-blot* na avaliação dos soros dos coelhos inoculados com o plasmídeo pcDNA3.1 IFN- β e controle. Na segunda etapa de experimentação animal houve imprevistos no LAEAN, dentre eles procedimentos de realização de validação do equipamento de autoclavagem e validação de seus rejeitos, bem como a falta de espaço apropriado para contenção destes animais OGMs (Organismos Geneticamente Modificados – Nível 1), os quais impossibilitaram a continuação da avaliação da imunização genética em modelo coelhos Nova Zelândia para obtenção do soro policlonal anti-IFN- β dentro do prazo estipulado para término desta dissertação.

Em relação ao soro do coelho inoculado com o plasmídeo pcDNA3.1 IFN- β , verificou-se que até a segunda sangria a intervalos de 7-10 dias (período de quase 4 semanas) este soro não apresentou anticorpos policlonais anti-IFN- β . Este resultado poderia ser justificado devido possivelmente ao curto período de tempo das inoculações e da duração destas.

Embora esta dissertação tenha sido concluída, a segunda etapa de experimentação com os outros dois plasmídios construídos (pZeoSV2⁺ e pCINeo, ambos com e sem IFN- β) está sendo realizada e seus resultados serão futuramente analisados e comparados, principalmente em relação ao período de inoculações, o qual foi estendido para aproximadamente 3 semanas (conforme trabalhos de Yeung *et al.*, 1997 e Gardsvoll *et al.*, 2000), visando assim melhorar a resposta da imunização genética.

Acreditamos que estes resultados poderão auxiliar na tomada de decisões para o estabelecimento do método de obtenção de anticorpos através da imunização por DNA plasmidial. Esperamos também que os MAbs anti-IFN- β obtidos e parcialmente caracterizados possam auxiliar na construção de um *kit* de detecção do IFN- β humano recombinante visando o controle de qualidade para esta proteína.

6. PERSPECTIVAS

1. A continuidade das inoculações com os plasmídios construídos (pZeoSV2⁺ e pCINeo - ambos com e sem IFN- β , e repetição com o pcDNA 3.1 IFN- β), com posterior análise dos resultados e comparação com a primeira etapa de experimentação animal, principalmente em relação ao intervalo das inoculações, o qual foi estendido para 3 semanas (conforme trabalhos de Yeung *et al.*, 1997 e Gardsvoll *et al.*, 2000), visando obter através da imunização genética uma resposta policlonal anti-IFN- β .
2. Obtendo-se os anticorpos policlonais e utilizando-se os MAbs anti-IFN- β obtidos e parcialmente caracterizados, buscamos através destes insumos auxiliar na construção de um *kit* imunoenzimático tipo ELISA para detecção do IFN- β humano recombinante visando o controle de qualidade desta proteína.
3. Seguir o estudo de análise da imunização genética, comparando-se metodologias *in vivo* e *in vitro* para obtenção de anticorpos, bem como verificando a ocorrência do surgimento simultâneo de duas subclasses de imunoglobulinas como ocorrido neste estudo.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2008.
- Akers M. **Special challenges in production of biopharmaceutical dosage formas**. *BioProcess Int* 2006; 4 (11): 36-43.
- Arduini RM, Strauch KL, Runkel LA, Carlson MM, Hronowski X, Foley SF *et al*. **Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon- β 1a and its receptor chains**. *Protein Sci* 1999; 8: 1867-77.
- Barry MA, Johnston AS. **Biological features of genetic immunization**. *Vaccine*, 1997; 15 (8): 788-91.
- Bates MK, Zhang G, Sebestyén MG, Neal ZC, Wolff JA, Herweijer H. **Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA**. *Biotechniques*, 2006; 40 (2): 199-208.
- Beláková J, Horynová M, Krupka M, Weigi E, Raska M. **DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future?** *Arch Immunol Ther Exp*, 2007; 55: 387-98.
- Billiau A. **Interferon: The pathways of discovery I. molecular and cellular aspects**. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006a; 17: 381-409.
- Billiau A. **Anti-inflammatory properties of type I interferons**. *Antiviral Res*, 2006b; 71: 108-16.
- Brown F, Griffiths E, Horaud F, Petriccioni JC (ed.). **Safety of Biological Products Prepared from Mammalian Cell Culture**. *Dev Biol Stand Basel*, Karger, 1998a; 93: 211-9.
- Brown F, Lubiniecki A, Murano G (ed.). **Characterization of Biotechnology Pharmaceutical Products**. *Dev Biol Stand Basel*, Karger, 1998b; 96: 97-104.
- Chattergoon M, Boyer J, Weiner B. **Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics**. *FASEB J*, 1997; 11: 753-63.
- Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J. **Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research**. *Biochimie*, 2007; 89: 713-8.
- Chen D, Endres RL, Erickson CA, Weis KF, McGregor MW, Kawaoka Y, Payne LG. **Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice**. *Nat Med* 2000; 6: 1187-90.
- Chiarella P, Fazio VM. **Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production**. *Biotechnol Lett* 2008; 30: 1303-10.

Cohen JA, Cutter GR, Fischer JS, Goodman AD, Heidenreich FR, Kooijmans MF *et al.* **Benefit of interferon beta-1a on MSFC progression in secondary progressive MS.** *Neurology*, 2002; 59: 679-87.

Davis HL. **Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization.** *Curr Opin Biotechnol*, 1997; 8: 635-40.

Dewar V, Voet P, Denamur F, Smal J. **Industrial implementation of *in vitro* production of monoclonal antibodies.** *ILAR J*, 2005; 46; 3: 307-13.

Dhib-Jalbut S. **Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis.** *Neurology*, 2002; 58 (4): S3-S9.

Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. **DNA vaccines: progress and challenges.** *The J Immunol*, 2005; 175: 633-9.

Edry E, Melamed D. **Class switch recombination: a friend and a foe.** *Clin Immunol*, 2007; 123: 244-51.

Esser C, Radbruch A. **Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis.** *Annu Rev Immunol*, 1990; 8: 717-35.

European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. **Placebo controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis.** *Lancet*, 1998; 352:1491-7.

Fujimaki T, Ishii H, Matsuno A, Arai H, Nakagomi T. **Effectiveness of interferon-beta and temozolomide combination therapy against temozolomide-refractory recurrent anaplastic astrocytoma.** *W J Surg Oncol*, 2007; 5: 85-9.

Gardsvoll H, Solberg H, Dano K, Hoyer-Hansen G. **Generation of high-affinity rabbit polyclonal antibodies to the murine urokinase receptor using DNA immunization.** *Immunol Methods*, 2000; 234: 107-16.

Garmory HS, Brown KA, Tibball RW. **DNA vaccines: improving expression of antigens.** *Genet Vaccines Therapy*, 2003; 1-5.

Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD *et al.* **Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the american academy of neurology and the MS council for clinical practice guidelines.** *Neurology*, 2002; 58: 169-78.

Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. **DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity.** *Curr Opin Immunol*, 2000; 12: 442-7.

Harle P, Lauret E, Pitha PM, Maeyer E, Carr DJJ. **Expression of human and macaque type I IFN transgenes interferes with HSV-1 replication at the transcriptional and translational levels: IFN- β is more potent than IFN- α 2.** *Virology*, 2001, 290: 237-48.

Harlow E, Lane D. **Antibodies a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.

Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJW. **Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines.** J Immunol Methods, 1999; 229: 1-22.

Henke, A. **DNA immunization – a new chance in vaccine research?** Med Microbiol Immunol, 2002; 191: 187-90.

Invitrogen. pcDNA3.1/V5-His© TOPO® TA Expression Kit. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 20/04/2007]; [37 telas]. Disponível em:
URL:http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf

Invitrogen. pZeoSV2(+) or pZeoSV2(-) A Constitutive Mammalian Expression Vector with Zeocin Selection. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 21/04/2007]; [31 telas]. Disponível em: URL:http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pzeosv2_man.pdf

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM *et al.* The Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). **Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis.** Ann Neurol, 1996; 39: 285-94.

Javed A, Reder AT. **Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis.** Pharmacol Ther, 2006; 110: 35-56.

Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, Wang J, Sonobe Y, Takeuchi H, et al. **Interferon- β is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia.** Brain Res, 2007; 1179: 140-6.

John Ross's Web. Humoral Immunity. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 17/10/2007]; [1 tela]. Disponível em:
URL:http://www.jdaross.cwc.net/humoral_immunity.html

Kano FS, Vidotto O, Vidotto MC. **Vacina de DNA: aspectos gerais e sua aplicação na medicina humana e veterinária.** Semina: Ciências Agrárias, 2007; 28 (4):709-26.

Karpusas M, Nolte M, Benton CB, Meire W, Lipscomb WN, Goelz S. **The crystal structure of human interferon β at 2.2-Å resolution.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 11813-8.

Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. **The structure of human interferon- β : implications for activity.** CMLS Cell. Mol Life Sci, 1998; 54: 1203-16.

Kohler G, Milstein C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.** Nature, 1975; 256: 495-7.

Leenaars M, Hendriksen CFM. **Critical steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations.** ILAR Journal [on-line]. 2005, (46) 3 [consultado em 9/10/2007]; 1-13. Disponível em:
URL:http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/46_3/html/v4603Leenaars.shtml

Lequin RM. **Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).** Clin Chem, 2005; 51(12): 2415-8.

Li DK, Paty DW. **Magnetic resonance imaging results of the PRISMS trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon-beta1a in relapsing-**

remitting multiple sclerosis. Prevention of relapses and disability by interferon-beta 1a subcutaneously in multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 1999; 46: 197-206.

Li DK, Zhao GJ, Paty DW. University of British Columbia MS/MRI Analysis Research Group. The SPECTRIMS Study Group. **Randomized controlled trial of interferon beta-1a in secondary progressive MS: MRI results.** *Neurology*, 2001; 56: 1505-13.

Lipscomb ML, Palomares LA, Hernández V, Ramírez OT, Kompala DS. **Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells.** *Biotechnol Prog*, 2005; 21:40-9.

Meager A, Das RG. **Biological standardization of human interferon beta: Establishment of a replacement world health organization international biological standard for human glycosylated interferon beta.** *J Immunol Methods*, 2005; 306: 1-15.

Miller DH, Leary SM. **Primary-progressive multiple sclerosis.** *Lancet Neurol*, 2007; 6: 903-12.

Millipore. Introduction to Antibodies - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). [on line]. Rio de Janeiro, Brasil; 2007. [Consultado em 20/06/2007]. [1 tela]. Disponível em: [URL:http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2C.asp](http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a2C.asp)

Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerak W. **Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein.** *Immunol Lett*, 2001; 76: 25-30.

Morel PA, Falkner D, Plowey J, Larregina AT, Falo Jr LD. **DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response.** *Vaccine*, 2004; 22: 447-56.

Mouta SSJ, Vianna COA, Ennes I, Gomes SA, Freire MS, Silva ED *et al.* **Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells.** *J Chromatogr B*, 2003; 787: 303-11.

MS/MRI. The IFN β Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. **Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial.** *Neurology*, 1995; 45: 1277-85.

MS/MRI. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. **Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years.** *Neurology*, 1996; 47: 889-94.

Nakatsuji Y, Moriya M, Sakoda S. **Targeting interferons in multiple sclerosis.** *Drug Discov Today: Ther Strategies*, 2007, 4(1): 49-55.

NEBcutter V2.0. Circular Sequence: pCINeo IFN beta. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2008. [consultado em 12/03/2008]; [2 telas]. Disponível em: [URL:http://tools.neb.com/NEBcutter2/cutshow.php?name=b7072c87-pCINeo_IFN_beta](http://tools.neb.com/NEBcutter2/cutshow.php?name=b7072c87-pCINeo_IFN_beta)

Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP. **Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection.** *Trends Pharmacol Sci*, 2003; 24(3): 131-8.

Neuhaus O, Kieseier BC, Hartung HP. **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the interferon-beta, glatiramer acetate, and mitoxantrone in multiple sclerosis.** J Neurol Sci, 2007; 259: 27-37.

Ni Y, Ma K, Ni J, Zheng X, Wang Y, Xiong S. **A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA Immunization.** Cell Mol Immunol, 2004; 1(4): 295-9.

OWIMS - The Once Weekly Interferon for MS Study Group. **Evidence of interferon beta-1a dose response in relapsing-remitting MS: the OWIMS Study.** Neurology, 1999; 53: 679-86.

Pachmann K, Killander D. **Simultaneous immunofluorimetric quantitation of IgM and IgG in single splenic lymphoid cells after immunization.** Immunol Lett 1986; 3:301-5.

Panitch H, Miller A, Paty Weinshenker B. **North American Study Group on Interferon beta-1b in Secondary Progressive MS. Interferon beta-1b in secondary progressive MS: results from a 3-year controlled study.** Neurology, 2004; 63: 1788-95.

Paty DW, Li DK. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. **Interferon beta-1b is effective in relapsing remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial.** Neurology, 1993; 43: 662-7.

Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BRG, Borden EC, Bordens R et al. **Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons.** Cancer Res, 1998, 58: 2489-99.

Popov, AV, Konstantin, VF, Sudarikov, AB. **RT-PCR isotyping of murine Ig-secreting cell lines.** Biotechniques, 1995; 18: 628-31.

PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. **Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis.** Lancet, 1998; 352: 1498-1504.

PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. **PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS.** Neurology, 2001; 56: 1628-36.

Promega. pCI-neo Mammalian Expression Vector. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 20/04/2007]; [13 telas]. Disponível em: URL:<http://www.promega.com/tbs/tb215/tb215.pdf>

Purkerson J, Isakson P. **A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching.** FASEB J, 1992; 6: 3245-52.

Puttikhunt C, Kasinrerak, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moosom S, Sittisombut N, Malasit P. **Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization.** J Virol Methods, 2003; 109: 55-61.

- Reder AT (ed). **Interferon therapy of multiple sclerosis**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000.
- Rezende CAF, Moraes MTB, Matos DCS, McIntoch D, Armoa GRG. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens**. *J Virol Methods*, 2005; 125: 1-9.
- Rice GP, Paszner B, Oger J, Lesaux J, Paty D, Ebers G. **The evolution of neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b**. *Neurology*, 1999; 52: 1277-9.
- Roche. Medicamentos Biológicos.[on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007 [consultado em 26/04/2007]. Disponível em: [URL:http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf](http://www.roche.com.br/NR/rdonlyres/27273F4A-1D0B-4FE4-9DD2-8951FB89EE6E/6488/medicamentosbiologicos1.pdf)
- Rodriguez J, Spearman M, Huzel N, Butler M. **Enhanced production of monomeric interferon- β by CHO cells through the control of culture conditions**. *Biotechnol Prog*, 2005; 21: 22-30.
- Samuel CE. **Antiviral actions of interferons**. *Clin Microbiol Rev*, 2001; 778-809.
- Sambrook J, Russel DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001.
- Sanchez MCA. Testes Sorológicos. *In*: Antonio Walter Ferreira; Sandra do Lago Moraes, org. **Diagnóstico de Laboratório das Principais Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.
- Sattler M, Demmer I, Williams SK, Maier K, Merkler D, Gadjanski I *et al*. **Effects of interferon-beta-1a on neuronal survival under autoimmune inflammatory conditions**. *Exp Neurol*, 2006; 201: 172-81.
- Shedlock DJ, Weiner DB. **DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity**. *J Leukoc Biol*, 2000; 68: 793-806.
- Shimizu A, Nussenzweig MC, Han H, Sanchez M, Honjo T. **Trans-Splicing as a possible molecular mechanism for the multiple isotype expression of the immunoglobulin gene**. *J Exp Med*, 1991; 173: 1385-93.
- Simon JH, Jacobs LD, Champion M, Wende K, Simonian N, Cookfair DL. *et al*. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. **Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis**. *Ann Neurol*, 1998; 43: 79-87.
- Spearman M, Rodriguez J, Huzel N, Butler M. **Production and glycosylation of recombinant β -interferon in suspension and cytopore microcarrier cultures of CHO cells**. *Biotechnol Prog*, 2005; 21: 31-9.
- SPECTRIMS Study Group. Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-beta-1a in MS. **Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: clinical results**. *Neurology*, 2001; 56: 1496-1504.
- Srivastava IK, Liu MA. **Gene vaccines**. *Ann Intern Med*, 2003; 138: 550-9.

Strelkauskas AJ, Lofton C, Aldenderfer PH. **Human monoclonal antibody: 2. Simultaneous expression of IgG and IgM with similar binding specificities by a human hybrid clone.** *Hybridoma* 1987; 6: 479-87.

Sturzebecher S, Maibauer R, Heuner A, Beckmann K, Aufdembrinke B. **Pharmacodynamic comparison of single doses of IFN-beta 1a and IFN-beta 1b in healthy volunteers.** *J Interferon Cytokine Res*, 1999; 19: 1257-64.

Tilbery CP, Felipe E, Moreira MA, Mendes MF, França AS. **Interferon beta 1a na esclerose múltipla – experiência de um ano em 62 pacientes.** *Arq Neuropsiquiatr*, 2000; 58 (2-B): 452-9.

Tymeiu S, Wijkhuisen A, Sagot MA, *et al.* **Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P.** *J Neuroimmunol*, 2002; 128: 23-30.

Vercammen M, Scorza T, Huygen K, De Braekelleer J, Jacobs D, Saman E, Vershueren H. **DNA vaccination with genes encoding toxoplasma gondii antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice.** *Infect Immun*, 2000; 68 (1): 38-45.

Vianna COA, Mouta SSJ, Martins MGT, Batoreu NM, Queiroz JL, Gomes SA *et al.* **Evaluation of murine monoclonal antibodies targeting different epitopes of the hepatitis B virus surface antigen by using immunological as well as molecular biology and biochemical approaches.** *J Immunol Methods*, 2006; 313: 38-47.

Wahren B. **Gene vaccines.** *Immunotechnology*, 1996; 2: 77-83.

Walsh G, Jefferis R. **Post-translational modifications in context of therapeutic proteins.** *Nat Biotechnol*, 2006; 24 (10): 1241-52.

Weber F, Haller O. **Viral suppression of the interferon system.** *Biochimie*, 2007; 89: 836-42.

Wikipédia. Human Interferon beta. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 20/04/2007]; [1 tela]. Disponível em:

URL:http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:1AU1_Human_Interferon-Beta.png

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felger PL. **Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*.** *Science*, 1990; 247: 1465-8.

Wright A, Semyonov A, Dawes G, Crameri A, Lyons R, Stemmer WPV, APT D, Punnonen J. **Diverse plasmid DNA vectors by directed molecular evolution of cytomegalovirus promoters.** *Hum Gene Ther*, 2005; 16: 881-92.

Wu CJ, Karttunen JT, Chin DHL, Sen D, Gilbert W. **Murine memory B cells are multi-isotype expressors.** *Immunology* 1991; 72: 48-55.

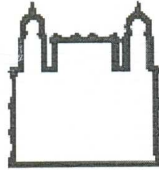
Yeung SCJ, Anderson J, Kobayashi K, Oka K, Chan L. **Production of rabbit polyclonal antibody against apobec-1 by genetic immunization.** J Lipid Res, 1997; 38: 2627-32.

Yong VW, Chabot S, Stuve O, Willians G. **Interferon beta in treatment of multiple sclerosis - mechanisms of action.** Neurology, 1998; 51: 682-9.

Zarrin A, Foroozesh M, Hamidi M, Mohammadi-Samani S. **A simple and rapid HPLC method for quantitation of interferon- α 2b in dosage forms and delivery systems.** J Chromatogr B, 2006; 83: 199-203.

ANEXOS

ANEXO I



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “**Obtenção do Interferom Beta Humano Recombinante para uso Terapêutico**” sob a responsabilidade da **Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza**, foi licenciado pelo nº **L-0022/08** e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 18/03/2008. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 18 de março de 2012.

Rio de Janeiro, 18 de março de 2008.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

ANEXO II**Preview**

From: ZSteplewski@comcast.net
To: baroni@bio.fiocruz.br
CC:
Subject: Hybridoma - Decision on Manuscript ID HYB-2008-0094.R1
Body: 09-Jan-2009

Dear Dr. Moraes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN RECOMBINANT INTERFERON BETA USING GENETIC IMMUNIZATION WITH SIMULTANEOUS EXPRESSION OF IgM AND IgG ISOTYPES" in its current form for publication in Hybridoma.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101.

Please also consider publishing a description of your monoclonal antibodies along with your manuscript. Attached you will find a Monoclonal Antibodies form to be completed and returned should you wish to share this information with your colleagues. Please send this form electronically to: ZSteplewski@comcast.net or Gillian.Hewitt@mail.tju.edu.

Authors who would like their papers to be posted on PMC immediately have the option to make their articles available free on line via Liebert Open Option for a one-time fee. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Hybridoma, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Zenon Steplewski
Editor-in-Chief, Hybridoma
ZSteplewski@comcast.net

Reviewer(s)' Comments to Author:

Date Sent: 09-Jan-2009

File 1: * [MALCopyrightRev0608.pdf](#)

File 2: * [MonoclonalAntibodiesform.doc](#)

Generation of Monoclonal Antibodies Against Human Recombinant Interferon Beta Using Genetic Immunization with Simultaneous Expression of IgM and IgG Isotypes

Carina Pacheco Cantelli,^{1,2} Maria da Glória Martins Teixeira,¹ Eneida Almeida Santos,¹ Haroldo Cid da Silva, Jr.,¹ Sergio da Silva e Mouta, Jr.,¹ Marcia Maria Araújo Pimenta,³ Carlos Otávio Alves Vianna,¹ Natália Plínio de Souza,¹ Nádia Maria Batoreu,⁴ Ricardo Galler,⁵ and Marcia Terezinha Baroni de Moraes¹

Monoclonal antibodies (MAbs) against human recombinant interferon β (hrIFN β) were generated by genetic immunization (GI). In order to test two viral promoters frequently used in mammalian expression plasmid vectors, mice were inoculated four times by intramuscular injection, without adjuvant, with 100 μ g of either pcDNA 3.1hrIFN β or pZeoSV2IFN β containing the entire human interferon β gene and under the control of, respectively, human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early promoter or early SV-40 enhancer/promoter. Only serum samples from mice immunized with pZeoSV2IFN β were positive to anti-hrIFN β . The spleens of the immunized mice were fused with myeloma Sp2/0 cells and the hybridoma clones generated screened by an in house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Fourteen MAbs were selected as reactive with hrIFN β . Western blot analysis was performed and only one recognized the 18 kDa isoform (non-glycosylated) of hrIFN β . All MAbs were subjected to antibody isotype characterization with a commercial ELISA and showed unusual profile with simultaneous expression of both IgM and IgG2a isotypes. This observation is further supported by RT-PCR amplification of the IgM CH4 domain using total RNA from hybridomas.

Introduction

INTERFERON- β (IFN β) IS A PLEIOTROPIC CYTOKINE with multiple biological activities, including antiviral effects, inhibition of cell proliferation, regulation of cell differentiation, and modulation of the immune system.^(1,2) Clinical studies demonstrated that human recombinant IFN β -1b (hrIFN β -1b) and human recombinant IFN β -1a (hrIFN β -1a), respectively, produced in *Escherichia coli* or mammalian Chinese hamster ovary cells (CHO) are effective for the treatment of patients with multiple sclerosis.^(3,4) Towards the production of hrIFN β for therapeutic purposes, produced in either *E. coli* or CHO cells, a purification step is necessary to remove host cell proteins. An effective methodology is the affinity purification with solid-phase-bound hrIFN β monoclonal antibody (MAb). In addition, antibodies against hrIFN β are useful in estimating yields and in quality control.

Materials and Methods

In this paper, we describe the generation of MAbs against hrIFN β by genetic immunization (GI). These MAbs were characterized for their isotype pattern and specificity to recognize hrIFN β in Western blot and in ELISA assays. For this purpose initially, the total RNA from normal human peripheral mononuclear blood cells (PBMC) was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA). This RNA was used as a template in the reverse transcriptase PCR (RT-PCR) of the entire hrIFN β gene using Superscript III one-step RT-PCR kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The primers used were forward (position 17-42, 5' CTTCgCCATggAggTTCTgTACTCAC 3') and reverse (position 730-757, 5' gTCgCgCCATCggCCgA ATTAATTACTC 3'). The PCR fragment was cloned both into the pcDNA 3.1.V5 topo plasmid and pCR2.1 topo plasmid (both from Invitrogen). The pZeoSV2IFN β was constructed

¹Laboratory of Recombinant Technology, Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

²Post-graduate Office of Master Course in Molecular and Cellular Biology (Professional Master Course of Technologies in Immunobiology), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

³Laboratory of Monoclonal Antibodies Technology, BioManguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Biopharmaceuticals Program, Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵Vice-directory of Technological Development, Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

by subcloning from pCR2.1 topo plasmid the entire hIFN β gene into the *EcoRI* site of pZeoSV2+ (Invitrogen). Human embryonic kidney HEK-293-T cells (CRL-11268), obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, and was used in transfection experiments using FuGENE 6 transfection Reagent (Roche, Konzern-Hauptsitz, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. About 1 μg of either pcDNA 3.1hrIFN β or pZeoSV2IFN β , purified using PureLink HiPure Plasmid Miniprep kit (Invitrogen), was used for transfection.

For genetic immunization, inbred adult BALB/c mice (protocol approved by Oswaldo Cruz Foundation Animal Ethics Committee, no. L-022-08), were anesthetized and injected with bupivacaine (Pfizer, Bentley-WA, Australia) intramuscularly into the quadriceps. Twenty hours later, mice were injected at the same site with 100 μg of either pcDNA 3.1hrIFN β or pZeoSV2IFN β mammalian expression vectors previously purified by cesium chloride (CsCl) gradients, according to Sambrook and Russel.⁽⁵⁾ Three other inoculations with 15-day intervals were done following the same procedure. Thirty days after the last inoculation, blood samples were collected from the ophthalmic venous plexus of mice and evaluated for anti-hrIFN β antibodies by ELISA.

One month after the last inoculation, mice inoculated with pZeoSV2IFN β were sacrificed and a splenocyte pool suspension was obtained and fused with Sp2/0 murine myeloma cell line (CRL-1581, ATCC), according to standard procedures.⁽⁶⁾ Hybridoma secreting MAbs were identified by ELISA and cloned by limiting dilution. Two positive clones named AA11 and AH7 were cloned by limiting dilution a second time and submitted to continuous culture for approximately 6 months. Ascitic fluids for each anti-hrIFN β MAb named AE9, AG8, AC9, AE6, AH7, AD6, AA11, CH4, AH10, AA10, AB1, AF9, AA4, and BA11 were produced by intraperitoneal inoculation of BALB/c mice with $5\text{--}10 \times 10^3$ hybridoma cells.

An in-house ELISA was standardized to test the supernatant of each clone, mice serum samples or ascitic fluid containing anti-hrIFN β (diluted 1:50 in PBS). One hundred μL of commercial anti-hrIFN β -1b polyclonal antibody (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) from R&D Systems (Minneapolis, MN) diluted in carbonate buffer (50 mM, pH 9.6) as capture was applied onto a 96-well microtiter plate Nunc PolySorp (Kamstrupvej-Roskilde, Denmark) and allowed to stand at 4°C overnight. The plate was washed four times in a plate washer Immunowash (BioRad, Hercules, CA), with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 (PBS-T). Then, 100 μL (2 ng/mL) of human IFN-beta ELISA single plate kit (Standard, Piscataway, NJ), diluted in PBS, was added to the wells. The plate was again incubated for 1 h at 37°C and the same washing procedure was repeated. After washing, 100 μL of each tested sample was added to the wells. In parallel, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of commercial MAb anti-human IFN β antibody (positive control) and the supernatant of Sp2/0 murine myeloma cell line (negative control) were included. The plate was incubated for 1 h at 37°C and washed following the same procedure. Anti-mouse polyclonal immunoglobulin peroxidase conjugate (diluted 1:5000 in PBS) was added and allowed to react for 1 h at 37°C. The plate was washed and incubated in the dark at room temperature with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

(TMB) liquid substrate system for ELISA (Sigma, St. Louis, MO); after 30 min, the reaction was stopped with 2 N sulfuric acid. The absorbance was measured at 450 nm with a microtiter plate reader-model 680 (BioRad). The assay was carried out in triplicates.

For the Western blot analysis, approximately 20 μL of Hu-IFN- β 1a commercial antigen (R&D Systems) and supernatant of HEK-293- cells (negative control) were applied per SDS-PAGE well. These proteins were transferred to non-transfected to Hybond-P PVDF membrane (GE-Healthcare, Waukesha, WI) using a semi-dry system (BioRad) and reacted with anti-hrIFN β purified ascitic fluid. Commercial anti-hrIFN β -1b polyclonal antibody (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; R&D Systems) and non-immune serums of mouse or goat were also used as respectively positive and negative control. The detection was conducted by chemiluminescence using ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE-Healthcare), according to the manufacturer's recommendations. The immunoglobulin class and subclass of each MAb anti-hrIFN β in the supernatants of hybridoma cells producing anti-hrIFN β (clones and re-clones) were determined using Mouse Mono AB1D Isotyping kit (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), according to the manufacturer's recommendations. In order to confirm the results of the isotyping, total RNA of hybridomas producing each one different MAb anti-hrIFN β was obtained using RNase mini kit (Qiagen) and used as template in the RT-PCR to define the IgG class, as described by Popov et al.⁽⁷⁾ In order to confirm IgM class expression the RNAs extracted from each hybridoma were used in the RT-PCR with specific primers to mouse mRNA fragment for IgM CH4-domain eighth exon (National Center for Biotechnology Information, access no. GI 52358): forward, 5' CCCTGCCA CACCTGGTGACC 3' and reverse 5' CCTGGTTGAGCG CTAGCATGGTC 3'. Beta actin RNA was used as control for RNA preparations and RT-PCR.

Results and Discussion

Transient expression of hrIFN β using the plasmid pcDNA 3.1hrIFN β , detected and quantified by commercial ELISA-Human IFN-beta ELISA kit (R&D Systems), was higher than with pZeoSV2IFN β at three different concentrations of HEK-293-T transfected cell supernatant. Sixty days after immunization with plasmid DNA constructs, anti-hrIFN β could be detected by in house ELISA only in serum collected from mice inoculated with pZeoSV2IFN β . The fusion of splenocytes of mice immunized using pZeoSV2IFN β with Sp2/0 murine myeloma cell line produced 94 hybridomas, 14 of which were positive based on the in house ELISA to detect anti-hrIFN β . Using the same in house ELISA, ascitic fluids containing each positive anti-hrIFN β MAb were evaluated (Fig. 1). Western blot analysis showed that only anti-hrIFN β MAb AG8 recognized the 18 kDa isoform (non-glycosylated) (data not shown). Additionally a band of approximately 16 kDa was recognized by MAbs AG8, CH4, and BA11. Isotyping of each anti-hrIFN β showed an unusual double reactivity with both IgM and IgG (IgG2a) class. The profile with simultaneous secretion of both IgG and IgM could be confirmed by electrophoresis agarose gel of PCR products obtained by the RT-PCR assay (Fig. 2).

GI is an attractive approach to generate antibodies because native proteins are expressed *in vivo* with regular post-

◀ F1

◀ F2

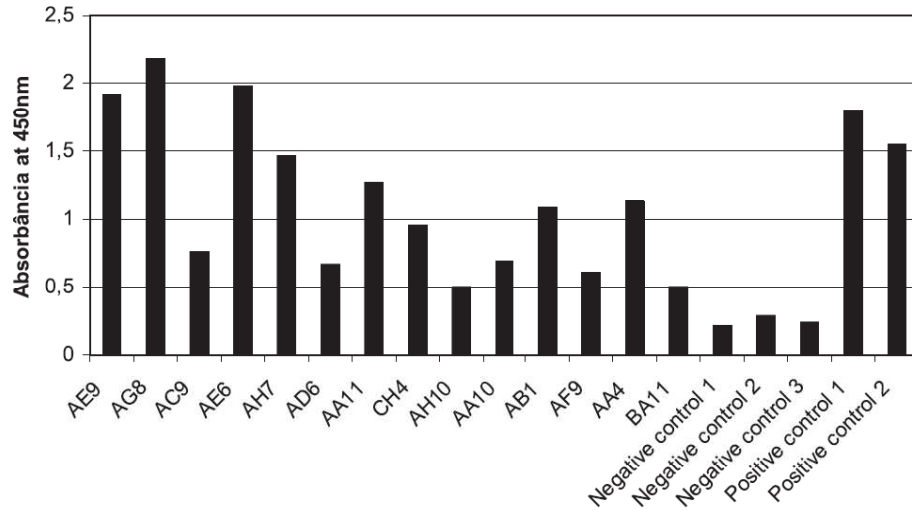


FIG. 1. Detection of anti-hrIFN β in ascitic fluids. MAbs named AE9, AG8, AC9, AE6, AH7, AD6, AA11, CH4, AH10, AA10, AB1, AF9, AA4, and BA11 were evaluated. Their reactivity toward anti-hrIFN β was measured by in house ELISA. One hundred μ L of each ascitic fluid diluted 1:50 in PBS were tested. The absorbance values were measured at 450 nm. Anti-human IFN β MAb (positive controls 1 and 2) and supernatants of Sp2/0 murine myeloma cells (negative controls 1 and 3), and non-secreting anti-hrIFN β ascitic fluid (negative control 2) were included.

transcriptional modifications and avoid time-consuming and costly antigen isolation or synthesis. The GI method yields MAbs that recognize the native form of the protein.⁽⁸⁾ This method is also extremely useful in those cases where the protein is unavailable or difficult to produce, such as in

membrane-bound or secreted proteins.^(9,10) However, the successful application of this technique for the generation of MAbs has been hindered by technical problems such as low efficiency of transfection method, with the consequence that very few hybridomas have been produced.⁽¹¹⁻¹⁵⁾ The

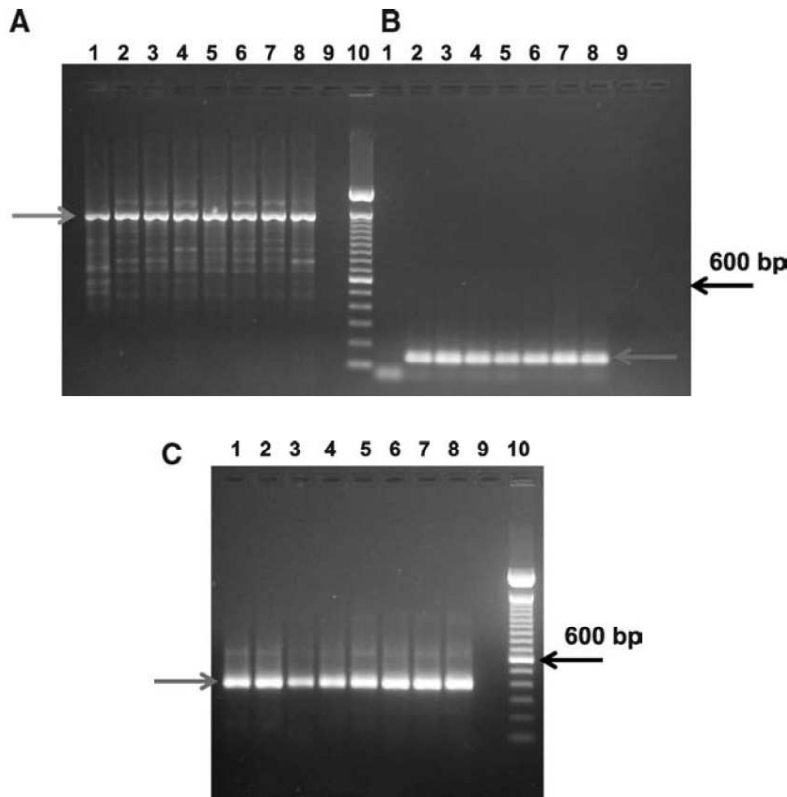


FIG. 2. Electrophoretic analysis of RT-PCR products from hybridoma cell clones. Electrophoresis gel agarose (1%) of RT-PCR products using specific primers to amplify IgG, IgM, or β -actin messenger RNA from total RNA extracted from hybridoma cells secreting anti-hrIFN β MAbs (A-C, lanes 3-8) or from hybridoma cells secreting IgG or IgM antibodies used as positive control (A-C, lanes 1, positive IgG control; lanes 2, positive IgM control). (A-C) Lanes 9 correspond respectively to RT-PCR control mix, and (A and C) lanes 10 correspond to 100 bp DNA ladder (Invitrogen). The positives bands to IgG, IgM, and β -actin correspond respectively to 1450 pb, 105 pb, and 385 pb.

protocols to generate MAbs by GI differ mainly in terms of route of immunization (intramuscularly, intraperitoneally, intravenously, and intrasplenically) and number of doses, which could influence the humoral immune response and the quality of MAbs that are generated.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ The focus of this study was to generate anti-hrIFN β MAbs to be used in the ELISA method to perform quality control. Our immunization of mice with pZeoSV2IFN β has produced 14 positive clones secreting anti-hrIFN β MAbs out of 94 hybridoma clones, representing about 20% of positivity. This is the first time that a SV-40 promoter based vector has been used for MAb generation by GI.

The SV-40 promoter generally shows sustained expression, with longer-term expression as compared to the CMV-promoter. We have only an antibody response in mice immunization with SV-40 based plasmid construct.

The profile of the hrIFN β MAbs with simultaneous secretion of both IgG and IgM could be confirmed in this study. A characteristic feature of the humoral immune response is a switch from IgM to other immunoglobulin (Ig) isotypes that typically occurs subsequent to a first exposure to antigen. Only a few authors have reported simultaneous secretion of IgM and IgG molecules from the same hybridoma clone.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ Isotype switching by B cells is highly regulated by a group of cytokines, including IL-4, IFN- γ , and TGF- β . A lymphocyte B cell can only express one isotype at a time; however, during an immune response it may be exposed to combinations of stimuli that provide it with conflicting switching instructions.

Acknowledgments

BioManguinhos and the Oswaldo Cruz Institute supported this work. We greatly appreciate the laboratory support provided by Eudoxia Pinheiro da Silva and Eliane Barbosa Baroni. We also thank Dr. José Procópio Moreno Senna for scientific remarks.

References

1. Biron CA: Interferon alpha and beta as an immune regulators—a new look. *Immunity* 2001;14:661–664.
2. Stark, GR: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227–264.
3. PRISMS Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISM-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2004;56:1628–1636.
4. Kappos L: Interferon in multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005;23:189–214.
5. Sambrook J, and Russel DW: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
6. Harlow E, and Lane D: *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2006.
7. Popov AV, Konstantin VF, and Sudarikov AB: RT-PCR isotyping of murine Ig-secreting cell lines. *Biotechniques* 1995;18:628–631.
8. Chiarella P, and Fazio VM: Mouse monoclonal antibodies in biological research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol Lett* 2008;30:1303–1310.
9. Nagata S, Salvatore G, and Pastan I: DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J Immunol Methods* 2003;280:59–72.
10. Garcia JF, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Sanchez-Verde L, Romero-Chala S, Piris MA, and Roncador G: Genetic immunization: a new monoclonal antibody for the detection of BCL-6 protein in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 2006;54:31–38.
11. Moonsom S, Khunkeawla P, and Kasinrerak W: Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein. *Immunol Lett* 201;76:25–30.
12. Puttikhunt C, Kasinrerak W, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moonsom S, Sittisombut N, and Malasit P: Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. *J Virol Methods* 2003;109:55–61.
13. Yang DH, Makhmoudova A, Arif BM, Feng Q, Retnakaran A, Palli SR, and Krell PJ: DNA versus protein immunization for production of monoclonal antibodies against *Choristoneura fumiferana* ecdysone receptor (CfEcR). *Vaccine* 2006;24:3115–3126.
14. Kasinrerak W, Moonsom S and Chawansuntati K: Production of antibodies by single DNA immunization: comparison of various immunization routes. *Hybrid Hybridomics* 2002; 21:287–293.
15. Chen D, Endres RL, Erickson CA, Weis KF, McGregor MW, Kawaoka Y, and Payne LG: Epidermal immunization by a needle-free powder delivery technology: immunogenicity of influenza vaccine and protection in mice. *Nat Med* 2000;6: 1187–1190.
16. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, and Felgner PL: Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247:1465–1468.
17. Pachmann K, and Killander D: Simultaneous immunofluorimetric quantitation of IgM and IgG in single splenic lymphoid cells after immunization. *Immunol Lett* 1986;3: 301–305.
18. Strelkauskas AJ, Lofton C, and Aldenderfer PH: Human monoclonal antibody. 2. Simultaneous expression of IgG and IgM with similar binding specificities by a human hybrid clone. *Hybridoma* 1987;6:479–487.
19. Wu CJ, Karttunen JT, Chin DHL, Sen D, and Gilbert W: Murine memory B cells are multi-isotype expressors. *Immunology* 1991;72:48–55.
20. Chen D, Altmann K, Hanna PJ, Tammer A, and Underwood JR: Detection of two isotypically different antibodies produced by a murine hybridoma. *Hybridoma* 1997;16:195–199.

Address reprint requests to:
 Marcia Terezinha Baroni de Moraes
 Bio-Manguinhos
 Instituto de Tecnologia em Imunobiologicos
 Avenida Brazil
 4365-Manguinhos
 Rio de Janeiro
 Brazil

E-mail: baroni@bio.fiocruz.br

Received: November 24, 2008

Accepted: January 9, 2009