

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E  
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

**RODRIGO DE ALMEIDA**

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS  
RECONHECEDORES DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS  
HUMANAS**

**Araraquara**

**2017**

**RODRIGO DE ALMEIDA**

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS  
RECONHECEDORES DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS  
HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para o título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Marisa Fusco Almeida

**Araraquara**

**2017**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**A447o**

Almeida, Rodrigo de

Obtenção de anticorpos monoclonais murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas / Rodrigo de Almeida. – Araraquara, 2017.  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas á Farmácia. Área de pesquisa em Imunologia.

Orientador: Andrei Moroz.

Coorientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Câncer de próstata. 3. Neoplasias da Próstata. 4. Imunização subtratativa. I. Moroz, Andrei, orient. II. Almeida, Ana Marisa Fusco, coorient. III. Título.

**CAPES: 40500005**

**RODRIGO DE ALMEIDA**

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS RECONHECEDORES  
DE CÉLULAS TUMORAIS PROSTÁTICAS HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para o título de mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 06 de Abril de 2017.

**Comissão Examinadora**

Dr. Andrei Moroz

Dra. Elenice Deffune

Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Aos meus pais, Pedro e Edeni

## AGRADECIMENTOS

Agradeço também a instituição de fomento FAPESP (Processo: 2015/21884-0), da qual recebi bolsa de mestrado, possibilitando que eu realizasse esse trabalho.

Agradeço a minha família (Pedro, Edeni, Juliana e Alanis) por sempre terem me dado apoio de todas as maneiras para que eu chegasse até onde cheguei. Meu pai Pedro Geraldo Ferraz de Almeida que nunca me negou o direito de estudar e fez tudo o que estava em seu alcance, e até além dele, para que eu conseguisse me manter firme nos estudos. Minha mãe Edeni de Oliveira Almeida que sempre estava lá me incentivando, dizendo palavras motivadoras, dando conselhos e sendo sempre minha maior fã. Amo vocês.

Agradeço ao José Ricardo Batista pela companhia e convivência durante esta etapa pela qual passamos juntos (cada um com o seu mestrado), muitos desafios que enfrentamos, artigos para escrever, madrugadas sem dormir, maratona de revisões bibliográficas e ortográficas, confusões em nosso condomínio, muitos sufocos, mas também muitas risadas e muitos momentos bons. Lembro até hoje daquela conversa no café em que você me apontou todos os motivos pelos quais eu deveria fazer o vestibular e entrar na graduação e desde então temos caminhado juntos nessa estrada até aqui e ainda temos uma grande jornada pela frente. Muito obrigado por tudo!

Agradeço a Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, minha Coorientadora que abriu as portas do Núcleo de Proteômica desde quando cheguei, inclusive me acolhendo, inicialmente como seu orientado. Muito obrigado por tudo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Andrei Moroz que desde a minha primeira iniciação científica acreditou em mim muitas vezes até mais do que eu mesmo fazendo com que eu sempre fosse em frente e pudesse realizar esse trabalho de mestrado. Muito obrigado por tudo.

Agradeço a todos os amigos do Núcleo de Proteômica que sempre me acolheram tão bem e me fizeram sentir-se parte da equipe mesmo trabalhando em áreas diferentes. Muito aprendi com todos vocês. Obrigado especialmente a Patricia (Laranja ou melhor Djanja) que foi a primeira a me receber e me introduzir na rotina do laboratório. Agradeço também a todos amigos, Natália, Mônica, Priscila, Mariana, Junya, Nayla, Fer Gullo, Haroldo, Carolzinha, Panta, Lili, Wanessa, Carol MG, Ana Espanha e também aos técnicos Cláudia e Paulo que sempre me ajudaram.

Agradeço a todos os animais utilizados que perderam suas vidas para que esse trabalho fosse realizado. Meu eterno respeito e gratidão a eles.

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o mais diagnosticado e a segunda causa de morte por câncer entre os homens na América e nos países da Europa Ocidental. No Brasil, o número de novos casos de CaP estimado para o ano de 2016 foi de 61.200. A forma mais letal do CaP é aquele resistente à castração, nos quais os tratamentos disponíveis conferem sobrevida média de 24 meses. Não há terapias curativas efetivas para os estágios avançados. Por essa razão, tratamentos adjuvantes associados à quimioterapia e radioterapia têm grande importância; destaque à imunoterapia passiva que utiliza anticorpos monoclonais (AcM), ferramentas que também tem relevância no diagnóstico e estadiamento da doença. Nesse sentido, esse projeto teve como objetivo principal a obtenção de um painel de AcM murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas. Para a obtenção dos AcM foi estabelecido um banco de células prostáticas e, também, de células mielomatosas murinas não secretoras de imunoglobulinas utilizadas durante todas as etapas de produção. Foram utilizados camundongos Balb/C imunizados pela técnica de imunização subtrativa com o uso da ciclofosfamida como agente tolerizador com um e dois ciclos (LNCAPS e LNCAPSS, respectivamente) e pela técnica convencional sem o uso de ciclos de tolerização (LNCAP), tendo como tolerógeno células não tumorais da linhagem RWPE-1 e como imunógeno, células tumorais da linhagem LNCaP. Após o término das imunizações, os camundongos foram sacrificados e os baços coletados para obtenção de linfócitos para fusão com células mielomatosas. Foi obtido o total de 12 hibridomas produtores de anticorpos positivos para o imunógeno. Foram clonados os 4 melhores hibridomas, obtendo-se o total de 94 clones com positividade acima de 90% contra o imunógeno, porém positivos também na média de 66,07% contra o tolerógeno. Com os resultados obtidos e com resultados obtidos em trabalhos relacionados do grupo concluiu-se que a eficiência da técnica de imunização subtrativa para obtenção de anticorpos específicos com o uso de ciclofosfamida está associada com o número de ciclos de tolerização.

**Palavras-chave:** Anticorpos monoclonais. Câncer de próstata. Neoplasias da Próstata. Imunização Subtrativa.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most diagnosed and the second leading cause of cancer deaths among men in America and in Western European countries. In Brazil, the number of new cases of PCa estimated for the year 2016 was 61,200. The most lethal form of PCa is that resistant to castration, in which the available treatments confer an average survival of 24 months. However, there are no effective curative therapies for the advanced stages. For this reason, adjuvant treatments associated with chemotherapy and radiotherapy are of great importance; The use of passive immunotherapy using monoclonal antibodies (MAbs), tools that also have relevance in the diagnosis and staging of the disease. In this sense, this project had as main objective the obtaining of a panel of murine MAbs recognizing human prostatic tumor cells. In order to obtain the MAbs, a bank of prostatic cells and also non-secretory murine myelomatosis cells used during all stages of production were established. Balb/C mice immunized by the subtractive immunization technique with the use of cyclophosphamide as a toleragen agent with one and two cycles (LNCAPS and LNCAPSS, respectively) and the conventional technique without the use of tolerance cycles (LNCAP) were used as toleragen Non-tumor cells of the RWPE-1 lineage and as immunogen, tumor cells of the LNCaP lineage. After the immunizations were completed, the mice were sacrificed and the spleens collected to obtain lymphocytes for fusion with myelomatosis cells. A total of 12 hybridomas producing antibodies to the immunogen were obtained. The 4 best hybridomas were cloned, obtaining a total of 94 clones with positivity above 90% against the immunogen, but also 66.07% positive against the toleragen. With the results obtained and with results obtained in related works of the group, it was concluded that the efficiency of the subtractive immunization technique to obtain specific antibodies with the use of cyclophosphamide is associated with the number of cycles of tolerization.

**Keywords:** Monoclonal Antibodies. Cancer, Prostate. Subtractive Immunization. Antibodies, Monoclonal. Prostatic Neoplasms.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AcM	Anticorpo Monoclonal
AcP	Anticorpos Policlonais
BC	Banco de células
°C	Graus Celsius
CaP	Câncer de próstata
Cy	Ciclofosfamida
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Isoticianato de flurosceína
h	hora(s)
HAMA	<i>Human Anti-mouse Antibodies</i>
HAT	Hipoxantina-aminopterin e timidina
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGPRT	Hipoxantina-ribosina-fosfo-ribosil-transferase
LNCAP	Protocolo utilizado com imunização convencional
LNCAPS	Protocolo utilizado com imunização subtrativa e um ciclo de tolerização
LNCAPSS	Protocolo utilizado com imunização subtrativa e dois ciclos de tolerizações
Ly	Linfócitos
MC	Meio de cultura
µg	micrograma

$\mu$ l	microlitro
mg	miligrama
mL	mililitro
PEG	Polietilenoglicol
PSA	Antígeno prostático específico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
SCC	Sobrenadante de cultura celular

## **LISTA DE QUADROS E TABELAS**

**Quadro 1** - Obtenção do Banco de Células (BC).

**Quadro 2:** Obtenção do Banco de Células (BC) após perda.

**Quadro 3:** Dados das fusões celulares

**Quadro 4.** Hibridomas plaqueados, hibridomas testados e hibridomas retidos

**Quadro 5:** Reatividade dos clones obtidos contra antígenos expressos pela LNCaP, por Citometria de Fluxo

**Quadro 6:** Controles Auto fluorescência e Anticorpo secundário dos *screenings* dos clones

**Tabela 1** – *Screenings* dos clones por Citometria de Fluxo

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Células utilizadas: A) Linhagem LNCaP; B) Linhagem RWPE-1; C) Linhagem mieloma NS1; D) Linhagem mieloma Sp2/0. Aumento de 100X, barra de escala: 100µm.

Fonte: (A,B e D) Arquivo pessoal; (C) ATCC.

**Figura 2:** Extração do timo para obtenção dos timócito (*Fedder Cells*). O timo pode ser visto como um órgão esbranquiçado logo acima do coração. Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 3:** Agenda de imunizações do protocolo LNCAP. Protocolo convencional. Nos dias 0, 14, 21 e 41 foi feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

**Figura 4:** Agenda de imunizações do protocolo LNCAPS. Protocolo imunização subtrativa com o uso de Cy. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1), seguido de duas doses de Cy, 24 e 48h. Após é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP) nos dias 14, 21 e 41.

**Figura 5:** Agenda de imunizações do protocolo LNCAPSS. Protocolo de imunização subtrativa com o uso de dois ciclos de tolerização. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1) no camundongo, seguido de duas doses de Cy 24 e 48h depois. Após 12 dias da última dose de Cy é feita novamente a inoculação do tolerógeno seguido de mais duas doses de Cy. Nos dias 30, 37 e 52 é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

**Figura 6:** Obtenção dos esplenócitos. O baço é furado diversas vezes e em seguida meio de cultura é injetado em seu interior expelindo os esplenócitos pelos furos feitos. Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 7.** Células pós-fusão: Células Mielomatosas murinas (**a**), linfócitos (**b**) e hemácias (**c**) observadas ao microscópio invertido com contraste de fase, logo após a fusão celular. Algumas das células marcadas com (a) são hibridomas, porém não é possível diferenciá-las morfologicamente das células mielomatosas. Aumento de 400X. Barra de escala= 20µM.

**Figura 8.** Vias metabólicas relevantes para seleção do híbrido em meio contendo hipoxantina-aminoptericina e timidina: Quando as principais vias sintéticas são bloqueadas com o análogo de ácido fólico aminoptericina (\*), a célula deve depender das enzimas de salvamento HGPRT e timidina quinase. As células HGPRT podem ser seleccionadas por crescimento em meio contendo os análogos de base tóxica 6-tioguanina ou 8 -azaguanina, que são incorporados na célula via HGPRT. Apenas as células HGPRT + sobrevivem. As células HGPRT- não podem crescer em meio HAT a menos que estejam fundidas com células HGPRT +

**Figura 9:** Clonagem por diluição limitante. Os hibridomas foram diluídos a partir de  $10^6$  até chegar a 75 células em um tubo com 10 mL de meio de cultura que então foi distribuído em microplaca de cultura de 96 poços.

**Figura 10.** Crescimento dos Clones (\*): **A)** Crescimento de clone único; **B)** Crescimento de clone duplo. Aumento de 100X. Barra de escala de 100µm

**Figura 11:** Análise dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos do protocolo LNCAPSS contra o imunógeno (LNCaP) por citometria de fluxo. **(A)** Animal 1, positivo em 97,3%; **(B)** Animal 3, positivo em 98,3%; **(C)** Controle autofluorescência, positivo em 10,1%; **(D)** Blot da população celular analisada; **(E)** Controle de autofluorescência, positivo em 0,1%.

**Figura 12.** Soro dos camundongos testados por Citometria de Fluxo com células LNCaP: **a)** Controle negativo; **b)** Camundongo 1 do protocolo LNCAPS **c)** Camundongo 2 do protocolo LNCAPS **d)** Camundongo 1 do protocolo LNCAP **e)** Blot da população celular pesquisada.

**Figura 13.** Hibridoma ao microscópio invertido: Aspecto morfológico ideal representativo de hibridomas em crescimento saudável (\*) para o teste de *screening* quando atingirem maior confluência. Aumento de 100x. Barra de escala = 100µM.

**Figura 14.** Morfologia dos hibridomas produzidos (esquerda) e perfil dos anticorpos por eles secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP (direita): **A)** LNCAPS 1-24, reconhecendo 97% das células-alvo. **B)** LNCAPS 1-33, reconhecendo 52% das células-alvo. **C)** LNCAPS 1-41, reconhecendo 60% das células-alvo. **D)** LNCAPS 1-43, reconhecendo 75% das células-alvo. **E)** LNCAPS 1-62, reconhecendo 65% das células-alvo. **F)** LNCAPS 1-73, reconhecendo 40% das células-alvo. **G)** LNCAPS 1-77, reconhecendo 35% das células-alvo. Todos estes hibridomas foram obtidos com protocolo de imunização subtrativa (provenientes de duas fusões celulares). **H)** LNCAP 1-110, reconhecendo 50% das células-alvo. Este hibridoma foi obtido com protocolo de imunização convencional (obtido de outra fusão, não previsto no projeto, mas realizado

para se ter controles de imunizações convencionais). **I)** Controle negativo. **J)** Controle positivo, CD81. Pode-se observar o perfil positivo quando o gráfico está deslocado e dentro da barra delimitada como M1. Perfis negativos, por sua vez, estão fora da barra M1. Aumento em todas as fotomicrografias de 100X. Barras de escala = 100µM.

**Figura 15.** Perfil dos anticorpos secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP: **A)** LNCAPSS 3-13, reconhecendo 91,3% das células-alvo. **B)** LNCAPSS 1-40, reconhecendo 78,1% das células-alvo. **C)** LNCAPSS 1-43, reconhecendo 73,8% das células-alvo. **D)** LNCAPSS 1-46, reconhecendo 48,9% das células-alvo; **E)** Blot da população celular estudada; **F)** Controle de autofluorescência (acima) mostrando positividade de 0,2% e controle de anticorpo secundário (abaixo) mostrando positividade de 13,3%.

**Figura 16:** Citometria de fluxo de células da linhagem RWPE-1 (tolerógeno) expostas ao soro de camundongos (**A a E**) que não receberam nenhum ciclo de tolerização (**F a J**) e de camundongos que receberam ciclos repetidos de tolerização; (**K**) Controle de autofluorescência; (**M**) Controle de anticorpo secundário; (**L**) Blot da população celular pesquisada.

**Figura 17:** Gráfico em coluna da média de positividade do *screening* dos clones de cada hibridoma construído por citometria de fluxo.

**Figura 18:** Revelação do experimento para detecção de contaminação por micoplasma por coloração indireta com DAPI. (A) Controle de Reporte Cells Fonte: Arquivo Pessoal; (B)

Hibridomas com células LNCaP. Fonte: Arquivo Pessoal; (C e D) controles positivos.

Fonte: Young et al. (2010)

## Sumário

<i>Capítulo 1</i> .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. O Câncer de Próstata.....	18
1.2. Anticorpos Monoclonais e Imunoterapia do Câncer de Próstata .....	19
1.3. Imunização Subtrativa.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
Objetivo Geral: .....	22
Objetivos Específicos:.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Obtenção das Linhagens Celulares de Câncer de Próstata e Células Efetoras.....	23
3.2. Obtenção das <i>feeder cells</i> .....	24
3.3. Protocolo de Imunização Subtrativa .....	26
3.4. Produção dos Anticorpos .....	29
3.4.1. Fusão Celular .....	29
3.4.1.1. Preparo de células companheiras de fusão.....	29
3.4.1.2. Eutanásia dos animais e esplenectomia .....	29
3.4.1.3. Controle da Imunização pelo método de Citometria de Fluxo.....	30
3.4.1.4. Fusão Celular.....	31
3.4.2. Seleção dos Hibridomas .....	31
3.4.3. Identificação dos Hibridomas para <i>Screening</i> .....	34
3.4.4. <i>Screening</i> dos Hibridomas .....	34
3.4.5. Clonagem Celular.....	34
3.5. Controle de contaminação dos hibridomas .....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Expansão das linhagens .....	38
4.2. Padronização da Ciclofosfamida para a imunização subtrativa .....	39
4.3. Imunização dos Animais .....	40
4.4. Controle de Imunização .....	40
4.5. Fusão Celular e <i>Screening</i> .....	43
4.6. Clonagem celular e <i>screening</i> dos clones obtidos .....	48
4.7. Controle de contaminação dos hibridomas .....	56
5. CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS .....	59
ANEXO.....	62
<i>Capítulo 2</i> .....	64



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula, situada na região baixa do abdômen, abaixo da bexiga e à frente do reto, responsável por parte do conteúdo que forma o sêmen. O câncer de próstata (CaP) é o câncer mais diagnosticado entre os homens nos Estados Unidos (EUA) (DESANTIS *et al.*, 2014; FUNG *et al.*, 2014), totalizando cerca de 200.000 óbitos a cada ano no mundo inteiro (WANG *et al.*, 2011), representando 1 em cada 10 casos de câncer (SINGH *et al.*, 2016). Projeções alarmantes de até 1.7 milhões de novos casos e aproximadamente meio milhão de mortes são esperados para o ano de 2030 (CENTER *et al.*, 2012), gerando gastos excessivos aos sistemas de saúde pública de todos os países. Estima-se gastos em torno de oito bilhões de dólares por ano (11% dos custos para o tratamento de todos os cânceres) e 81.658 dólares por paciente entre o diagnóstico até o óbito (RACIOPPI *et al.*, 2012). De acordo com “*World cancer research fund International*” (WORLD CANCER RESEARCH, 2016) o câncer de próstata está em segundo lugar no *ranking* dos cânceres que acometem homens, sendo responsável pelo total de 15% de todos os casos diagnosticados atrás, apenas, do câncer de pulmão que representa 16,7% dos cânceres em homens. No Brasil, o número de novos casos de CaP estimado para o ano de 2016 foi de 61.200, o que corresponde a aproximadamente 62 casos a cada 100.000 indivíduos. Além dos tumores de pele do tipo não-melanoma, dados do INCA mostram que o CaP é o mais incidente entre os homens em todas as regiões de nosso país (INCA, 2016).

O crescente número de diagnósticos de câncer de próstata pode estar relacionado ao aumento de informação e implementação do exame Antígeno Prostático Específico (PSA, do inglês *Prostate-Specific Antigen*) para homens a partir dos 50 anos e para os homens com 40 anos que possuam casos em familiares (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Todavia, o exame de PSA não é eficiente para a detecção de todos os tipos de CaP, sendo necessário também o exame de toque (ONCOGUIA, 2014).

Quando o CaP é diagnosticado em seus estágios iniciais, a taxa de sobrevivência do paciente em até cinco anos é alta, já nos estágios mais avançados da doença essa taxa cai consideravelmente, acompanhado do aumento do risco de metástase (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012; ONCOGUIA, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Por essa razão, a busca por novas maneiras de detecção da doença de forma mais rápida e eficiente é o

que impulsiona grande parte das pesquisas que envolvem variados tipos de cânceres e assim, é ressaltada a importância dos biomarcadores que de acordo com *National Cancer Institute* são definidos como: “Uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos, que é um sinal de um processo normal ou anormal, em dada condição patológica” (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012). Portanto, os anticorpos monoclonais podem ter papel fundamental para a detecção desses biomarcadores.

## **1.2. Anticorpos Monoclonais e Imunoterapia do Câncer de Próstata**

A técnica de produção de anticorpos monoclonais (AcM) murinos foi descrita em publicação no periódico *Nature* há mais de quatro décadas por um pesquisador alemão e outro argentino (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Após vários anos de aplicação diagnóstica, acreditava-se que os anticorpos murinos seriam eficazes no tratamento de doenças humanas (ROSS *et al.*, 2005). No entanto, isso não se verificou devido à *human anti-mouse antibodies* (HAMA), uma resposta imunológica humana contra a imunoglobulina murina (KLEE, 2000; ROSS *et al.*, 2005). Eventualmente, a consolidação das técnicas de humanização e hibridização permitiram o uso de AcM para a aplicação terapêutica. Existe atualmente uma gama de anticorpos em testes clínicos (ROSS *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2010; BERMAN *et al.*, 2015).

Desta forma, após décadas de maturidade tecnológica na produção de AcM, a imunoterapia passiva tem conquistado espaço e vêm apresentando resultados *in vitro* e/ou *in vivo* satisfatórios em uma variedade de tumores sólidos e malignidades hematopoiéticas (ROSS *et al.*, 2005; MCNEEL, 2007; JACHIMOWICZ *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; BERMAN *et al.*, 2015), como terapias adjuvantes ao tratamento do CaP, bem como de outros cânceres (MCNEEL, 2007; FIZAZI *et al.*, 2010; BERMAN *et al.*, 2015).

## **1.3. Imunização Subtrativa**

Com as técnicas clássicas de imunização a probabilidade de obtenção de anticorpos específicos contra antígenos tumorais é menor, tendo em vista que a distribuição destes sobre a membrana celular é reduzida quando comparado a antígenos comuns presentes também, em células não tumorais. Desse modo a resposta imunológica do camundongo a essa célula é majoritariamente contra os antígenos imunodominantes (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS

*et al.*, 1993). No entanto, uma técnica inovadora, denominada imunização subtrativa tem sido utilizada com sucesso para a obtenção de anticorpos relevantes e dirigidos contra antígenos associados a apoptose, invasividade, agressividade e potencial metastático em diferentes relatos (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS *et al.*, 1993; BOUKERCHE *et al.*, 2000; TREFZER *et al.*, 2000; YANG; WANG, 2002; HOOPER *et al.*, 2003; RASMUSSEN; DITZEL, 2009; YASUMOTO *et al.*, 2012).

A referida técnica tem como princípio uma prévia imunização do camundongo com antígenos pelos quais não há o interesse de se obter anticorpos. Após essa imunização é feita uma tolerização da resposta imunológica obtida, ou seja, é inibido uma futura resposta contra esse imunógeno. Em seguida, faz-se a imunização com os antígenos de interesse, além dos antígenos tolerizados, obtendo-se dessa vez uma resposta imunológica e a produção de anticorpos apenas contra os antígenos de interesse (BROOKS *et al.*, 1993; HAMABASHIRI *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2012).

A imunização subtrativa pode ser feita de três maneiras diferentes, a saber: tolerização neonatal, tolerização química e tolerização baseada no fenômeno natural de tolerância imunológica, denominada “zona de alta tolerância” (GOLUMBESKI; DIMOND, 1986; KRUEGER *et al.*, 2001; JIN *et al.*, 2012). A técnica de tolerização química vem demonstrando promissores resultados na obtenção de anticorpos monoclonais específicos a antígenos raros ou específicos. Essa técnica utiliza-se de um agente imunossupressor, a ciclofosfamida, entre imunizações sequenciais, utilizando-se duas linhagens celulares fenotipicamente semelhantes, mas com características especiais distintas. Esse agente elimina seletivamente os linfócitos B e T ativados por prévia inoculação de um imunógeno (célula não tumoral, por exemplo), agindo como agente alquilante, suprimindo a resposta imune contra antígenos imunodominantes presentes neste imunógeno (COLVIN, 2003) – os imunógenos utilizados nessa imunização inicial são denominados na técnica como tolerógeno. Após o tratamento com a ciclofosfamida e a eliminação dos clones de linfócitos ativados, um segundo imunógeno denominado na técnica apenas como imunógeno, desta vez contendo, além dos antígenos presentes também no tolerógeno, antígenos específicos relacionados a alguma alteração biológica (crescimento desordenado e capacidade metastática, por exemplo) é inoculado nos animais. Os antígenos compartilhados pelas duas linhagens que são em sua maioria imunodominantes não ativarão resposta imune, pois já foram tolerizados, enquanto os antígenos presentes apenas nas células tumorais, o imunógeno, irão gerar resposta imune, obtendo-se desta maneira os desejados anticorpos específicos a processos de agressividade e

invasividade tumoral (BROOKS *et al.*, 1993; RASMUSSEN; DITZEL, 2009; JIN *et al.*, 2012; YASUMOTO *et al.*, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Obter anticorpos monoclonais murinos contra células tumorais prostáticas utilizando a técnica de imunização subtrativa com ciclofosfamida.

### **Objetivos Específicos:**

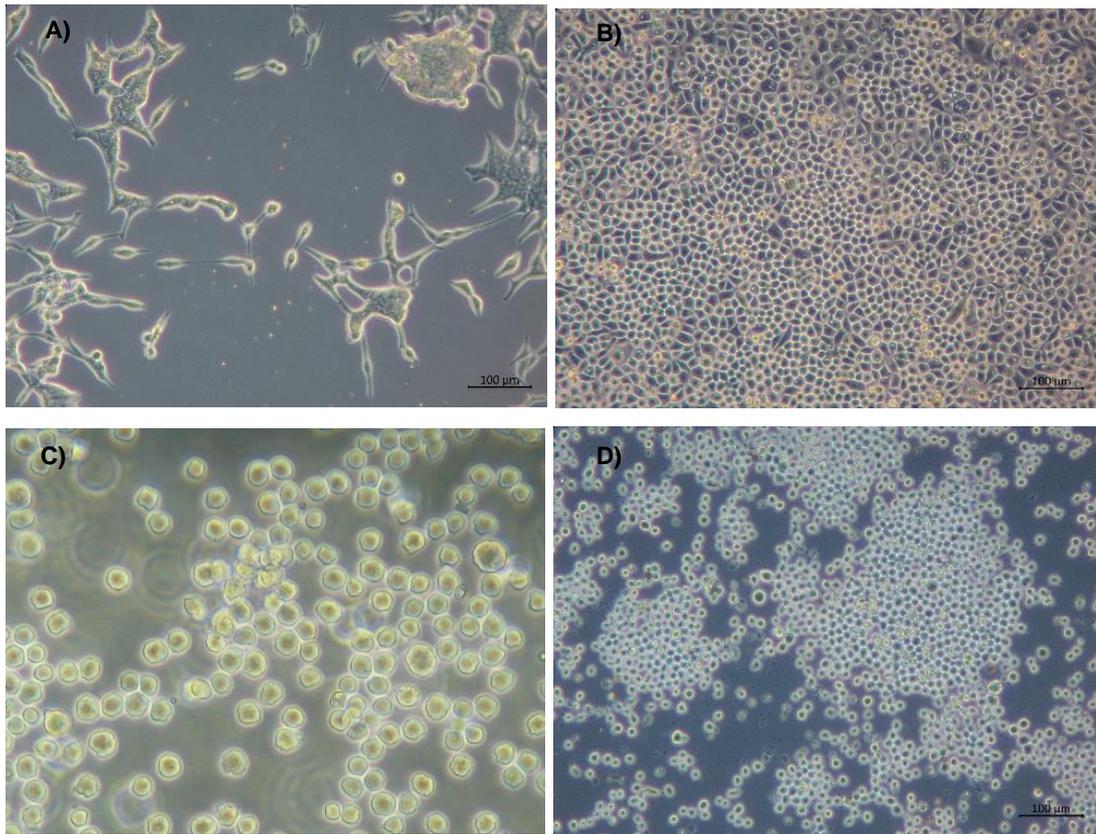
- Obter os hibridomas a partir da fusão dos linfócitos B de camundongos BALB/C (previamente imunizados segundo o protocolo subtrativo) com células mielomatosas murinas;
- Clonar os hibridomas de interesse que produzam anticorpos reconhedores das células utilizadas como imunógeno;
- Identificar os clones de alta prioridade, secretores de anticorpos que reconheçam as células utilizadas como imunógenos e não as utilizadas como tolerógeno;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das Linhagens Celulares de Câncer de Próstata e Células Efetoras

As linhagens celulares prostáticas humanas RWPE-1 (não tumoral) (**Figura 1B**) e LNCaP (tumoral) (**Figura 1A**) utilizadas para as imunizações dos camundongos e para as etapas de *screening* foram previamente adquiridas pelo Laboratório de Anticorpos Monoclonais da empresa especializada *American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA, EUA. A linhagem LNCaP foi expandida em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™) a 10%, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml anfotericina B (Gibco/Invitrogen™). A linhagem não tumoral RWPE-1 foi expandida em meio *Keratinocyte Serum Free Medium* (Gibco/Invitrogen™), suplementado com 2 aditivos (extrato de pituitária bovina e fator de crescimento epidermal humano recombinante ) nas concentrações indicadas pelo fabricante (Gibco/Invitrogen™) e de acordo como descrito anteriormente (MOROZ *et al.*, 2013).

As linhagens de mielomas murinos não secretoras de imunoglobulinas NS1 e Sp2/0 foram utilizadas como células companheiras de fusão. As células mielomatosas murinas da linhagem NS/1 (**Figura 1C**) são provenientes de doação do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sangüine de Paris*, integrante da *Agence Française du Sang* ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. As células mielomatosas murinas da linhagem Sp2/0 (**Figura 1D**) são provenientes da empresa especializada *American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA, EUA, cedidas gentilmente pelo laboratório de biologia molecular do Centro Infantil Boldrini do Câncer. Essas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO/Invitrogen™) suplementado com SFB (Gibco/Invitrogen™) a 10%, 50 µg/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina e 0,5 µg/ml anfotericina B (Gibco/Invitrogen™).



**Figura 1. Células utilizadas:** **A)** Linhagem LNCaP; **B)** Linhagem RWPE-1; **C)** Linhagem mieloma NS1; **D)** Linhagem mieloma Sp2/0. Aumento de 100X, barra de escala: 100µm. Fonte: (A,B e D) Arquivo pessoal; (C) Laboratório de Engenharia Celular FMB - UNESP

As células foram encubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e o meio foi trocado a cada dois dias. Foi realizado o acompanhamento diário das células ao microscópio invertido (Zeiss Primovert®), não tendo sido constatada nenhuma contaminação por agentes microbianos.

### 3.2. Obtenção das *feeder cells*

Para obtenção dos timócito (*feeder cells*) foram utilizados camundongos com idades entre 14 e 21 dias. É necessário o uso de camundongos dessa idade porque o timo é um órgão que diminui de tamanho conforme a idade do camundongo aumenta. Sendo assim quanto mais novo o animal maior é a quantidade de timócitos extraídas e mais fácil a coleta do órgão. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, mergulhados rapidamente em solução de hipoclorito a 2% e então levados para cabine de segurança biológica. Realizou-se incisão no tórax do animal expondo o timo, órgão com aspecto esbranquiçado localizado logo acima do

coração (**Figura 2**). O órgão foi pinçado e extraído com auxílio de tesoura cirúrgica. Após ser extraído o órgão foi mergulhado em meio HEPES para lavagem e em seguida colocado em uma placa de Petri contendo meio HEPES. O órgão foi descelularizado com o auxílio de uma agulha em formato de Z, que ao ser passada por cima do órgão delicadamente, para não romper o órgão, retira as células de seu interior. Essas células foram coletadas, centrifugadas, contadas e então colocadas em cultura em meio RPMI-1640 com 10% de SFB quando havia a necessidade de utilizá-las em poucos dias ou então, foram criopreservadas para uso posterior uma vez que essas células não têm vida útil longa em cultura.



**Figura 2: Extração do timo para obtenção dos timócito (*Fedder Cells*).** O timo pode ser visto como um órgão esbranquiçado logo acima do coração. Fonte: Arquivo Pessoal.

Os timócitos são importantes nas etapas pós fusão e clonagem porque elas condicionam o meio de cultura com citocinas e fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento dos hibridomas. Os protocolos brevemente descritos acima respeitaram as técnicas descritas por Deffune (1992).

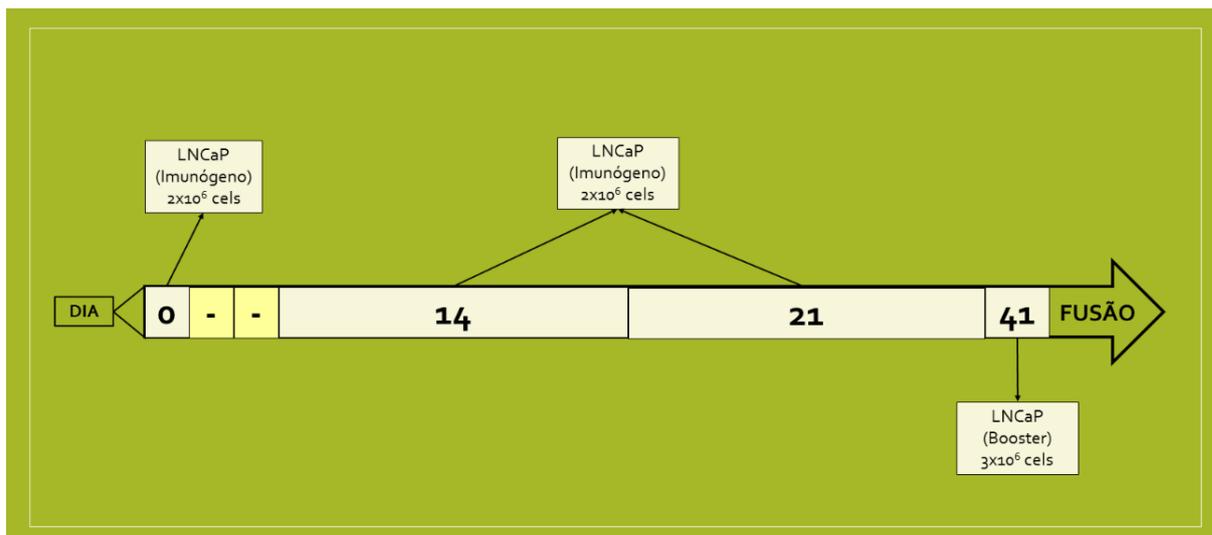
### 3.3. Protocolo de Imunização Subtrativa

Todos os procedimentos com os animais respeitaram os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAr – UNESP (processo número 24/2015) (**Anexo 1**).

Este trabalho foi dividido em duas partes com diferenças nos protocolos a partir da imunização, cuja a primeira parte há dois protocolos de imunizações (protocolos LNCAP e LNCAPS). A proposta original do projeto não havia o protocolo LNCAP, porém optou-se por adicioná-lo, mas não é subtrativo para comparação entre os protocolos. A segunda parte (protocolo LNCAPSS) é uma modificação nos ciclos de tolerização adicionada de acordo com os resultados obtidos na primeira parte.

#### 3.3.1. Protocolo LNCAP

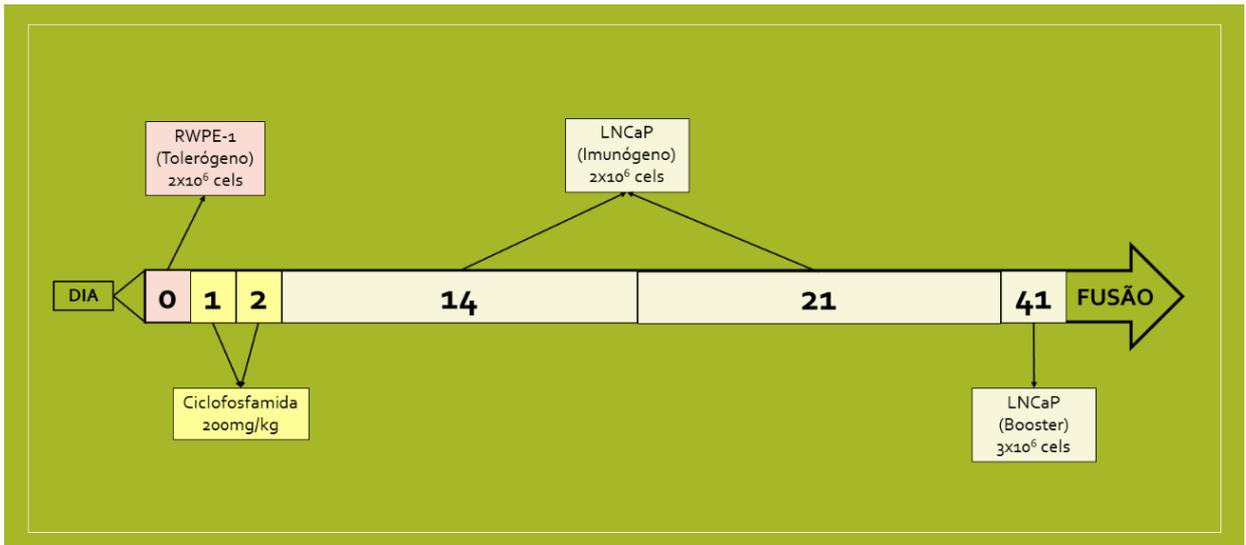
Foram utilizados 2 camundongos da linhagem isogênica BALB/C de 6 semanas de vida. Durante todo o processo os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Análises Clínicas com temperatura e umidade do ar controladas, recebendo ração e água *ad libitum*. Foi adotado o protocolo de imunização convencional sem o uso da ciclofosfamida (Cy) como descrito por Deffune (1992). As imunizações foram realizadas nos dias 0, 14, 21 e 41, como descrito na **Figura 3**. A linhagem prostática usada nas imunizações foi a LNCaP. Ao final do procedimento de imunização coletou-se o sangue dos animais para obtenção de soro contendo anticorpos policlonais posteriormente utilizado para detecção dos anticorpos contra as linhagens RWPE-1 e LNCaP (separadamente) empregando-se o método de citometria de fluxo.



**Figura 3: Agenda de imunizações do protocolo LNCaP.** Protocolo convencional. Nos dias 0, 14, 21 e 41 foi feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

### 3.3.2. Protocolo LNCAPS

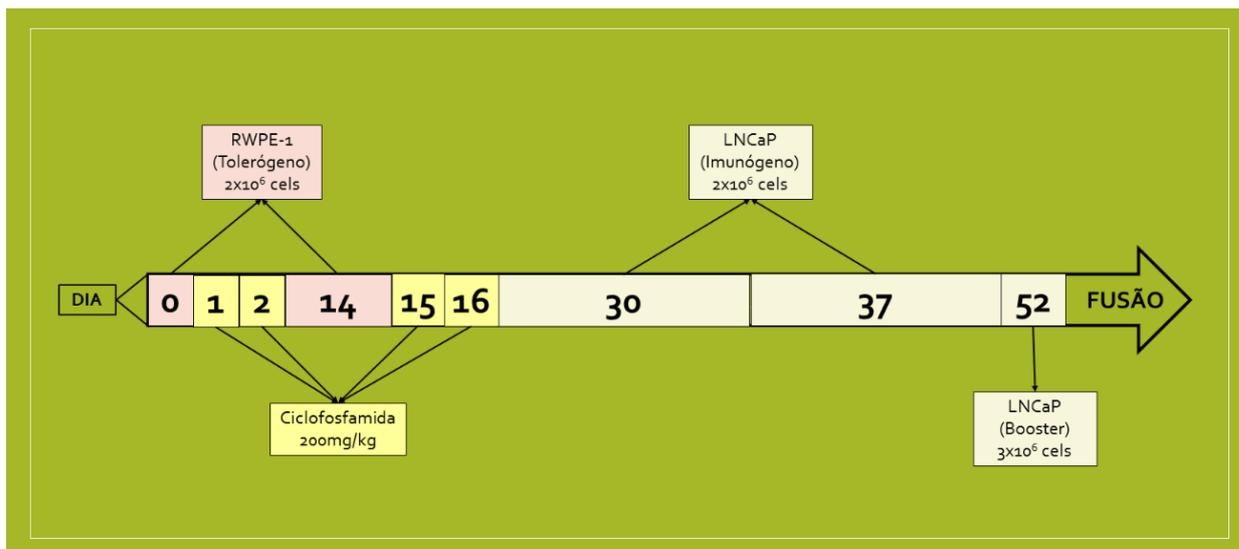
Utilizou-se 4 camundongos da linhagem isogênica BALB/C de 6 semanas de vida. Durante todo o processo os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Análises Clínicas com temperatura e umidade controladas, recebendo ração e água *ad libitum*. Adotou-se o protocolo de imunização subtrativa com Cy (Sigma-Aldrich™), como previamente descrito (BROOKS et al, 1993; DORREL et al, 2008). Realizou-se ss imunizações nos dias 0, 1, 2, 14, 21 e 41, como descrito na **Figura 4**. Inicialmente inoculou-se a linhagem RWPE-1 como tolerógeno em solução salina contendo 30% de SFB. Usou-se o SFB na tolerização por conter um grande número de proteínas imunogênicas e as células utilizadas como imunógenos cresceram em meio suplementado com SFB. Dessa forma, haveria uma grande resposta imunológica contra as proteínas no momento da imunização com o imunógeno. Após 24 e 48 horas, a resposta imune contra tais antígenos (LNCaP e SFB) foi suprimida com o uso da droga Cy (200mg/kg de peso do animal) e inoculou-se como imunógeno a linhagem tumoral prostática LNCaP. Os antígenos compartilhados com a linhagem RWPE-1 foram tolerizados, sendo assim, a resposta imune do camundongo foi predominantemente contra os antígenos expressos nas células LNCaP. Ao final do procedimento de imunização, no dia da fusão, coletou-se o sangue dos animais para obtenção de soro contendo anticorpos policlonais, utilizado para detecção dos anticorpos contra as linhagens RWPE-1 e LNCaP (separadamente) empregando-se o método de citometria de fluxo.



**Figura 4: Agenda de imunizações do protocolo LNCAPS.** Protocolo imunização subtrativa com o uso de Cy. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1), seguido de duas doses de Cy, 24 e 48h. Após é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP) nos dias 14, 21 e 41.

### 3.3.3. Protocolo LNCAPSS

Utilizou-se 4 camundongos da linhagem isogênica BALB/C de 6 semanas de vida mantidos nas mesmas condições que os camundongos do item anterior. Adotou-se o protocolo de imunização subtrativa com a repetição de um ciclo de tolerização com Cy (Sigma-Aldrich™) (VILLAVEDRA, 2007). As imunizações realizaram-se nos dias 0, 1, 2, 14, 15, 16, 30, 37 e 52 como demonstrado na **Figura 5**. Inicialmente inoculou-se a linhagem RWPE-1 suspensa em solução salina com 30% de SFB como tolerógeno. Após 24 e 48 horas, a resposta imune contra os referidos antígenos foi suprimida com o uso da droga Cy (200mg/kg de peso do animal). Esse processo de tolerização repetiu-se mais uma vez após 14 dias da primeira inoculação do tolerógeno. Após o término das tolerizações inoculou-se como imunógeno a linhagem tumoral LNCaP. Ao término do procedimento de imunização, coletou-se o sangue dos animais para obtenção de soro contendo anticorpos policlonais que foram utilizados para detecção dos anticorpos contra as linhagens RWPE-1 e LNCaP (separadamente) empregando-se o método de citometria de fluxo.



**Figura 5: Agenda de imunizações do protocolo LNCAPSS.** Protocolo de imunização subtratativa com o uso de dois ciclos de tolerização. No dia 0 é inoculado o tolerógeno (RWPE-1) no camundongo, seguido de duas doses de Cy 24 e 48h depois. Após 12 dias da última dose de Cy é feita novamente a inoculação do tolerógeno seguido de mais duas doses de Cy. Nos dias 30, 37 e 52 é feita a inoculação do imunógeno (LNCaP).

### 3.4. Produção dos Anticorpos

#### 3.4.1. Fusão Celular

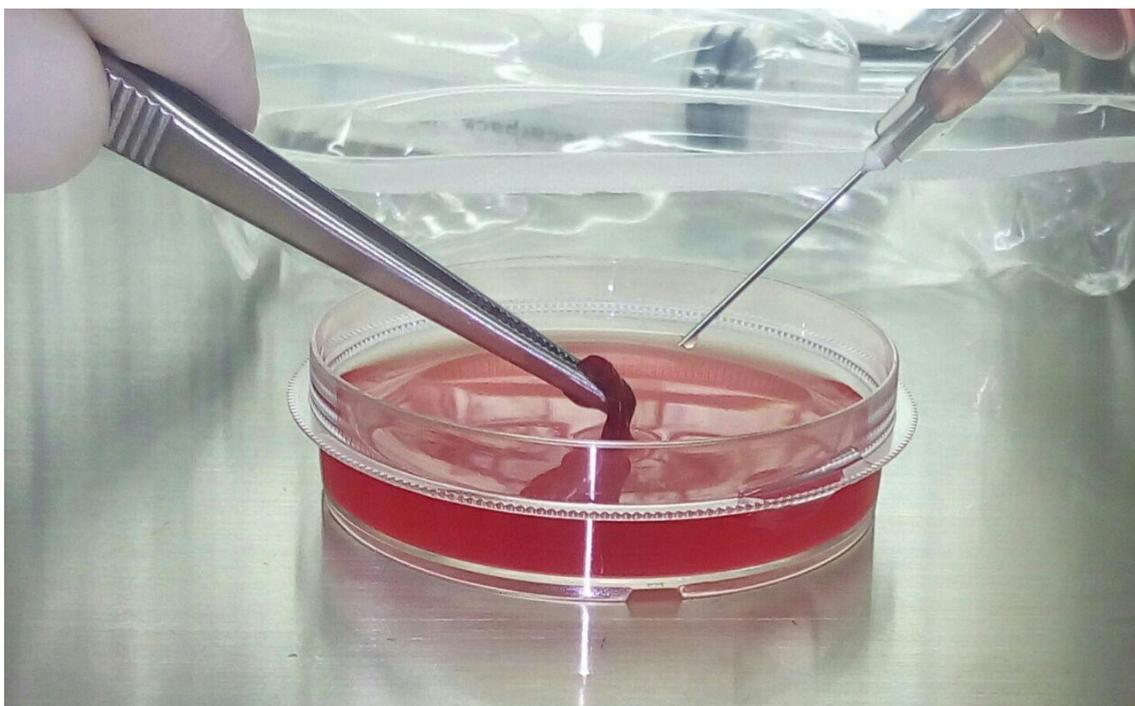
##### 3.4.1.1. Preparo de células companheiras de fusão

Duas semanas antes da fusão, descongelou-se uma ampola e iniciou-se uma cultura de células mielomatosas murinas não secretoras de imunoglobulinas, da linhagem NS/1 (protocolos LNCAP e LNCAPS) e Sp2/0 (protocolo LNCAPSS) para serem usadas como células parceiras de fusão. Estas células foram mantidas encubadas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de SFB até a fase de crescimento exponencial, apresentando viabilidade celular igual ou superior a 80% verificada por coloração azul de Trypan em câmara de Neubauer.

##### 3.4.1.2. Eutanásia dos animais e esplenectomia

Os animais foram anestesiados com o uso da associação das drogas ketamina e xilazina, e coletou-se o sangue. Após a coleta do sangue, sacrificou-se os animais em câmara de CO<sub>2</sub> e removeu-se o baço, mantendo-se a máxima possível esterilidade. Em seguida, o órgão foi colocado em uma placa de Petri estéril, contendo meio HEPES, lavado e transferido à outra placa de Petri contendo novo meio HEPES. Com o auxílio de uma seringa com agulha,

perfurou-se o órgão diversas vezes (**Figura 6**). Em seguida injetou-se meio de cultura da placa repetidas vezes dentro do órgão, expelindo assim todos os esplenócitos para a placa pelos furos feitos. Esse meio (contendo os esplenócitos) foi coletado, centrifugado a 1200 rpm durante 10 minutos para sedimentação das células. O sobrenadante foi aspirado e as ressuspendeu-se as células em meio RPMI, contadas em câmara de Neubauer com o uso do corante Azul de Tripiano para determinação da viabilidade celular.



**Figura 6: Obtenção dos esplenócitos.** O baço é furado diversas vezes e em seguida meio de cultura é injetado em seu interior expelindo os esplenócitos pelos furos feitos. Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.4.1.3. Controle da Imunização pelo método de Citometria de Fluxo

O soro coletado de cada camundongo foi diluído 1:500 em solução salina ISOTON II (BD Biosciences™) e 150µL de cada diluição foram incubadas contra  $2 \times 10^5$  células LNCaP, por 1 hora, em agitação branda. Seguiu-se centrifugação de 3600rpm por 5 minutos, e então o sobrenadante foi aspirado (para retirar anticorpos não acoplados às células). Após as células foram incubadas com anticorpo Goat anti-mouse anti-Ig (IgG + IgM + IgA) murino marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Abcam™) por mais 30 minutos, no escuro, em agitação branda. Seguiu-se nova centrifugação de 3600rpm por 5 minutos, aspiração do sobrenadante (para retirar anticorpos não acoplados aos anticorpos primários), suspensão das células em solução salina ISOTON II (BD Biosciences™) e análise ao citômetro de fluxo (FACS CANTO I).

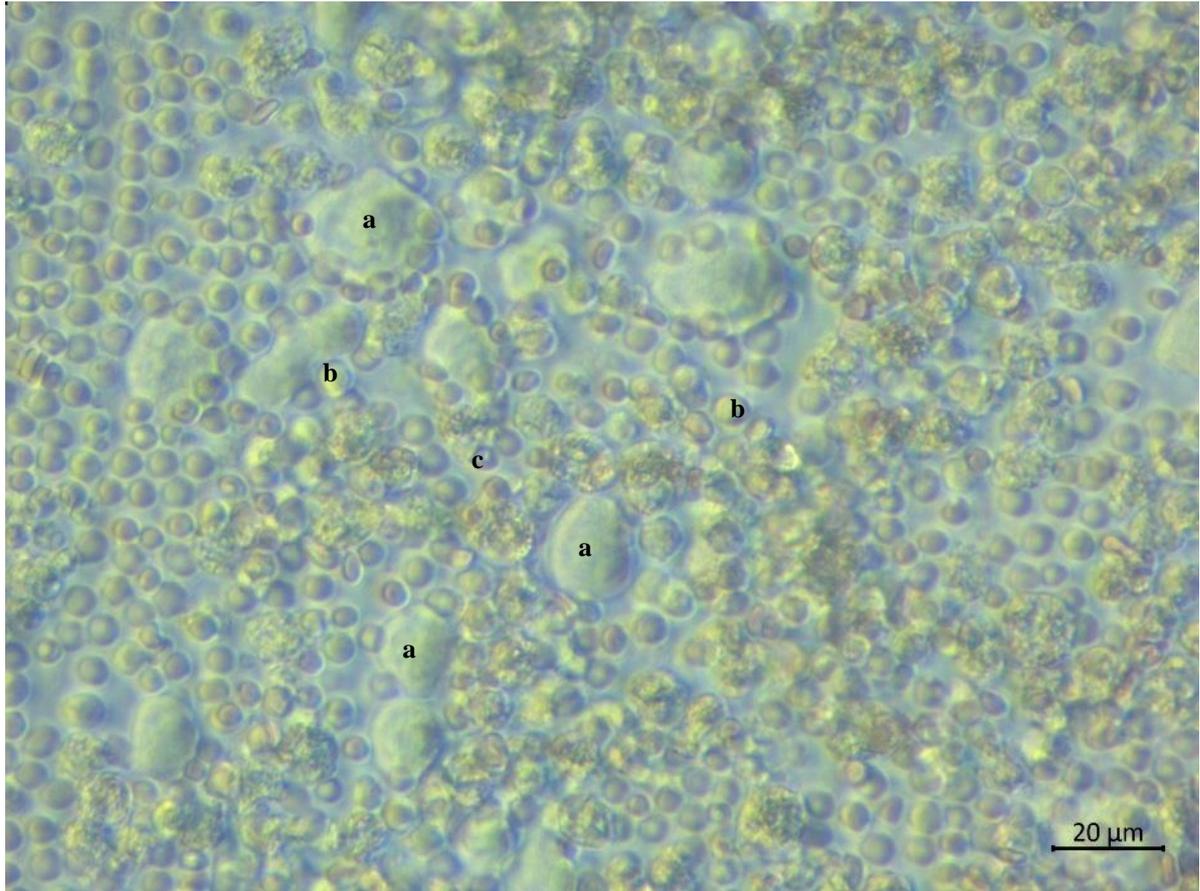
#### 3.4.1.4. Fusão Celular

Após determinado o número obtido de esplenócitos foi calculado a quantidade de células parceiras de fusão (NS1 para os protocolos LNCAP e LNCAPS e Sp2/0 para o protocolo LNCAPSS) necessárias mantendo-se a relação linfócito/NS1 de 10/1 e linfócito/Sp2/0 de 10/2 (como indicado pela empresa fornecedora).

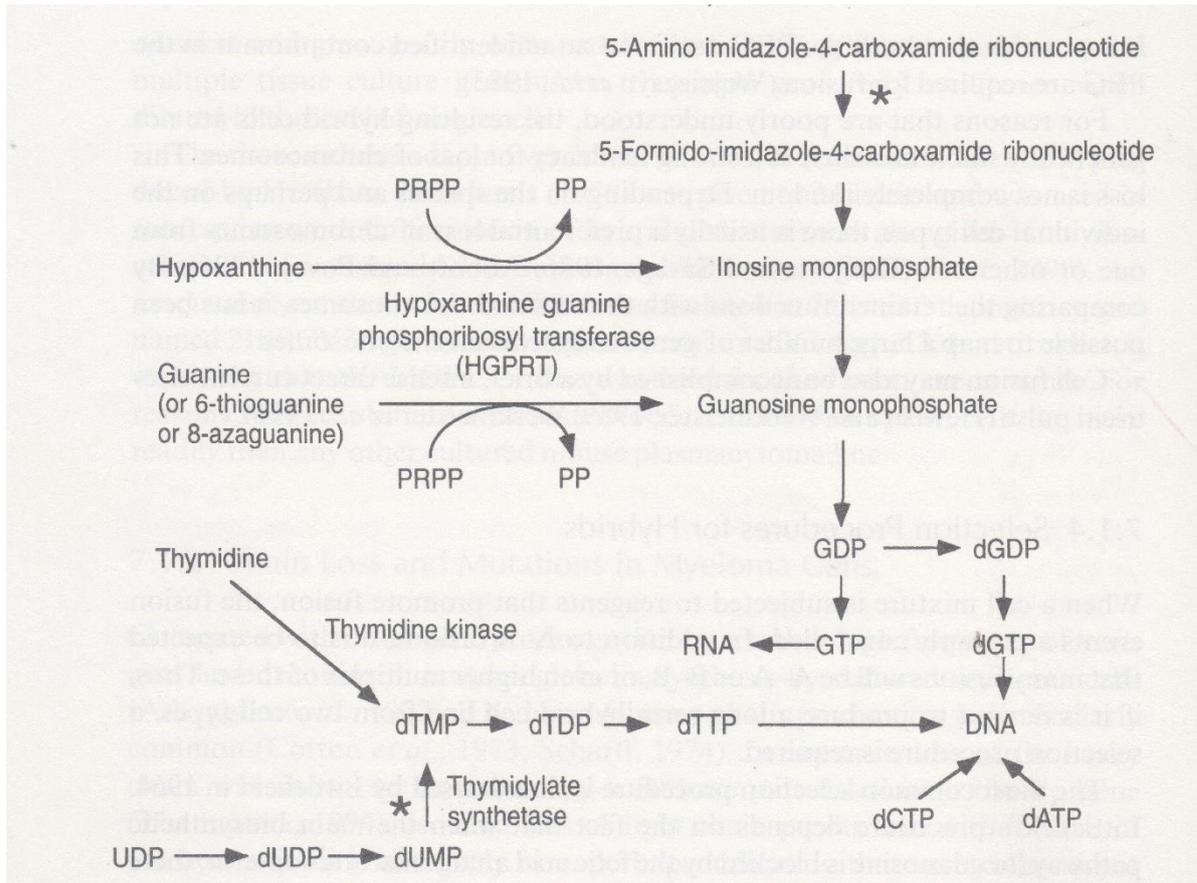
As células (linfócitos e mieloma) foram colocadas juntas na presença de polietilenoglicol PM 4000 (PEG) (Sigma-Aldrich™) e submetidas a centrifugação por 1 minuto a 1200 rpm e após o tempo passado a rotação foi aumentada para 1500 rpm sem o desligamento da centrífuga por mais 2 minutos. Ao término da centrifugação foi adicionado SFB para inibição da ação do PEG e deixados em repouso por 10 minutos. Do momento em que as células foram colocadas em contato com o PEG até o momento que foi adicionado o SFB o procedimento foi cronometrado para não ultrapassar 8 minutos e assim perder a viabilidade das células devido à ação do PEG. Após os 10 minutos, foi adicionado meio enriquecido - meio usado para cultivo de hibridomas tendo como base o meio RPMI 1640 enriquecido com aminoácidos essenciais e não essenciais entre outros aditivos. Essa suspensão, após delicada homogeneização, foi distribuída em microplacas de cultura celular de 96 poços. Todos os protocolos brevemente descritos respeitaram as técnicas clássicas descritas por Earley & Osterling (1985).

#### 3.4.2. Seleção dos Hibridomas

Em contato com o PEG ocorre fusão entre linfócitos/mieloma, mieloma/mieloma, linfócito/linfócito, além de uma quantidade de células que não conseguem se fundir (**Figura 7**). Para que apenas os hibridomas provenientes de linfócitos/mieloma sejam selecionados, desenvolveu-se um método baseado em uma característica da bioquímica das linhagens de mielomas utilizadas, NS1 e Sp2/0. Sabidamente, estas linhagens possuem um gene hipermetilado que lhe confere a característica de ser hipoxantina-guanosina-fosfo-ribosil-transferase (HGPRT) negativo e assim as impede de usar a via alternativa para a síntese de nucleotídeos em meio hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT) enquanto que linfócitos B de camundongos imunizados possuem gene normal, com a característica de ser HGPRT positivo (+)(**Figura 8**). O híbrido ideal é aquele que no momento da fusão guarda suas características HGPRT+ e usam a via alternativa para sintetizar os nucleotídeos.



**Figura 7. Células pós-fusão:** Células Mielomatosas murinas (a), linfócitos (b) e hemácias (c) observadas ao microscópio invertido com contraste de fase, logo após a fusão celular. Algumas das células marcadas com (a) são hibridomas, porém não é possível diferenciá-las morfológicamente das células mielomatosas. Aumento de 400X. Barra de escala= 20μM.



**Figura 8. Vias metabólicas relevantes para seleção do híbrido em meio contendo hipoxantina-aminoptericina e timidina:** Quando as principais vias sintéticas são bloqueadas com o análogo de ácido fólico aminoptericina (\*), a célula deve depender das enzimas de salvamento HGPRT e timidina quinase. As células HGPRT podem ser selecionadas por crescimento em meio contendo os análogos de base tóxica 6-tioguanina ou 8-azaguanina, que são incorporados na célula via HGPRT. Apenas as células HGPRT + sobrevivem. As células HGPRT- não podem crescer em meio HAT a menos que estejam fundidas com células HGPRT +

No dia seguinte da fusão, adicionou-se ao meio de cultura hipoxantina-aminoptericina e timidina (HAT *Supplement* 50X, Gibco®), eliminando células de mieloma não fusionadas ou fusionadas com outros mielomas, restando apenas híbridos provenientes de fusões entre linfócito/mieloma. Os linfócitos não fusionados e os fusionados com outros linfócitos não são eliminados, porém o tempo que sobrevivem em cultura celular é pequeno. Destarte, em alguns dias são eliminados naturalmente. Após a seleção enzimática, foram adicionadas nas culturas dos hibridomas células de timo de camundongo (protocolo *feeder cells* - células de companhia (item 1.2)), na quantidade de  $10^5$  células por poço. A utilização destas células tem como finalidade condicionar o meio de cultura com citocinas e fatores de crescimento, elementos importantes para o crescimento celular. Todos os protocolos brevemente descritos acima respeitaram as técnicas descritas por Deffune (1992).

### **3.4.3. Identificação dos Hibridomas para *Screening***

Nesta etapa, as placas de 96 poços contendo os hibridomas foram investigadas em microscópio invertido equipado com contraste de fase (Zeiss Primovert®). Durante essa meticulosa investigação (os poços são verificados, um a um) foram selecionados para prosseguirem ao *screening* apenas os poços que possuísem hibridomas translúcidos, com membrana plasmática regular e em fase de crescimento exponencial. Os poços com colônias de fibroblastos aderentes foram descartados (DEFFUNE, 1992).

### **3.4.4. *Screening* dos Hibridomas**

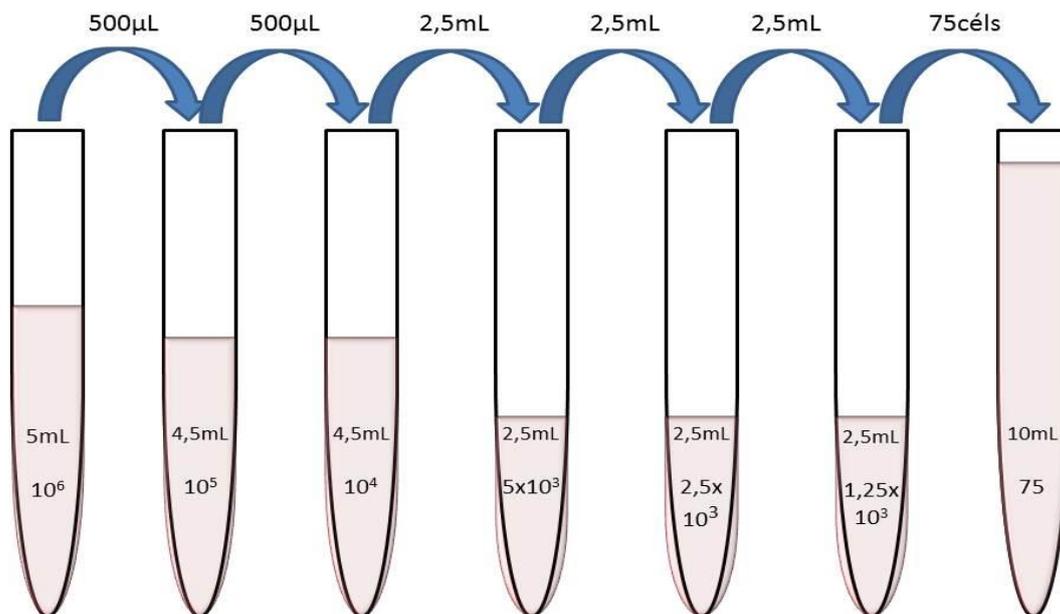
Testou-se o sobrenadante de cultura (SCC) dos poços identificados na etapa anterior contra as células utilizadas como imunógeno (LNCaP). Para isso, após dois dias da troca do meio de cultura, para a concentração dos anticorpos, coletou-se o SCC afim de realizar o ensaio.

O método de *screening* foi realizado por citometria de fluxo utilizando-se células íntegras, assim como utilizadas células íntegras nas imunizações. Desta maneira, as células tumorais prostáticas utilizadas como imunógenos (LNCaP) foram incubadas com os SCCs obtidos dos hibridomas, durante 2 horas, segundo descrito (MOROZ 2009; MOROZ et al., 2013b). Após esta incubação, procedeu-se a centrifugação das células e aspirou-se o SCC para retirada dos anticorpos não ligados, em seguida, incubadas com um anticorpo reconhecedor de IgG + IgA + IgM (Abcam™) de camundongo, marcado com FITC, por 1,5 horas seguida de nova centrifugação para retirada dos anticorpos secundários que não se acoplaram. Então os tubos foram submetidos à leitura de fluorescência em citômetro de fluxo. Os hibridomas que apresentaram alta positividade passaram por mais três testes. Apenas os hibridomas que se mantiveram positivos durante todos os testes prosseguiram para a próxima etapa. Como controle de autofluorescência utilizou-se a célula sem nenhuma incubação com anticorpos e foi utilizado também a célula incubada apenas com o anticorpo secundário como controle do anticorpo secundário.

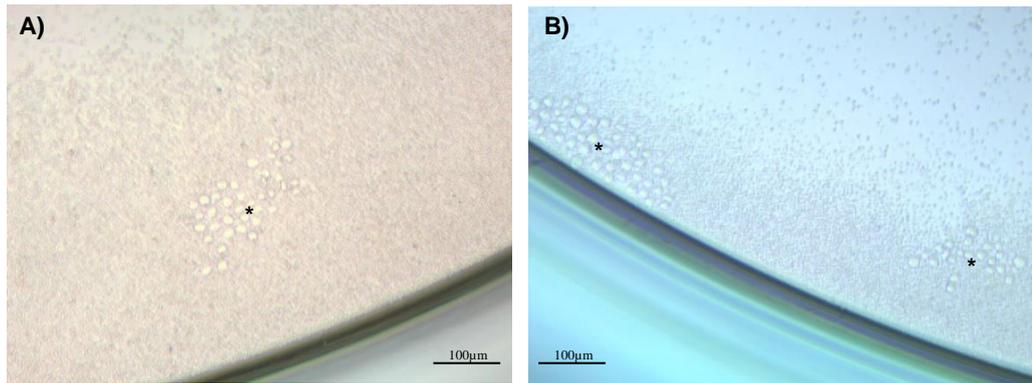
### **3.4.5. Clonagem Celular**

Previamente à clonagem, a placa que recebeu os clones foi coberta com células obtidas de timos (protocolo *feeder cells* - células de companhia (item 1.2)) (DEFFUNE, 1992).

As linhagens de hibridomas que apresentaram alta positividade contra o imunógeno (LNCaP) foram submetidas à clonagem pela técnica de diluição limitante (**Figura 9**), e então depositadas em placas de 96 poços, segundo descrito (DEFFUNE, 1992; FRESHNEY, 2005). A concentração celular de hibridomas depositada nas placas foi de 0,75 células/poço, de modo a maximizar a probabilidade de que apenas uma célula seja transferida para cada poço, obtendo-se a garantia de que a subsequente divisão celular daria origem a um clone de composição genética idêntica em cada poço. Após 24 horas da semeadura as placas foram observadas no microscópio invertido para se identificar os poços com clones únicos (**Figura 10**). Estes foram identificados de acordo com as recomendações de tamanho e forma das colônias, descritos por Lietzke e Unsicker (1985).



**Figura 9: Clonagem por diluição limitante.** Os hibridomas foram diluídos a partir de  $10^6$  até chegar a 75 células em um tubo com 10 mL de meio de cultura que então foi distribuído em microplaca de cultura de 96 poços.



**Figura 10. Crescimento dos Clones (\*):** **A)** Crescimento de clone único; **B)** Crescimento de clone duplo. Aumento de 100X. Barra de escala de 100µm

### 3.4.6. *Screening* dos Clones e Determinação dos Clones de Alta Prioridade

Nesta etapa realizou-se o mesmo procedimento descrito no *screening* dos hibridomas (item 1.4.4), porém utilizando-se o SCC dos poços que possuíam colônias de clones translúcidos e com membrana plasmática regular.

Adicionalmente, os clones secretores que apresentaram positividade foram também testados contra células RWPE-1, utilizadas como tolerógeno durante as imunizações. Desta maneira, determinou-se quais clones secretam anticorpos que reconhecem antígenos diferencialmente expressos nas células tumorais, doravante definidos como **alta prioridade** e quais anticorpos reconhecem antígenos compartilhados com células não tumorais, doravante definidos como **baixa prioridade**. Os clones que obtiveram positividade alta contra o imunógeno, bem como a metade da porcentagem dessa positividade contra o tolerógeno foram criopreservados.

### 3.5. Controle de contaminação dos hibridomas

Para garantir que os hibridomas não estavam contaminados por micoplasma, o que poderia alterar o ciclo celular, foi realizado o teste de coloração indireta por 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) segundo descrito por Young *et al.* (2010). Como controle positivo é recomendado usar uma cepa comercial de micoplasma, porém com a estrutura do laboratório isso seria inviável, uma vez que não apresenta os níveis de segurança para manipulação deste microorganismo sem colocar em risco todas as células em cultura. Então utilizamos imagens de amostras positivas para servirem como comparativas com as imagens obtidas em nosso experimento. Como os hibridomas crescem em suspensão na cultura e fica difícil diferenciar a

limitação núcleo/citoplasma, foi cultivado esses hibridomas juntamente com células LNCaP como *Reporter Cell* que crescem aderidas ao frasco, durante o período de 7 dias e então, após marcação com DAPI foi realizada a leitura no aparelho *InCell Analyzer 2200* (GE Healthcare Life Sciences™). Foi utilizado como controle negativo a célula LNCaP (*Reporter Cell*).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Expansão das linhagens

Previamente às imunizações, foi necessário expandir as células das linhagens LNCaP (tumoral) e RWPE-1 (não tumoral), utilizadas como imunógenos e tolerógenos, respectivamente, efetivando-se o banco de células necessárias a todos os protocolos de obtenção dos hibridomas e também para os *screenings*.

Todas as células foram mantidas em placas de cultura celular de poliestireno de 25cm<sup>2</sup> e 75cm<sup>2</sup>, com tratamento da superfície de crescimento, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> com atmosfera úmida a 37°C. Quando as células atingiram 80% de confluência, foram repicadas usando tripsina (Gibco/Invitrogen™) 0,25% EDTA e transferidas para novas placas de cultura (MOROZ et al., 2013). De duas ampolas de cada linhagem, obteve-se 53 ampolas das células LNCaP e 16 ampolas das células RWPE-1 (**Quadro 1**), as quais foram criopreservadas em solução SFB + 10% de dimetilsufóxido (DMSO), estabelecendo-se desta maneira o Banco de Células.

**Quadro 1:** Constituição do Banco de Células (BC).

<b>Linhagem</b>	<b>Ampolas recebidas</b>	<b>Ampolas no BC</b>	<b>MC utilizado</b>
<b>RWPE-1</b>	2	16	Keratinocyte
<b>LNCaP</b>	2	53	RPMI+10%SFB
<b>NS1</b>	2	10	RPMI+10%SFB

**Legenda:** BC (Banco de Células); MC (Meio de cultura); SFB (Soro Fetal Bovino)

O banco de células foi estabelecido, porém em Dezembro de 2015 houve problemas na rede de distribuição elétrica no Campus da Universidade durante o final de semana o que acarretou em danos ao *freezer* -80°C do laboratório que se desligou, descongelando todo material biológico que estava criopreservado. No momento em que esse fato ocorreu não existia nenhuma linhagem celular em cultura, pois todas estavam criopreservadas no *freezer*. Transferiu-se as ampolas para *freezers* de outros laboratórios assim que foi constatado o mau funcionamento e, nos dias seguintes, todas as ampolas foram submetidas a teste de viabilidade com Azul de tripano e câmara de Neubauer, no qual constatou-se que não havia nenhuma linhagem viável devido ao descongelamento ocorrido, uma vez que para o congelamento é

utilizado um meio contendo 90% SFB e 10% de DMSO. Este em temperatura ambiente por um determinado tempo é prejudicial às células. Dessa maneira, as ampolas de todas as linhagens foram perdidas e o projeto teve um atraso de 7 meses, uma vez que o laboratório foi estabelecido com o início desse trabalho e não existia ainda um *backup*.

Porém, com muita afinco e trabalho, o banco de células foi reestabelecido (**Quadro 2**) com 1 ampola de cada linhagem prostática cedidos pelo Professor. Dr. Sérgio Luis Felisbino do Instituto de Biociências do campus da UNESP de Botucatu e 1 ampola da linhagem de mieloma murino não secretora de imunoglobulina Sp2/0 (linhagem que assim como a NS1 utilizada na imunização LNCAPS pode ser usada para a fusão com linfócitos e geração dos hibridomas), cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Boldrini de Campinas.

**Quadro 2:** Re-constituição do Banco de Células (BC) após perda.

<b>Linhagem</b>	<b>Ampolas recebidas</b>	<b>Ampolas no BC</b>	<b>MC utilizado</b>
<b>RWPE-1</b>	1	30	Keratinocyte
<b>LNCaP</b>	1	40	RPMI+10%SFB
<b>NS1</b>	1	12	RPMI+10%SFB

**Legenda:** BC (Banco de Células; MC (Meio de cultura); SFB (Soro Fetal Bovino)

#### **4.2. Padronização da Ciclofosfamida para a imunização subtrativa**

Nos protocolos previamente descritos sobre o uso da Cy nos processos de imunização subtrativa não havia relatos de complicações com os animais (RASMUSSEN; DITZEL, 2009) mas havia o receio que isto acontecesse. Portanto, realizou-se a padronização do uso desta droga nos camundongos. Durante a padronização três camundongos da linhagem isogênica BALB/C, de seis semanas de idade, receberam duas injeções de Cy (Sigma-Aldrich™) dissolvidas em D-PBS (Gibco/Invitrogen™, estéril). A dose foi a mesma utilizada no protocolo de tolerização, 200mg/kg de peso, duas injeções com 24 horas de intervalo, como descrito (BROOKS *et al.*, 1993). Esses animais foram acompanhados (inspeção diária no biotério referente ao consumo de ração e água e comportamento do animal) durante 41 dias, simulando-se todo o período dos protocolos de imunização da primeira parte do projeto. Não foram observadas diferenças nos parâmetros estudados. Os animais não tinham sinais de irritação e mantiveram-se vivos durante todo o período.

### 4.3. Imunização dos Animais

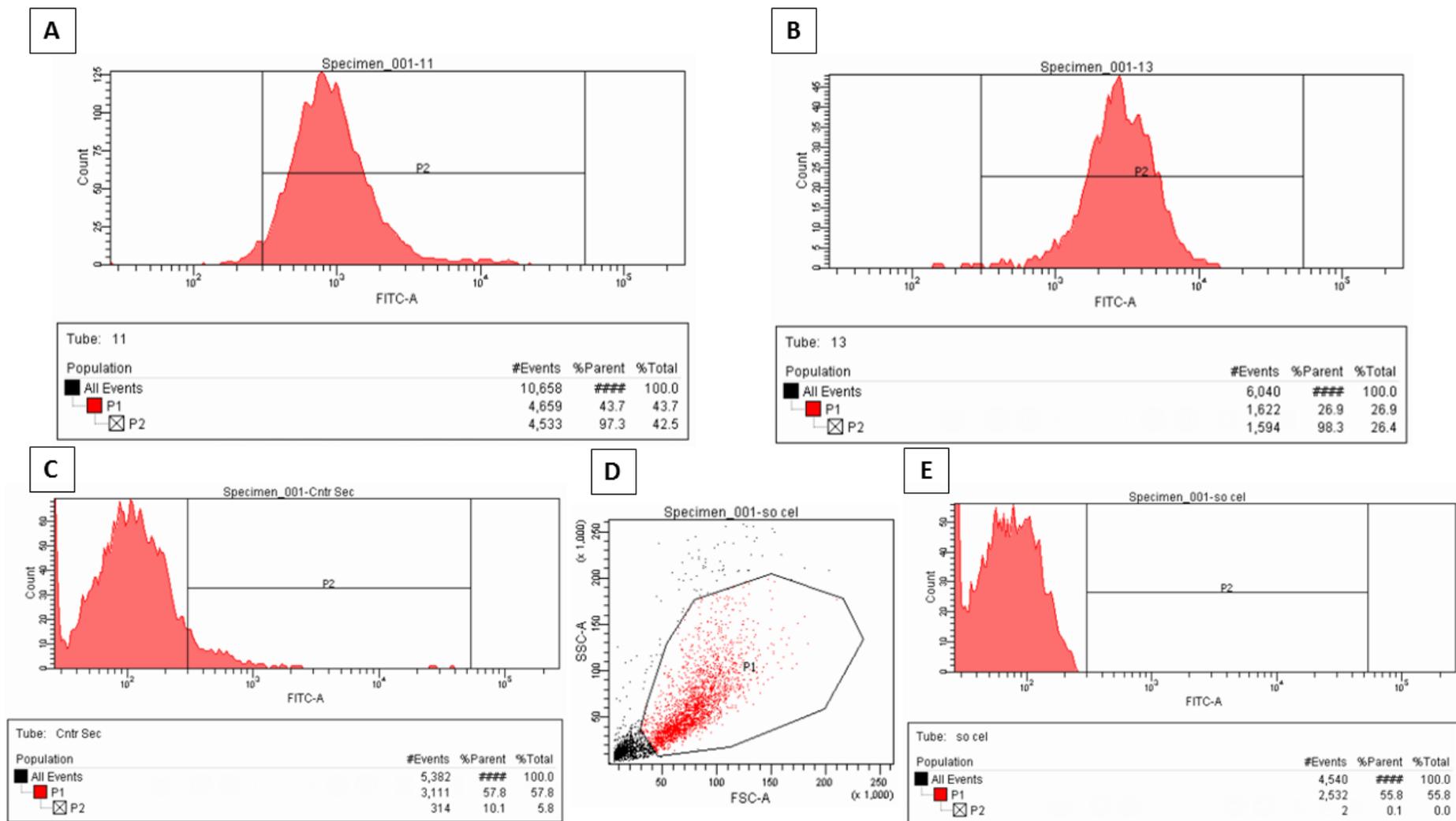
Realizou-se três protocolos de imunização, definidos LNCAPS (subtrativo, com um ciclo de tolerização com Cy), LNCAPSS (subtrativo, com dois ciclos de tolerização com Cy) e LNCAP (convencional, sem uso de Cy) dos quais três animais do protocolo LNCAPS e um animal do protocolo LNCAP vieram a óbito. Já que durante a padronização da ciclofosfamida nenhum animal morreu. Acredita-se que esses óbitos possam estar relacionados à possíveis problemas técnicos (controle de temperatura, por exemplo) do biotério ou em decorrência da exposição às células tumorais, porém os animais que morreram não foram estudados para determinação da causa das mortes. Em conclusão, restaram dois animais do protocolo de imunização LNCAPS e um animal do protocolo LNCAP para as próximas etapas de obtenção de anticorpos monoclonais.

No protocolo LNCAPSS não houve óbito de nenhum animal, todavia, foram escolhidos dois animais para seguirem para fusão. Essa escolha dos animais do protocolo LNCAPSS procedeu-se de acordo com o resultado encontrado por meio do teste do soro desses animais contra as células utilizadas como imunógeno e tolerógeno por citometria de fluxo.

### 4.4. Controle de Imunização

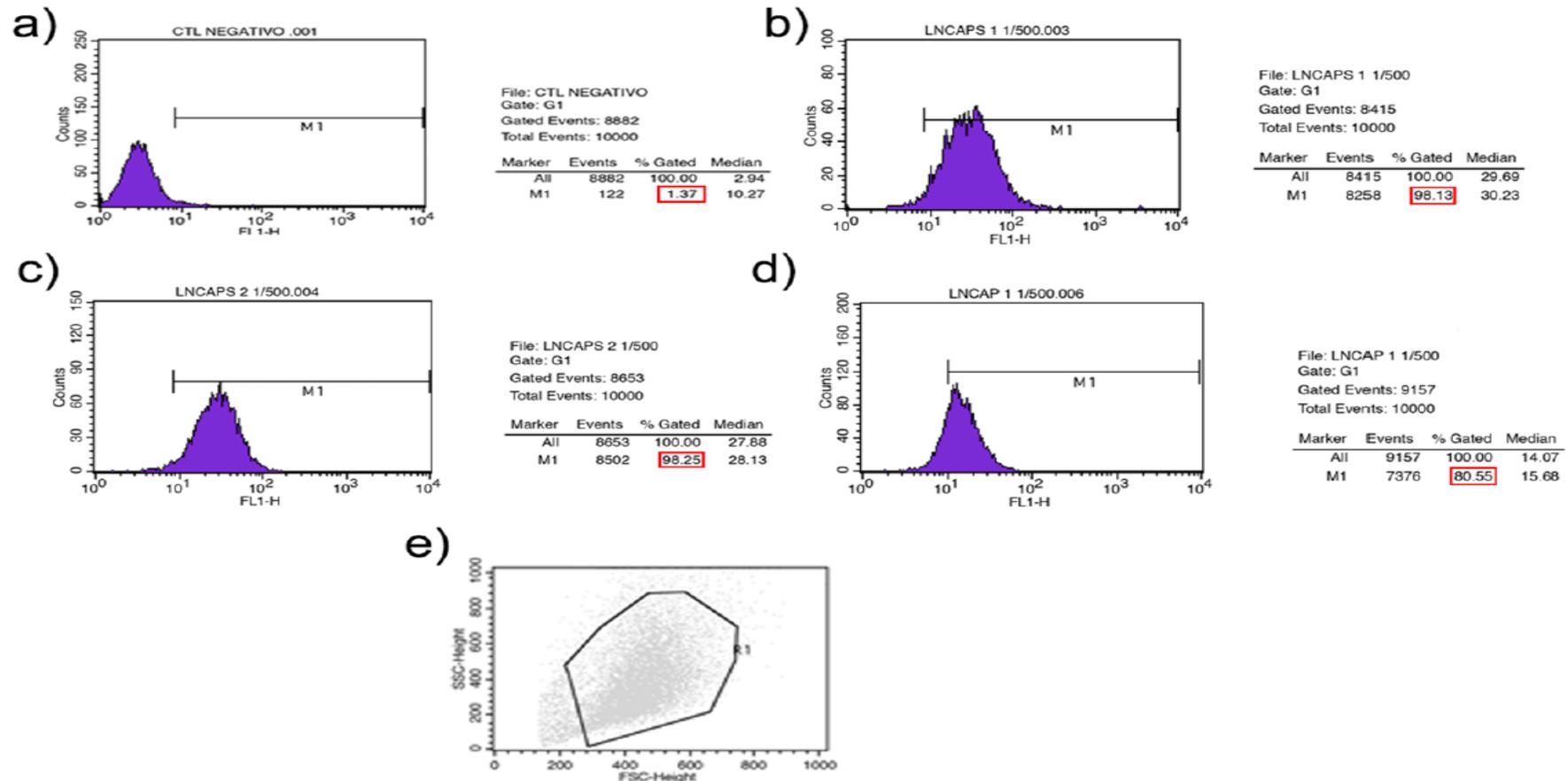
Previamente ao sacrifício e esplenectomia, coletou-se o sangue sem o uso de anticoagulantes, de cada camundongo. O sangue foi centrifugado a 1200rpm durante 10 minutos para obtenção do soro. O soro de cada animal, rico em AcP, foi testado contra as células imunógenas LNCaP, em técnica de citometria de fluxo para se constatar a presença ou ausência de anticorpos reativos de interesse, como descrito (VICENTINI-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Para a realização da fusão, foram escolhidos os animais 1 e 3, que obtiveram o melhor resultado contra a célula LNCaP (97,3% e 98,3%, respectivamente), os animais 2 e 4 tiveram resultados positivos de 60,9% e 26%, respectivamente. Os controles de autofluorescência e controle de anticorpos secundário foi de 0,1% e 10,1%, respectivamente para as células LNCaP como mostrado na **Figura 11**:



**Figura 11: Análise dos anticorpos policlonais presentes no soro dos camundongos do protocolo LNCAPSS contra o imunógeno (LNCaP) por citometria de fluxo. (A) Animal 1, positivo em 97,3%; (B) Animal 3, positivo em 98,3%; (C) Controle autofluorescência, positivo em 10,1%; (D) Blot da população celular analisada; (E) Controle de autofluorescência, positivo em 0,1%.**

As análises revelaram 98,13%, 98,25% e 80,55% de positividade para os animais 1 e 2 do protocolo LNCAPS e animal 1 do protocolo LNCAP, respectivamente, comprovando a imunização eficiente dos animais (**Figura 12**). O controle negativo (controle isotópico) revelou menos de 2% de positividade.



**Figura 12. Soro dos camundongos testados por Citometria de Fluxo com células LNCaP: a) Controle negativo; b) Camundongo 1 do protocolo LNCAPS c) Camundongo 2 do protocolo LNCAPS d) Camundongo 1 do protocolo LNCAP e) Blot da população celular pesquisada.**

#### 4.5. Fusão Celular e *Screening*

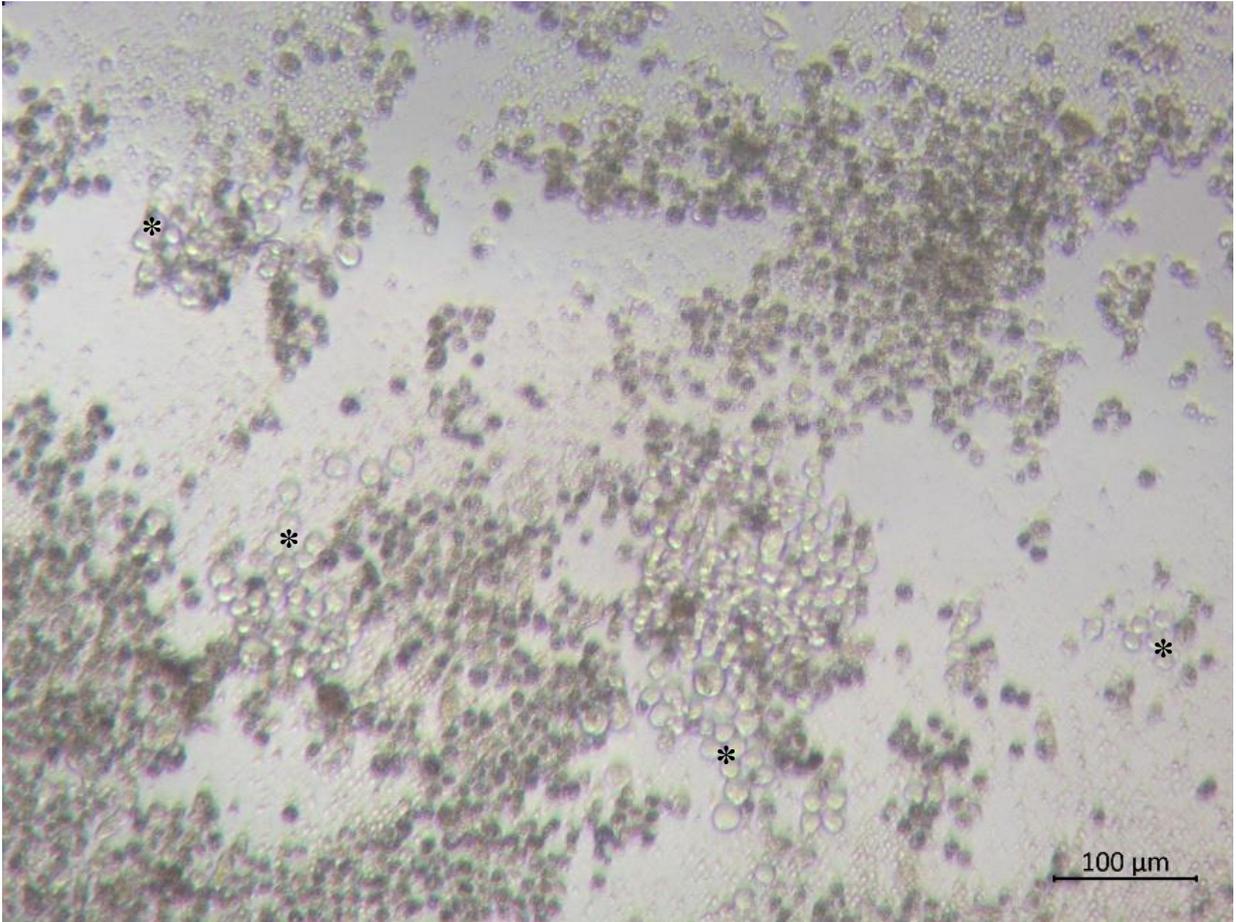
Os linfócitos foram fundidos com células mielomatosas murinas da linhagem NS1 ou Sp2/0 por método químico utilizando o PEG (EARLEY; OSTERLING, 1985). A quantidade de linfócitos obtidas no protocolo LNCAPS foi 325% maior que a quantidade de linfócitos do protocolo LNCAPSS, sendo a média de  $1,95 \times 10^8$  para o protocolo LNCAPS e  $6 \times 10^7$  para o protocolo LNCAPSS. O protocolo LNCAP obteve a quantidade de  $9 \times 10^7$  linfócitos como visto no **quadro 3**. A quantidade de linfócitos, no entanto, varia de animal para animal não estando esse dado relacionado ao tipo de protocolo de imunização utilizado ou ao tempo de fusão.

**Quadro 3:** Dados das fusões celulares

FUSÃO	MIELOMA	LY	PEG	Nº DE PLACAS	TEMPO DE FUSÃO
LNCAP	$9 \times 10^6$	$90 \times 10^6$	1mL	03	7min. 02seg
LNCAPS1	$24 \times 10^6$	$240 \times 10^6$	2,64mL	09	7min. 20seg
LNCAPS2	$15 \times 10^6$	$150 \times 10^6$	1,65mL	05	6min 42seg
LNCAPSS1	$8,4 \times 10^6$	$42 \times 10^6$	0,5mL	02	6min 17seg
LNCAPSS3	$15,6 \times 10^6$	$78 \times 10^6$	0,93mL	03	6min 11seg

**Legenda:** LNCAP1 (fusão celular protocolo convencional, animal 1); LNCAPS1 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 1); LNCAPS2 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 2); LNCAPSS1 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 2); LNCAPSS3 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 3); Mieloma NS1 (protocolos: LNCAP, LNCAPS1, LNCAPS2), Mieloma Sp2/0 (protocolos LNCAPSS1 e LNCAPSS3); Ly (linfócitos); PEG (polietilenoglicol).

Após essa etapa, cada poço foi inspecionado ao microscópio invertido para identificação dos poços que apresentavam crescimento positivo de hibridomas, com aspectos morfológicos característicos (**Figura 13**), quando coletou-se o SCC para realizar o *screening* e verificar a presença ou ausência de anticorpos reconhedores de células tumorais imunógenas (LNCaP) através de citometria de fluxo. Os hibridomas que apresentaram resultado positivo foram submetidos ao teste por mais 3 vezes, resultando em 12 hibridomas retidos, como mostrado no **quadro 4**



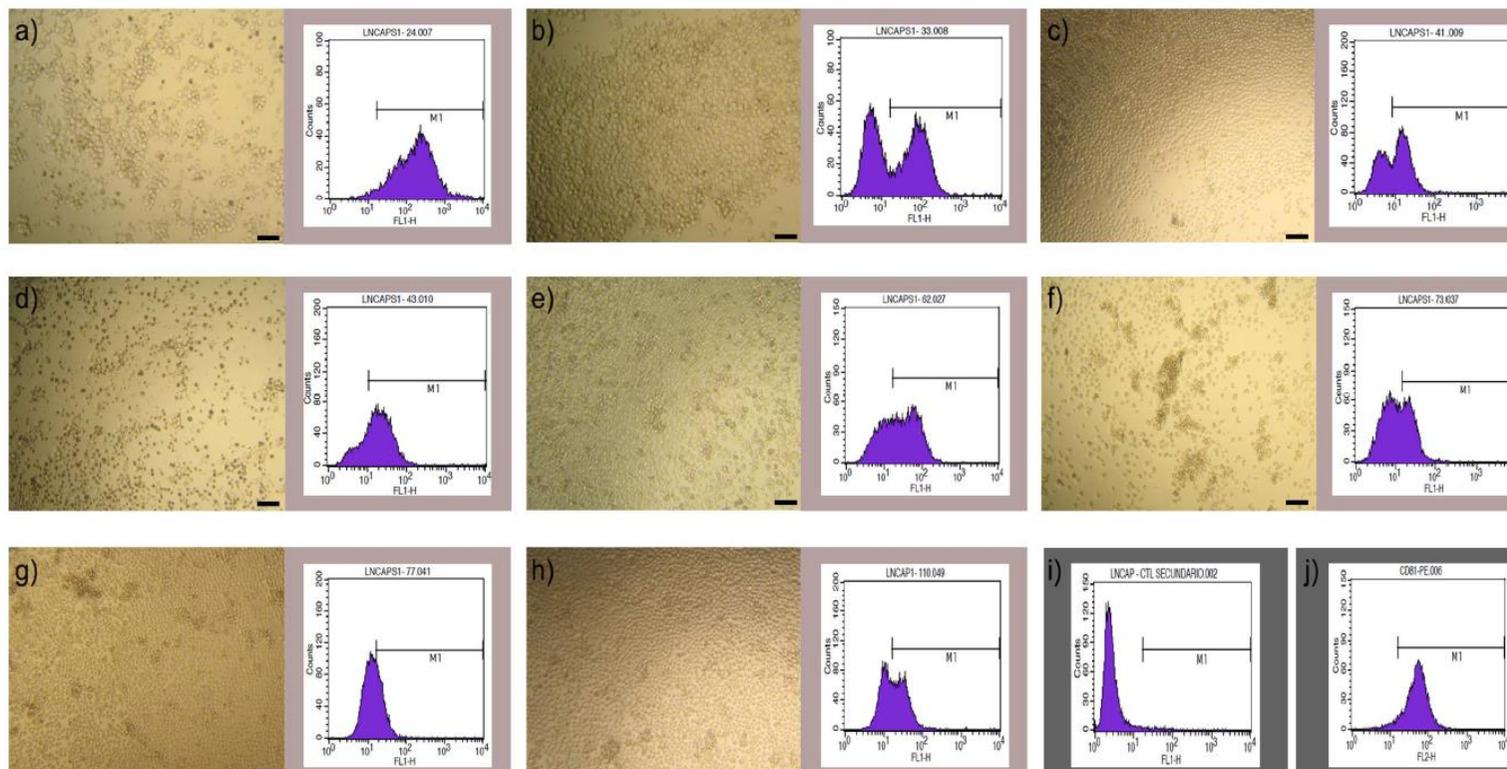
**Figura 13. Hibridoma ao microscópio invertido:** Aspecto morfológico ideal representativo de hibridomas em crescimento saudável (\*) para o teste de *screening* quando atingirem maior confluência. Aumento de 100x. Barra de escala = 100μM.

**Quadro 4.** Hibridomas plaqueados, hibridomas testados e hibridomas retidos.

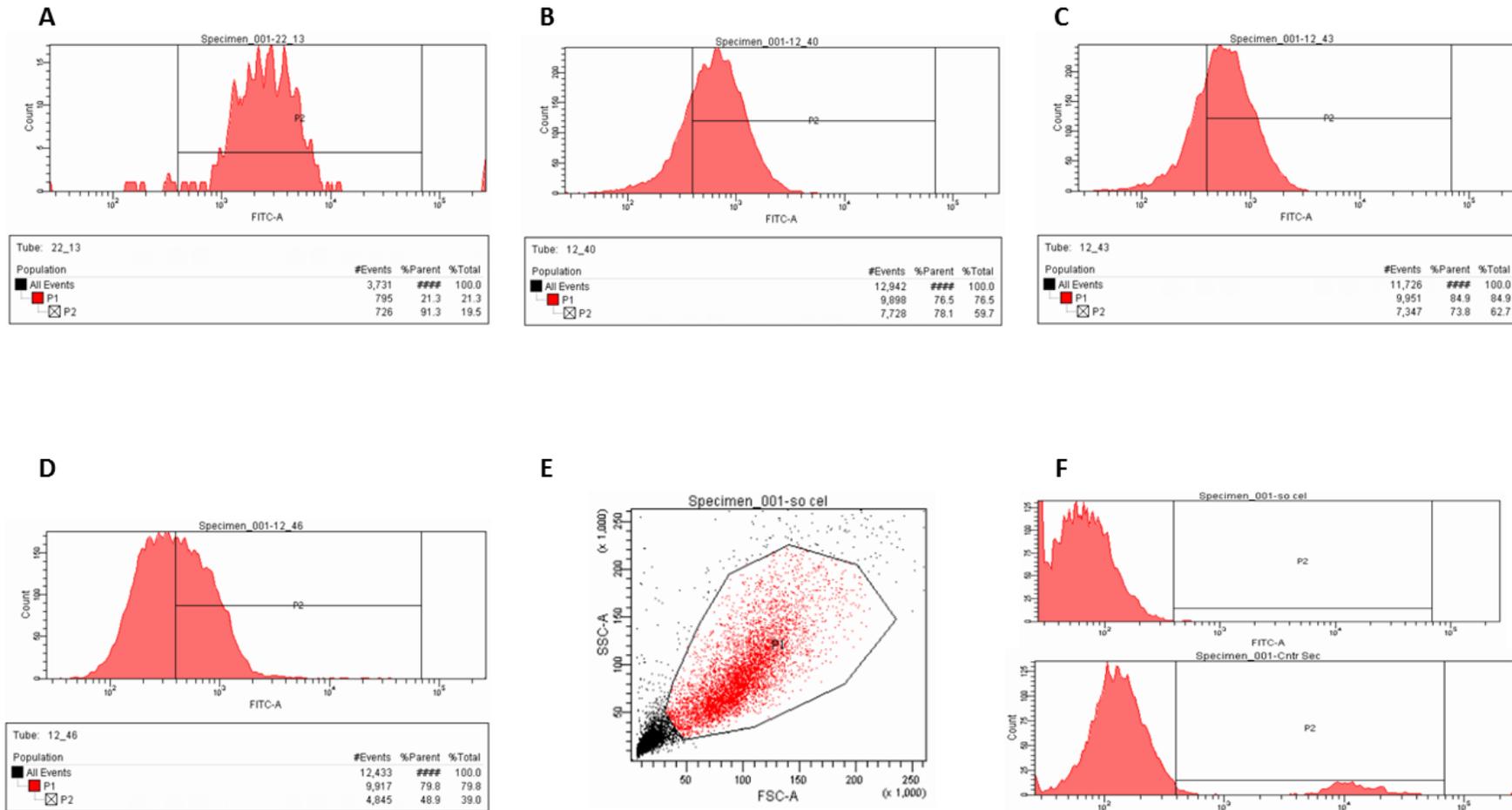
<b>PROTOCOLO</b>	<b>HIBRIDOMAS PLAQUEADOS</b>	<b>HIBRIDOMAS TESTADOS</b>	<b>HIBRIDOMAS RETIDOS</b>
<b>LNCAP</b>	288	73	1
<b>LNCAPS1</b>	864	106	7
<b>LNCAPS2</b>	480	134	0
<b>LNCAPSS1</b>	120	16	1
<b>LNCAPSS3</b>	225	128	3

**Legenda.** LNCAP1 (fusão celular protocolo convencional, animal 1); LNCAPS1 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 1); LNCAPS2 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 2); LNCAPSS1 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 2); LNCAPSS3 (fusão celular protocolo subtrativo, animal 3); Hibridomas plaqueados (número total de poços plaqueados com as células após a fusão); Hibridomas testados (número de poços plaqueados que apresentaram crescimento satisfatório de células com características morfológicas de hibridomas); Hibridomas retidos (número de linhagens positivas ao screening mais três repetições do teste : número final de hibridomas retidos).

Ao final do screening, foram obtidas, ao todo, 12 diferentes linhagens de hibridomas que secretam anticorpos monoclonais reativos às células utilizadas durante à imunização, sendo 8 hibridomas da primeira parte do projeto (**Figura 14**) e 4 hibridomas da segunda parte (**Figura 15**).



**Figura 14. Morfologia dos hibridomas produzidos (esquerda) e perfil dos anticorpos por eles secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP (direita):**  
**A)** LNCAPS 1-24, reconhecendo 97% das células-alvo. **B)** LNCAPS 1-33, reconhecendo 52% das células-alvo. **C)** LNCAPS 1-41, reconhecendo 60% das células-alvo. **D)** LNCAPS 1-43, reconhecendo 75% das células-alvo. **E)** LNCAPS 1-62, reconhecendo 65% das células-alvo. **F)** LNCAPS 1-73, reconhecendo 40% das células-alvo. **G)** LNCAPS 1-77, reconhecendo 35% das células-alvo. Todos estes hibridomas foram obtidos com protocolo de imunização subrativa (provenientes de duas fusões celulares). **H)** LNCAP 1-110, reconhecendo 50% das células-alvo. Este hibridoma foi obtido com protocolo de imunização convencional (obtido de outra fusão, não previsto no projeto, mas realizado para se ter controles de imunizações convencionais). **I)** Controle negativo. **J)** Controle positivo, CD81. Pode-se observar o perfil positivo quando o gráfico está deslocado e dentro da barra delimitada como M1. Perfis negativos, por sua vez, estão fora da barra M1. Aumento em todas as fotomicrografias de 100X. Barras de escala = 100µM.



**Figura 15. Perfil dos anticorpos secretados, em citometria de fluxo, contra células-alvo LNCaP: A)** LNCAPSS 3-13, reconhecendo 91,3% das células-alvo. **B)** LNCAPSS 1-40, reconhecendo 78,1% das células-alvo. **C)** LNCAPSS 1-43, reconhecendo 73,8% das células-alvo. **D)** LNCAPSS 1-46, reconhecendo 48,9% das células-alvo; **E)** Blot da população celular estudada; **F)** Controle de autofluorescência (acima) mostrando positividade de 0,2% e controle de anticorpo secundário (abaixo) mostrando positividade de 13,3%.

#### 4.6. Clonagem celular e screening dos clones obtidos

Os hibridomas LNCAPS1-24, LNCAPS1-33, LNCAPSS1-40 e LNCAPSS3-13 que obtiveram maiores positivities após serem testados pela terceira vez (98,6%, 80,5%, 77% e 91,4%, respectivamente) foram submetidos à clonagem pelo método de diluição limitante, sendo plaqueados à relação de 0,75 células por poço em um total de 4 placas de 96 poços para cada hibridoma construído (portanto, 16 placas de clonagem), contendo  $2 \times 10^5$  células de timo por poço, as quais foram plaqueadas previamente (protocolo *Feeder cells*).

As células recém-clonadas foram cultivadas com meio de cultura RPMI-1640 com todos os suplementos necessários para hibridomas e 20% de SFB. Foi analisado diariamente cada poço das placas obtidas na clonagem para identificação de proliferação celular resultante de apenas um único hibridoma. Quando identificado o crescimento de possível único hibridoma, agora denominado clone, passou pelo *screening* por citometria de fluxo.

Na clonagem do hibridoma LNCAPS1-24 obteve-se 127 poços com crescimento de um único clone e na clonagem do hibridoma LNCAPS1-33 foram obtidos 71 poços. O sobrenadante de cultura de todos esses clones foi testado contra a célula imunógena LNCaP por citometria de fluxo, como mostrado no **quadro 5** abaixo:

**Quadro 5:** Reatividade dos clones obtidos contra antígenos expressos pela LNCaP, por Citometria de Fluxo

Hibridoma	Clones Obtidos	>90%	50% > < 90%	<50%
LNCAPS1-24	127	43	64	20
LNCAPS1-33	71	11	50	10
LNCAPSS1-40	45	38	7	0
LNCAPSS3-13	96	2	52	42

Os clones que apresentaram positividade acima de 90% contra as células LNCaP foram expandidos e testados novamente contra o imunógeno e contra o tolerógeno RWPE-1, porém todos os clones apresentaram alta porcentagem de ligação com o tolerógeno, ficando

na média de 66,5% contra média de 37,4% para o imunógeno (**Tabela 1**). Com essa baixa especificidade nenhum anticorpo obtido pôde ser considerado de alta prioridade. Acreditamos que esse resultado se deu pela quantidade de ciclos de tolerizações utilizadas. A quantidade de antígenos imunodominantes presentes na membrana celular é alta e como já se sabe, quando há uma resposta imunológica contra um agente invasor não há a produção de anticorpos contra todos os antígenos desse agente invasor, ficando restrita apenas aos antígenos que são imunodominantes. Desta maneira, supomos que a repetição dos ciclos de tolerização faz um mapeamento nos antígenos expressos no tolerógeno e assim aumentando a chance de uma resposta imunológica específica contra os antígenos que diferenciam o imunógeno do tolerógeno.

**Tabela 1:** *Screenings* dos clones por Citometria de Fluxo

<b>SCREENING DOS CLONES</b>		
<b>CLONES</b>	<b>Screening contra o imunógeno (LNCaP)</b>	<b>Screening contra o tolerógeno (RWPE-1)</b>
<b>LNCAPS1-24A7</b>	97,5%	89,2%
<b>LNCAPS1-24A33</b>	96,6%	92,5%
<b>LNCAPS1-24A34</b>	94,9%	75,6%
<b>LNCAPS1-24A59</b>	95,5%	73,9%
<b>LNCAPS1-24A58</b>	92,6%	76,6%
<b>LNCAPS1-24A55</b>	68,4%	75,4%
<b>LNCAPS1-33A54</b>	62,3%	60,7%
<b>LNCAPS1-33A24</b>	65,8%	67,1%
<b>LNCAPS1-33A22</b>	81,0%	67,0%
<b>LNCAPS1-33A5</b>	82,3%	80,0%
<b>LNCAPS1-33A45</b>	90,1%	76,2%
<b>LNCAPS1-33A50</b>	88,6%	79,4%

LNCAPS1-33A39	56,2%	73,9%
LNCAPS1-33A7	74,9%	41,1%
LNCAPS1-33A36	67,5%	62,0%
LNCAPS1-33A37	58,4%	68,6%
LNCAPSS3-13A9	33,2%	54,0%
LNCAPSS3-13A29	16,3%	31,9%
LNCAPSS3-13A31	26,6%	30,1%
LNCAPSS3-13A35	19,7%	42,8%
LNCAPSS3-13A41	25,1%	48,6%
LNCAPSS3-13A47	34,6%	62,6%
LNCAPSS3-13A62	29,5%	66,7%
LNCAPSS3-13A63	27,2%	64,2%
LNCAPSS3-13A66	20,9%	67,9%
LNCAPSS3-13A68	31,1%	69,9%
LNCAPSS3-13A69	32,0%	69,2%
LNCAPSS3-13A71	29,5%	72,5%
LNCAPSS3-13A72	25,6%	65,2%
LNCAPSS3-13A75	20,2%	58,8%
LNCAPSS3-13A76	18,9%	56,2%
LNCAPSS3-13A77	27,8%	66,4%
LNCAPSS3-13A79	38,0%	66,2%
LNCAPSS3-13A80	34,2%	70,4%
LNCAPSS3-13A82	35,0%	67,6%
LNCAPSS3-13A84	30,3%	60,8%

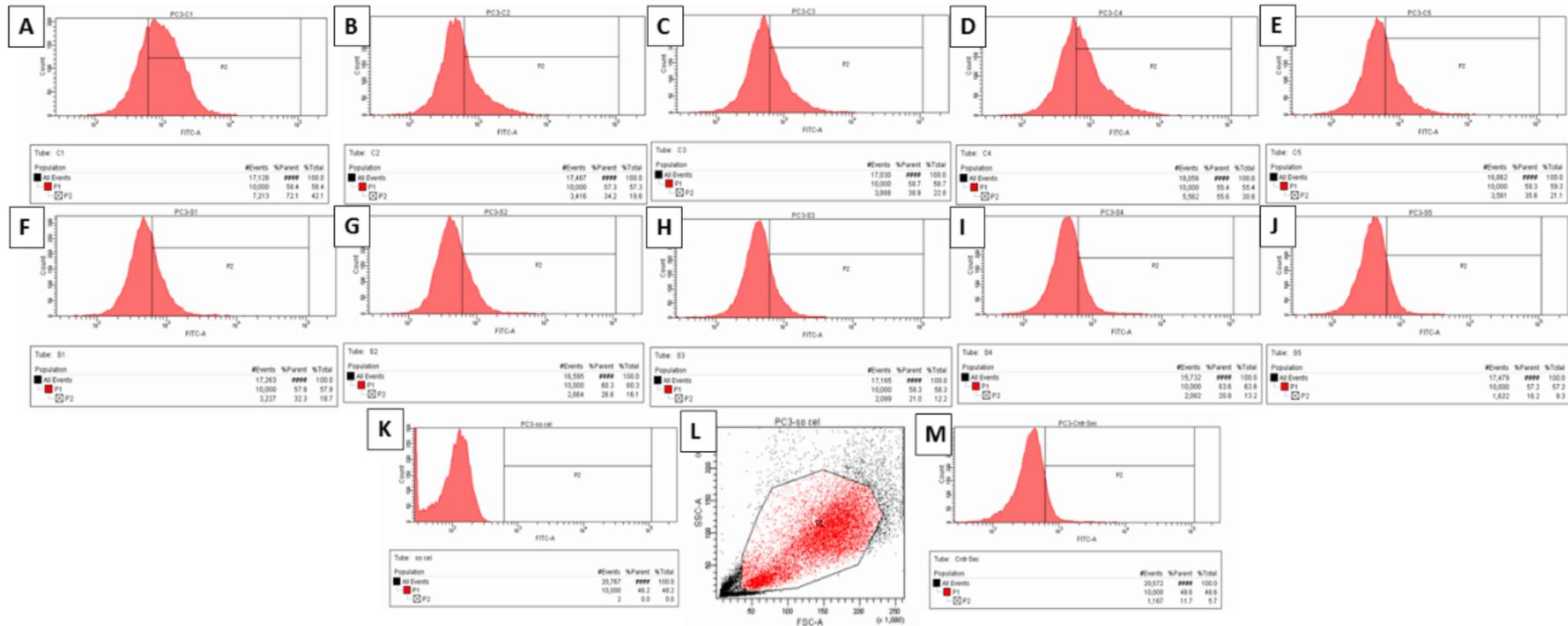
LNCAPSS3-13A86	70,5%	73,5%
LNCAPSS3-13A87	24,7%	76,3%
LNCAPSS3-13A88	39,4%	69,8%
LNCAPSS3-13A89	28,2%	62,0%
LNCAPSS3-13A90	35,7%	63,3%
LNCAPSS3-13A91	52,4%	86,2%
LNCAPSS3-13A92	48,0%	64,9%
LNCAPSS3-13A96	34,1%	66,3%
LNCAPSS1-40A1	29,9%	69,4%
LNCAPSS1-40A2	0,8%	7,5%
LNCAPSS1-40A3	3,6%	38,1%
LNCAPSS1-40A4	33,8%	76,3%
LNCAPSS1-40A5	31,8%	73,5%
LNCAPSS1-40A6	1,1%	29,9%
LNCAPSS1-40A7	21,2%	70,5%
LNCAPSS1-40A8	33,2%	70,9%
LNCAPSS1-40A9	30,3%	70,6%
LNCAPSS1-40A10	19,6%	71,8%
LNCAPSS1-40A11	33,6%	71,6%
LNCAPSS1-40A12	0,8%	21,2%
LNCAPSS1-40A13	30,8%	72,2%
LNCAPSS1-40A14	27,2%	78,6%
LNCAPSS1-40A15	40,0%	75,6%
LNCAPSS1-40A16	33,6%	77,1%

LNCAPSS1-40A17	34,6%	77,5%
LNCAPSS1-40A18	16,8%	70,8%
LNCAPSS1-40A19	30,5%	76,0%
LNCAPSS1-40A20	36,3%	85,8%
LNCAPSS1-40A21	0,9%	8,0%
LNCAPSS1-40A22	1,0%	44,0%
LNCAPSS1-40A23	15,2%	73,8%
LNCAPSS1-40A24	33,9%	81,6%
LNCAPSS1-40A25	46,3%	76,9%
LNCAPSS1-40A26	22,8%	84,0%
LNCAPSS1-40A27	38,8%	79,3%
LNCAPSS1-40A28	41,1%	76,4%
LNCAPSS1-40A29	44,3%	75,9%
LNCAPSS1-40A30	39,0%	73,7%
LNCAPSS1-40A31	25,5%	83,0%
LNCAPSS1-40A32	17,5%	74,7%
LNCAPSS1-40A33	24,6%	72,6%
LNCAPSS1-40A34	32,8%	73,4%
LNCAPSS1-40A35	39,6%	87,4%
LNCAPSS1-40A36	31,3%	80,0%
LNCAPSS1-40A37	38,0%	81,9%
LNCAPSS1-40A38	36,4%	83,9%
LNCAPSS1-40A39	32,4%	82,0%
LNCAPSS1-40A40	1,7%	20,4%

LNCAPSS1-40A41	1,2%	15,6%
LNCAPSS1-40A42	25,8%	78,4%
LNCAPSS1-40A43	35,3%	70,5%
LNCAPSS1-40A44	26,2%	72,3%
LNCAPSS1-40A45	22,9%	72,4%
<b>MÉDIA</b>	<b>37,4%</b>	<b>66,5%</b>

Resultados ainda preliminares em nosso laboratório referentes ao Auxílio Pesquisa (processo FAPESP: 2014/23738-8) e de bolsa de iniciação científica (processo FAPESP: 2016/07047-0) contribuem para essa nossa hipótese, no qual é usado como imunógeno uma linhagem de célula tumoral diferente da usada nesse projeto. Todavia, fez-se o uso de ciclos de tolerização repetidos três vezes. Quando testado o soro dos camundongos contra o tolerógeno após os ciclos de tolerização e comparados com o soro de camundongos que não receberam a tolerização por citometria de fluxo observou-se que, nos animais que receberam os ciclos de tolerização estava diminuído (média de 51,9%) enquanto que dos camundongos que não tiveram nenhum ciclo de tolerização manteve-se alto (média de 97,6%) (**Figura 16**).

**Figura 16: Citometria de fluxo de células da linhagem RWPE-1 (tolerógeno) expostas ao soro de camundongos (A a E) que não receberam nenhum ciclo de tolerização (F a J) e de camundongos que receberam ciclos repetidos de tolerização; (K) Controle de autofluorescência; (M) Controle de anticorpo secundário; (L) Blot da população celular pesquisada.**



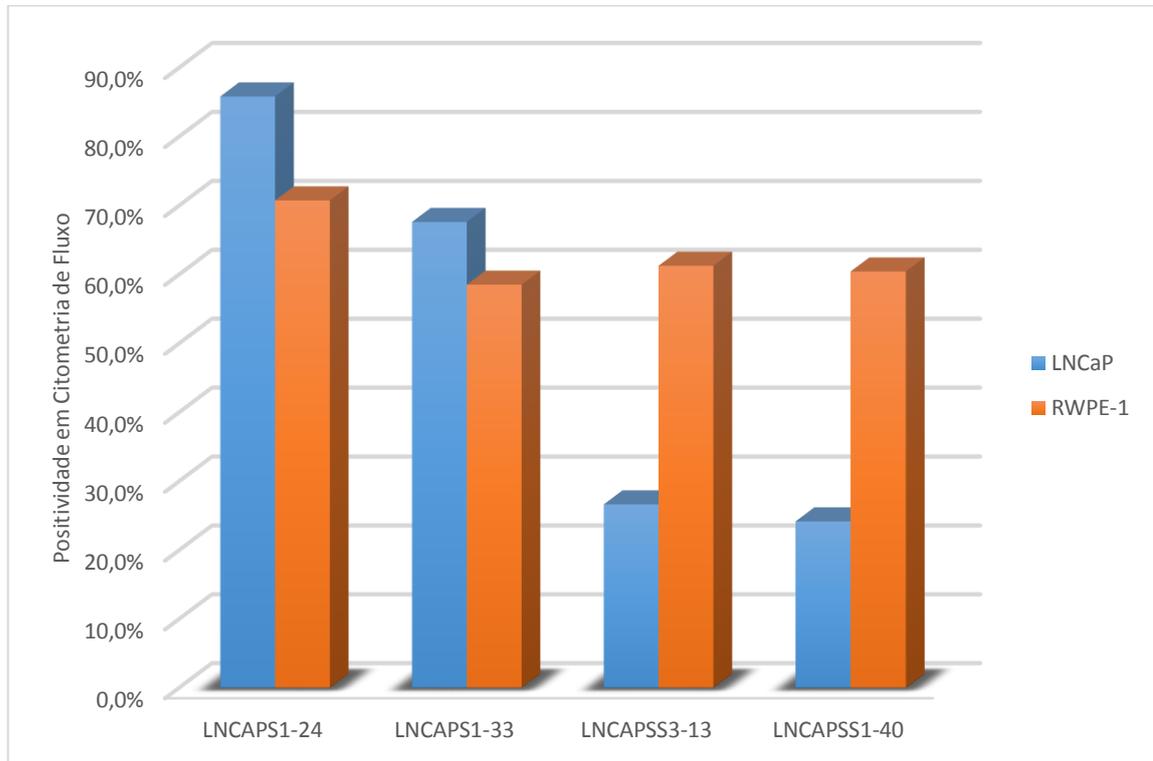
Nos resultados em análise, quando comparado à média obtida nos screenings dos clones de cada hibridoma, descontando o valor do controle do anticorpo secundário (**Quadro 6**), revelou que os hibridomas construídos nos protocolos que tiveram apenas um ciclo de tolerização apresentaram médias semelhantes quando testados com o imunógeno (85,8% para LNCAPS1-24 e 67,6% para LNCAPS1-33) e contra o tolerógeno (70,7% para LNCAPS1-24 e 58,5% para LNCAPS1-33) (**Figura 17**), já os construídos a partir do protocolo subtrativo apresentaram na média positividade contra o tolerógeno (61,3% para LNCAPSS3-13 e 60,4% para LNCAPSS1-40) consideravelmente maiores em relação aos testados contra o imunógeno (26,6% para LNCAPSS3-13 e 24,2% para LNCAPSS1-40) (**Figura 17**).

**Quadro 6:** Controles Autofluorescência e Anticorpo secundário dos *screenings* dos clones

Hibridomas	Controle de Autofluorescência		Controle do Anticorpo secundário	
	LNCaP	RWPE-1	LNCaP	RWPE-1
<b>LNCAPS1-24</b>	1%	1,9%	5,1%	9,8%
<b>LNCAPS1-33</b>	1%	1,9%	5,1%	9,8%
<b>LNCAPSS3-13</b>	0,1%	0,2%	5,1%	1,4%
<b>LNCAPSS1-40</b>	0,2%	0%	1,7%	6,4%

Com os referidos resultados destacam nossa hipótese de que é necessário um número maior de tolerizações para que, em cada ciclo repetido, se consiga inibir a resposta imunológica contra antígenos imunodominantes diferentes presentes na superfície da célula, uma vez que aumentando apenas um ciclo de tolerização foi possível inibir a resposta contra uma grande parte de antígenos compartilhados entre as células. Contudo, pode-se observar que a tolerização não resultou na diminuição esperada. Observou-se também, na **Figura 16** que os perfis de ligação dos anticorpos produzidos pelos clones que são contra antígenos imunodominantes nas células RWPE-1, haja vista que não estão expressas na mesma quantidade nas células LNCaP. Outra hipótese que levantamos é que a dose de ciclofosfamida, como descrita na literatura (WILLIAMS *et al.*, 1992; BROOKS *et al.*, 1993) utilizada para a tolerização uma vez que não apresentou nenhum efeito adverso durante a padronização e sabendo que em pacientes que fazem uso dessa droga há efeitos como queda de pelos e até mesmo sangramentos acreditamos que a dose utilizada para melhorar a

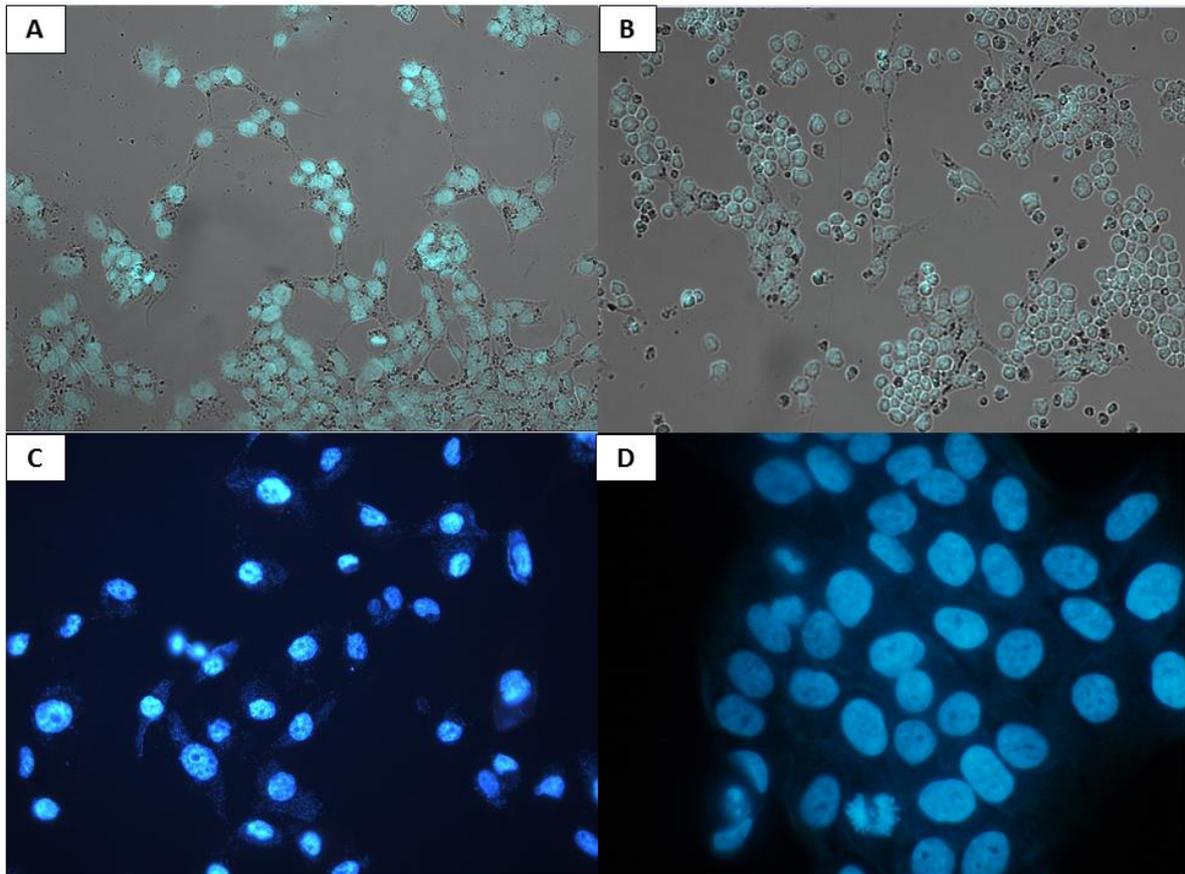
imunossupressão e assim uma melhor tolerização necessite ser maior do que a utilizada (200mg/Kg).



**Figura 17: Gráfico em coluna da média de positividade do screening dos clones** de cada hibridoma construído por citometria de fluxo.

#### 4.7. Controle de contaminação dos hibridomas

Após uma semana de cultivo dos hibridomas com as células LNCaP, foi realizada a leitura da marcação no *InCell Analyzer 2200* (GE Healthcare Life Sciences™) e como pode ser observado na **Figura 18**, não houve coloração no citoplasma das células LNCaP controle e das cultivadas juntamente com os hibridomas.



**Figura 18: Revelação do experimento para detecção de contaminação por micoplasma por coloração indireta com DAPI.** (A) Controle de *Reporter Cells*. Fonte: Arquivo Pessoal (B) Hibridomas com células LNCaP. Fonte: Arquivo Pessoal; (C e D) controles positivos. Fonte: Young *et al.* (2010)

## 5. CONCLUSÕES

- O uso da ciclofosfamida mostrou não haver efeitos adversos severos ou comprometedores nos camundongos que pudessem inviabilizar a técnica de imunização subtrativa, de modo que os óbitos que ocorreram dos animais provavelmente foram causados por outros motivos que não pudemos determinar;
- As análises por Citometria de fluxo do soro dos animais revelaram a eficiência na imunização dos animais, mas não foi encontrado, até o momento, anticorpos monoclonais específicos contra o imunógeno
- A clonagem feita pelo método de diluição limitante obteve efetividade em relação a aquisição de possíveis clones únicos.
- Não foi encontrado um clone que produzisse anticorpos específicos e altamente reativos com células utilizadas como imunógeno, sendo assim nesse trabalho não foi encontrado nenhum clone de alta prioridade.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. About Prostate Cancer. 2016. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about.html> >. Acesso em: March 10.
- BERMAN, D. et al. The development of immunomodulatory monoclonal antibodies as a new therapeutic modality for cancer: the Bristol-Myers Squibb experience. **Pharmacol Ther**, v. 148, p. 132-53, Apr 2015. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476108> >.
- BOUKERCHE, H. et al. A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. **Cancer Res**, v. 60, n. 20, p. 5848-56, Oct 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059782> >.
- BROOKS, P. C. et al. Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. **J Cell Biol**, v. 122, n. 6, p. 1351-9, Sep 1993. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376467> >.
- CENTER, M. M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **Eur Urol**, v. 61, n. 6, p. 1079-92, Jun 2012. ISSN 1873-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424666>>.
- COLVIN, M. Alkylation Agents. In: KUFÉ, D.; POLLOCK, R., *et al* (Ed.). **Holland-Frei Cancer Medicine 6**: Hamilton (ON): BC Decker, 2003.
- COSTA, A. R. et al. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 74, n. 2, p. 127-38, Feb 2010. ISSN 1873-3441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853660> >.
- DEFFUNE, E. **Obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre le troisième composant du complément**:intêret en imunohematologie. 1992. 146p. Thesis (Doutorado em Imunologia) -Universidade Pierre et Marie Curie, LISE / CNRS, França.
- DESANTIS, C. E. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 4, p. 252-71, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890451> >.
- EARLEY, E. M.; OSTERLING, M. C. Fusion of mouse-mouse cells to produce hybridomas secreting monoclonal antibody: **J Tissue Cult Methods**, v.9, n.3, p. 141-146, 1985. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01665919>>.
- FIZAZI, K. et al. Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer. **BJU Int**, v. 105, n. 6, p. 748-67, Mar 2010. ISSN 1464-410X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353536> >.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: a manual of basic techniques**. 5th. ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

FUNG, C.; DALE, W.; MOHILE, S. G. Prostate cancer in the elderly patient. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 24, p. 2523-30, Aug 2014. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071137>>.

GODING, J. W. **Monoclonal Antibodies: principles and practice**. 3rd. ed. London: Academic Press, 1996. 492p. ISBN 0-12-287023-9.

GOLUMBESKI, G. S.; DIMOND, R. L. The use of tolerization in the production of monoclonal antibodies against minor antigenic determinants. **Anal Biochem**, v. 154, n. 2, p. 373-81, May 1986. ISSN 0003-2697. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2425654>>.

HAMABASHIRI, M. et al. Novel monoclonal antibodies against pancreatic juice from pancreatic cancer patients and their possible application in differential diagnosis. **Int J Mol Med**, v. 28, n. 4, p. 599-603, Oct 2011. ISSN 1791-244X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21667013>>.

HOOPER, J. D. et al. Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen. **Oncogene**, v. 22, n. 12, p. 1783-94, Mar 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660814>>.

INCA. Estimativa 2016. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>>. Acesso em: 01/12/2016.

JACHIMOWICZ, R. D. et al. Induction of in vitro and in vivo NK cell cytotoxicity using high-avidity immunoligands targeting prostate-specific membrane antigen in prostate carcinoma. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 6, p. 1036-45, Jun 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525185>>.

JIN, M. et al. A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food E. coli O157:H7 contamination. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31352, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347466>>.

KLEE, G. G. Human anti-mouse antibodies. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 6, p. 921-3, Jun 2000. ISSN 0003-9985 (Print) 0003-9985 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835540>>.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-7, Aug 1975. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191>>.

KRUEGER, P. et al. Monoclonal antibody identifies a distinctive epitope expressed by human multiple myeloma cells. **J Immunother**, v. 24, n. 4, p. 334-44, 2001 Jul-Aug 2001. ISSN 1524-9557. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11565835>>.

LIETZKE, R.; UNSICKER, K. A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. **J Immunol Methods**, v. 76, n. 2, p. 223-8, Feb 1985. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3973391>>.

MCNEEL, D. G. Prostate cancer immunotherapy. **Curr Opin Urol**, v. 17, n. 3, p. 175-81, May 2007. ISSN 0963-0643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414515> >.

MOROZ, A. et al. Finasteride Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion through MMP2 and MMP9 Downregulation. **Plos One**, v. 8, n. 12, DEC 30, 2013 2013. ISSN 1932-6203.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. 2012. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet> >. Acesso em: 13/01/2017.

ONCOGUIA, I. Exame de Toque Retal para Diagnóstico do Câncer de Próstata. 2014. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/exame-de-toque-retal-para-diagnostico-do-cancer-de-prostata/5856/289/> >. Acesso em: March 14.

RACIOPPI, M. et al. Hot topics in urological health economics. A mini review. **Arch Ital Urol Androl**, v. 84, n. 2, p. 47-52, Jun 2012. ISSN 1124-3562. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22908771> >.

RASMUSSEN, N.; DITZEL, H. J. Scanning the cell surface proteome of cancer cells and identification of metastasis-associated proteins using a subtractive immunization strategy. **J Proteome Res**, v. 8, n. 11, p. 5048-59, Nov 2009. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764822> >.

ROSS, J. S. et al. Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 24, n. 4, p. 521-37, Dec 2005. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16408160> >.

SINGH, P. R. et al. Nimbolide inhibits androgen independent prostate cancer cells survival and proliferation by modulating multiple pro-survival signaling pathways. **Biomed Pharmacother**, Nov 2016. ISSN 1950-6007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889231> >.

TREFZER, U. et al. SM5-1: a new monoclonal antibody which is highly sensitive and specific for melanocytic lesions. **Arch Dermatol Res**, v. 292, n. 12, p. 583-9, Dec 2000. ISSN 0340-3696. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214818> >.

VICENTINI-OLIVEIRA, J. C. et al. Taenia saginata: production and characterization of monoclonal antibodies against Taenia saginata metacestode antigens. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 4, p. 621-5, Dec 2010. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542032> >.

VILLAVEDRA, M.; LEMKE, S.; TO, J.; BROADY, K.; WALLACH, M.; RAISON, R. L. Carbohydrate epitopes are immunodominant at the surface of infectious Neoparamoeba spp. **J Fish Dis.**, v. 30, n.4, p. 191-199, 2007. DOI:10.1111/j.1365-2761.2007.00800.x.

WANG, X. et al. In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1728-39, Sep 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750220> >.

WILLIAMS, C. V.; STECHMANN, C. L.; MCLOON, S. C. Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens. **Biotechniques**, v. 12, n. 6, p. 842-7, Jun 1992. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1642892> >.

WORLD CANCER RESEARCH. Fund International. Worldwide Data. 2016. Disponível em: < <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data> >. Acesso em: 01/12/2016.

YANG, L. J.; WANG, W. L. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 5, p. 808-14, Oct 2002. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12378620> >.

YASUMOTO, M. et al. The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v. 65, n. 4, p. 327-32, Apr 2012. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228907> >.

YOUNG, L. et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat Protoc**, v. 5, n. 5, p. 929-34, May 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20431538> >.

**ANEXO**

Anexo 1:

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 24/2015

Pesquisador: RODRIGO DE ALMEIDA

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Marisa Fusco Almeida

Projeto: Produção de anticorpos monoclonais murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas

**Despacho nº 17/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (campus Araraquara), em reunião do dia

16 de junho de 2015, verificou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Produção de anticorpos monoclonais murinos reconhecedores de células tumorais prostáticas humanas”, apresentado pelo pós-graduando RODRIGO DE ALMEIDA, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Marisa Fusco Almeida, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, necessita dos seguintes esclarecimentos/ adequações:

- 1) Adequar ou justificar, no item 2 do formulário de submissão, a qualificação dos executores quanto ao termo “participação posterior”;
- 2) Justificar, no item 7.2, o método de eutanásia a ser utilizado, ou considerar uma forma mais simples, pois apesar de ser um método aceito, o deslocamento cervical exige maior qualificação dos executores.

Solicita-se, ainda, que a resposta a este despacho seja enviada em forma de carta/ofício de forma ordenada, conforme os itens constantes deste despacho, com os esclarecimentos ou indicações das possíveis alterações efetuadas no novo protocolo preenchido. O projeto em questão terá prazo de até 30 dias para sua adequação, após o que o processo de análise será arquivado, conforme letra c do Art. 21 do Regimento desta CEUA.

Araraquara, 24 de junho de 2015.



Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> CARLOS CESAR CRESTANI

Coordenador da CEUA

*Capitulo 2*

**Short Communication****A renewing approach in obtaining highly specific antibodies:  
multiple tolerization subtractive immunization****mAbs ISSN: 1942-0862**

Rodrigo de Almeida<sup>a</sup>, Cecília Naomi Nakamura<sup>a</sup>, Marina de Lima Fontes<sup>a</sup>, Elenice Deffune<sup>b</sup>,  
Ana Marisa Fusco-Almeida<sup>a</sup>, Andrei Moroz<sup>a,b,c\*</sup>.

<sup>a</sup> Univ Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Proteomics Center, Monoclonal Antibody Lab., Araraquara, SP, Brazil.

<sup>b</sup> Univ Estadual Paulista – UNESP, School of Medicine, Blood Transfusion Center, Cell Engineering Lab., Botucatu, SP, Brazil.

<sup>c</sup> Univ Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Department of Bioprocess and Biotechnology, Araraquara, SP, Brazil.

**Running Title:** Multiple tolerization subtractive immunization for monoclonals.

**Disclosure Statement:** The author reports no conflict of interest.

**\*Corresponding author:** A. Moroz, Ph.D. Univ Estadual Paulista – UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Proteomics Center, Monoclonal Antibody Lab., Araraquara, SP, Brazil. Phone and FAX number: 0551433014635. E-mail: [moroz@fcfar.unesp.br](mailto:moroz@fcfar.unesp.br)

**Abstract**

Despite the growing and rapid advances in genomics and proteomics, monoclonal antibodies (mAbs) are still a valuable biotechnology-derived product, especially for many areas such as the evolution of basic research in stem cells and cancer, immunophenotyping different cell populations, diagnosis and prognosis of diseases, and immunotherapy. Here, we report a novel immunization technique that can renew the production of mAbs: the multiple tolerization subtractive immunization. To support our claims, we compiled direct evidences that this technique is efficient in obtaining mAbs specific to rare epitopes, at different protocols, such as mAbs against food contaminants and tumor cells. We also explain the mechanics behind this technique, comparing it with other subtractive immunization techniques.

**Key words:** subtractive immunization; monoclonal antibodies; murine; hybridoma; immunization; tolerization; cyclophosphamide.

Biofabricated cell/protein biosensors have been areas of intense research for some years now. Interestingly, this high-tech platform relies on the use of a very old tool, the monoclonal antibody (mAb) although it has been more than four decades since the Köhler and Milstein described the technology of hybridomas as permanent biofactories.<sup>1</sup> Their finding paved the way for the production of the mAbs, powerful research tools that have revolutionized biomedical science in several areas, including cancer research, stem cell biology, and now, biosensors. Despite the growing advances in technology (e.g., engineered human antibodies, diabodies, transgenic mice platforms, phage display), classical murine hybridoma technology can still deliver unique antibodies for research and development. Producing antibodies that may recognize novel biomarkers critical to understanding some pathological conditions is just one possible use of the technology.

An old strategy such as murine hybridoma mAb production, however, requires some upgrading and tweaking in order to fulfill the above mentioned promise. The question is how? Because we rely on this technology, our laboratory has been searching for alternatives to renew mAb production. After a considerable study, we have concluded that the best manner to update, tweak, and renew is to employ a subtractive immunization (SI) with some modifications, described below, when producing mAbs via hybridomas.

To understand why, we must first understand this technique. Described in the early 1990s, SI is a procedure where two sets of immunogenic substances are employed (tolerogen and immunogen) intercalated with cyclophosphamide, instead of one only (immunogen), as performed in common immunization schedules.<sup>2,3</sup> Tolerogen and immunogen must be similar, but differ only in some selected properties. One example, and perhaps the best one, is when one desires mAbs that react only against tumor-associated antigens, in which case cells from the same tissue origin are used in their non-tumoral and tumoral phenotypes as the tolerogen and immunogen respectively, with administration of cyclophosphamide occurring in between those.<sup>2,3</sup> Other techniques include neonatal tolerization and high-zone tolerance, (Table 1). A broader view of these techniques is provided by Holbrook et al.<sup>4</sup> Accumulated evidence has shown that this approach is able to actively modify the biologic behavior of the immune response within mice, directing it against rare antigens, such as those that directly influence tumoral cell metastasis or other relevant biological processes. In this sense, several reports have demonstrated the feasibility of this technique to provide mAbs specific for tumors in liver, pancreas, lung, and other tumors.<sup>5-8</sup>

Our group has also verified the efficacy of the SI technique during a mAb production protocol that has delivered some promising mAbs against human prostate tumor cells, which do not cross-react with their prostate non-tumoral counterparts. However, we also observed

that a considerable number of hybridoma cell lines were still producing antibodies that did react against the tolerogen cells. Therefore, we concluded that the SI technique, as classically described by Williams et al. and Brooks et al.,<sup>2,3</sup> has only limited efficacy in yielding highly specific antibodies, which prompted us to look further for more positive results.

While investigating why antibodies reacted with non-tumoral cells, (probably via immunodominant shared epitopes), we found a report by Jim et al.,<sup>9</sup> in which the authors employed SI and produced antibodies that were specific to a limited strain of enterohemorrhagic bacteria, the *E. coli* O157:H7, a common contaminant of food, which causes subsequent diarrhea. These mAbs had no cross-reactivity against other enterobacteria, such as the *E. coli* O157:H19.<sup>9</sup> However, what immediately caught our attention was the fact that these researchers, unlike others, performed additional tolerization steps sequentially before introducing the actual immunogen in the host's system.

We proceeded to modify our own subtractive immunization protocols, and observed, for the first time, that the results often are better when successive tolerization steps are performed, before immunizing with the antigens of interest. One example involved the mentioned human prostate tumor cells mAb production protocol. All animal manipulation respected the *Guidelines of Animal Experimentation* approved by the Commission of Ethics in Animal Manipulation (Protocol number CEUA/FCF/CAr n° 22/2015) at the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP. We used ten BALB/C mice in our experiments, divided in two different groups for immunization: Group 1 - Single tolerization (may also be defined as subtractive immunization), and Group 2 - Multiple tolerization (may also be defined as multiple tolerization subtractive immunization (MTSI)). Animals in Group 1 received one inoculation of RWPE-1 cells (human prostate, epithelial, non-tumoral,  $2 \times 10^6$ /animal), followed by cyclophosphamide (200 mg/kg, 10 min, 24 h and 48 h following RWPE-1 cells) and then received serial inoculations of PC3 cells (human prostate, epithelial, tumoral,  $2 \times 10^6$  cells/animal, three times in 14 day intervals).

Animals in Group 2 received our MTSI protocol, as follows: one inoculation of RWPE-1 cells (human prostate, epithelial, non-tumoral,  $2 \times 10^6$ /animal), followed by cyclophosphamide (200 mg/kg, 10 min, 24h and 48h following RWPE-1 cells). This whole tolerization step was repeated three other times, with 14 day intervals between the last cyclophosphamide exposure and the next RWPE-1 cell inoculation. Therefore, Group 2 received multiple tolerization/immunosuppression rounds. Finally, the animals received the same PC3 cell exposure as group one. At the end, animals were euthanized for hybridoma production. Also, blood was taken from each animal, and their sera individually tested against the non-tumoral RWPE-1 cells in flow cytometry. The population gate was defined and

positive counts were recorded with FACS Calibur<sup>TM</sup>. Positive controls and negative controls were also used.

After the MTSI (first described here) was employed, the serum of the immunized animals, in Group 2, contained considerably less polyclonal antibodies (mean of ~ 45% positive counts) that reacted against the tolerogen (RWPE-1 cells), as an initial observation, compared to the serum of the animals that underwent regular subtractive immunization (Group 1), with only one round of tolerization/immunosuppression (mean of ~ 98% positive counts) (Figure 1). This result was statistically significant ( $p < 0.05$ ). After cell fusions, we also observed that the frequency of hybridoma cell lines producing mAbs that reacted against the immunogen had increased, while the frequency of hybridoma cell lines producing mAbs that reacted against the tolerogen had decreased.

We believe that when each step of tolerization is performed, a percentage of the antigens anchored to the cell membrane is processed, resulting in the selection of clones that are specific to those antigens. We also believe this percentage to be small/limited, and therefore, when multiple steps of tolerization are repeated, increasing amounts of antigens are processed, resulting in a larger coverage of the antigens anchored to the cell membrane. Since we employ cyclophosphamide after the tolerogen is inoculated, all the proliferating lymphocytes should be eliminated. We think that these multiple steps of tolerization are beneficial to a more complete tolerization of the immunodominant epitopes. Finally, given that tolerogen and immunogen derives from the same tissue origin, and both are epithelial cells, a large percentage of these immunodominant epitopes should be shared, resulting in a specific immune response to the epitopes that are expressed only by the immunogen cells.

In addition to cancer research, another area that may benefit from highly specific mAbs produced with this novel technique is adult stem cell biology. Currently, the availability of engineered tissue for regenerative medicine is limited because it is difficult to correctly identify all of the different populations of stem cells available and their actual plasticity, given that these cells share numerous antigens. For example, it has been reported that there are more than 10 different phenotypes of mesenchymal-stem cell-like populations and others in the bone marrow alone.<sup>10</sup> The difficulties arise from the fact that, to date, mAbs that can easily and specifically identify these different cell lines are not available. We hypothesize that this is because the antibodies under use recognize immunodominant epitopes, shared with other stem-cell niches or other cell types, resulting in difficulty to definitively characterize the cells. We also believe that using some of these lines, in different combinations of tolerogens/immunogens using the MTSI, would be an efficient manner to obtain a panel of mAbs that can correctly and definitively identify them.

It must be noted that there are some possible negative aspects of this technique. For example, it was hypothesized that cyclophosphamide not only eliminate the clones of B cells in proliferation, which would generate antibodies reactive with normal cell antigens from the tolerogen (desired effect), but that this drug also eliminates helper T cells required for B-cell maturation and differentiation (undesired effect, when the immunogen is injected).<sup>11</sup> Therefore, this could lead to a scenario in which, when the animals receive the immunogen, only low affinity antibodies of the IgM isotype could be retrieved. To prevent this undesired effect, we must take into account that some time is required for the host to start to produce cells that will differentiate into helper T cells. Therefore, the inoculation of the immunogen should be at least 21 days after the last dose of cyclophosphamide is performed. It is also very important to constantly titer the polyclonal antibodies in mice sera against the tolerogen, and screen the mice for cytotoxic effects due to cyclophosphamide exposure.

Moreover, we also hypothesize that combining different approaches of subtractive immunization could be an interesting way to obtain novel mAbs. For example, neonatal tolerization with cyclophosphamide-induced tolerization would prevent the undesirable production of antibodies that recognize immunodominant epitopes from the tolerogen. Another strategy would be the production of polyclonal antibodies (against the tolerogen) in mice, prior to the subtractive immunization with cyclophosphamide. Then, during this immunization, other mice that are being immunized with the tolerogen could also receive, in that same time, the polyclonal antibodies produced earlier (masking immunization technique). In this scenario, the production of undesirable antibodies against the tolerogen would be blocked in two different axes, i.e., by the polyclonal antibodies and drug-induced lymphocyte death.

In conclusion, there may be sufficient capacity and potential to obtain novel mAbs using a classical and well-assimilated technique such as murine hybridomas, by making simple adjustments of our immunization scheme. MTSI does not require any other modifications other than those described above, and thus this technique can be readily used by others in studies involving murine mAb protocols.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Mr. Chris Gieseke at University of Texas at San Antonio, for providing excellent assistance in the English language revision of this article. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) is also greatly acknowledged for research fund grants (processes nº 2014/23738-8, 2015/21884-0, and 2016/07047-0).

## References

1. Köhler G, Milstein C 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature* 256 495-497.
2. Williams C V, Stechmann C L, McLoon S C 1992 Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens *Biotechniques* 12 842-847.
3. Brooks P C, Lin J M, French D L, Quigley J P 1993 Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis *J Cell Biol* 122 1351-1359.
4. Holbrook F L, Nicholson I C, Zola H 2002 Tolerization as a tool for generating novel monoclonal antibodies *Immunol & Cell Biol* 80 319-322.
5. Boukerche H, Baril P, Tabone E, Bérard F, Sanhadji K, Balme B, et al. 2000 A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype *Cancer Res* 60 5848-5856.
6. Hooper J D, Zijlstra A, Aimes R T, Liang H, Claassen G F, Tarin D, et al. 2003 Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen *Oncogene* 22 1783-1794.
7. Rasmussen N, Ditzel H J 2009 Scanning the cell surface proteome of cancer cells and identification of metastasis-associated proteins using a subtractive immunization strategy *J Proteome Res* 8 5048-5059.
8. Yasumoto M, Hamabashiri M, Akiba J, Ogasawara S, Naito Y, Taira T et al. 2012 The utility of a novel antibody in the pathological diagnosis of pancreatic acinar cell carcinoma *J Clin Pathol* 65 327-332.
9. Jin M, Lang J, Shen Z Q, Chen Z L, Qiu Z G, Wang X W, et al. 2012 A rapid subtractive immunization method to prepare discriminatory monoclonal antibodies for food *E. coli* O157:H7 contamination *PLOS ONE* 7 1-7.
10. Ratajczak M Z, Zuba-Surma E K, Machalinski B, Kucia M 2007 Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J Appl Genet* 48 307-319.
11. Bowdish K S, Xin H, Maruyama T, Dakappagari N 2007 Antibodies against cancer produced using masked cancer cells as immunogen Patent Application number EP20050771329 20050708.

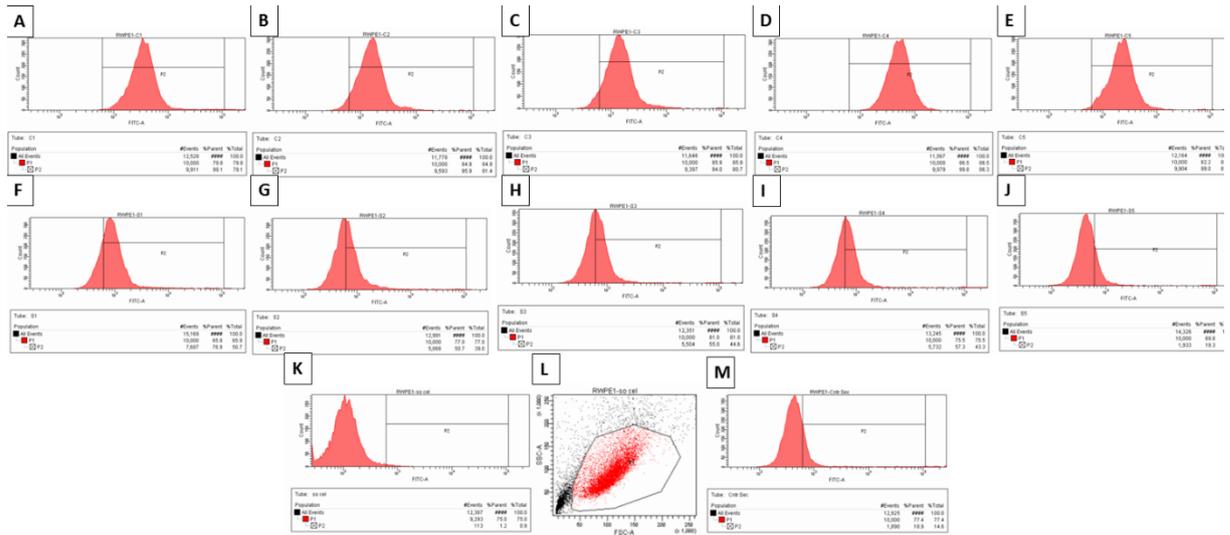


Figure 1: Polyclonal sera from mice that underwent just one cycle of tolerization (A to E) or four cycles of tolerization (also defined as multiple tolerization subtractive immunization, MTSI) (F to J), tested against the tolerogen cells (RWPE-1, human prostate, epithelial, non-tumoral) at flow cytometry. Five animals were used in each type of immunization; each chart corresponds to one animal. K) Fluorescence control, cells only; M) Secondary antibody control; L) Forward and side scatter, cell population studied. Positive counts correspond to the P2 area. It is possible to observe that, in the animals that received only one tolerization cycle, the serum of each one reacts strongly against the tolerogen cells (mean of approximately 98% positive counts). However, the animals that received the new proposed technique (MTSI) display considerably lower reactivity against the same cell line (mean of approximately 45% positive counts). This means that more B cell clones that underwent clonal proliferation, after exposure to tolerogen cells, were eliminated. Thus, antibodies that recognize shared epitopes should be less frequent.

**Tolerization Strategies for Production of Monoclonal Antibodies**

<b>Method</b>	<b>Vantages</b>	<b>Disadvantages</b>	<b>Characteristics</b>
Drug-induced	Controllable / reliable / overall satisfactory results reported	Expensive (due to cyclophosphamide use) / possibility of mice death / limited tolerization	Effect is achieved via elimination of B-cell clones in proliferation (previously induced by tolerogen exposure), during exposure to cyclophosphamide
Neonatal Exposure	Cheaper / possibility to combine with drug-induced tolerization / overall satisfactory results reported	Difficulty of newborn mice manipulation / possibility of mice death / even longer immunization protocol	Effect is achieved via premature exposure of antigens (tolerogen) when immune system is not yet fully functional (recognized as self-antigens)
High-zone tolerance	Faster immunization protocol / no drugs are used	Large quantities of antigen required / expensive / require intense antigen purification	Effect is achieved via failure of helper T-cell maturation during tolerance
Multiple Tolerization Subtractive Immunization (MTSI)	Controllable / reliable / increased tolerization of immunodominant epitopes / increased production of highly specific antibodies	Expensive (due to cyclophosphamide use) / possibility of mice death / longer immunization protocols / needs more antigen material	Similar to drug-induced, effect is achieved via elimination of B-cell clones in proliferation, but in a higher extent due to the multiple tolerization steps

**Table 1:** Different tolerization approaches that may be employed during the generation of monoclonal antibodies.