

Artigo / Article

Obtenção e caracterização de anticorpo monoclonal murino anti-fator VIII da coagulação sanguínea

Attainment and characterization of murine monoclonal anti-factor VIII antibodies

Rosana Rossi-Ferreira¹Elenice Deffune²Izolete Thomazini-Santos³Paulo E. A. Machado⁴

Entre os avanços da engenharia celular e biotecnologia nas últimas décadas, destaca-se a produção de anticorpos monoclonais murinos (AcMm) utilizados no aprimoramento diagnóstico nas rotinas laboratoriais. A produção de fator VIII de alta pureza sempre foi o desejo e a preocupação das indústrias de hemoderivados para tratamento de pacientes portadores de hemofilia A, porém este produto inexistente no Brasil, sendo necessária sua obtenção no mercado internacional a custos elevados. O trabalho tem por objetivo a produção de AcMm anti-fator VIII humano (FVIII_H) através da expansão dos clones e caracterização imunológica do anticorpo. Camundongos Balb/c foram imunizados com FVIII_H purificado como também proveniente de crioprecipitado e as células esplênicas dos animais foram fusionadas com células mielomatosas murinas segundo o método descrito por Kohler e Milstein para produção de híbridos em cultura. Foram testados 1.983 híbridos dos quais 105 foram submetidos à clonagem. Destes, 39 obtiveram monoclonalidade e 7 destes clones foram caracterizados através de técnicas de immunoblotting. Foram submetidas à purificação por cromatografia três imunoglobulinas de diferentes classes pertencentes aos clones LAMB1-10A1A4, LAMB1-17A1A1 e LAMB1-24A2A1. A imunoglobulina purificada pertencente ao clone LAMB1-10A1A4 foi adsorvida em coluna de imunoafinidade para purificação de concentrado de FVIII proveniente de crioprecipitado plasmático. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(2):97-104.

Palavras-chave: Fator VIII; hemofilia; hemoderivados; produtos biotecnológicos.

Introdução

A hemofilia é uma doença causada pela deficiência do Fator VIII, uma glicoproteína que participa na via intrínseca da coagulação sanguínea e tem como etiologia a herança genética, ligada ao cromossomo X, ocorrendo exclusivamente em homens. A severidade da doença está diretamente relacionada com a extensão da deficiência de FVIII, que é classificada em hemofilia severa, moderada e branda. O tratamento consiste na reposição do Fator VIII através de transfusões sanguíneas.

Em 1959, Pool & Robinson,¹ utilizando o método de Cohn² na produção de sedimento insolúvel (crioprecipitado) através de processos de congelamento e descongelamento lento, purificaram as proteínas plasmáticas com atividade anti-hemofílica. O crioprecipitado foi utilizado na terapia da hemofilia até a início da década de 80, quando surgiu o dramático problema da contaminação pelo vírus do HIV, detectado no sangue de hemofílicos que receberam crioprecipitado plasmático. A partir daí iniciaram-se inúmeras pesquisas com o objetivo de introduzir novos produtos na terapêutica da hemofilia.³⁻¹²

¹Doutora. Deptº Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências – Bauru - Unesp.

²Doutora. Deptº Urologia – Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina – Unesp.

³Doutora. Laboratório de Hemostasia – Hemocentro de Botucatu – Unesp.

⁴Doutor. Professor titular do Deptº de Clínica Médica Faculdade de Medicina – Botucatu – Unesp.

Correspondência: Rosana Rossi Ferreira

Hemocentro, FMB, Unesp

Distrito de Rubião Júnior, s/n

18618-970 – Botucatu-SP – Brasil

Fax: +55-14-3801-6041

E-mail: rossi@fc.unesp.br

As novas técnicas de engenharia celular e biotecnologia avançaram muito nas últimas décadas e entre elas a produção de anticorpos monoclonais utilizados tanto para o aprimoramento diagnóstico em rotinas laboratoriais como na produção de medicamentos e purificação de proteínas utilizadas na terapêutica.¹³⁻¹⁷ Os concentrados de FVIII purificados através de anticorpos monoclonais (denominados produtos ultrapuros) colocados no mercado no início dos anos 90 vieram solucionar complicações desastrosas no tratamento da hemofilia, pois se trata de terapêutica eficaz e segura apresentando alta especificidade, segurança viral e redução de efeitos colaterais. Porém estes produtos só podem ser adquiridos no mercado internacional a um custo bastante elevado, pois inexistente no Brasil a produção destes anticorpos voltados a esta finalidade. É objetivo deste trabalho a obtenção de anticorpos monoclonais murinos, purificação e posterior adsorção em coluna de imunoafinidade para obtenção de concentrado de fator VIII ultrapuro.

Materiais e Métodos

Animais e imunização

Utilizamos camundongos da linhagem isogênica BALB/c. As imunizações foram realizadas através da inoculação de fator VIII purificado (Koate® Cutter 250UI - 5ml) e fator VIII proveniente de bolsa de crioprecipitado, ambos por via intraperitoneal. Nos dois protocolos (I e II respectivamente) foi utilizado adjuvante de imunização KAl(SO₄)₂ (0,2g/ml).²⁵

Fusão celular

As fusões celulares foram realizadas segundo o método descrito por Kohler & Milstein¹⁸ utilizando como parceiro de fusão mieloma múltiplo murino (NS₁) e linfócitos B retirados do baço dos animais previamente imunizados. A seleção enzimática dos híbridos obtidos (hibridomas) foi realizada dentro do sistema hipoxantina-guanina-fosforiltransferase (HGPRT).

Screening dos híbridos obtidos

O método de escolha para o *screening* dos híbridos obtidos foi a quantificação de inibidores de FVIII com resultados expressos em Unidades Bethesda (U_β).¹⁹

Clonagem dos híbridos secretores

A partir da determinação da viabilidade celular através da coloração com azul de tripano a 0,3%, a clonagem foi realizada pelo método da diluição limitante.^{20,21}

Produção de líquido ascítico

Este procedimento foi realizado com o objetivo de se obterem concentrações dez vezes maiores que as obtidas com os sobrenadante da cultura.²²

Foi injetado 1 ml de óleo mineral puro por via intra-

peritoneal em camundongos com idade entre 2 a 3 meses. Após 10-14 dias, injetou-se 1ml de meio de cultura contendo 5 x 10⁵ a 5 x 10⁶ células pela mesma via. Os animais foram observados diariamente quanto ao crescimento do abdômen. Após uma a duas semanas, o líquido acumulado foi puncionado.

A classe e subclasse das imunoglobulinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos de especificidade conhecida como Rabbit Anti-IgM Mouse (ICN Biomedicals®) and Goat Anti-IgG Mouse (Serotec U.K.®)

Eletroforese em SDS-PAGE

Foram utilizadas as seguintes fontes de FVIII: 1-Koate®, 2-Octavi®, 3-Biotest SDH®, 4-Crioprecipitate. Os concentrados protéicos foram separados em gel de poli-acrilamida (PAGE) utilizando tampão contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e analisados através de programa de análise de imagem (VDS® Amersham Pharmacia Biotech) para determinação dos pesos moleculares.

Immunoblotting

Bandas de diferentes pesos moleculares definidas na proteína FVIII através de eletroforese SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45μ (Gibco BRL®)²³ e incubadas com o AcMm *overnight*. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário Rabbit anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (Nordic® Immunological).

Purificação em proteína A sefarose

O líquido ascítico foi incorporado à matriz de proteína A sefarose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech®) e eluído através da passagem de tampões com diferentes pHs.

Adsorção em coluna de imunoafinidade

Utilizamos como matriz de acoplamento sefarose CNBr (Amersham Pharmacia Biotech®) ativada que recebeu 15 mg/ml de imunoglobulina. O concentrado de fator VIII (crioprecipitado) desprovido de plasma e tratado com Tris-HCl 0,02M pH 6.7 acrescido de heparina 3UI/ml e Al(OH)₃ foi aplicado sobre o gel.^{22,24}

Resultados

Os protocolos de fusões celulares realizados segundo método descrito por Kohler & Mistein¹⁸ estão descritos na tabela 1. Os híbridos obtidos foram submetidos ao teste de *screening* no qual foi escolhido o método de quantificação de inibidores do fator VIII, e os valores obtidos foram expressos em Unidades Bethesda (U_β). O resultado do *screening* apontou para uma separação dos híbridos obtidos de acordo com a reatividade apresentada pelos mesmos. Esta reatividade indica a capacidade secretora dos hibridomas

Tabela 1
Eficiência das fusões celulares nos protocolos de imunização utilizando como antígeno fator VIII concentrado comercial

Fusão (Protocolos)	Nº de placas	Nº de híbridos distribuídos	Nº de híbridos obtidos	Nº de híbridos testados	Eficiência de fusão (%)
LAMB 1 2 animais	10	960	651	292	67,8
LAMB 2 4 animais	21	2016	1461	960	72,6

Tabela 2
Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-fator VIII medidas através do método de quantificação de inibidores de fator VIII expressos em Unidades Bethesda/ml (UBeth/mL)

Fusão (Protocolos)	Nº de híbridos positivos	Baixa reatividade 0,6 - 1,5 UBeth/ml	Reatividade mediana 1,5 - 4,0 UBeth/ml	Alta reatividade 4,0 - 8,0 UBeth/ml
LAMB 1 2 animais	25	11	13	01
LAMB 2 4 animais	71	11	19	41

Tabela 3
Resultado das clonagens realizadas a partir de híbridos selecionados.

Híbridos	Viabilidade	Nº de clones obtidos	Nº de clones positivos no screening	Clones selecionados
LAMB 1-10	<98%	13	08	LAMB1-10A1A2 LAMB1-10A1A4 LAMB1-10A1A6 LAMB1-10A1A7 LAMB1-10A1A8 LAMB1-10A1A9 LAMB1-10A1A10 LAMB1-10A4A1
LAMB 1-17	<95%	25	07	LAMB1-17A1A1 LAMB1-17A1A2 LAMB1-17A1A3 LAMB1-17A1A4 LAMB1-17A4A2 LAMB1-17A4A8 LAMB1-17A4A10
LAMB 1-24	<92%	14	05	LAMB1-24 A1A3 LAMB1-24 A2A1 LAMB1-24 A2A4 LAMB1-24A2A5 LAMB1-24A2A9
LAMB 2-8	<95%	29	08	LAMB2-8 A2 LAMB2-8 A3 LAMB2-8 A5 LAMB2-8 A12 LAMB2-8 A20 LAMB2-8 A24 LAMB2-8 A27 LAMB2-8 A29

selecionados. A tabela 2 mostra a separação de acordo com a reatividade compreendida em faixas de Unidades Bethesda e o número de hibridomas encontrados em cada faixa. Um segundo teste de *screening*, agora somente com os híbridos de alta reatividade, foi realizado uma semana após o primeiro para se confirmar a manutenção da especificidade. As células que tiveram sua especificidade confirmada foram expandidas em cultura para clonagem. Foram clonadas somente células com viabilidade celular superior a 90%.²¹ A tabela 3 mostra os híbridos submetidos à clonagem e os híbridos selecionados por manterem a especificidade em novo *screening* realizado.

Clones que apresentaram expansão satisfatória em cultura foram inoculados no peritônio dos animais para produção de líquido ascítico. Após a coleta, foi realizado o controle da monoclonalidade através de eletroforese em gel de agar. Todos os clones apresentaram pico monoclonal, embora com intensidades diferentes (Figura 1). Posteriormente foram submetidos à caracterização quanto à classe e subclasse da imunoglobulina através da citometria de fluxo. Os resultados estão ilustrados na tabela 4.

Para a caracterização imunoquímica foi realizado o *immunoblotting* com a transferência das frações visualizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) proveniente de três produtos comerciais e também do crioprecipitado plasmático (FVIII *in natura*) e posterior incubação com as imunoglobulinas secretadas pelos clones. Para realizar uma análise mais precisa dos pesos moleculares em relação às frações obtidas na eletroforese, utilizamos o programa VDS® de análise de imagem.

A figura 2 mostra a eletroforese dos produtos analisados e o *immunoblotting* do clone LAMB1-10A1A4. De acordo com a análise de imagem feita pelo programa VDS® (dados não mostrados) observa-se que o anticorpo secretado reconheceu a fração de 250 kDa identificada em todos os produtos de FVIII transferidos para a membrana de nitrocelulose. Também reconheceu frações de 160 kDa (Crio e Biotest®), 88 kDa (Biotest®) e ainda frações de 40 e 50 kDa em todos os produtos.

A figura 3 mostra as frações reconhecidas pela imunoglobulina secretada pelo clone LAMB1-17A1A1 cuja análise das imagens mostra o reconhecimento também da fração de 250 kDa e frações de 40 e 50 kDa. O clone LAMB1-24A2A1 também reconheceu as mesmas frações dos clones anteriores (Figura 4).

Tabela 4
Determinação da classe e subclasse dos clones obtidos nos protocolos LAMB1 e LAMB2 por citometria de fluxo

Clone	Classe e subclasse
LAMB1-10A1A4	IgG ₁
LAMB1-17A1A1	IgG _{2b}
LAMB1-24A2A1	IgG ₃
LAMB2-8A2	IgG ₃
LAMB2-8A5	IgG ₃
LAMB2-8A20	IgG ₃
LAMB2-8A29	IgG ₃

As figuras 5, 6, 7 e 8 mostram a corrida eletroforética dos três concentrados de Fator VIII comerciais juntamente com o *immunoblotting* dos clones do protocolo LAMB2.

O anticorpo monoclonal LAMB2-8A2 (Figura 5) reconheceu uma fração de 89 kDa (produto Biotest®), LAMB2-8A5 (Figura 6) reconheceu frações de 250kDa, (nos três produtos) e 60 kDa (Biotest® e Koate®).

O anticorpo monoclonal LAMB2-8A20 (Figura 7) reconheceu fração de 250 kDa e fração entre 70 e 80 kDa nos três produtos analisados.

O anticorpo LAMB2-8A29 (Figura 8) reconheceu frações de peso molecular entre 180 e 90 kDa somente do produto Biotest®.

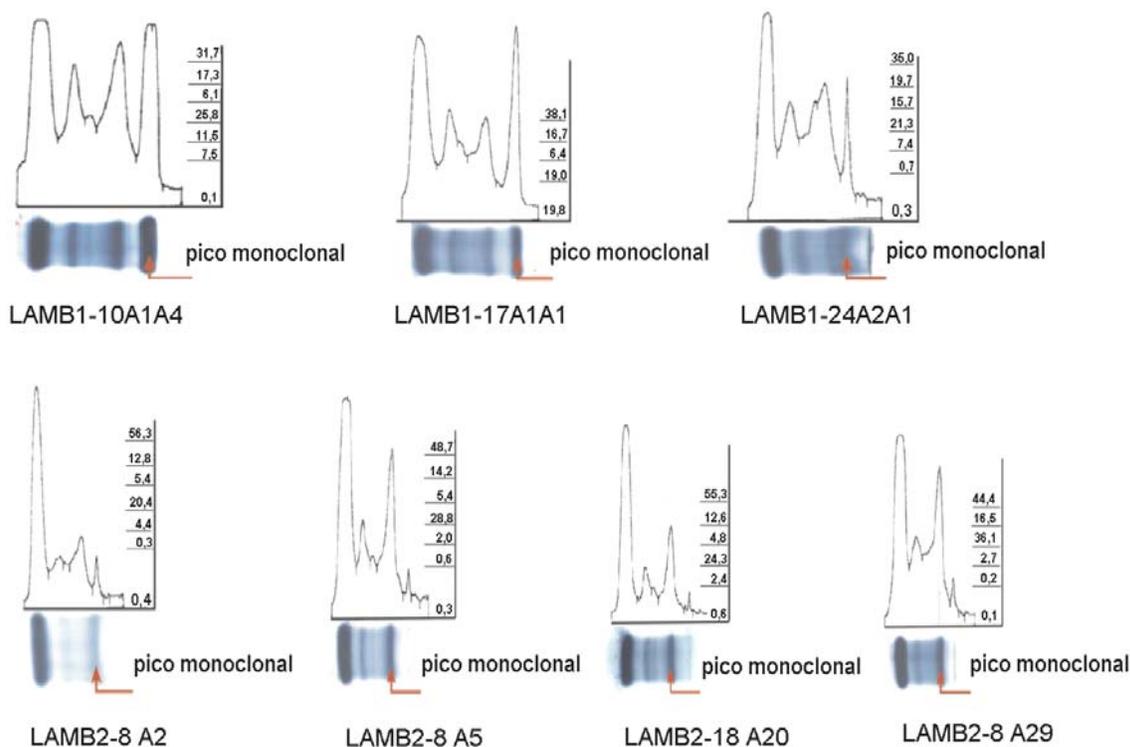


Figura 1. Eletroforese em gel de ágar 1% de líquido ascítico de camundongo BALB/c. Coloração negro de amido

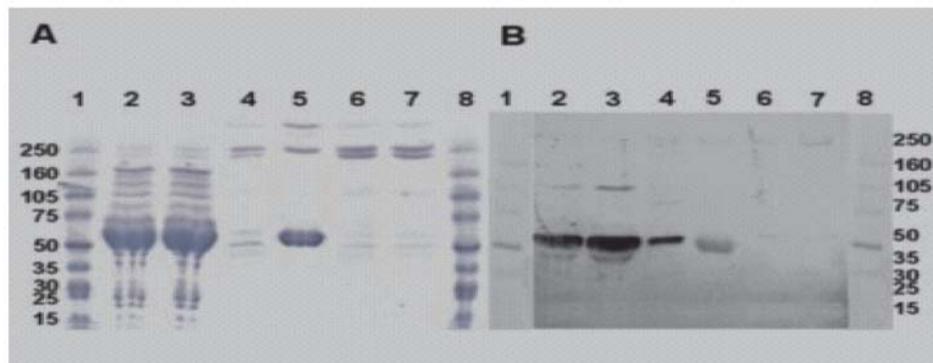


Figura 2. Eletroforese SDS-PAGE – gradiente 4%-15% (A) e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB1-10 A1A4 contra fator VIII (B).

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 – FVIII crioprecipitado; Pista 4 – FVIII Biotest®; Pista 5 – FVIII Koate®; Pistas 6 e 7 – FVIII Octavi®

B) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 e 3 – Crioprecipitado; Pista 4 - FVIII Biotest®; Pista 5 – FVIII Koate®; Pista 6 e 7 – fator VIII Octavi®

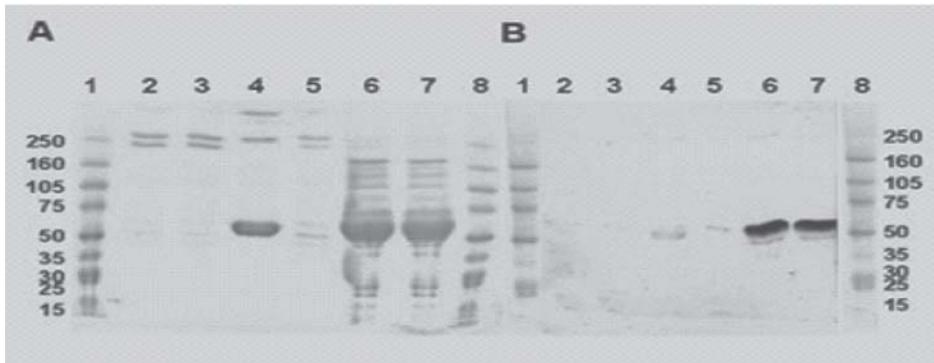


Figura 3. Eletroforese SDS-PAGE – gradiente 4%-15% (A) e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB1-17A1A1 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 – FVIII Octavi®; Pista 4 – FVIII Koate®; Pista 5 – FVIII Biotest®; Pistas 6 e 7 – FVIII crioprecipitado.

B) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 e 3 – Octavi®; Pista 4 – FVIII Biotest®; Pista 5 – FVIII Koate®; Pista 6 e 7 – fator VIII crioprecipitado

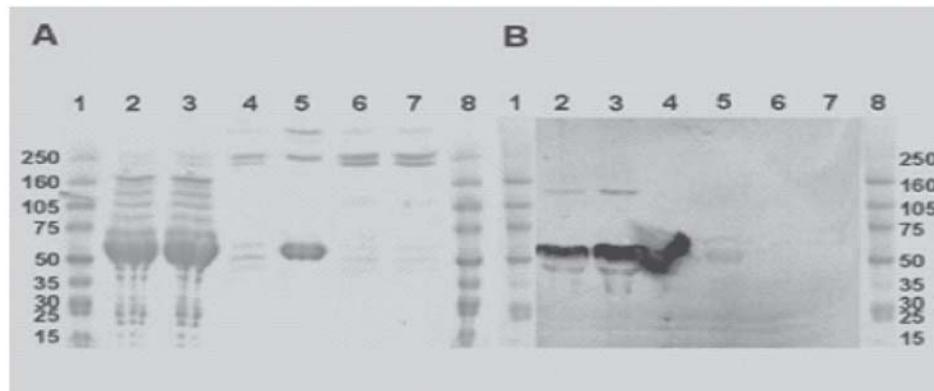


Figura 4. Eletroforese SDS-PAGE – gradiente 4%-15% e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB1-24 A2A1 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 – FVIII crioprecipitado; Pista 4 – FVIII Biotest®; Pista 5 – FVIII Koate®; Pistas 6 e 7 – fator VIII Octavi®

B) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 e 3 – Crioprecipitado; Pista 4 – FVIII Biotest®; Pista 5 – FVIII Koate®; Pista 6 e 7 – fator VIII Octavi®

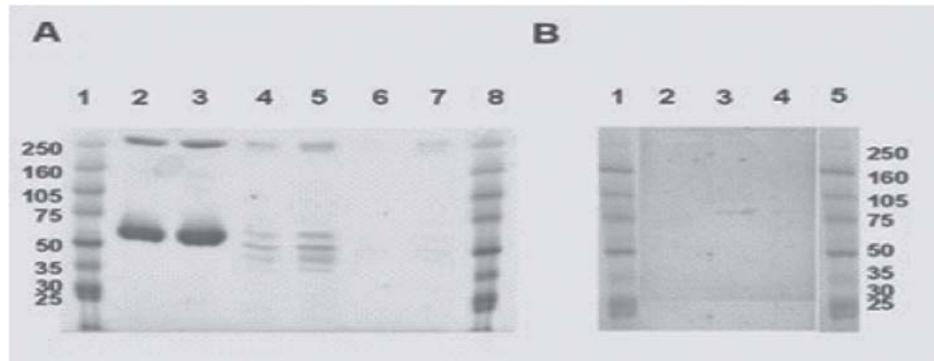


Figura 5. Eletroforese SDS-PAGE - gradiente 4%-15% e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB2-8A2 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 – FVIII Koate®; Pistas 4 e 5 – FVIII Biotest®; Pistas 6 e 7 – FVIII Octavi®

B) Pistas 1 e 5 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 – FVIII Koate®; Pista 3 – FVIII Biotest®, Pista 4 – FVIII Octavi®

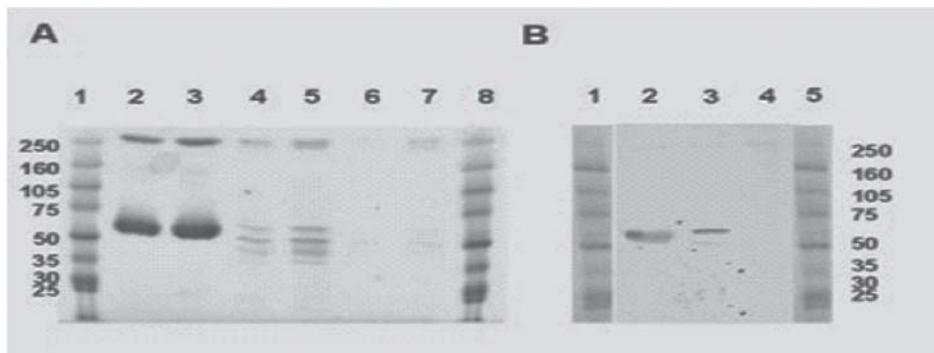


Figura 6. Eletroforese SDS-PAGE – gradiente 4%-15% e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB2-8A5 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 – FVIII Koate®; Pistas 4 e 5 – FVIII Biotest®; Pistas 6 e 7 – FVIII Octavi®

B) Pistas 1 e 5 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 – FVIII Koate®; Pista 3 – FVIII Biotest®; Pista 4 – fator VIII Octavi®

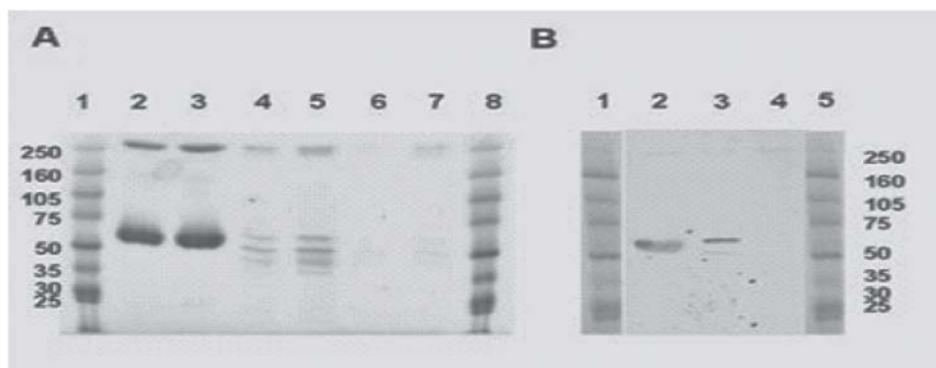


Figura 7. Eletroforese SDS – PAGE – gradiente 4%-15% e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB2-8A20 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 FVIII Koate®; Pistas 4 e 5 – FVIII Biotest®; Pistas 6 e 7 – FVIII Octavi®
 B) Pistas 1 e 5 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 – FVIII Koate®; Pista 3 – FVIII Biotest®; Pista 4 – fator VIII Octavi®

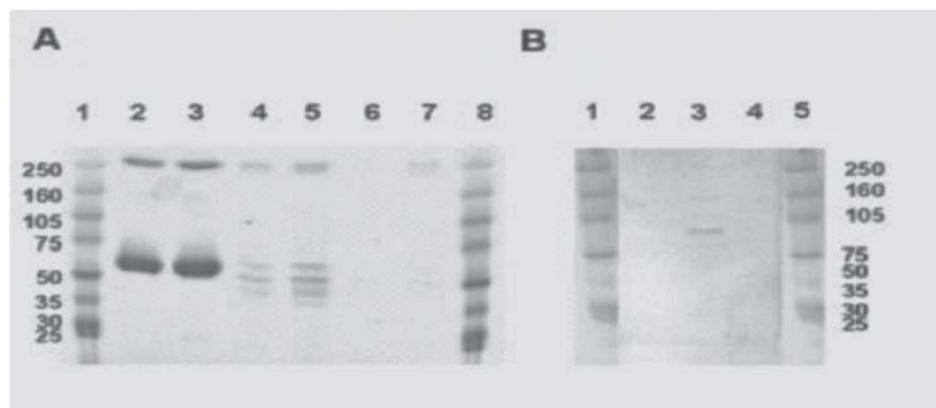


Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE – gradiente 4%-15% e *immunoblotting* do AcMm produzido pelo clone LAMB2-8A29 contra fator VIII

A) Pistas 1 e 8 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pistas 2 e 3 FVIII Koate®; Pistas 4 e 5 – FVIII Biotest®; Pistas 6 e 7 – FVIII Octavi®
 B) Pistas 1 e 5 – Marcador de peso molecular (Rainbow® Pharmacia); Pista 2 – FVIII Koate®; Pista 3 – FVIII Biotest®; Pista 4 – FVIII Octavi®

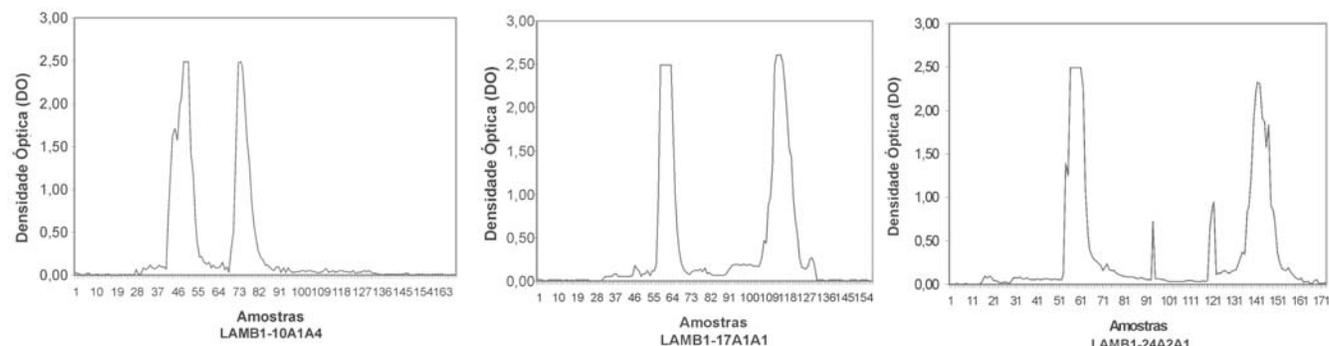


Figura 9. Purificação dos clones LAMB1-10A1A4, LAMB1-17A1A1 e LAMB1-24A2A1 em coluna de proteína A sefarose

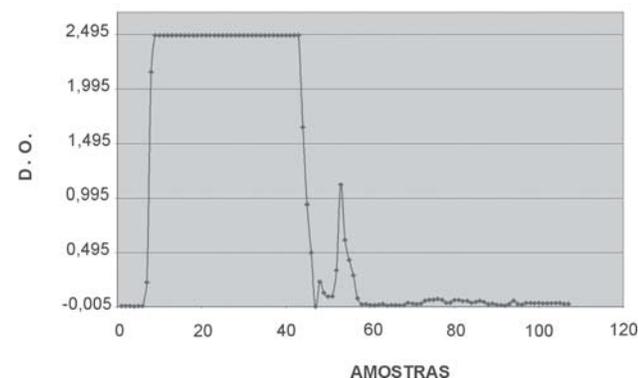


Figura 10. Purificação do fator VIII através do AcMm LAMB1-10A1A4 adsorvido na matriz de acoplamento do tipo Sephadex-CNBr-ativated

Após a caracterização imunológica, as imunoglobulinas secretadas pelos clones selecionados foram purificadas em coluna de proteína A sefarose. A figura 9 mostra o resultado gráfico das purificações.

O anticorpo monoclonal LAMB1-10A1A4 foi acoplado em matriz sefarose CNBr-ativada e o concentrado de fator VIII (crioprecipitado) desprovido de plasma foi aplicado sobre o gel.

A figura 10 mostra o gráfico das densidades óticas obtidas com a eluição das amostras coletadas. A primeira eluição refere-se às proteínas não fixadas no gel. Após o retorno da linha de base, foi feita a eluição com CaCl₂ 0,15M onde obtivemos um "pico" de densidade ótica que sugere ser a proteína fator VIII purificada.

Discussão

Frente aos resultados obtidos no *immunoblotting* verificamos que nos concentrados comerciais utilizados como fonte de fator VIII, os anticorpos monoclonais produzidos pelos três clones selecionados do protocolo LAMB1 são dirigidos tanto para a fração de maior peso molecular (antes da molécula de fator VIII sofrer clivagem proteolítica pela trombina) como a fração de menor peso molecular (resultante do processo proteolítico). Vale notar que os anticorpos monoclonais reconheceram somente epítomos pertencentes à molécula de fator VIII, pois a fração de 60 kDa presente nos três produtos, que provavelmente refere-se à albumina, não foi reconhecida pelos anticorpos monoclonais. Este fato é devido ao *screening* realizado, onde foram retidos somente clones secretores de anti-fator VIII, mas muito provavelmente o animal deve ter respondido com imunoglobulinas contra outras proteínas, entre elas a albumina, devido a sua grande quantidade nos produtos utilizados para imunização. A albumina é utilizada no processo de purificação desses concentrados para estabilizar a molécula de fator VIII, uma glicoproteína de 265 kDa extremamente sensível à clivagem.^{27,28,29} A produção de antialbumina já tem sido motivo de estudos em nosso laboratório. No concentrado proveniente do crioprecipitado, os anticorpos monoclonais também foram hábeis em reconhecer fração de tamanho intermediário de 160 kDa e 70 kDa. Isto pode significar que estas imunoglobulinas frente a concentrados plasmáticos ricos em FVIII reconhecem epítomos que representam porções mais ativas do fator anti-hemofílico como a fração de 70 kDa.²⁹ Isto contribui, sobremaneira, para a utilização dos clones em processos de purificação na obtenção de concentrados de fator VIII de alta pureza. Os anticorpos monoclonais oriundos do protocolo LAMB2 analisados mostraram o reconhecimento de epítomo que provavelmente representa a fração ativa do fator VIII (FVIII:C) com peso molecular em torno de 70 kDa. Esse reconhecimento foi mais freqüente sobre as frações obtidas com o produto da Biotest®. Isto pode significar que os concentrados purificados de fator VIII comerciais apresentam diferenças no processo de manufatura, o que pode promover modificações conformacionais na molécula do FVIII,²⁶ fato que explicaria o reconhecimento das frações ter recaído mais sobre o concentrado comercial Biotest®, lembrando que a fonte imunogênica foi o crioprecipitado, onde podemos dizer que a proteína fator VIII encontra-se em seu estado *in natura*, ou seja, isenta de qualquer processo de manufatura industrial como a purificação. Quando foram transferidas para membrana de nitrocelulose as frações obtidas na separação por eletroforese do crioprecipitado, observamos que todos os anticorpos monoclonais oriundos do protocolo que tiveram como estímulo imunogênico o próprio crioprecipitado fizeram o reconhecimento de maneira mais uniforme.

Abstract

Among the advances in cellular engineering and biotechnology over the last decades, the production of murine monoclonal antibodies (AcMm), used to improve laboratory diagnoses, stands out. The production of very pure factor VIII has always been a concern of suppliers of blood products to treat patients with hemophilia A and this product is still not produced in Brazil. Hence, it can only be attained on the international market at a high cost. The aim of this work was to produce AcMm anti-factor VIII human (FVIIIh) by expanding clones and characterizing the antibodies by immunochemistry. Balb/c mice were immunized with FVIII both purified and from cryoprecipitation and the splenic cells of the animals were fused with myelomatous murine cells according to the method described by Kohler and Milstein to produce hybrids in a culture. A total of 1983 hybrids were tested and 105 were selected for cloning. Of these, 39 developed monoclonality and 7 of these clones were characterized through immunoblotting techniques. Three immunoglobulins from different classes, LAMB1-10A1A4, LAMB1-17A1A1 and LAMB1-24A2A1, were submitted to chromatography for purification. The purified immunoglobulin from the LAMB1-10A1A4 clone was adsorbed in the immunoaffinity column to purify the factor VIII concentrate coming from the plasmatic cryoprecipitate. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006; 28(2):97-104.

Key words: Factor VIII; monoclonal antibodies; hemophilia; blood derivatives; biotechnology.

Agradecimentos

Somos gratos a Srta. Fátima Regina Guimarães pelo apoio técnico na realização das culturas celulares.

Referências Bibliográficas

1. Pool P, Robinson R. Observation on plasma banking and transfusion procedure for haemophilic patients using a quantitative assay for antihemophilic globulin (AHG). *British Journal Haematology* 1959;5: 24-30.
2. Cohn EJ, Strong LE, Hugues WL. Preparation and properties of serum and plasma protein. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal American Chemistry Society* 1946;68:459.
3. Rotblat F, O'Brien D, Goodall A, Tuddenham EGD. Purification of human factor VIII: C and its characterization by Western Blotting using monoclonal antibodies. *Biochemistry* 1985;24:4294.
4. Foster PR, McIntoch RV. The manufacture of factor VIII concentrate. *Transfusion* 1991;31(6):573.
5. Morfini M, Messori A, Longo G, Cinotti S, Matucci M, Rossi-Ferrini P. Half-life and in vivo recovery of heated factor VIII. *Lancet* 1986; II, p. 571-2.
6. Messori A, Longo G, Matucci M, Morfini M, Rossi-Ferrini P, Cianotti S, et al. Clinical pharmacokinetics of factor VIII in patients with classic hemophilia. *Clinical Pharmacokinetic* 1987;13:365-80.
7. Morfini M, Mannucci PM, Longo G, Cinotti S, Messori A. Comparative evaluation of the pharmacokinetics of three monoclonal factor VIII concentrate. *Thrombosis Haemostasis* 1991;61:85-90.
8. Morfini M. In vitro characteristics of highly purified factor VIII concentrate. *Annals of Hematology* 1991;63:123-25.

9. Kasper CK, Kim HC, Gomperts ED, Smith KJ, Salzman PM, Tipping D, et al. In vivo recovery and survival of monoclonal-antibody-purified factor VIII concentrates. *Thrombosis Research* 1991;66(6):730-3.
 10. Morfini M, Mannucci PM, Tenconi PM, Longo G, Mazzucconi MG, Rodeghiero F et al. Pharmacokinetics of monoclonal-purified and recombinant factor VIII in patients with severe von Willebrand disease. *Thrombosis Research* 1993; 70 (2): 270-2.
 11. Schuman S. Effects of factor VIII concentrates on the immune system in hemophilic patients. *Annals of Hematology* 1991;63:145-51.
 12. Gomperts ED. Antihemophilic factor isolated with monoclonal antibodies. *Annals of Hematology* 1991;63:142-144.
 13. Lusher JM. Viral safety and inhibitor development associated with monoclonal antibody-purified FVIII: C. *Annals of Hematology* 1991;63: 138-41.
 14. Smid WM, Van der Meer J, Halie MR. Efficacy and safety of a monoclonal purified factor VIII concentrate: 5-year follow-up in previously treated HIV-negative haemophiliacs. *Haemostasis* 1995;25: 229-236.
 15. Gordon E, Al-Batniji F, Golsmith J. Continuous infusion of monoclonal antibody-purified factor VIII: rational approach to serious hemorrhage in patients with allo-autoantibodies to factor VIII. *American Journal of Hematology* 1994;45:142-145.
 16. De Geus B, Hendriksen CFM. In vivo and production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. *Research Immunology* 1998;119:533-4.
 17. Chen C, Fang XD, Zhu I, Wu XF, Zhang ZC, Gu JX, et al. The gene expression of coagulation factor VIII in mammalian cell lines. *Thrombosis Research* 1999;95(2):105-115.
 18. Kohler G & Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(7):495-497.
 19. Kasper K, Alendort LM, Counts RB, Edson JR, Fratantoni J, Green D, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thrombosis Diathesis Haemorrhagie* 1975;34:869-871.
 20. Catty D & Raykundalia C. Immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining. In: Catty, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL Press, v.1, cap.6, p.137-167. 1988.
 21. Davis JN. *Basic cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 301p. 1994.
 22. Deffune E. *Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie*. Doctoral thesis, Université Pierre et Marie Curie-IV, Paris. 1992.
 23. Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 1979; 76: 4.350-4.354.
 24. Rossi-Ferreira R. *Obtenção de anticorpo monoclonal murino anti-fator VIII da coagulação sanguínea*. Doctoral thesis. Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, Brazil. 2001.
 25. Davis JN. *Basic cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 301p. 1994.
 26. Fulcher C, Roberts JR, Zimmerman T. Thrombin proteolysis of purified factor VIII procoagulant protein; correlation of activation with generation of a specific polypeptide. *Blood* 1983;61(4): 807-811.
 27. Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, Felch M, et al. Some factor VIII inhibition antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain Amino Acids 2248 through 2312 which overlap a phospholipid-binding site. *Blood* 1995;86(5):1.811-1.819.
 28. Pitman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of antihemophilic factor (factor VIII). *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 1988;85:2.429-2.433.
 29. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. *Journal of Biology and Chemistry* 1991;266(14):8.957-8.962.
- Avaliação: Editor e dois revisores externos.
Conflito de interesse: não declarado
- Recebido: 06/12/2005
Aceito após modificações: 17/02/2006
- Recursos financeiros: Pesquisa financiada por Finep.