



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular

Expressão de fragmentos de anticorpos que reconhecem o antígeno CD20 humano.

Tarcila Zuleica Zapparoli Lopes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Queiroz Maranhão

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

BRASÍLIA-DF

2015



Universidade de Brasília ⁱⁱ
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular

Expressão de fragmentos de anticorpos que reconhecem o antígeno CD20 humano.

Tarcila Zuleica Zaparolli Lopes

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andréa Queiroz Maranhão

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Patologia Molecular.

BRASÍLIA-DF

2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho- UFAM
Membro Titular

Prof^a Dr^a Kelly Grace Magalhães- UnB
Membro Titular

Prof^a Dr^a Andréa Queiroz Maranhão- UnB
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido- UnB
Co-orientador

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia
Molecular da Universidade de Brasília sob orientação da
Prof^a Dr^a Andréa Queiroz Maranhão.

*Eu dedico esse trabalho a todos que
acreditaram em mim!*

*"No início, faça o imprescindível, depois o possível, e de repente estará
fazendo o impossível!"*

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por esta oportunidade!

Sou imensamente grata a minha orientadora Prof^a Dr^a Andréa Queiroz Maranhão e ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido, pelos anos de orientação, companheirismo, apoio, paciência e confiança.

Aprendi muito com vocês! Muito obrigada!

Agradeço a minha mãe Elza Zaparolli Lopes e toda minha família pelo apoio, amor e carinho durante toda esta etapa!

Agradeço as minhas amigas e amigos de Brasília e Votuporanga/SP, pela amizade, pelos momentos divertidos e pelo imenso apoio!

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Imunologia Molecular, pelo apoio, companheirismo e pelos conhecimentos compartilhados!

Agradeço a todos os alunos, funcionários e professores do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio, companheirismo e gentileza!

Agradeço aos membros da banca pela atenção e pela oportunidade de compartilhar conhecimentos!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular/UnB pelo apoio e gentileza!

Agradeço ao BNDES e ao Laboratório Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, por apoiarem e patrocinarem o projeto: "ANTI-CD20 - DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA O ANTÍGENO LINFOCITÁRIO HUMANO CD20".

Sumário

Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
Introdução	
1.1 Imunoterapia.....	2
1.2.1 Os Anticorpos.....	2
1.2.2 Anticorpos Monoclonais.....	9
1.2.3 Engenharia e Humanização de anticorpos.....	10
1.3 Anticorpos de uso terapêutico.....	14
1.4 O antígeno CD20 e os anticorpos anti-CD20.....	18
1.5 Expressão heteróloga de anticorpos.....	26
1.6 Desenho gênico de versões humanizadas dos domínios variáveis leve e pesado do Rituximabe.....	29
Objetivos	
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
Materiais e Métodos	
3.1 Materiais.....	34
3.1.1 Linhagem de Bactéria.....	34
3.1.2 Linhagem de Célula de Mamífero.....	34
3.1.3 Meios de cultura e soluções para bactérias.....	34
3.1.4 Meios de cultura e soluções para células de mamíferos.....	36
3.1.5 Soluções para extração de DNA plasmídial.....	37
3.1.6 Enzimas.....	38
3.1.7 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose.....	39
3.1.8 Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das clonagens dos scFvs no vetor de expressão	39
pCOMIRES Δ 600.....	40
..	

3.1.10 Marcadores moleculares para proteína.....	42
3.1.11 Kits comerciais.....	42
3.2 Métodos.....	44
3.2.1 Extração de DNA plasmidial.....	44
3.2.2 Análise de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose.....	46
3.2.3 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	47
3.2.4 Eletroeluição de fragmentos de DNA em gel de agarose com o kit comercial Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit (Millipore).....	47
3.2.5 Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador.....	48
3.2.6 Ligação de fragmentos de DNA.....	48
3.2.7 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	49
3.2.8 Condições e preparo da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	51
3.2.9 Cultura de células de mamíferos.....	52
3.2.10 Descongelamento de células CHO- K1 e passagem de células.....	53
3.2.11 Tripsinização, passagem das células e formação de monocamada celular.....	53
3.2.12 Congelamento de células CHO-K1 – Criopreservação.....	54
3.2.13 Determinação da viabilidade celular por meio da contagem em câmara de Neubauer.....	54
3.2.14 Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer.....	55
3.2.15 Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection).....	55
3.2.16 Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina® (G418-Sulfato).....	56
3.2.17 Análises dos sobrenadantes de cultura em placas de microtitulação por meio de ELISA.....	57
3.2.18 Purificação de Proteínas com a coluna His Trap da Ge HealthCare e concentração das amostras eluídas com a coluna Centricon da Millipore.....	58
3.2.19 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante.....	59
3.2.20 Coloração do gel SDS- PAGE com o kit comercial Proteo Silver Stain da Sigma.....	60
3.2.21 Análise das proteínas recombinantes por Western Blot.....	60

Resultados e Discussão	
4.1 Clonagem dos scFv humanizados e murino no vetor de expressão pCOMIRES Δ 600.....	63
4.2 Obtenção da população mista de clones estáveis de células CHO-K1 produtores dos FvFcs recombinantes.....	70
4.3 Produção e purificação das proteínas recombinantes.....	74
Conclusão	
Conclusão e Perspectivas.....	81
Referências Bibliográficas	83

Índice de Figuras

Figura 1 Representação esquemática de uma IgG Humana.....	4
Figura 2 Diagrama esquemático do rearranjo dos segmentos gênicos que codificam para as cadeias leve e pesada.....	7
Figura 3 Resumo esquemático das estratégias abordadas para engenharia de anticorpos.....	12
Figura 4 Representação de uma molécula de imunoglobulina (IgG) em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante (FvFc e scFv).....	14
Figura 5 Demonstração esquemática da interação antígeno CD20 e os dois tipos de anticorpos anti- CD20: em A o tipo I e B o tipo II.....	20
Figura 6 O epítipo descontínuo ao qual o Rituximab se liga, localiza-se dentro do domínio extracelular do CD20 humano.....	21
Figura 7 Ontogenia da célula B, mostrando as linhagens de linfócitos que expressam o antígeno CD20.....	22
Figura 8 Mecanismos de ação propostos pelo Rituximab contra o antígeno CD20 humano.....	23
Figura 9 : Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600.....	27
Figura 10 Desenho esquemático da estratégia de clonagem com o vetor de expressão em células de mamíferos pCOMIRES Δ 600	65
Figura 11 Desenho esquemático do vetor: pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv A e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose.....	66
Figura 12 Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão murina scFv O e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose.....	67
Figura 13 Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv L e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose.....	68
Figura 14 Desenho esquemático dos primers utilizados para a confirmação das clonagens por PCR	69
Figura 15 Análise em gel de agarose 1,5% com o resultado da PCR das	

três construções.....	70
Figura 16 Gel SDS-PAGE mostrando as três construções, após os processos de purificação.....	76
Figura 17 Análise por Western Blot dos fragmentos FvFcs A, O e L, após os processos de purificação.....	77
Figura 18 Capacidade de ligação á molécula CD20 das três construções FvFcs em comparação com o anticorpo rituximabe.....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos monoclonais aprovados pela <i>FDA</i> até 2014	15
Tabela 2: Anticorpos anti- CD20 utilizados na clínica médica e aprovados pela <i>FDA</i>	25
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das clonagens dos scFvs no vetor de expressão	40
Tabela 4: Quantificação estimada do total em ng/mL referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão O.....	73
Tabela 5: Quantificação estimada do total em ng/mL referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão A.....	73
Tabela 6:Quantificação estimada do total em ng/mL referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão L.....	74

Lista de Abreviaturas

- ADCC do inglês ***Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity***- Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
- ADCP do inglês ***Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*** - Fagocitose celular dependente de anticorpo.
- Amp^R - Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
- C-Terminal - Extremidade carboxi – terminal
- CDC do inglês Complement- Mediated Cytotoxicity -Citotoxicidade dependente de complemento
- cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar
- CDR - Região determinante de complementariedade
- CH - Cadeia constante pesada de anticorpo
- CHO - Células de ovário de *hamster* chinês
- CL - Cadeia constante leve de anticorpo
- CMV – citomegalovírus
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- dH₂O - Água destilada
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dNTPs – mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados adenosina, citidina, guanosina e timidina.
- dsDNA – DNA de fita dupla
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- Fab - Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
- FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*
- Fc - Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
- FcR- Receptor de Fc
- FDA - *Food and Drug Administration* (EUA)
- FITC - Fluoresceína isotiocianato
- FR - Arcabouço (*Framework*)
- Fv - Fragmento (do anticorpo) varável
- g - Força gravitacional
- g - Grama
- HACA- do inglês, ***Human Anti-Chimeric Antibody***
- HAHA- do inglês ***Human Anti- Humanized Antibody***

HAMA- do inglês *Human Anti-Murine Antibodies*
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
kb - Kilobase
kDa - Kilodalton
L - Litro
M - Molar
mA - Miliampère
mAb - Anticorpo Monoclonal
mg - Miligrama
MM - Massa Molecular
mM - Milimolar
mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
ms - Milisegundo
°C - Grau Celcius
OD – densidade óptica
OKT3 - Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
ori - Origem de replicação
p - Peso
p/v – razão peso/volume
pb - Par de base
PBS - Tampão salina fosfato
PCD (do inglês *Programmed Cell Death*)- Morte Celular Programada
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)
PDB - *Protein Data Bank*
PE - Ficoeritrina
PEG – Polietileno glicol
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonato
ptnA - Proteína A de *Staphylococcus aureus*
RNA - Ácido ribonucléico
RNAase - Ribonuclease
rpm - Rotações por minuto
scFv - Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS - Sódio Duodecil Sulfato
SFB – soro fetal bovino
TE – tampão Tris/EDTA

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

U - Unidade

UTR - Região não traduzida do gene

V – volts

v/v – razão volume/volume

VH - Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo

VL - Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

τ – tempo de passagem da corrente elétrica

Ω – unidade de medida da resistência elétrica (ohm)

RESUMO

Em 1997, foi aprovado especificamente para o tratamento de pacientes com LNH de baixo grau (folicular) ou linfomas foliculares agressivos non-Hodgkin, o anticorpo recombinante anti-CD20: Rituximabe (MabThera®, Rituxan). Esse anticorpo, causa uma depleção seletiva e transitória de ambas subpopulações de células B CD20 positivas, normais ou malignas, dentro de etapas chaves da ontogenia das células B. Neste trabalho, objetivou-se a expressão, produção e purificação de fragmentos de anticorpos na forma FvFc específicos para o antígeno humano CD20, por meio de células de ovário de hamster chinês versão K1 (CHO-K1). Foram selecionadas duas versões scFvs humanizadas, contendo as CDRs do anticorpo monoclonal quimérico Rituximabe e uma versão scFv murina similar ao anticorpo original. Posteriormente, essas versões foram transferidas para o vetor de expressão em células de mamíferos pCOMIRES Δ 600. Esse vetor possui os genes que codificam os domínios CH2 e CH3 do fragmento cristalizável de imunoglobulina humana IgG, de forma que a proteína liberada pela célula de mamífero corresponda ao fragmento FvFc do anticorpo. Após a finalização das etapas de clonagens, as células CHO-K1 foram utilizadas como sistema de expressão e produção de anticorpos. Essas células foram mantidas na presença do antibiótico geneticina para a seleção da população mista de células CHO-K1 produtoras dos FvFcs recombinantes. Os sobrenadantes de cultura foram avaliados quanto à presença de FvFc por meio de imunodeteção ELISA. Posteriormente, foram submetidos a uma cromatografia de afinidade, utilizando a coluna HITRAP protein A HP. Após a purificação as frações coletadas da coluna, foram analisadas quanto ao grau de pureza destes fragmentos por meio do gel SDS-PAGE e Western-Blot. Com esses resultados foi possível realizar análises da capacidade de ligação das proteínas recombinantes por meio de citometria de fluxo. Os resultados também sugerem que é possível propor avaliações das proteínas recombinantes quanto à estabilidade conformacional, e em relação as funções efetoras realizadas pelo rituximabe.

ABSTRACT

In 1997 was approved specifically for treating patients with low-grade NHL (follicular) or aggressive follicular non-Hodgkin lymphomas, anti-CD20 recombinant antibody: Rituximab (MabThera, Rituxan). This antibody causes a selective and transient depletion of both subpopulations of CD20 positive, normal or malignant, within key steps of B cell ontogeny. This study aimed to expression, production and purification of antibody fragments in the form FvFc specific to human CD20 antigen, using Chinese hamster ovary cells version K1 (CHO-K1). Two versions of humanized scFvs were selected, containing the CDRs of the chimeric monoclonal antibody Rituximab and a scFv version similar to the original murine antibody. Subsequently, these versions were transferred to the expression vector into mammalian cells pCOMIRES Δ 600. This vector has the gene encoding the CH2 and CH3 domains of the crystallizable fragment of human immunoglobulin IgG, so that the protein released from the mammalian cell FvFc corresponds to the fragment of the antibody. After completion of cloning steps, the CHO-K1 cells were used as expression system and production of antibodies. These cells were maintained in the presence of the antibiotic geneticin for selecting the mixed population of CHO-K1 cells producing the recombinant FvFcs. The culture supernatants were evaluated for the presence of FvFc by immunodetection ELISA. Subsequently, they were subjected to affinity chromatography using a HiTrap Protein A HP column. After purification the fractions collected from the column were analyzed for purity of these fragments by means of SDS-PAGE and gel blot Western. With these results it was possible to perform analyzes of the binding capacity of the recombinant proteins by flow cytometry. The results also suggest that it is possible to propose reviews of recombinant proteins for the conformational stability, and for the effector functions performed by rituximab.

Introdução

1.1 Imunoterapia

O sistema imunológico exerce mecanismos fisiológicos determinados a manter a homeostasia, a defesa e a vigilância do organismo. Podendo atuar contra patógenos, identificar e tentar destruir qualquer substância exógena que possa ser considerada “estranha”, discriminar o próprio e o não próprio, promover a especificidade, e exercer diferentes propriedades relacionadas com a adaptação e memória (Litman *et al.*, 2010).

Embora a resposta imune seja um mecanismo defensor evoluído nos vertebrados, em nenhum indivíduo ela pode ser considerada totalmente perfeita em relação a todas as suas propriedades (Litman *et al.*, 2010). Atualmente, a imunoterapia é uma das alternativas para aperfeiçoar tais mecanismos, uma vez que, tem como finalidade promover ou inibir as respostas imunes (Bornstein *et al.*, 2010).

Inúmeros são os desafios da medicina contemporânea, dentre os quais destacam-se: prover um tratamento menos “invasivo” a pacientes com tumores, administrar fármacos de alta especificidade em pacientes com doenças auto-imunes ou rejeição a transplantes. Atualmente a imunoterapia é considerada um tratamento promissor para diversas patologias envolvendo disfunções do sistema imune, infecções e neoplasias (Bornstein *et al.*, 2010).

Os anticorpos recombinantes podem resolver problemas de difícil solução, como por exemplo, o ataque de células cancerígenas (Robak e Robak, 2011). Diferente do soro o anticorpo monoclonal, consiste em uma preparação homogênea monoespecífica capaz de reconhecer um único alvo (Maranhão e Brígido, 2001).

Um dos êxitos da imunoterapia no tratamento do câncer é a administração do anticorpo recombinante Rituximabe (MabThera, Rituxan) em pacientes com linfomas foliculares ou agressivos non-Hodgkin (Bornstein *et al.*, 2010).

1.2.1 Os Anticorpos

Um dos principais mecanismos fisiológicos do sistema imune humoral é a produção de glicoproteínas solúveis por células B. Essas proteínas são denominadas anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig), possuem uma massa

molecular em torno de 150 kDa, e podem estar presentes na superfície da membrana do linfócito B ou serem secretadas por linfócitos no estágio de diferenciação terminal (Davies e Metzger, 1983). São compostas por dois tipos de cadeias polipeptídicas: cadeia pesada (H do inglês *heavy*) e cadeia leve (L do inglês *light*) sendo que, cada imunoglobulina possui duas destas cadeias as quais formam tetrâmeros (Stanfield *et.al.*, 1990). Estes tetrâmeros perfazem três fragmentos com tamanhos aproximadamente iguais (Figura 1), sendo dois fragmentos ligadores de antígeno (Fab) e um terceiro fragmento que induz a atividade efetora do sistema imune, também conhecido como fragmento cristalizável (Fc) (Stanfield *et.al.*, 1990).

As cadeias H e L formam a unidade básica das moléculas de imunoglobulinas, possuem pontes dissulfeto (ligações bissulfídicas) e interações não covalentes, sendo que, a quantidade destas interações varia entre os diferentes tipos de anticorpo (Davies e Metzger, 1983). As cadeias pesada e leve e as duas cadeias pesadas são mantidas juntas por pontes dissulfeto intercadeia e por interações não covalentes (Stanfield *et.al.*, 1990). Há também, pontes dissulfeto dentro de cada uma das cadeias polipeptídicas, essas ligações bissulfídicas intercadeias criam os domínios de imunoglobulina, caracterizados pela estrutura de sete folhas-B-pregueadas conectadas por voltas (*loops*) do anticorpo (Stanfield *et.al.*, 1990).

Estas ligações bissulfídicas, estão presentes em intervalos regulares de aproximadamente 100-110 aminoácidos formando um domínio globular compacto em cada alça nas cadeias polipeptídicas covalentes. Logo, cada cadeia L apresenta dois domínios, enquanto que cada cadeia H consiste em quatro ou cinco domínios separados por uma curta região flexível. Além da união entre as diferentes cadeias por meio das pontes dissulfeto, os domínios juntam-se em pares por meio de interações hidrofóbicas não covalentes (Stanfield *et.al.*, 1990).

As cadeias leves e pesadas podem ser divididas em duas regiões com base na variabilidade da sequência de resíduos de aminoácidos: regiões amino-terminais variáveis e regiões carboxi-terminais constantes. As regiões constantes estão presentes na cadeia leve e na cadeia pesada de forma desigual (Figura 1), a cadeia leve tem um domínio carboxi-terminal constante CL1, enquanto que a cadeia pesada possui três ou quatro: CH1, CH2, CH3 e CH4. Os domínios CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada formam a região cristalizável (Fc) que recruta e interage com

componentes efetores do sistema imune. Já o primeiro domínio constante das cadeias H e L executa interações biológicas, porque estão presentes no fragmento Fab da imunoglobulina juntamente com a região variável (Brodsky, 2009).

Os domínios amino-terminais variáveis das cadeias H e L, fragmento variável (Fv), representam a parte da molécula do anticorpo que se liga ao determinante antigênico, o epítipo (Brodsky, 2009). Nas extremidades do domínio N-terminal destas cadeias existem ilhas hipervariáveis (Figura 1), também conhecidas como regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (Bassing *et.al.*, 2002). Estas regiões hipervariáveis, consistem em uma sequência de aproximadamente 110 aminoácidos com elevadas taxas de variabilidade, as quais conferem especificidade a um anticorpo e são denominadas como: CDR1, CDR2 e CDR3 (Gelert, 2002). Juntas, as CDRs formam o paratopo, sítios de ligação ao antígeno, que correspondem a uma superfície complementar ao epítipo. Dentre as três regiões hipervariáveis, a CDR3 é a região determinante de complementariedade com maior variabilidade de resíduos de aminoácidos (Jung, 2004).

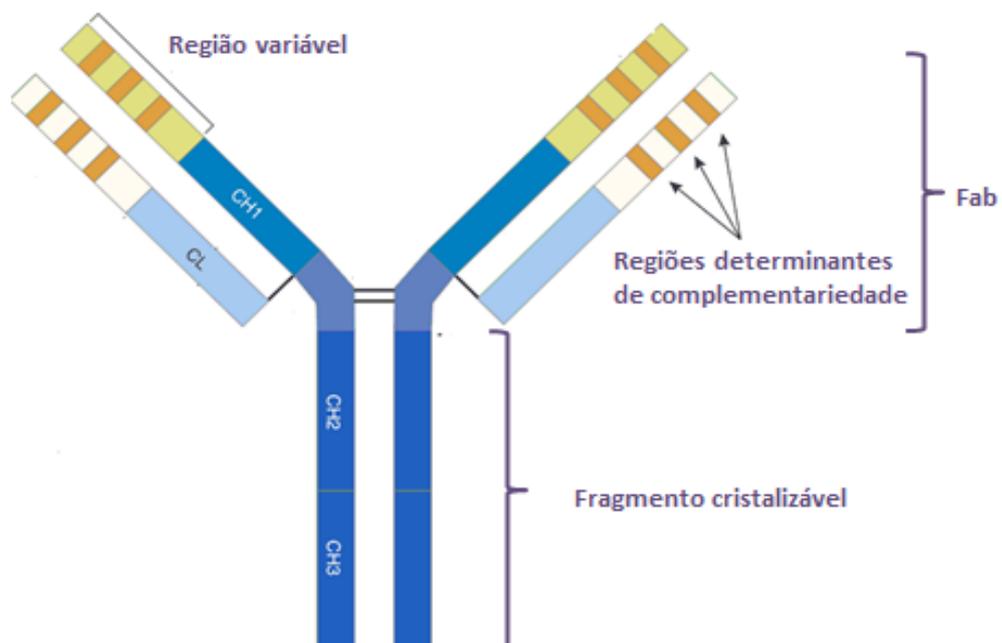


Figura 1. Representação esquemática de uma IgG humana. Em azul escuro, as regiões constantes da cadeia pesada. Em azul claro, as regiões constantes da cadeia leve. Em verde, região variável da cadeia pesada (VH). Em branco, região variável da cadeia leve (VL). Linhas laranjas, CDRs – regiões determinantes de complementariedade. Adaptada de (Brodsky, 2009).

As atividades biológicas executadas pelas imunoglobulinas dependem das suas estruturas que definem os isótipos (classes). As cadeias L são classificadas em κ ou λ , de acordo com as regiões constantes carboxi-terminais que as compõem. Já as cadeias pesadas diferem umas das outras em relação ao conteúdo de carboidrato, tamanho, e classe (isótipos). A classificação da cadeia H tem como base as regiões constantes, as quais conferem diferentes funções biológicas a cada isótipo: μ , ϵ , α , γ , δ (Brodsky, 2009).

No organismo humano os plasmócitos, linfócitos que se diferenciaram, secretam anticorpos dos seguintes isótipos: IgM, IgE, IgA, IgG e IgD. A IgA é o principal anticorpo presente em secreções externas, e impede a ligação do patógeno com a superfície do epitélio. A IgD está presente na superfície das células B e, assim como a IgE, é encontrado no soro em baixos títulos (Brodsky, 2009). A imunoglobulina IgE é encontrada na superfície de mastócitos e basófilos e exerce importantes atividades nas infecções helmínticas recrutando eosinófilos, e também promovendo a liberação de mediadores inflamatórios (Honjo *et.al.*, 2002).

A imunoglobulina IgG é relevante nas respostas imunes secundárias muito comum e abundante sendo, inclusive, predominante entre os anticorpos de uso terapêutico. Este anticorpo é dividido em quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Brodsky, 2009).

Em mamíferos, os progenitores linfóides iniciais e as células tronco hematopoiéticas contêm na sua configuração herdada genes organizados em seguimentos que codificam as cadeias leve e pesada das imunoglobulinas (Schatz e Ji, 2011). Nesta configuração (Figura 2), os *loci* destas cadeias têm em comum, múltiplos genes de regiões variáveis (V), um ou alguns genes de regiões constantes (C) e, entre os genes V e C segmentos gênicos de junção (J) compostos por várias porções pequenas de nucleotídeos (Papavasiliou *et.al.*, 2002). Os genes que codificam a região variável da cadeia pesada de imunoglobulina, além de possuírem os seguimentos V e J, também utilizam o seguimento de diversidade (D) enquanto que a região variável da cadeia leve conta com os seguimentos V e J (Schatz e Ji, 2011).

Existe a possibilidade de serem formadas cerca de 10^3 cadeias leves e 10^4 cadeias pesadas diferentes. Visto que cada uma é formada independente da outra, cerca de 10^7 tipos de imunoglobulinas podem ser criadas a partir da união das

cadeias leve e pesada na célula (Bassing *et.al.*, 2002). Para tanto (Figura 2), dois eventos genéticos estão envolvidos na síntese das cadeias de imunoglobulina: a organização e o rearranjo dos genes das cadeias leve e pesada e, a regulação da expressão dos genes de imunoglobulinas (Papavasiliou *et.al.*, 2002). A organização e o rearranjo dos segmentos gênicos V e J (cadeia leve) ou VDJ (cadeia pesada) é também conhecida como recombinação somática. Este processo é mediado pela ação de recombinases e, pelas proteínas gênicas ativadoras de recombinase que reconhecem as sequências de DNA as quais flanqueiam todos os segmentos gênicos V, D e J (Schatz e Ji, 2011).

Sendo assim, uma molécula de imunoglobulina é formada a partir de dois genes criados durante a fase antígeno-independente do desenvolvimento do linfócito B. Embora existam duas cópias cromossômicas da cadeia H em cada célula, somente uma poderá ser expressa de forma funcional. Dessa forma, a regulação da expressão dos genes de imunoglobulina é relevante para que cada célula B produza um anticorpo de uma única especificidade antigênica (Schatz e Ji, 2011).

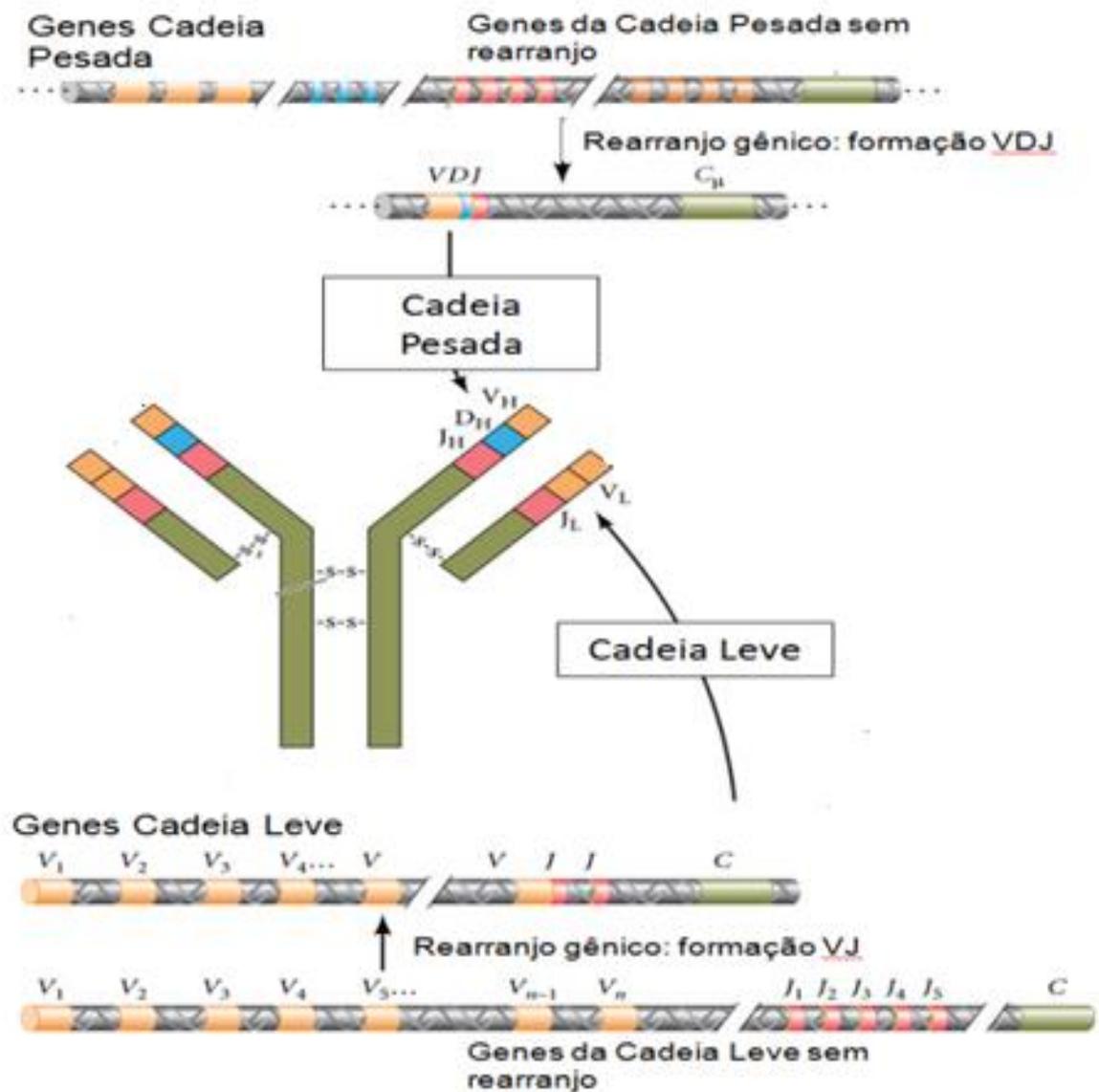


Figura 2. Diagrama esquemático do rearranjo dos segmentos gênicos que codificam para as cadeias leve e pesada. Adaptada de (Gilbert, 2006).

Os eventos genéticos da síntese das cadeias de imunoglobulina e a geração da diversidade das imunoglobulinas contribuem para a formação do imenso repertório de linfócitos B capazes de lidar com um universo de epítopos diferentes (Bassing *et.al.*, 2002). Outro mecanismo responsável pela síntese de um grande número de imunoglobulinas diferentes de forma que cada uma atue de forma específica para um determinado epítipo é, a troca de isótipo das imunoglobulinas. A troca de isótipo, ou troca de classe, consiste na sobreposição de rearranjos de DNA que

justapõe os genes VDJ rearranjados a um gene diferente na região C da cadeia pesada. Este evento ocorre em células B maduras e não altera a especificidade antigênica (Schatz e Ji, 2011).

Nas imunoglobulinas, a região de ligação ao antígeno forma uma superfície plana capaz de acomodar muitas formas diferentes, sendo assim as imunoglobulinas são capazes de se ligar a uma ampla variedade de antígenos, incluindo macromoléculas e moléculas químicas (Jung *et.al.*, 2004). A força com a qual um anticorpo se liga à superfície de um epítopo é denominada: interação de afinidade (De Franco *et.al.*, 2000). A repetida estimulação antigênica aumenta a afinidade de um anticorpo, sendo denominada maturação de afinidade (De Franco *et.al.*, 2000).

A maturação de afinidade, é outro evento genético possível no linfócito B, deve-se aos pontos de mutação nas regiões V ocorrendo quando as células B ativadas migram para os folículos linfóides formando centros germinativos (De Franco *et.al.*, 2000). Ou seja, é possível que durante a vida do linfócito B ele produza uma variedade de imunoglobulinas devida a mutações que podem ocorrer nos genes V das cadeias pesadas e/ou leves, sendo que, a sequência de aminoácidos desses anticorpos gerados por causa de um segundo estímulo é similar a sequência codificada devido ao primeiro estímulo (Niironen *et.al.*, 2002). Esta mudança de resíduos de aminoácidos aumenta a variedade dos anticorpos e ocorre por um tempo limitado, sendo denominada: hipermutação somática (Niironen *et.al.*, 2002).

Porém, apesar da afinidade ao mesmo antígeno, a maioria das imunoglobulinas presentes no soro não são idênticas entre si, e são derivadas de diferentes linhagens de células B. Logo, esta produção de anticorpos é definida como policlonal e nem sempre reprodutível na clínica médica, porque esses anticorpos não se direcionam ao mesmo epítopo (Brodsky, 2009).

Com base nestes conhecimentos, na década de 1970 os pesquisadores Milstein e Kohler desenvolveram um dos mais importantes avanços tecnológicos em imunologia: a geração de anticorpos monoclonais. Este foi um grande salto quanto ao poder de resolução e discriminação de anticorpos, porque diferente dos anticorpos policlonais os monoclonais são idênticos e capazes de reconhecer o mesmo epítopo (Kohler e Milstein, 1975).

1.2.2- Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAc) consistem em populações homogêneas de anticorpos, produzidos por uma única célula B imortalizada selecionada a partir da hibridização de uma célula B do baço de um animal imunizado por um determinado antígeno com células de mielomas (tumores de plasmócitos) (Maranhão e Brígido, 2002).

Milstein e Kohler selecionaram uma população de células de mieloma, incapazes de produzir imunoglobulinas e a enzima HGPRT, e fusionaram com as células do baço de um camundongo recém imunizado. A mutação na linhagem celular do mieloma que impedia essas células de produzirem a enzima HGPRT (hipoxantina- guanina- fosforribosil transferase), não permitia que essas células sobrevivessem em cultura quando eram adicionadas drogas que inibem a síntese de purinas e timidilato, síntese de DNA, como a aminopterina presente no meio HAT (hipoxantina, amnopterina e timidina). No caso, a fusão ou hibridização, entre as células tumorais e os linfócitos B do baço de um camundongo imunizado, gerava hibridomas e, também permitia a sobrevivência das células fusionadas em meio HAT, uma vez que as células B do animal imunizado expressavam a enzima HGPRT normalmente. (Kohler e Milstein, 1975).

O êxito desta hibridização experimental deve-se ao fato dos linfócitos B, provenientes do baço do camundongo, serem HGPRT+ e produtores de imunoglobulinas. A partir de uma população de hibridomas, uma célula híbrida pode ser selecionada e clonada originando uma população de células que secretam anticorpos idênticos com a mesma especificidade para um determinado epítipo (Kohler e Milstein, 1975).

Atualmente, os anticorpos monoclonais são protagonistas nos testes diagnósticos específicos e na imunoterapia. No entanto, para que esses anticorpos monoclonais chegassem à clínica médica diversas abordagens em engenharia genética foram utilizadas fazendo com que essas imunoglobulinas provenientes de camundongo tivessem resultados clínicos consistentes. Porque, apesar do alto poder de resolução e discriminação dos anticorpos monoclonais, o fato de, na maioria dos casos, serem gerados por camundongos, torna limitante a sua administração contínua em humanos. Esta limitação se dá pelo fato do sistema

imunológico reconhecer essas imunoglobulinas de caráter murino como estranhas e, produzir a resposta HAMA (do inglês *Human Anti-Murine Antibodies*) (Maranhão e Brígido, 2002).

A resposta HAMA, também conhecida como doença do soro, consiste em uma reação de hipersensibilidade (tipo III), na qual os pacientes produzem anticorpos contra proteínas e complexos imunes compostos pelos anticorpos injetados. Os imunocomplexos ficam depositados nos vasos sanguíneos, rins e articulações, levando a superprodução de citocinas (“chuva de citocinas”), inflamação, glomerulonefrite e artrite. Outro efeito deletério da resposta HAMA é a rápida remoção do anticorpo monoclonal que é neutralizado por anticorpos de classe IgM e IgG produzidos pelo paciente, devido a grande quantidade de resíduos murinos (Holliger e Hudson, 2005).

A humanização de anticorpos foi a responsável por tornar o quadro favorável para a utilização dos anticorpos monoclonais na clínica. O objetivo de humanizar anticorpos, é fazer com que o anticorpo exerça suas funções na forma de uma estrutura discreta, não induzindo respostas imunes significativas, sendo assim, ele passaria pelas demais células como uma estrutura protéica comum (o que será mais difícil se ele tiver grandes fragmentos protéicos de origem murina). Este processo também resguarda a especificidade e afinidade da imunoglobulina (Maranhão e Brígido, 2002).

1.2.3- Engenharia e Humanização de Anticorpos

O potencial terapêutico do uso de anticorpos monoclonais tem sido explorado pelas empresas farmacêuticas. Investimentos e novos projetos estruturais melhoraram a farmacocinética in vivo (Figura 3), gerando uma ampla variedade de moléculas modificadas capazes de reconhecer um amplo repertório imune e se direcionar contra alvos refratários e proteínas complexas (Marszal e Fowler, 2012).

A inovadora tecnologia do DNA recombinante tem melhorado a eficiência clínica dos mAbs murinos, a primeira estratégia para reduzir a imunogenicidade foi a produção de mAbs quiméricos (Marszal e Fowler, 2012). O processo de quimerização envolve a fusão gênica da porção Fab do anticorpo murino ao fragmento cristalizável (Fc) de uma imunoglobulina humana, formando uma quimera

(Figura 3) (Maranhão e Brígido, 2002). Apesar deste processo reduzir a imunogenicidade e melhorar o mecanismo efetor do biofármaco, a permanência da fração Fab murina na molécula têm provocado, em pelo menos 9% dos pacientes, a resposta HACA (do inglês, **Human Anti-Chimeric Antibody**) (Weiner *et. al.*, 2010). Similar à resposta HAMA, a resposta HACA inviabiliza a utilização dos anticorpos de uma forma repetitiva, uma vez que o paciente passa a produzir imunoglobulinas das classes IgG e IgM contra as versões de anticorpos quiméricos, provocando a sua neutralização e podendo resultar na doença do soro (Weiner *et. al.*, 2010).

Diante destas evidências, foi proposto que a humanização de anticorpos deveria diminuir a quantidade de resíduos de aminoácidos murinos, aumentando a estrutura humana da molécula. Com a finalidade de reduzir ao máximo a quantidade destes resíduos e preservar a função do anticorpo, surgiu a técnica CDR *grafting* (transplante de CDR). Por meio de manipulação gênica, esta técnica permite que as três CDRs murinas permaneçam em um arcabouço (*framework*) humano, no caso, a estrutura de uma Fv (Weiner *et. al.*, 2010). Sendo assim, as regiões amino-terminais variáveis das cadeias leve e pesada são redesenhadas de forma homóloga a imunoglobulina do camundongo, propiciando o transplante das sequências codificadoras das CDRs murinas. Para finalizar a construção do anticorpo humanizado, uma porção constante humana é fusionada a Fv humanizada (Figura 3) (Presta, 2008).

Outras técnicas também podem ser abordadas para transplantar as CDRs do anticorpo murino, tais como: a escolha de sequências germinais, *best fit* e *resurfacing*. A técnica de *resurfacing* substitui apenas os resíduos acessíveis ao reconhecimento dos anticorpos, porque ficam expostos ao solvente. A técnica *best fit* ou “melhor encaixe” consiste na escolha das sequências humanas que melhor se assemelham as sequências murinas, hipermutadas, não necessariamente germinais. A seleção das sequências germinais tem como base o princípio das técnicas *best fit* e CDR *grafting*, porém somente as sequências germinais são analisadas como arcabouço, uma vez que acredita-se que essas sequências possuem menor imunogenicidade porque estão presentes em linfócitos B imaturos e não passaram pelo processo de hipermutação somática (Presta, 2008).

O reconhecimento pelo sistema imune das CDRs murinas dos anticorpos humanizados, ou qualquer outro fragmento de anticorpo murino presente no

arcabouço do anticorpo, resultando na resistência a terapia é denominada: resposta HAHA (do inglês *Human Anti- Humanized Antibody*). Embora rara, a resposta HAHA é possível e provoca as mesmas sintomatologias das respostas HACA e HAMA (Weiner *et. al.*, 2010).

Diversas estratégias (Figura 3) para a produção de anticorpos terapêuticos totalmente humanos estão sendo desenvolvidas. São exemplos: a seleção a partir de bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos por *phage display*, e a utilização de camundongos transgênicos produtores de anticorpos humanos. A técnica de transgênia em camundongos permite a substituição dos *loci* de imunoglobulina murina por imunoglobulina humana resultando na produção de anticorpos monoclonais humanos (Krauss, 2003).

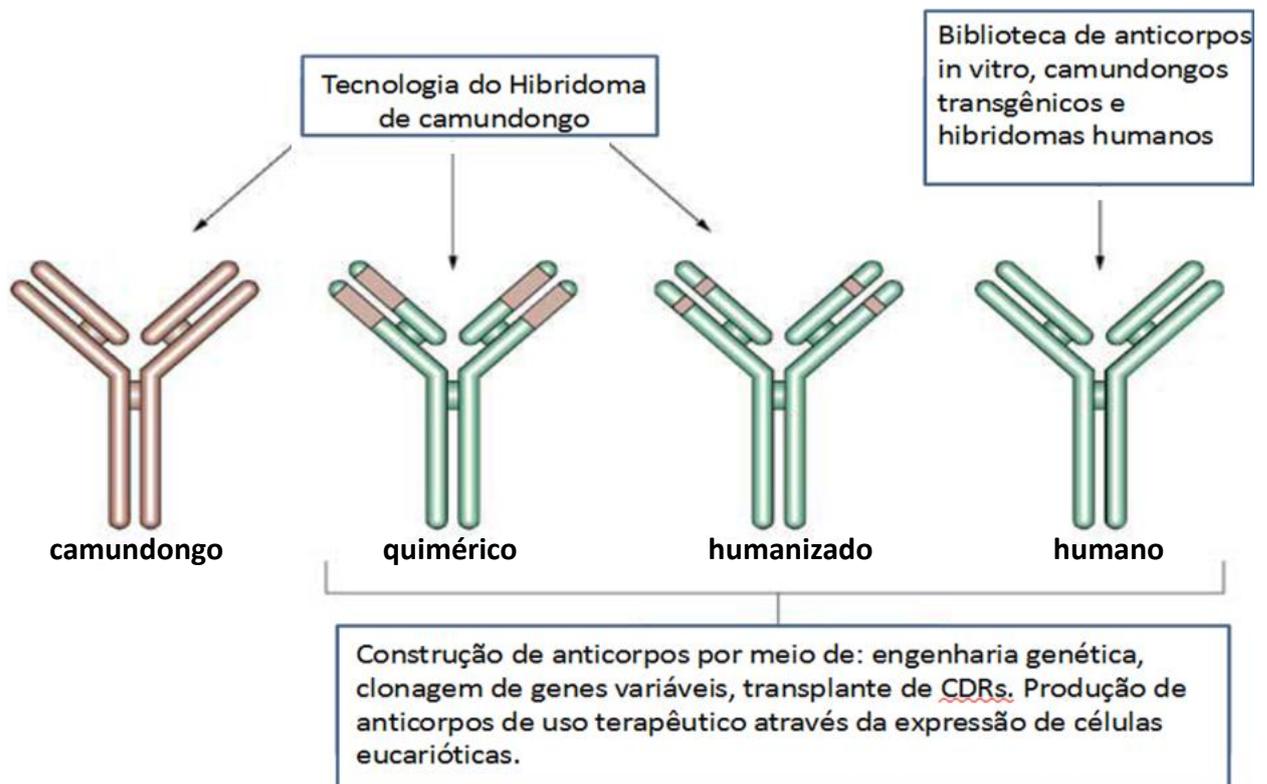


Figura 3: Resumo esquemático das estratégias abordadas para engenharia de anticorpos.

Adaptada de (Sevastyanovich *et.al.*, 2009).

A possibilidade de dividir a molécula de imunoglobulina em diversos fragmentos (humanos ou humanizados) também é uma alternativa para diminuir a imunogenicidade (Andrade *et.al.*, 2000). Foi isolado e caracterizado o fragmento de

ligação ao antígeno (Fab), que pode ser clivado proteoliticamente com papaína e ser desmembrado da fração Fc. Este fragmento pode ser quimicamente modificado, melhorando suas propriedades de retenção e de internalização, sendo vantajoso no tratamento de patologias onde a função efetora do anticorpo não se faz necessária (Fang *et.al.*, 2011).

Outra abordagem similar capaz de otimizar essas vantagens é a manipulação gênica para a construção do fragmento scFv (Andrade *et.al.*, 2000). O fragmento-scFv (Figura 4) ou fragmento variável de cadeia única (do inglês *single chain Fv*) é composto pelas regiões variáveis das cadeias leves e pesadas unidas por um polipeptídeo conector composto por aminoácidos hidrofílicos que conferem flexibilidade a estrutura protéica (Gly₄ Ser)₃, por exemplo. Este fragmento interage com o antígeno e não possui os domínios constantes CH1, CH2, CH3 e CL1 (Figura 4). No caso, nestas construções a molécula tem que ter alta afinidade ao epítipo, porque sua remoção da circulação sanguínea será mais rápida (Andrade *et.al.*, 2005).

Porém, um anticorpo capaz de recrutar as funções efetoras do sistema imune e também ser removido rapidamente da circulação sanguínea, pode ser mais eficaz em algumas doenças (Bornstein *et.al.*, 2009). O fragmento Fc é extremamente relevante para recrutar essas funções efetoras. Outra vantagem do fragmento Fc foi demonstrada por Andrade e colaboradores por meio de análises termodinâmicas e experimentos *in vitro* utilizando agentes desnaturantes. Eles mostraram que o fragmento FvFc possui maior estabilidade conformacional que o scFv uma vez que a presença dos domínios carboxi-terminais conferem esta estabilidade. Estes fragmentos (Figura 4) contém regiões variáveis das cadeias leve e pesada (fragmento Fv) essenciais à especificidade do anticorpo, as quais são formadas por um único cistron que confere uma estequiometria correta dessas cadeias (Andrade *et.al.*, 2005). Estes fragmentos são obtidos a partir do fragmento scFv fusionado aos domínios CH2 e CH3 (Fc), preservando o sítio de glicosilação (Fang *et.al.*, 2011).

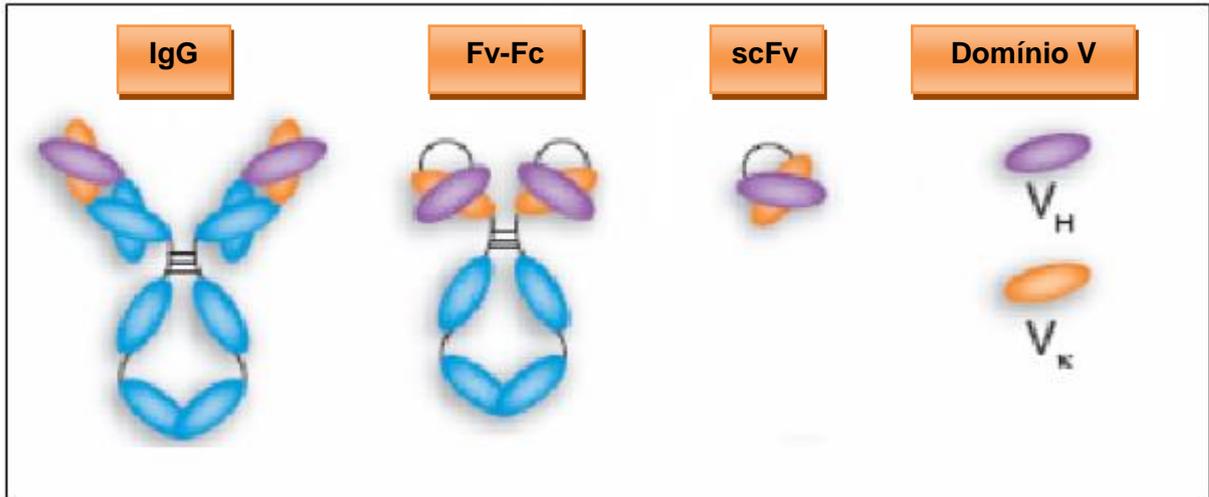


Figura 4: Representação de uma molécula de imunoglobulina (IgG) em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante (FvFc e scFv). Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

Várias estratégias podem ser abordadas para modificar os fragmentos de anticorpos, melhorando as suas propriedades em comparação a molécula progenitora. Todas elas dependem de inúmeros fatores, tais como: a densidade e a acessibilidade dos epítomos, estudos cristalográficos, a flexibilidade conformacional do alvo e os módulos de ligação ao antígeno. Analisando estas condições e através da estrutura tridimensional proposta, é possível, também, conjugar quimicamente diferentes moléculas nos fragmentos de imunoglobulinas. Um exemplo, é a construção de um scFvCD20Cys humano que foi conjugado a um micro RNA não codificador com atividade repressora, o antagomiR155. Este biofármaco não encontra-se disponível para uso clínico, porém os resultados farmacocinéticos são consistentes e confirmam a entrega e a função eficiente tanto do single chain quanto do micro RNA não codificador aos seus respectivos alvos (Wang *et.al.*, 2014).

1.3 Anticorpos de uso terapêutico

A utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) para fins terapêuticos têm solucionado muitos problemas no tratamento de várias patologias. A tecnologia do hibridoma desenvolvida por Milstein e Kohler forneceu bases teóricas para que em 1986, o primeiro anticorpo monoclonal fosse aprovado pela FDA- do inglês *Food and Drug Administration*- o Orthoclone OKT3. Esta preparação homogênea

monoespecífica é capaz de reconhecer um único alvo: a molécula de CD3 humana presente no complexo receptor da célula T. Este anticorpo murino foi utilizado para redução de rejeição a transplantes (Silva *et.al.*, 2009).

Assim como o OKT3, vários outros mAbs de origem murina foram aperfeiçoados por técnicas de engenharia genética para diminuir os efeitos colaterais sem afetar a especificidade do biofármaco. Diversos mAbs têm sido aprovados pela FDA: em 1997 o primeiro anticorpo humanizado pela técnica de transplante de CDR foi aprovado para uso clínico, o anti-IL2R Zenapax®, PDL (Vicent, 1998). Em 2002, utilizando-se a técnica de *phage display* um anticorpo totalmente humano foi aprovado, o anti-TNF α Humira Abbott (Measi, 2005). Em 2006, foi aprovado o primeiro anticorpo monoclonal produzido por camundongo transgênico, o Panitumumabe (utilizado no tratamento para câncer colorretal) (Gibson *et. al.*, 2006).

Essas inovações tecnológicas perfazem uma das áreas de maior crescimento na indústria farmacêutica atual, a tabela 1 mostra os anticorpos monoclonais aprovados pela FDA (*Food Drug Administration*).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados pela FDA até 2014*.

Anticorpo	Molécula Alvo	Tipo	Indicação	Empresa	Ano de aprovação
OKT3 (Muromonab- CD3)	CD3	Murino	Rejeição a transplantes	Johnson & Johnson	1986
Reopro (Abciximab)	CA17-1 ^a	Quimérico	PTCA	Centocor	1994
Panorex (Edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer Colorretal	Centocor	1995
Rituxan (Rituximab)	CD20	Quimérico	Linfoma Non- Hodgkin	Biogen IDEC	1997
Zenapax (Daclizumab)	IL2R	Humanizado	Rejeição a transplantes	Prot Design Labs	1997
Simulect (Basiliximab)	IL2R	Quimérico	Rejeição a transplantes	Novarts	1998

Synagis (palivizumab)	RSV F	Humanizado	Profilaxia de RSV	MedImmune	1998
Remicade (Infliximab)	TNF- α	Quimérico	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Centocor	1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her2/neu	Humanizado	Metástase de câncer de mama	Genentech	1998
Mylotarg (Gemtuzumab)	CD33	Humanizado	Leucemia mielóide	Wyeth	2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica	Millennium/ ILEX	2001
Zevalin (Ibritumomab)	CD20	Murino	Linfoma Non- Hodgkins	Biogen IDEC	2002
Humira (Adalimumab)	TNF- α	Humano	Artrite reumatóide, doença de Crohn	Abbott	2002
Xolair (Oralizumab)	IgE	Humanizado	Asma	Genentech	2003
Bexxar (Tositumomab- I131)	CD20	Murino	Linfoma Non- Hodgkins	Corixa	2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Genentech	2003
Erbix (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer coloretal	Imclone Systems	2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer coloretal, renal	Genentech	2004
Tysabri (Natalizumab)	Integrina A4	Humanizado	Doença de crohn, esclerose	Biogen IDEC	2004
Lucentis (Renibizumab)	VEGF-A	Humanizado	Degeneração macular	Genentech	2006
Vectibix (Panitumomab)	EGFR	Humano	Câncer coloretal	Amgen	2006
Soliris (Eculizumab)	C5	Humanizado	Hemoglobinúria (PNH)	Alexion Pharm	2007

Milatumumab	CD74	Humanizado	Mieloma múltiplo, Linfoma Non- Hodgkin	Immunomedics	2008
Cimzia (Certolizumab)	Integrina	Humanizado	Doença de Crohn	Biogen IDEC	2008
Simponi (Golimumab)	TNF- α	Humano	Artrite reumatoide	Johnson & Johnson	2009
Ilaris (Canakinumab)	IL-1 β	Humano	CAPS	Novartis	2009
Stelara (Ustekinumab)	IL-12 e IL- 23	Humano	Psoríase	Johnson & Johnson	2009
Arzerra (Ofatumumab)	CD20	Humano	Leucemia linfocítica crônica	Genmab	2010
Vedotin (Brentuximab)	CD30	Quimérico	Linfoma Hodgkin	Seattle Genetics	2011
Ipi (Ipilimumab)	CTLA-4	Humano	Melanoma metastático	Bristol	2011
Belimumab (Benlysta)	BLyS	Humano IgG1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	Human Genome Sciences	2011
Brentuximab vendontin (Adcetris)	CD30	Quimérico IgG1; imunoconjugado	Linfoma de Hodgkin, Linfoma de grandes células anaplásicas sistêmicas	Seattle Genetics	2011
Pertuzumab (Perjeta)	HER2	Humanizado IgG1	Cancer de mama	Genentech	2012
Raxibacumab (Pending)	B anthraxis PA	Humano IgG1	Infecção Antrax	Human Genome ieScnces	2012
Ado- trastuzumab entansine (Kadcyla)	HER2	Humanizado IgG1 imunoconjugado	Câncer de mama	Genentech/ Roche	2013
Obinutuzumab (Gazyva)	CD20	Humanizado IgG1	Leucemia Linfocítica Crônica	Roche	2013

Siltuximab (Sylvant)	IL-6	Quimérico IgG1	Doença de Castleman	Janssen Biotech	2014
Vedolizumab (Entyvio)	$\alpha 4\beta 7$ integrina	Humanizado IgG1	Colite ulcerativa e Doença de Crohn	Millennium Pharmaceuticals/ Takeda	2014
Ramucirumab (Cyramza)	VEGFR2	Humano IgG1	Câncer Gástrico	ImClone Systems	2014

*Adaptada do site da *Food Drug Administration*

Disponível em: http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php

1.4 O antígeno CD20 e os anticorpos anti-CD20

Os linfomas são neoplasias malignas que se originam nos linfonodos. Em 1832 o Dr. Thomas Hodgkin fez os primeiros diagnósticos de linfomas, descrevendo-os como sendo formados por células mononucleadas, Linfomas de Hodgkin. Em 1900 a Dr^a Dorothy Reed e o Dr Carl Sternberg observaram células B grandes e multinucleadas formando um complexo com as células mononucleadas, representando aproximadamente 1% do tumor, essas células são denominadas Reed-Sternberg (RS) e o complexo formado com as células mononucleares HRS. Posteriormente, outros pesquisadores descrevem que além das células HRS, são encontradas diversas células que infiltram o tumor, tais como linfócitos e histiócitos (van Oers e Kersten, 2011).

Todos os outros linfomas que não se enquadram neste padrão, são denominados Linfomas Non-Hodgkin (LNH). Uma vez que, os Linfomas de Hodgking são constituídos por células que perderam suas características de origem, ao contrário dos LNH que as mantêm em grande parte. Atualmente, Segundo a Organização Mundial de Saúde, a classificação dos Linfomas não-Hodgkin relaciona as características imunogenéticas, morfológicas e moleculares do tumor, as quais descrevem mais de 20 subtipos, em geral, 85% são de células B sendo raros os linfomas de células T (Marszal e Fowler, 2012).

Em 1980 surgiu o anti-CD20 B1, o primeiro anticorpo monoclonal para o

tratamento do Linfoma Non- Hodgkin de células B capaz de reconhecer um antígeno presente e específico nesta célula, o antígeno CD20 humano (Fang *et.al.*, 2011). Por ser um anticorpo monoclonal murino, o anti- CD20 B1 ou tositumomabe, não foi rapidamente aprovado para uso clínico. Nos anos seguintes os anticorpos anti-CD20 foram geneticamente modificados para aplicação clínica, atualmente são classificados em tipos I e II (Ernest *et al*, 2005). Vários aspectos os diferenciam, principalmente: a cinética de depleção das células B e a estequiometria em que permanecem após realizarem as interações com o antígeno CD20 (Klein *et al*, 2013). Em 1997, foi aprovado especificamente para o tratamento de pacientes com LNH de baixo grau (folicular) ou linfomas foliculares agressivos non- Hodgkin, o primeiro anticorpo recombinante: Rituximabe (MabThera®, Rituxan) (Kotani *et.al.*, 2006).

O MabThera® Rituxan e a maioria dos anticorpos anti-CD20 são classificados como tipo I (Figura 5), exemplos: ocrelizumab (2H7) e ofatumumab (2F2). Os anticorpos tipo I após estabelecerem as ligações com o antígeno CD20, induzem a sua translocação em microdomínios lipídicos dentro da membrana plasmática, depletando o linfócito B através dos seguintes mecanismos: morte celular programada PCD (do inglês *Programmed Cell Death*), citotoxicidade celular dependente de anticorpo ADCC (do inglês *Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity*), fagocitose celular dependente de anticorpo ADCP (do inglês *Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis*), citotoxicidade dependente de complemento CDC (do inglês complement- mediated cytotoxicity), (Oflazoglu e Aldoly, 2010).

O processo de translocação do CD20 favorece geometricamente a formação de *clusters* de anticorpos (Figura 5) na superfície do linfócito B posicionando melhor a região Fc do anticorpo aumentando o recrutamento da função efetora (Marszal e Fowler, 2012). A cinética de depleção das células B promovida por imunoglobulinas anti-CD20 do tipo II (Figura 5) deve-se á adesão homotípica que eles realizam ao se ligarem na molécula CD20. Sendo assim, eles induzem menos CDC e ADCC. (Binder *et. al.*, 2006). Recentes estudos comprovaram que os anticorpos anti-CD20 do tipo II, não promovem apoptose e sim uma forma direta e não apoptótica de morte celular. A interação de um anti-CD20 tipo II com a molécula CD20 aumenta o contato da actina célula a célula resultando no rompimento dos lisossomos e da

geração de espécies reativas de oxigênio promovendo a morte celular. São exemplos de anticorpos tipos II: GA101 e tositumomabe (B1) (Klein *et al*, 2013).

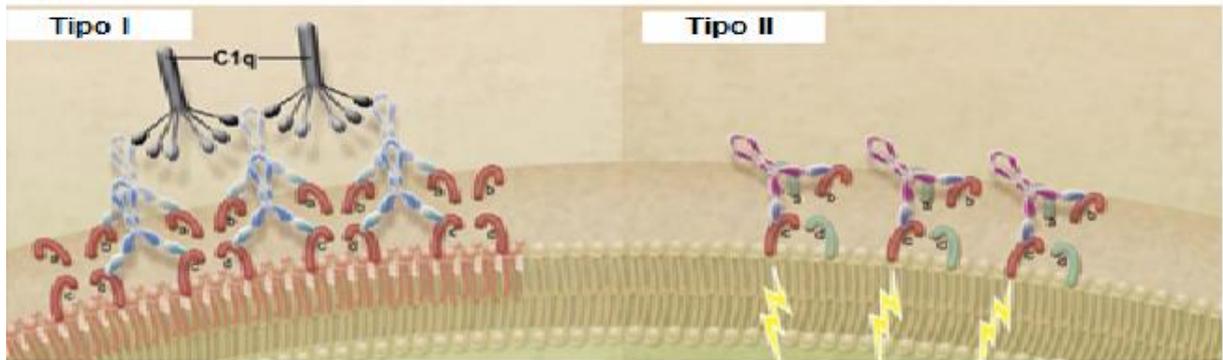


Figura 5: Demonstração esquemática da interação antígeno CD20 e os dois tipos de anticorpos anti-CD20: tipo I e tipo II respectivamente. Adaptada de (Cragg, 2011).

O rituximabe consiste em um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20, onde a fração Fv é de origem murina e fusionada às regiões humanas constantes de IgG1 e Ck, seu peso molecular é de 145 kDa sendo duas cadeias pesadas de 451 aminoácidos e duas cadeias leves de 213 (Lim, *et.al.*, 2010). Este modelo quimérico, no formato de IgG1 humana é atualmente, utilizado no tratamento de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (Keatting, 2010) e Artrite Reumatóide (AR) (Perscovitz, 2009) e Miastenia Graves (Wang *et.al.*, 2014), sendo manufacturado pelas empresas Genentech e Biogen. O medicamento foi aprovado para uso clínico em 1997 (Pateinakis e Pырpasopoulou, 2014).

O antígeno leucocitário humano CD20, esta presente na superfície de células da linhagem linfóide B, desde seu estágio pré B á linfócito B maduro, não sendo, em condições naturais, expresso em plasmócitos (Oflazoglu e Aldoly, 2010). É uma fosfoproteína transmembrânica não glicosilada de aproximadamente 33 a 37 kDa capaz de atravessar quatro vezes a membrana plasmática, estando presente na maioria dos linfócitos B. A principal característica desta molécula é uma volta (“loop”) extracelular de aproximadamente 44 aminoácidos (Figura 6) com uma ponte bissulfeto entre as citeínas 167-183 localizada entre os domínios 3 e 4 transmembrânicos (Ernst *et. al.*, 2005).

O epítipo reconhecido pelo rituximabe (Figura 6) é formado pelos peptídeos (170) ANPS (173) e (182) YCYSI (186) ambos unidos por pontes disulfeto C (167) –

C (183) (Klein, et AL, 2013). Esses resíduos formam pontes de hidrogênio ao redor dos *loops* das CDRs (Klein *et.al.*, 2013). O epítipo descontínuo do CD20 contribui com a estabilidade de ligação do rituximabe (Binder *et.al.*, 2006). Outro fator que pode contribuir (Figura 6) são as pontes dissulfeto entre os resíduos C(167) e C(183)5 que aparentemente se aproximam favorecendo a ligação do rituximabe ao epítipo descontínuo, sendo que, os resíduos de alanina na posição 170 (A170), e prolina na posição 176 (P172) são considerados os mais relevantes para permitir que estas interações sejam formadas (Klein *et.al.*, 2013).

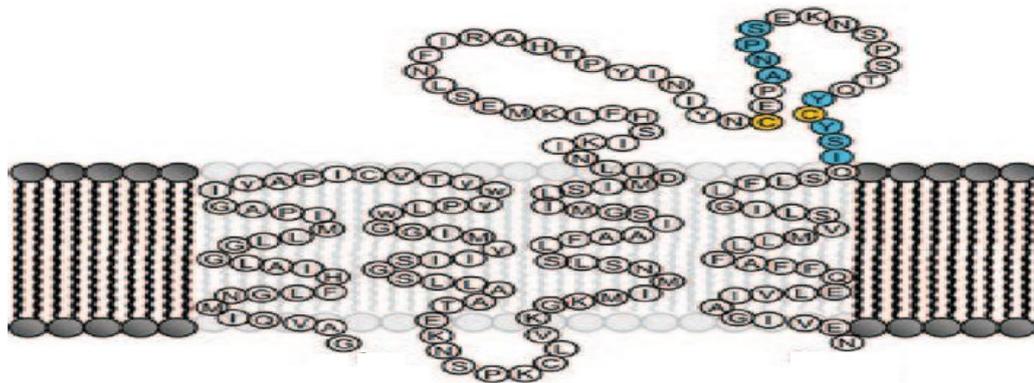


Figura 6: O epítipo descontínuo ao qual o rituximabe se liga. Em amarelo os resíduos C(167) e C(183)5 que formam pontes dissulfeto. *Adaptada de (Binder *et.al.*, 2006).

Nas células B normais, a expressão do antígeno CD20 é de aproximadamente 100.000 moléculas por células, em outros tipos celulares esta expressão é insignificante, mas nas células B malignas esta expressão encontra-se aumentada (Montraveta *et.al.*, 2014).

Sendo assim, o rituximabe causa uma depleção seletiva e transitória de ambas subpopulações de células B normais CD20 positivas e de células B malignas (Figura 7). Porém, a expressão do CD20 ocorre dentro de etapas chaves do desenvolvimento das células B que dão origem a diversas patologias, não sendo expresso em células-tronco hematopoiéticas B, de modo que a hematopoiese de células B, os plasmócitos e outras linhagens de células não são alvejadas (Ruuls *et.al.*, 2008).

Dados na literatura demonstram que o espectro de ação deste biofármaco em outras patologias onde, a depleção de células B CD20+ pode ser relevante (Montraveta *et.al.*, 2014). Já existem aplicações nos seguintes tipos de doenças: Lupus eritematoso sistêmico (Pateinakis e Pырpasopoulou, 2014). Síndrome de Stiff

Person (Bacorro e Tehrani, 2010), Diabetes Mellitus do tipo I (Xinyu *et.al*, 2013), Leucemia Linfóide Crônica (Keating, 2010), como adjuvante para a tolerização de órgãos em procedimentos de rejeição a transplantes (Sarkar e Philip, 2013) dentre outras.

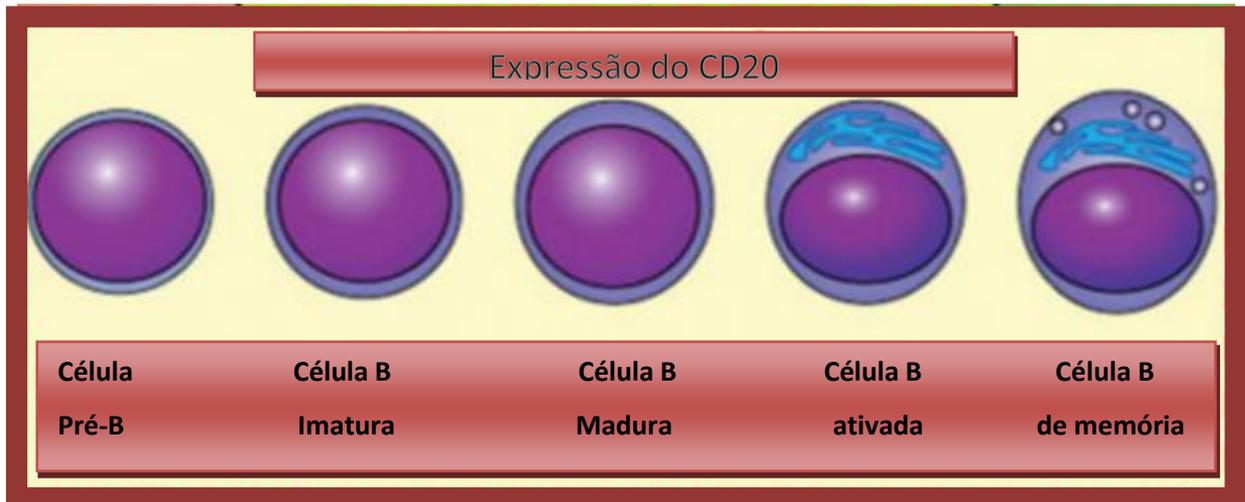


Figura 7: Linhagens de linfócitos que expressam o antígeno CD20. *Adaptada de (Ruuls *et.al.*, 2008).

Diversos estudos demonstram que o papel terapêutico do Rituximab na depleção de células B esta relacionado com quatro mecanismos (Figura 8): ADCP, CDC, ADCC e PCD (Ruuls *et.al.*, 2008).

Vários mecanismos são descritos sobre apoptose (Figura 8) durante o tratamento com anti- CD20, porque após estabelecida a interação do anticorpo com o CD20 ocorrem fosforilações na membrana plasmática das células- alvo (Pateinakis e Pырpasopoulou, 2014). As vias apoptóticas incluem tanto mecanismos intrínsecos da via de ativação da caspase quanto, vias dependentes de permeabilização. (Oflazoglu e Aldoly, 2010). São exemplos clássicos: as vias das caspases 3 e 9, interações com os genes Bcl-2 e Bcl-6, com as vias Bax e Bak e com o NFκB (Pateinakis e Pырpasopoulou, 2014).

Os anticorpos de classe IgG1 como o rituximabe, facilitam a deposição de proteínas do sistema complemento por meio da via clássica quando ligam-se aos seus respectivos antígenos, formando um imunocomplexo (Figura 8), resultando na citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Isso acontece porque a proteína

C1q do complemento se liga as duas regiões Fc do anticorpo quimérico as quais ficam expostas (Amoroso *et.al.*, 2011).

As células Natural Killer também reconhecem e se ligam à região cristalizável (receptor Fc) do rituximabe, mas por meio de seu receptor FcγRIIIa. Essas células são então ativadas, devido à ligação entre seu receptor e por meio das interações entre as porções hidrato de carbono, liberando grânulos capazes de destruir a célula B (Pievani *et.al.*, 2011). Outro evento, menos descrito na literatura, é a fagocitose dependente de anticorpo. Macrófagos e monócitos expressam receptores Fc e receptores para proteínas do sistema do complemento, logo existe a possibilidade do linfócito ser fagocitado juntamente com o anticorpo (Pateinakis e Pyrpasopoulou, 2014).

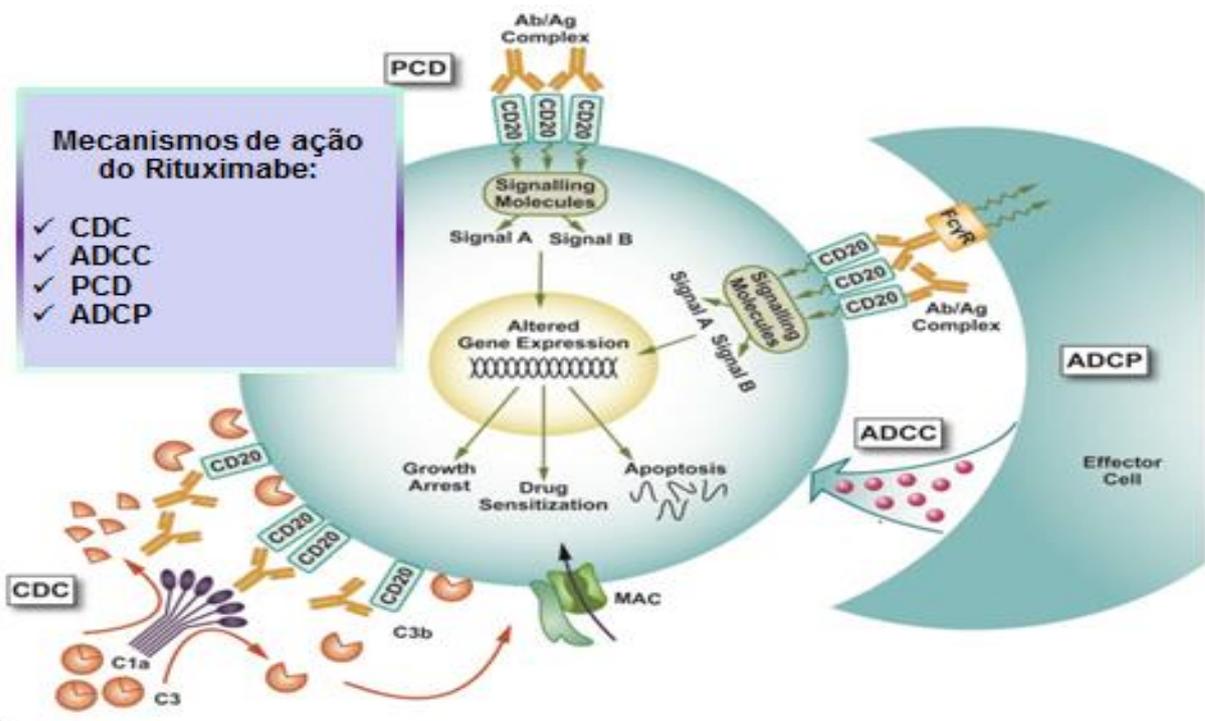


Figura 8: Mecanismos de ação propostos pelo rituximabe contra o antígeno CD20 humano.

*Adaptada de (Oflazoglu e Aldoly, 2010).

Apesar do rituximabe ser eficaz em depletar células B, cerca de 50% dos pacientes com câncer HNL CD20 não respondem à terapia inicial com rituximabe, resistência inata, de 30 e cerca de 60% dos pacientes não vão mais se beneficiar com o tratamento novamente, resistência adquirida (Zimmermann *et al*, 2014).

Estudos mostram que alterações no domínio intracelular do antígeno CD20 podem afetar a função das proteínas pró-apoptóticas SERCA3 e Bax/Bak resultando num decréscimo do influxo de Ca^{2+} intracelular inibindo a apoptose. Porém, acredita-se que a maior parte dos mecanismos de resistência não estão vinculados a atividades intrínsecas das células B malignas (Zimmermann *et al*, 2014).

Outro mecanismo de resistência comum esta relacionado à constituição gênica dos receptores FcγR das células efectoras. Alguns genes responsáveis por codificar esses receptores exibem polimorfismo alélico, resultando em alótipos, por exemplo o gene FcγRIII: devido ao seu dimorfismo, pode codificar FcγRIIIa (CD16) com o aminoácido fenilalanina (F) ou valina (V) na posição 158. Os indivíduos homozigotos para FcγRIIIa-valina valina158 (V/_V) estabelecem ligações mais fortes com o fragmento Fc da IgG1 (Waleed e Tim, 2011).

Entretanto, este polimorfismo e a redução da eficácia do tratamento com o rituximabe são contestáveis, por exemplo, de acordo com Zimmermann *et. al* 2014, pacientes com doenças linfoproliferativas pós- transplantados portadores da região polimórfica com fenilalanina na posição 158 do FcγRIIIa podem responder bem ao tratamento desde que aumentadas as doses do biofármaco, imunoterapia R-CHOP em vez de quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, hidroxidoxorubicina, vincristina e prednisona) após monoterapia rituximab R-CHOP (Zimmermann. *et al*, 2014). Outro exemplo de polimorfismo ocorre no componente C1qA do sistema complemento, e está correlacionado com a remissão completa após a terapia prolongada do rituximabe (Waleed e Tim, 2011).

Apesar da eficiência, em 3% dos pacientes com linfoma, a terapia com rituximabe pode estar associada a imunossupressores e corticosteróides devido à resposta HACA (**H**uman **A**nti-**C**himeric **A**ntibodies) (van Oers e Kersten, 2011). Porém essa resposta é bem maior quando o rituximabe é usado para o tratamento de doenças auto-imunes e leva a uma tolerização à terapia (Pinto *et.al.*, 2013). Com a finalidade de minimizar tais efeitos colaterais, foram propostos outros modelos de anticorpos recombinantes, de origem murina ou humanizados, dentre os quais destacam- se Ofatumumab 6,7, Ocrelizumab8, Veltuzumab 11,12, AME-133v13,14 e GA101 (Lim *et. al.*, 2010). Na tabela 2 estão representados os anticorpos anti- CD20 utilizados na clínica médica e aprovados pela FD.A.

Tabela 2: Anticorpos anti-CD20 utilizados na clínica médica e aprovados pela FDA.

Anticorpo	Forma	Tipo	Indicação	Empresa	Ano de aprovação ou Fase de teste
Rituximabe Rituxan	Quimérico	I	NHL, RA	Genentech	1997
Ibritumoabe Zevalin	Murino	I	NHL	Biogen IDEC	2002
Tositumomabe Bexxar	Murino	II	NHL	GlaxoSmithKlin e	2003
Ofatumumabe Arzerra	Humano	I	NHL, RA, CLL	Genmab, GlaxoSmithKlin e	2009
Ocrelizumabe	Humanizado	I	NHL, RA	Genentech, Roche, Biogen	III
Veltuzumabe	Humanizado	I	NHL, ITP	Immunomedics	II
Obinutuzumabe	Humanizado	II	NHL, CLL	Roche	II
AME-133v	Humanizado	I	NHL	Applied Molecular Evolution	II
TRU-015	FvFc	II	RA	Trubion Pharma	II
PRO131921	Humanizado	I	NHL, CLL	Genentech	I, II
GA-101	Humanizado	II	CLL, NHL	Glycart / Roche	I, II

*Adaptada do site da *Food Drug Administration*

Disponível em : http://www.antibodysociety.org/news/approved_mabs.php

1.5 Expressão heteróloga de anticorpos em células de mamíferos

Na década de 1970, com o aperfeiçoamento das técnicas de engenharia genética e produção de proteínas recombinantes, surgiu um grande interesse por parte dos pesquisadores em padronizar técnicas e protocolos para produção de biofármacos em células de mamíferos. Essas células perfazem o sistema ideal para produção de anticorpos. Elas possuem capacidades intrínsecas de mimetizar essa produção pelo organismo humano, devido ao alto grau de fidelidade em relação às modificações pós-traducionais, tais como: a N-glicosilação, acetilação, metilação, fosforilação, glicosilação, prenilação, sulfonação dentre outros (Jayapal et.al., 2007).

Segundo Datta *et.al.*, 2013, a produção industrial de anticorpos recombinantes por meio de células de mamíferos, em especial as células CHO, correspondem a mais de 70% das proteínas terapêuticas em um mercado global avaliado em US \$ 30 bilhões em vendas anuais (Datta *et. al.*, 2013).

A linhagem imortalizada de ovário de hamster chinês (CHO) e suas variantes, como por exemplo a CHO-K1, são comumente utilizadas para produção de biofármacos (Ruggiero, 2002). Essas células epiteliais de morfologia fibroblastóide são aderentes ao plástico. Para permanecerem aderidas ao plástico após se propagarem, ou mesmo manterem sua morfologia, essas linhagens de CHO necessitam de soro fetal bovino como fonte de hormônios, fatores de crescimento, proteção contra variações de pH e pressão osmótica (Jayapal et.al., 2007).

Para que as células de mamíferos possam produzir anticorpos fidedignos a sua sequência gênica, elas necessitam de vetores de expressão adaptados as suas necessidades, e previamente planejados a lidar com alguns dos mecanismos de regulação da expressão gênica em eucariotos (Silva et. al., 2009). O Grupo de Imunologia Molecular da UnB, trabalha com diversos projetos na área de expressão heteróloga de anticorpos, vários vetores foram construídos com o objetivo de melhorar a produção dessas proteínas recombinantes. O vetor utilizado neste trabalho, foi o vetor pCOMIRES Δ 600. (Figura 9) (Quilici, 2012).

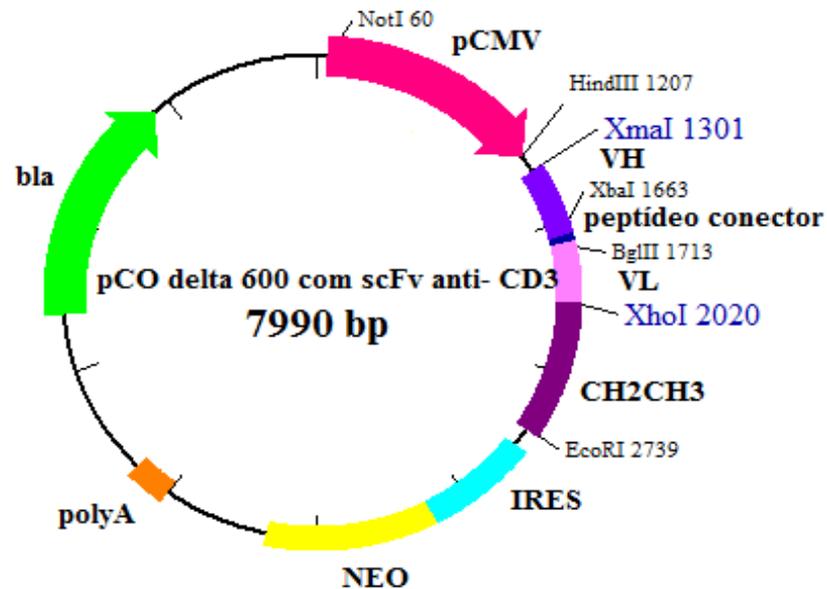


Figura 9: Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600. Adaptado de (Quilici, 2012).

O vetor foi construído por Quilici (2012) e possibilita a produção heteróloga das proteínas recombinantes em células de mamíferos. O vetor pCOMIRES Δ 600 possui os genes relacionados com as cadeias CH2 e CH3 do Fc de imunoglobulina humana IgG, que estão presentes entre o sítio da enzima *Xho* I e da enzima *EcoR* I, de forma que a proteína liberada pela célula de mamífero corresponda ao fragmento FvFc do anticorpo (Quilici, 2012). O vetor pCOMIRES Δ 600, também possui: gene para resistência á ampicilina (*Bla*), que facilita a manipulação em bactéria e o gene de resistência a geneticina (NEO^R), para a seleção de transfectomas estáveis (Sousa, 2013).

Os genes que codificam o fragmento FvFc estão em fase com a sequência líder, codificadora do peptídeo sinal de imunoglobulina, dirigindo assim os produtos recombinantes para o aparato secretório da célula (Sousa, 2013). A expressão do gene é dirigida pelo promotor CMV (Citomegalovírus), este promotor tem como principal característica promover altos níveis de transcrição do gene da proteína recombinante (Mariati et.al., 2010), para tanto ele possui o íntron A com uma deleção de 600 pares de base (Quilici, 2012). O íntron A é responsável para que a performance do processo de splicing ocorra de forma a permitir maior fidelidade de transcrição do FvFc, que encontra-se clonado como cDNA (Le et.al., 2003). O vetor também possui o sinal de poliadenilação eficiente do vírus 40 de macaco SV40

(*Smian Vírus 40*) que codifica a “cauda polyA” do RNA (Le et.al., 2003).

Outra característica importante é que o gene de resistência a geneticina (NEO^R) está clonado a montante á um elemento *IRES* (do inglês *Internal Ribosome Entry Site*). O *IRES* consiste em sequências localizadas na região 5`UTR (do inglês *Untranslated Region*) de alguns vírus de RNA e sua presença em um vetor de expressão é considerada extremamente importante para possibilitar a expressão policistrônica por permitir uma expressão duradoura e estável de proteínas recombinantes, como imunoglobulinas (Houbebine et.al., 1999).

Essa característica faz com que tanto o mRNA gerado a partir do cassete de expressão contenha a sequência codificadora da proteína recombinante, o *IRES* e a sequência que codifica a marca seletiva Neo. Esse mRNA serve de molde para a tradução simultânea de ambos os cistrons, de forma que ao se selecionar a célula pela sua resistência a geneticina, seleciona-se aquele com capacidade de produzir proteína recombinante (Houbebine et.al., 1999).

Um vetor com todas essas características pode influenciar positivamente no processo de produção de anticorpos recombinantes, e ser uma estratégia promissora para produção em larga escala.

1.6 Desenho gênico de versões humanizadas dos domínios variáveis leve e pesado do rituximabe.

Com o objetivo de desenvolver uma estrutura menos complexa do que a do anticorpo inteiro, podendo apresentar um tempo de meia vida menor na circulação sanguínea, sendo considerado ideal nos tratamentos onde a rápida remoção do biofármaco pode resultar em uma melhor evolução do quadro do paciente (Maranhão e Brígido, 2002), foram produzidos dois fragmentos FvFc humanizados e um fragmento FvFc similar a estrutura original do rituximab, onde o domínio Fc é o mesmo que o dos domínios da IgG humana.

A especificidade da molécula original foi mantida, transplantando as CDRs murinas do rituximabe para dois arcaibouços humanos, através da técnica CDR grafting. Não foi necessário realizar a construção da molécula inteira, uma vez que o grupo de Imunologia Molecular já tinha uma sequência gênica para dos domínios CH2 e CH3, clonados no vetor de expressão pCOMIRES Δ 600. Os scFvs foram

desenhados de forma a propiciar a fusão gênica desses domínios e receber as CDRs murinas do rituximabe, analisando os resíduos de aminoácidos essenciais correspondentes a sequência que codifica a estrutura cristalográfica.

Como visto, manter as CDRs murinas do rituximabe é uma estratégia promissora, pois o êxito na depleção das células B em uma fase de desenvolvimento chave promove um tratamento adequado à pacientes de várias patologias. As CDRs são capazes de manter esta identidade da molécula progenitora. Possíveis mutações que possam ocorrer na molécula CD20 afetando o epítipo do rituximabe são raras, ocorrem em apenas 0,4% dos pacientes. (Klein *et. al.*, 2013).

Foram selecionados *frameworks* humanos para as cadeias VH e VL murinas que estão presentes no anticorpo original Rituximabe (Andrade *et.al.*, 2000). E realizadas buscas a partir de sequências humanas de cadeias variáveis germinais depositadas no banco de dados que apresentaram maior similaridade com a sequência do anticorpo murino (Caldas, 2000). Essas sequências foram alinhadas e analisadas usando o programa Bioedit. Para a escolha das sequências similares, foi considerada as sequências depositadas no Ig Blast.

Segundo Kaswiuri *et. al* 2005, a correta escolha de um modelo tridimensional humano e a identificação dos resíduos no framework, são cruciais para estabelecer ligações com o antígeno (Kaswiuri *et. al* 2005). O uso das sequências germinais reduz a imunogenicidade da molécula. Os frameworks de dois anticorpos humanos diferentes podem ser usados como molde para o processo de humanização das cadeias VH e VL, no caso desta humanização as duas versões humanizadas são similares em relação a estrutura tridimensional, pois as duas cadeias L poderiam receber as CDRs do rituximab e a mesma cadeia H de imunoglobulina, logo foram produzidos dois fragmentos scFv humanizados com a mesma cadeia pesada e diferentes cadeias leves.

Posteriormente, foram realizadas a retro-tradução das sequências peptídicas em polinucleotídicas, levando em conta a presença de códons preferenciais para células de mamíferos, propondo-se a sequência dos genes a serem sintetizados quimicamente (Caldas *et. al*, 2000). Foram selecionados dois segmentos germinais de cadeias pesadas de imunoglobulina e três segmentos germinais para cadeia leves de Ig, respectivamente: human VH1-46, mouse VH J558.42, V κ A27, V κ L1, V κ am4. Sendo assim, foram sintetizadas quimicamente duas versões scFvs

humanizadas e uma versão scFv murina similar a do rituximabe original, respectivamente: A (humanVH1-46/V κ A27), L (humanVH1-46/V κ L1) e O (VH J558.4/V κ am4).

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Expressar, produzir e purificar, fragmentos de anticorpos anti-CD20 na forma FvFc. Sendo, uma versão FvFc murina similar ao rituximabe original e duas versões FvFcs humanizadas.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonagem dos scFvs humanizados e murino no vetor de expressão pCOMIRES Δ 600.
- Obtenção da população mista de células CHO-K1 produtoras dos FvFcs recombinantes.
- Produção e purificação das proteínas recombinantes.

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Linhagem de bactéria

Linhagem de bactéria *Escherichia coli* utilizada para os procedimentos de clonagem neste trabalho, os genes listados indicam alelos mutantes.

- XL1-blue (Stratagene): recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]. *E. coli* foi desenvolvida para a transformação de grandes moléculas de DNA, e com alta eficiência.

3.1.2 Linhagem de Célula de Mamífero

- CHO-K1- Linhagem celular derivada da subclonagem de uma célula de ovário de hamster Chinês (CHO) parental, iniciada pela biópsia de um ovário da fêmea adulta do hamster Chinês *Cricetulus griseus*.

São células epiteliais, aderentes e necessitam de suplementação de soro fetal bovino e prolina ao meio de cultura. Número ATCC: CCL-61. As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (Hyclone) contendo soro fetal bovino (SFB) a uma concentração de 10 % (v/v)

3.1.3 Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína 1,0 % (p/v)

Extrato de levedura 0,5 % (p/v)

NaCl 1,0 % (p/v)

pH 7,0.

Meio LB ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 1,4 % (p/v).

Meio SB (Super Broth)

Peptona de caseína 3,0 % (p/v)

Extrato de levedura 2,0 % (p/v)

MOPS 1,0 % (p/v)

pH 7,0.

Meio SOB

Bacto-triptona 2,0 % (p/v)

Extrato de levedura 0,5 % (p/v)

NaCl 0,06 % (p/v)

KCl 0,002 % (p/v)

pH 7,0.

Meio SOC

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de Mg^{2+} 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

$MgCl_2$ 1 M

$MgSO_4$ 1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução de $CaCl_2$

$CaCl_2$ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 50 % (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

Cubetas de eletroporação (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad[®], n^o catálogo: 165-2086)

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos

3.1.4. Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos

Para a cultura das linhagens de células de mamífero utilizadas neste estudo, foi utilizado o meio de cultura HAM-F12 da Sigma e da Gibico. Todos esses meios de cultura apresentam uma composição química bastante complexa, contendo sais inorgânicos diversos, vitaminas, aminoácidos e outros compostos. Era adicionado bicarbonato de sódio no meio, com a finalidade de manter o pH durante a estocagem a 4C°.

Meio Ham-F12 com L-Glutamina a 2 mM (Invitrogen[®], no cat 21700-075)

Meio Base 1 pacote

NaHCO₃ 1,176 g

dH₂O q.s.p 1 L

pH 7,4

Meio de Congelamento de Células

HamF12 45%

Soro Fetal Bovino 45 % (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

Soluções utilizadas para cultura de células CHO-K1:

*Tripsina-EDTA (Invitrogen[®], n^o catálogo: 27250-018)

Tripsina 2,5 g

EDTA 0,38 g

BSS.CMF qsp 1 L

pH 8,0

*Soro Fetal Bovino (Invitrogen[®], n^o catálogo: 10438-026)

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura Ham-F12 com L-glutamina à concentração de 5% ou 10% (v/v).

*Azul de Tripan

Corante Azul de Tripan 400 mg

PBS pH 7,2 q.s.p. 100 mL

*Reagente de transfecção JetPEI™ (Polyplus Transfection, n^o de catálogo 101-01N)

Esse reagente de transfecção é um derivativo linear de uma polietilenimina. É um composto catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos.

3.1.5 Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

Solução II

NaOH 0,2 M

SDS 1,0 % (p/v)

Solução III

Acetato de potássio 3 M

Ácido Acético 2 M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

RNAse A (Invitrogen[®], n^o de catálogo 12091-021).

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6 1 v

Clorofórmio 1 v

B-hidroxiquinilona 0,05 % (p/v)

Equilibrado com 0,1 v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6

Clorofil

Clorofórmio 24 v

Álcool isoamílico 1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE

Acetato de Sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

3.1.6 Enzimas

Enzimas de Restrição

*Biolabs:

Not I (10U/μL)

Hind III (10U/μL)

EcoR I (20U/μL)

Xho I (10U/μL)

Xma I (1U/μL)

Kpn I (5U/μL)

Pst I (10U/μL)

*Fermentas:

Cfr9 I (10U/μL)

Xho I (10U/μL)

*Promega

Kpn I (10U/ μ L)

Pst I(10U/ μ L)

Outras enzimas

*Invitrogen

T4 DNA Ligase (100u/ uL)

Taq DNA polimerase (100 u/uL) Invitrogen

3.1.7 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose

Tampão de corrida TEB 1X (Trizima- Base, Edta, Ácido Bórico) pH 8,0

Tampão de corrida TAE 1X (Trizima- Base, Tris- Acetato, Ácido Acético Glacial)

Tampão de amostra para gel de agarose 10X Azul de Bromofenol 0,1 % (p/v)

3.1.8 Anticorpos utilizados no ELISA

Goat anti-Human IgG (H+L) Secondary Antibody 2 mg, da Life thecnologies, número de catálogo A18807.

F(ab')₂-Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, AP conjugate 500ug, da Life thecnologies, número de catálogo A24479. (Também utilizado no Western).

3.1.9 Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das clonagens dos scFvs no vetor de expressão pCOMIRES Δ 600.

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela GenOne e solubilizados em água Milli-Q para concentração de uso de 10 pmoles/ μ L. A tabela 3 mostra as seqüências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3. Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados

Identificação	Seqüência do Oligonucleotídeo	Utilização
VH <i>Xma</i> I	5' GGTGTACATTGTGAGCTCGCCCG 3'	Anela com o início da CDR 1 na região variável da cadeia pesada (VH)
VH <i>Xba</i> I	5' TGGAACCACCGTGACCGTGT 3'	Anela com o final da CDR 3 na região variável da cadeia pesada (VH)
VL <i>Bgl</i> II	5' CTGGAGGAGGAGGATCAGATC 3'	Anela com o início da CDR 1 na região variável da cadeia leve (VL)
VL <i>Xho</i> I	5' CCTCCTACCTTCGGAGGAGGA 3'	Anela com o final da CDR 3 na região variável da cadeia leve (VL)

3.1.10 Antibióticos

Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspendida em água destilada na concentração de 20 a 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção para plasmídios transformados em células de *E. coli*.

Tetraciclina

A tetraciclina liofilizada foi ressuspendida em etanol 70% na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado para a semeadura e manutenção de células *E. coli* das linhagens XL1-blue e XL10-gold, que possuem o gene de resistência a esse antibiótico.

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina 10.000U

Estreptomicina 10.000µg

Anfotericina B 25µg/mL

Preparada em 0,85 % de salina

Solução utilizada como antibacteriano e antimicótico que foi adicionada aos meios de cultura das células de mamífero, na concentração final 1X.

Geneticina[®] (G418-Sulfato)

Liofilizada foi ressuspendida em água destilada na concentração de 50 mg/mL e esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a -20°C e protegida da luz. A geneticina foi utilizada para a obtenção de clones estáveis de construções com seqüências indutoras de Z-DNA na linhagem CHO-K1.

3.1.11 Marcadores moleculares para DNA

1 kb plus DNA Ladder – (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 10787-026)

Fragmentos de DNA em pb: 100; 200; 300; 400; 500; 650; 850; 1.000; 1.650; 2.000; 3.000; 4.000; 5.000; 6.000; 7.000; 8.000; 9.000; 10.000; 11.000; 12.000.

1 kb DNA Ladder – (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 15615-016)

Fragmentos de DNA em pb: 201; 220; 298; 344; 396; 500; 517; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090; 6.106; 7.126; 8.144; 9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

Low Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º. catálogo. 10068-013)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2.000; 1.200; 800; 400; 200 e 100. Utilizando 4 µL do marcador, corresponde a massa de 200; 120; 80; 60; 40 e 20 ng, respectivamente.

High Mass DNA Ladder (Invitrogen[®] n.º. catálogo 10496-016)

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 4 µL do marcador, corresponde a massa de 200; 120; 80; 60; 40 e 20 ng, respectivamente.

3.1.12 Marcadores moleculares para proteína

BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (2x 250uL), Life Thecnologies, número de catálogo 10748-010.

NexusPointer Mid Range Dual Color (250ul), Bionexus, número de catálogo BNPM30.

3.1.13 Kits comerciais

QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação plasmidial em escala intermediária (Qiagen[®] , n.º. catálogo 12145).

QIAprep Spin Miniprep Kit (250) - Para preparação plasmidial em pequena escala (Qiagen[®] , n.º. catálogo 27106).

Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA

Centrifugal Unit (Millipore[®], nº. catálogo 42600). Para extração de DNA de gel de agarose.

Qubit Fluorometer - para quantificação de DNA/RNA. Invitrogen (n^o catálogo: Q32860)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de DNA plasmidial

- ✓ Em pequena escala adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo IV (Maranhão e Moraes, 2003).

Para as preparações de DNA plasmidial em pequena escala, preparava-se um inóculo de 5,0 mL meio LB/ Amp ampicilina (150 µg/mL) com células *E. coli* *XL1BLUE*, transformadas com o plasmídio de interesse. Incubava-se o inóculo durante 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

Após o crescimento, os 3 mL do inóculo eram centrifugados por meio de duas centrifugações de 3 minutos a 3.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação:

- Ressuspendia-se o sedimento em 200 µL de Solução I. Depois incubava-se as amostras no gelo por 5 min.
- Após 5 min com a solução I, adicionava-se 400 µL de Solução II e homogeneiza-se as amostras vagorosamente várias vezes. Incubava-se no gelo por 5 min.
- Depois, acrescentava-se 300 µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubou-se no gelo por 10 min.
- Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- Recolhia-se o sobrenadante em microtubos e eram adicionados 10 µL de RNase A (na concentração de 10mg/mL) depois incubava-se por 2 horas a 37°C.
- Foram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte agitação no vortex, centrifugava-se por 5 min a 5.000 g à temperatura ambiente, e recolhia-se a fase aquosa em outro microtubo.
- Foram adicionados 300 µL de clorofil e repetiu-se o mesmo procedimento anterior de agitação intensa, centrifugação e coleta.
- Foram adicionados 2,0 v de etanol absoluto gelado e incubou-se a -20°C por no mínimo 2 horas.

- 10- Centrifugou-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
 - Foram adicionados 300 µL de etanol 70 % gelado e centrifugou-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
 - Secava-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.
 - O sedimento foi ressuspensionado em 50 µL de TE, e as amostras conservadas a -20°C.
- ✓ Em larga escala adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo IV, (Maranhão e Moraes, 2003).

Para as preparações de DNA plasmidial em larga escala, preparava-se um inóculo de 5,0 mL meio LB/Amp ampicilina (150 µg/mL) com células *E. coli XL1BLUE*, transformadas com o plasmídeo de interesse. Incubava-se o pré- inóculo durante 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

Depois, eram utilizados 1mL deste pré- inóculo para preparar um inóculo de 200mL de cultura em meio LB/ Amp (200 µg/mL). A cultura crescia durante a noite por 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

Posteriormente os 200 mL eram centrifugados durante 15 min a 3.000xg, desprezando-se o sobrenadante:

- O sedimento de células era ressuspensionado em 5 mL de Solução I sob forte agitação. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.
- Em seguida adicionava-se 10 mL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, vagarosamente diversas vezes. Depois incubavam-se as amostras no gelo por 5 min.
- Foram adicionados 7,5 mL de Solução III, repetindo o mesmo procedimento de homogeneização e incubou-se no gelo por 20 min.
- Foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- O sobrenadante era filtrado em papel de filtro umedecido e, eram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, as amostras eram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.

- Desprezou-se o sobrenadante e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento foi ressuscitado em 500 μ L de TE ao qual eram adicionados 10 μ L de RNase A. Incubou-se por 2 horas a 37°C.
- Foram adicionados 1 v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foi coletada para outro tubo.
- O passo anterior foi repetido mais uma vez.
- Foram adicionados 1 v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- Adicionaram-se 0,5 v de acetato de amônio 7,5 M e 2,0 v de etanol 100% gelado seguido de incubação por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- Foram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante.
- Foram adicionados 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- Após secagem o sedimento foi ressuscitado em 200 μ L de TE, e as amostras foram conservadas a -20°C.

3.2.2 Análise de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose.

Adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo VII (de-Souza, 2003).

O gel de agarose era preparado de acordo com a faixa de tamanho (kb) de DNA (dupla fita ou linear), em geral neste trabalho os géis eram feitos em 0,7 a 1,5 %. O tampão utilizado era o TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo.

Era acrescentado tampão nas amostras de DNA e depois, eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 1X. Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador (Pharmacia-LKB[®]) e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação.

3.2.3 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

As digestões dos plasmídios utilizados foram realizadas com enzimas de restrição conforme instruções dos fabricantes. O tempo de incubação e a quantidade de material a ser digerido variavam de acordo com o interesse do experimento realizado.

3.2.4 Eletroeluição de fragmentos de DNA em gel de agarose com o kit comercial Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit (Millipore – número de catálogo 42600).

- 1 – Preparava-se o gel de agarose com tampão TAE 1x, de acordo com o tamanho da banda a ser eletroeluída.
- 2- O tempo e a velocidade a ser aplicada na corrida, também eram proporcionais ao tamanho da banda a ser eletroeluída. Em geral, a corrida era de 4 horas a 30Volts.
- 3- A banda correspondente ao fragmento de DNA a ser purificado era cortada do gel de agarose.
- 4 – A banda era embrulhada em um envelope de parafilme e depois congelada no freezer -80 °C, por 20 minutos.
- 5 – Depois procedia-se com a maceração da banda embrulhada no envelope de parafilme, sem descongelar a agarose, a agarose congelada era transferida para as colunas do Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]).
- 6- As colunas eram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado em microtubos.
- 7- Depois acrescentava-se 50 uL de buffer EB na coluna, e repetia o processo de centrifugação.
- 8- O líquido era coletado e acrescentado ao microtubo de coleta.
- 9- Após a centrifugação o material foi precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. Procedeu-se a uma incubação a -20°C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.
- 10- No outro dia, as amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.

11- Eram adicionados 300 µL de etanol 70 % gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

12- Secava-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.

13- O sedimento foi ressuspenso em 15 µL de água Milli Q, e as amostras conservadas a -4°C.

3.2.5 Precipitação de DNA utilizando glicogênio como carreador (Silva, 2008).

O volume do material a ser precipitado foi aferido. Em seguida, acrescentou-se, na ordem, 3 µL de glicogênio 20 mg/mL, 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,0 e 2 volumes de etanol 100 % gelado. O sistema de precipitação foi incubado a - 20 °C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 45 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 200µL de etanol 70 % (v/v) gelado, centrifugando-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos para secar.

3.2.6 Ligação de fragmentos de DNA (Silva, 2008).

As concentrações de DNA (vetor: inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente numa razão molar de 1:3 ou 1:5 e aplicando-se a fórmula:

$$\frac{\text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto em pb}}{\text{tamanho do vetor em pb}} \times \text{razão inserto} = \frac{\text{ng de inserto}}{\text{vetor}}$$

As reações de ligação foram realizadas de acordo com instrução do fabricante da T4 DNA Ligase da Invitrogen. Após incubação, em geral de 16 horas a 4°C, os sistemas de ligação eram usados para transformar células de *E. coli*.

3.2.7 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.

Adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo VIII (Maranhão, 2003).

- ✓ Por choque térmico- CaCl_2 .

Preparava-se um pré-inóculo de 5 mL com tetraciclina na concentração de 50ug/mL, com uma colônia isolada da célula XL1BLUE. Incubava-se o inóculo durante 16 horas a 37°C, sob agitação de 250 rpm.

Inoculavam-se 500 μL do pré- inóculo em 50 mL de meio LB sem antibiótico. Incubava-se a 37°C com rotação de 220 rpm, até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) de 0,1 a 0,3.

Procedia-se com a centrifugação de 3.000x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e conservando as células em banho de gelo com água, procedia-se com :

- A centrifugação de 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e conservando as células em banho de gelo com água. O sedimento de células era ressuscitado em 10 mL de solução de CaCl_2 50mM estéril gelada, com movimentos suaves;
- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento era ressuscitado em 1 mL de solução de CaCl_2 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.

Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram consideradas competentes, e procedia-se com o processo de transformação.

- Os sistemas de transformação eram realizados em tubos de hemólise vedados com parafilme (uma vez que, o vidro promove a troca de temperatura melhor do que o plástico) Incubavam-se de 100 a 200 μL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- Procediam-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.

- Adicionava-se imediatamente 1 mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C.
- Para semear as placas, eram utilizadas pérolas de vidro. Semeavam-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 200 µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

✓ Por eletroporação.

Uma colônia isolada da célula de interesse foi inoculada em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37°C sob agitação de 220 rpm por 16 horas.

Inoculava-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} de 0,7 a 0,9. Posteriormente:

- Centrifugava-se a 3.000 x g por 20 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e mantendo sempre a célula gelada a partir desse momento.
- O sedimento era ressuspendido em 25 mL de glicerol 10 % estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de glicerol 10 % gelado.
- Centrifugava-se a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo-se a etapa anterior.
- O sedimento era ressuspendido em 25 mL de Glicerol 10 % estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.
- O sedimento final era ressuspendido em 1 a 2 mL de glicerol 10 % e as células eram aliqotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.
- Para a transformação, o plasmídeo, já em um tubo resfriado previamente, era adicionado à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioRad[®]) também já resfriadas.
- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessas condições era de 4,0 a 5,0 milisegundos.

- Imediatamente após o choque a cubeta era lavada com 3 mL de meio SOC e o meio era recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.
- Após uma incubação de 1 h a 37°C e 220 rpm, diluições da transformação eram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

3.2.8 Condições e preparo da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).

Os oligonucleotídeos com as seqüências controles e indutoras estão listados em materiais. A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada com a enzima Taq DNA Polymerase 100u da Invitrogen (Número de catálogo 18038-018).

Condições da PCR

Reação	Temperatura	Tempo
1- <i>Temperatura de Desnaturação</i>	95 °C	5 min.
2- <i>Temperatura de Desnaturação</i>	95 °C	1 min.
3- <i>Temperatura de Anelamento</i>	55 °C	1 min.
4- <i>Temperatura de Extensão</i>	72 °C	1 min.
5 <i>Repetiu- se 29 vezes a partir do 2</i>		
6- <i>Temperatura de Extensão</i>	72 °C	5 min.
7- <i>End</i>	4 °C	-

Preparo da PCR

DNA	Primer 5'	Primer 3'	dNTP	MgCl ₂	Buffer Taq.	Taq.	H ₂ O	Vol.Total
10 ng	<i>Xma I</i> 10 uM	<i>Xba I</i> 10 uM	10 mM	50 mM	10 x	1 uL	<i>Milli Q</i>	
1 uL	3 uL	-	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	34 uL	50 uL
1 uL	-	3 uL	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	34 uL	50 uL
1 uL	3 uL	3 uL	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	31 uL	50 uL

DNA	Primer 5'	Primer 3'	dNTP	MgCl ₂	Buffer Taq.	Taq.	H ₂ O	Vol.Total
10 ng	<i>Bgl II</i> 10 uM	<i>Xho I</i> 10 uM	10 mM	50 mM	10 x	1 uL	<i>Milli Q</i>	
1 uL	3 uL	-	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	34 uL	50 uL
1 uL	-	3 uL	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	34 uL	50 uL
1 uL	3 uL	3 uL	5 uL	2 uL	5 uL	1 uL	31 uL	50 uL

3.2.9 Cultura de células de mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células eram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH e incubadas na estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade. O meio utilizado foi o HamF12 da Gibico (para preparo), com adição de bicarbonato para manutenção do pH. O meio quando em cultura era suplementado com Soro Fetal Bovino a diferentes concentrações, sendo utilizado o Soro Fetal Bovino Low IgG a 1,25% durante o acúmulo de sobrenadante.

3.2.10 Descongelamento de células CHO-K1 e passagem de células (Silva, 2008).

1- Primeiramente, descongelou-se a 37°C criotubos com alíquotas de células CHO-K1 preservadas em nitrogênio líquido, colocou-se em meio Ham-F12 acrescido de soro fetal bovino 20%.

2- Centrifugou-se a 1.300 rpm por 5 minutos.

3- As células foram ressuspensas e depois plaqueadas na densidade de 2×10^2 por garrafa de 25cm^2 em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB com antibiótico-antimicótico 1% e incubadas a 37°C , 5% de CO_2 e 70% de umidade.

3.2.11 Tripsinização, passagem das células e formação de monocama celular (Silva, 2008).

Após o descongelamento e passagem para as garrafas de 25cm^2 , quando as células atingiam a confluência total de 100% elas eram tripsinizadas e transferidas para garrafas de 75cm^2 , posteriormente quando atingiam 100% de confluência além da tripsinização e da transferência para garrafa maior de 150cm^2 , também era realizado o congelamento de alíquotas. O protocolo para tripsinização tem poucas modificações em relação ao tamanho da garrafa:

1 – O meio de cultura da garrafa era descartado.

2 – Eram adicionados 3 mL de tripsina para garrafas com 25cm^2 , para garrafas com 75cm^2 5 mL, e para garrafas com 150cm^2 7 mL. Logo após a adição de tripsina, as garrafas eram homogeneizadas até a tripsina ficar um pouco turva.

4 – Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu.

5 – Para neutralizar a ação da tripsina, acrescia-se o dobro de meio cultura do que foi colocado de tripsina, o meio utilizado era suplementado com 30% de SFB.

6 – A suspensão celular era transferida para tubos tipo falcon de 50 mL, e centrifugados a 1.300 rpm por 8 minutos.

7 – O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspense em 3 mL de meio acrescido de 10% SFB.

8 – Era transferida toda a população células para garrafas de: 25cm², 75 cm² ou 150 cm² contendo respectivamente: 5, 10, ou 20 mL de meio HamF12 acrescido de 10%SFB.

9-. Foram realizadas 5 passagens para garrafas de 150 cm².

3.2.12 Congelamento de células CHO – Criopreservação (Ruggiero, 2002).

1 – As células em cultura aderente eram tripsinas, como descrito no item anterior.

2 – A suspensão celular era então transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL, ao qual se adicionava- se o dobro de meio Ham-F12 acrescido de 10 % de Soro fetal bovino (SFB), para a inativação da tripsina que é nociva as células.

3 – As células eram centrifugadas a 1300 rpm por 8 minutos.

4 – O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspense no meio de cultura remanescente do tubo.

5 – As células eram ressuspendidas com 5 mL de meio para congelamento, preparado na seguinte proporção: 45% de meio HamF12, 45% de SFB e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido).Depois, distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos.

6 – Os criotubos eram incubados a 4 °C por 30 minutos, depois a – 20 °C por 30 minutos e depois a – 80 °C durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a esta temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

3.2.13 Determinação da viabilidade celular por meio da contagem em câmara de Neubauer (Silva, 2008).

1 – As células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 5 mL de meio Ham F12 com SFB a 10%.

2 – As células foram centrifugadas a 1300 x g por 8 minutos.

- 3 – O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 3 mL de meio de cultura Ham F12 com SFB a 10%.
- 4 – Vinte microlitros da suspensão celular eram incubados com 80 µL da solução de Azul de Tripán (diluição de 5 vezes da cultura).
- 5 – A câmara de Neubauer era montada, e nela aplicou-se um volume de 10 µL da mistura.
- 6 – Eram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não-viáveis (azuis). A célula não-viável tem a membrana celular mais permeável, e por isso, o corante entra na célula, tornando-a azul.

3.2.14 Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer (Silva, 2008).

- 1 – As células eram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura.
- 2 – A câmara de Neubauer era coberta com a lamínula e eram aplicados 10 µL de suspensão de células em cada compartimento da Câmara. Caso alguma diluição tivesse sido necessária, o número de células contado era multiplicado por esse fator de diluição.
- 3 – As células eram observadas em microscópio óptico (na objetiva com aumento de 40 vezes) e contadas nos 4 quadrantes externos. Em seguida, era utilizada a fórmula:

$$\frac{\text{número de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{número de quadrantes contados}} = \text{n}^\circ \text{ de células / mL}$$

3.2.15 Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection, nº de catálogo 101-01N).

O reagente JetPEI consiste em um polímero catiônico derivado de polietilenimina linear, e tem como objetivo inibir a formação de complexos de DNA, permitindo a transfecção do DNA na célula.

- 1- Após as 5 passagens de células CHO-K1, plaqueo- se 2×10^4 , de células viáveis com 2 mL de meio HAM e SFB 10% em placas para cultura de células com 6 poços.

Essas células foram transfectadas quando atingiam uma confluência na placa entre 50 a 60%, essa confluência ocorria após 24 horas.

2- Para transfectar as células CHO-K1, placas de 6 poços foram divididas em três grupos de acordo com a versão do plasmídeo pCOMIRES Δ 600: placas A foram transfectadas com o plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão A (Vk A27/ humanVH1-46), placas O com plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão O (V am4/ mouse VH J558.4) e, placas L com o plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão L (V kL1/ humanVH1-46).

3- Cada placa de cultura foi semeada cerca de 2×10^4 células por poço, adicionando-se em seguida 2 mL de meio acrescido de 10 % SFB e solução de antibiótico/antimicótico.

4- As células foram incubadas na estufa a 37°C, 5 % de CO₂ e 70 % de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência ideal de 50 a 60 %.

5- Para a transfecção de Células CHO em placas de 6 poços, as células tinham aproximadamente 60% de confluência no momento da transfecção.

6- Foi diluído 1 μ g de DNA em 100 μ l do buffer jetPEI™ em um microtubo. Homogeneizou-se e o microtubo foi agitado no vórtex por 10 segundos.

7- Em seguida adicionou-se 2 μ l de reagente jetPRIME™. Agitou-se no vórtex, por 10 s, e homogeneizou-se por *spin* rapidamente.

8- Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente.

9- Posteriormente, foram adicionados 100 μ l da mistura de transfecção, gota a gota, por poço com as células em meio de crescimento celular normal.

10- Homogeneizou-se suavemente as placas para trás e para os lados..

11- Após 4 h de transfecção o meio de crescimento foi trocado e as placas retornavam para estufa a 37°.

12- O resultado era analisado 48 horas depois.

3.2.16 Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina[®] (G418-Sulfato).

1 - Após 48 horas da transfecção o meio foi trocado por outro com geneticina a uma concentração de 400 μ g/mL em todos os poços transfectados com o plasmídeo e também nos poços controle, com células não transfectadas.

2- Após 48 horas, foi realizada outra troca de meio, mas com a concentração de geneticina a 600 µg/mL.

3 – Posteriormente o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias nas mesmas condições descritas anteriormente e visualizava-se, ao microscópio ótico, a morte celular no poço controle de células não transfectadas, que ocorre quando essas células mudam sua morfologia de elípticas para esféricas e perdem a aderência à placa de cultura.

4- Quando observava-se a morte das células não transfectadas e que as células nos poços transfectados com os plasmídios atingiram uma confluência de aproximadamente 60%, essas células passavam para as garrafas de 15 cm².

3.2.17 Análises dos sobrenadantes de cultura em placas de microtitulação por meio de ELISA.

Eram realizadas análises dos sobrenadantes de cultura em placas de microtitulação por meio de ELISA sandwiche, utilizando os anticorpos descritos na seção de materiais. As placas permaneciam vedadas durante as incubações, e após as etapas de lavagens, elas eram invertidas e batidas em uma pilha de papel toalha. Três poços eram utilizados como background, onde procedia-se com a incubação de PBS.

1- As placas eram sensibilizadas com 150µL do anticorpo de Cabra anti- IgG humana (H+L) diluído com PBS em 1:1000.

2- Após 2 horas de sensibilização, as placas eram lavadas 3 vezes com 200 uL de tampão PBST.

3- Incubavam-se as placas com 200 uL de solução bloqueio (PBS com 5% de leite em pó) em temperatura ambiente por 2 horas.

4- Após a incubação, as placas eram lavadas 3 vezes com 200 uL de tampão PBST.

5- As amostras eram colocadas nos poços: as diluições tanto da curva padrão como das amostras eram: 1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81. A curva padrão era realizada com a IgG humana, e iniciava-se na concentração de 113ng/mL.

6- As amostras eram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas.

7- Após a incubação, as placas eram lavadas 3 vezes com 200 uL de tampão PBST.

- 8- Depois, acrescentavam-se 150 uL do anticorpo de Cabra anti-Fc humana conjugado com fosfatase alcalina, na diluição de 1:5000.
- 9- As amostras eram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas
- 10- Após a incubação, as placas eram lavadas 3 vezes com 200 uL de tampão PBST e uma vez com 200 uL de tampão APB (tampão para fosfatase alcalina).
- 11- Preparava-se a solução reveladora utilizando o Kit pNPP (p-nitrophenyl phosphate) da ThermoScientific, e depois acrescentava-se 200 uL desta solução em todos os poços.
- 12- Procedia-se com a leitura dos poços após incubação de 3 minutos com a placa embrulhada em papel alumínio. A leitura era realizada no leitor de ELISA *Microplate reader Biorad*, modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm. Eram considerados os valores do controle com PBS e os valores da curva padrão para realizar os cálculos das concentrações dos sobrenadantes.

3.2.18 Purificação de Proteínas com a coluna His Trap da GeHealthCare e concentração das amostras eluídas com a coluna Centricon da Millipore.

- 1- Primeiramente foi montada a bomba peristáltica para ser utilizada com a coluna.
- 2- Desempacotou-se a resina na coluna, e depois colocou-se a coluna em posição vertical até que ela voltasse a ficar empacotada.
- 3- Abriu-se a mangueira da bomba peristáltica e filtrou-se 10 mL de Biding Buffer.
- 4- Posteriormente, foi colocado o sobrenadante diluído na proporção de 1:1 com Biding Buffer;
- 5- Assim que todo o sobrenadante foi passado pela coluna, colocou-se 30 mL de Biding Buffer.
- 6- Após a passagem dos 30 mL, foi colocado 20 mL de Elution Buffer.
- 7- A eluição foi coletada em 20 microtubos.
- 8- Depois foram passados mais 10 mL de Biding Buffer na coluna.
- 9- Após este processo a coluna foi lavada com água Milli Q. com azida sódica a 0,5%.
- 10- Posteriormente foram feitas análises por Dot Blot das frações eluídas da coluna.
- 11- Procedeu-se a concentração das amostras com a coluna Centricon da Millipore.
- 12- A coluna foi centrifugada a 7.500 g por 10 minutos com tampão PBS.

13- Depois inverteu- se a coluna e colocou- se as amostras diluídas 1:1 com tampão PBS.

14- Centrifugou- se a 7.500 g por 10 minutos com tampão PBS.

15- Coletou- se as amostras em microtubos.

3.2.19 Análise de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante

Adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo XII (Silva-Pereira, 2003).

A eletroforese unidimensional em gel SDS- PAGE (SDS- PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrilamide Gel Eletrophoresis) foi utilizada para determinar a massa molecular dos FvFc's recombinantes após as etapas de purificação. Foram preparados dois géis SDS- PAGE, um foi corado com a coloração de prata, e o outro foi transferido para uma membrana de nitrocelulose para ser feito o Western- Blot.

1- Primeiramente foi montado o aparato de eletroforese: limpeza das placas, montagem das placas com os espaçadores laterais.

2- Preparou- se a solução do gel separador na concentração de 12% de policacrilamida (proporcional a 55 kDa), removeu- se bolhas com butanou e depois lavou- se o gel com água Milli Q.

3- Manteu- se a placa em posição vertical, até que a polimerização do gel terminasse.

4- Preparou- se a solução com o gel concentrador, vertendo sobre o gel separador e, introduzindo o pente para a formação de poços.

5- Após a polimerização do gel concentrador, removeu- se o pente.

6- Posteriormente as amostras foram preparadas: adicionou- se o tampão de amostras contendo β - mercaptoetanol 4%, e depois cada amostra foi fervida a 100°C durante 5 minutos.

7- As amostras foram aplicadas nos poços com os marcadores. Descritos em materiais.

8- As condições de migração do gel foram: 20 mA (miliampéres), voltagem 300 v, durante 4 horas.

3.2.20 Coloração do gel SDS-PAGE com o kit comercial Proteo Silver Stain da Sigma.

- 1- Após a eletroforese o gel SDS- PAGE foi fixado por 40 minutos com a solução de fixação em uma placa de petri de vidro;
- 2- Depois a solução de fixação foi desprezada e o gel foi lavado com 100 mL de etanol 30% por 10 minutos.
- 3- Lavou- se o gel com 100mL de água Milli Q.
- 4- Incubou- se o gel com a solução de sensibilização por 10 minutos.
- 5- Depois a solução de sensibilização foi desprezada e colocou- se 100 mL da solução equilibrada com prata, por 10 minutos.
- 6- Desprezou- se a solução e incubou- se com água Milli Q. por 1 minuto.
- 7- Depois a água foi desprezada e incubou- se o gel com a solução reveladora por 10 minutos.
- 8- Após o aparecimento das bandas do gel SDS- PAGE, adicionou- se 5 mL da solução Stop Proteo Silver.
9. Depois a solução foi desprezada e o gel foi armazenado com água Milli Q.

3.2.21 Análise das proteínas recombinantes por Western Blot

Adaptado do livro Técnicas Básicas de Biologia Molecular. Capítulo XIII (Brígido, 2003).

Após realizada a corrida do gel SDS- PAGE, um dos géis preparados no item 3.2.20, foi transferido para uma membrana de nitrocelulose.

- 1- Foram cortados 12 pedaços de papel filtro Whatman e um pedaço de membrana de nitrocelulose (todos do tamanho do gel que foi transferido).
- 2- A membrana de nitrocelulose e os papeis filtros, foram molhados com o tampão de transferência.
- 3- Montou-se um sanduíche com os papeis filtros e a membrana de nitrocelulose com o gel no meio. E colocou- se sobre o eletrodo de grafite.
- 4- A transferência do gel procedeu- se com 80 mA, 10 V, por cerca de duas horas.

- 5- Após o gel ser transferido para a membrana de nitrocelulose, a membrana foi incubada por 2 horas com a solução bloqueio (PBS com 5% de leite em pó Mólico).
- 6- A membrana de nitrocelulose foi lavada com PBST por 3 vezes.
- 7- Após as lavagens, incubou- se por 2 horas o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, F(ab')₂-Goat anti-Human IgG Fc.
- 8- Depois foram feitas 3 lavagens com PBST.
- 9- Após as lavagens adicionou- se a solução reveladora Immun-Blot[®] Opti-4CN[™] da Bio rad.

Resultados e Discussão

4.1 Clonagem dos scFvs humanizados e murino no vetor de expressão pCOMIRES Δ 600.

Como descrito na introdução, foram sintetizadas quimicamente no vetor pBSK duas versões scFvs humanizadas e uma versão scFv murina similar a do Rituximabe original, respectivamente: A (humanVH1-46/ V κ A27), L (humanVH1-46/ V κ L1) e O (VHJ558.4/V κ am4). Primeiramente, o vetor de escolha para as etapas de clonagens foi o vetor de expressão em células de mamíferos pCOMIRES Δ 600 desenvolvido por Quilici (2008). Este vetor possibilitou a produção heteróloga das proteínas recombinantes em células de mamíferos. Nos desenhos gênicos foram inseridos sítios para clivagem com enzimas de restrição, de forma a possibilitar a clonagem no vetor pCOMIRES Δ 600 (Quilici, 2008). As versões scFvs sintetizadas quimicamente no vetor pBSK, e os sítios para clivagem dos scFvs correspondem as endonucleases *Xma* I e *Xho* I, presentes também em sítios únicos no vetor pCOMIRES Δ 600, com uma versão scFv anti-CD3 humanizada.

O vetor pCOMIRES Δ 600 possui os genes que codificam os domínios CH2 e CH3 do fragmento cristalizável de imunoglobulina humana IgG, que estão presentes entre o sítio da enzima *Xho* I e da enzima *EcoR* I, de forma que a proteína liberada pela célula de mamífero corresponda ao fragmento FvFc do anticorpo (Silva *et.al.*, 2009). O vetor pCOMIRES Δ 600, também possui: gene para resistência á ampicilina (*bla*), que facilita a manipulação em bactéria e o gene NEO^R que confere as células CHO resistência á geneticina, com isso selecionando transfectomas estáveis (Silva *et.al.*, 2009). Outra característica importante é que o gene de resistência a geneticina (NEO^R) está clonado a jusante ao elemento *IRES (Internal Ribosome Entry Site)*.

Nas etapas de clonagens das versões e também na amplificação dos plasmídios originais, foram utilizadas células *Escherichia coli*, linhagem XL1BLUE, a qual possui o gene de resistência à tetraciclina. As extrações e purificações de DNA plasmídial em pequena escala foram feitas com os protocolos experimentais descritos em materiais e métodos, e as extrações em grande escala foram realizadas com Kit Quiagen. Após as extrações, os plasmídios foram clivados com as enzimas *Xma* I e *Xho* I, o vetor e os fragmentos foram eletroeluídos em gel de agarose preparados com tampão TAE. Posteriormente os fragmentos scFvs foram

ligados ao vetor pCOMIRES Δ 600 com T4 DNA ligase da Invitrogen. Esta estratégia de clonagem encontra-se representada na figura 10.

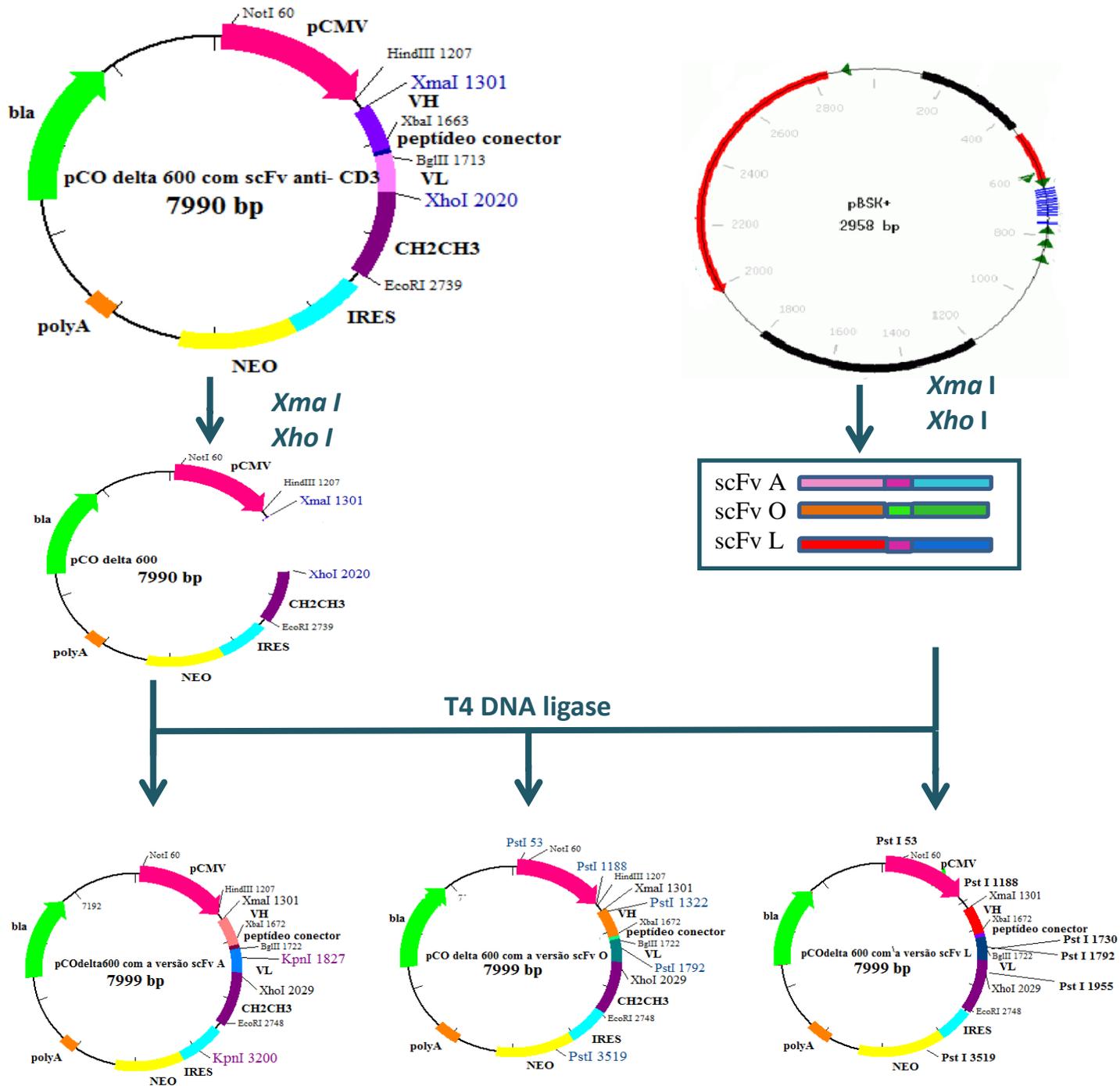


Figura 10. Desenho esquemático da estratégia de clonagem com o vetor de expressão em células de mamíferos pCOMIRESΔ600. Demonstração da clivagem dos vetores com as endonucleases *XmaI* e *XhoI*. Os fragmentos scFvs foram ligados, individualmente, ao vetor pCOMIRESΔ600 com T4 DNA ligase. Componentes do vetor pCOMIRESΔ600: *bla* (gene de resistência a ampicilina), pCMV (peptídeo sinal), genes para fração Fc de IgG (CH2CH3), IRES, NEO^R, e poly A.

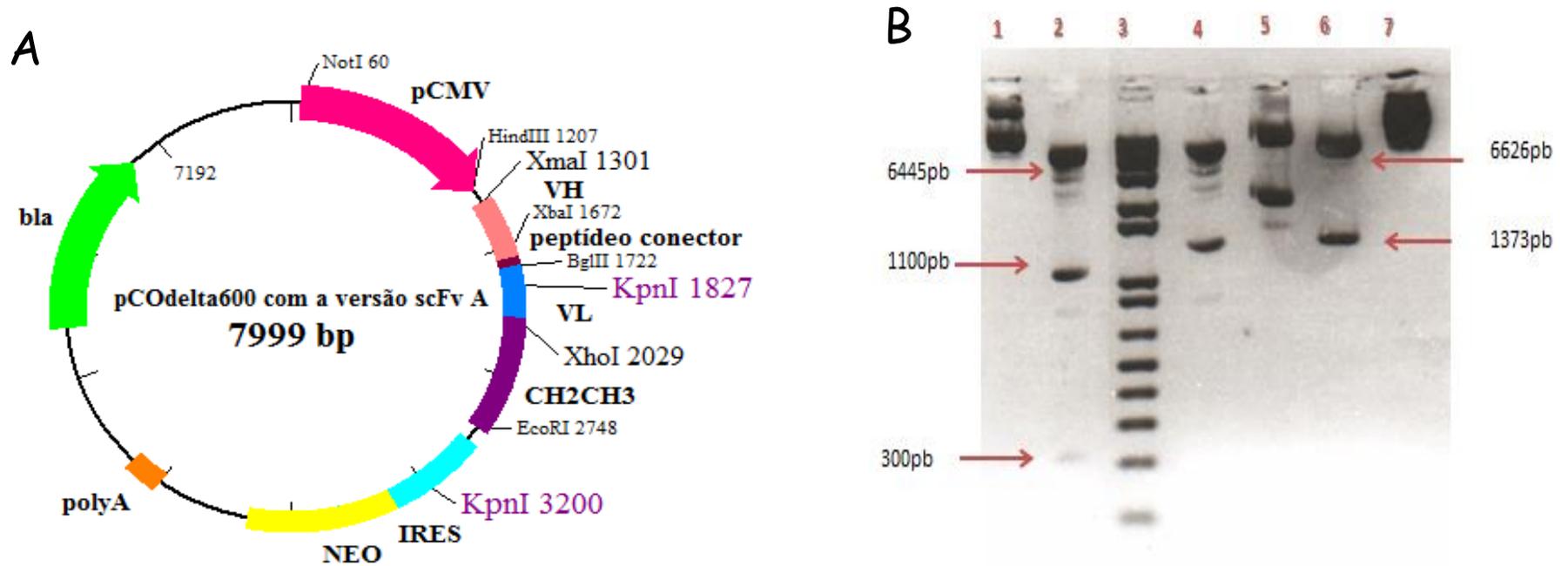
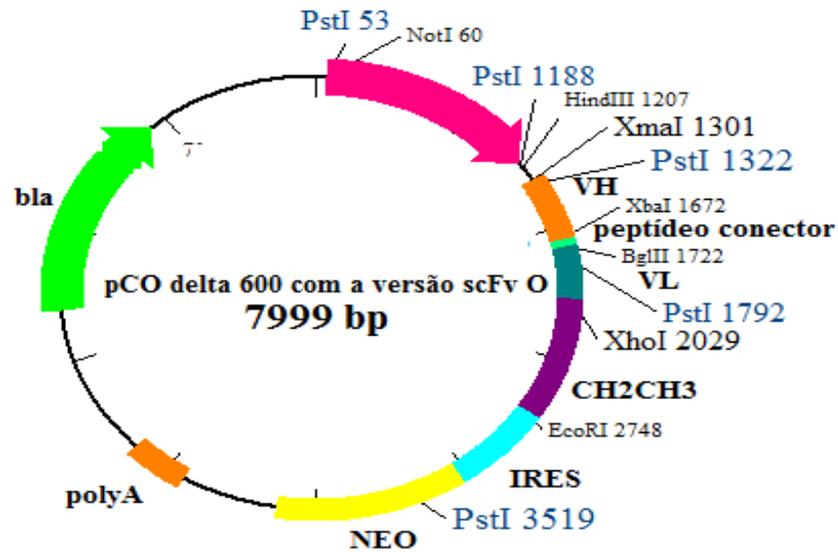


Figura 11. Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv A e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose. Em A desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv A (human VH1-46/ V κ A27); B: foram realizadas digestões com a enzima *Kpn* I para diferenciar os clones recombinantes do plasmídeo parental original (pCOMIRES Δ 600 versão scFv anti- CD3), 1- : pCOMIRES Δ 600 anti-CD3 intacto; 2- : pCOMIRES Δ 600 anti-CD3 digerido com *Kpn* I (bandas:6445, 1100, 300); 3-:1kb DNA ladder Plus (Invitrogen); 4-: pCOMIRES Δ 600 scFv A intacto; 5- : pCOMIRES Δ 600 scFv A digerido com *Kpn* I (bandas: 6626,1373); 6- : pCOMIRES Δ 600 scFv A digerido com *Kpn* I (bandas: 6626,1373) ; 7-: pCOMIRES Δ 600 scFv A intacto.

A



B

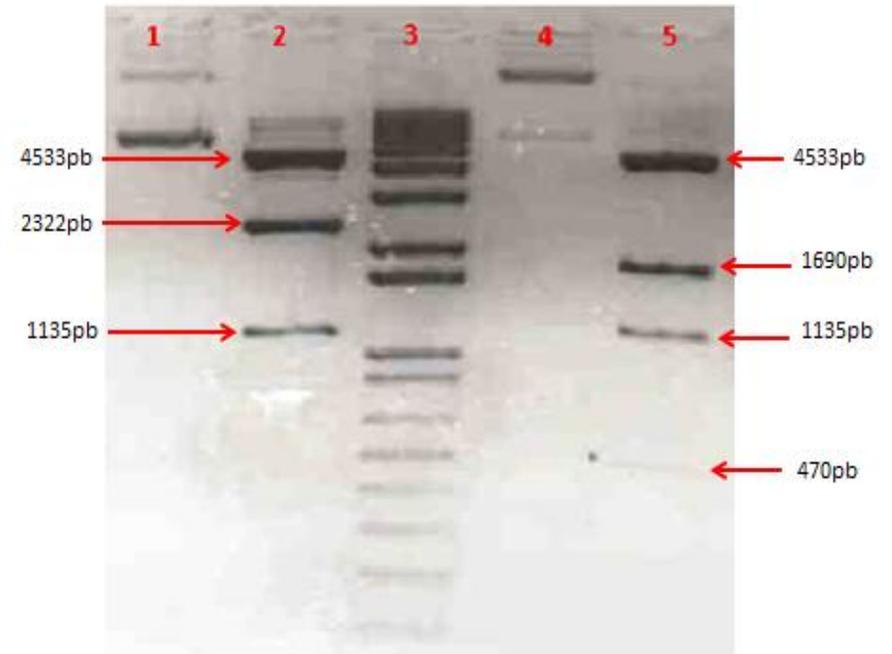


Figura 12. Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão murina scFv O e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose. Em A desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão murina scFv O (VH J558.4/ V κ am4); B: foram realizadas digestões com a enzima *Pst* I para diferenciar os clones recombinantes do plasmídeo parental original (pCOMIRES Δ 600 versão scFv anti-CD3). 1- pCOMIRES Δ 600 versão scFv anti- CD3 intacto; 2: pCOMIRES Δ 600 versão scFv anti- CD3 clivado com *Pst* I (bandas:4533,2322,1135); 3: 1kb DNA ladder Plus (Invitrogen); 4: pCOMIRES Δ 600 scFv murino intacto; 5: pCOMIRES Δ 600 scFv murino digerido com *Pst* I (bandas:4533, 1690, 1135, 470, 162).

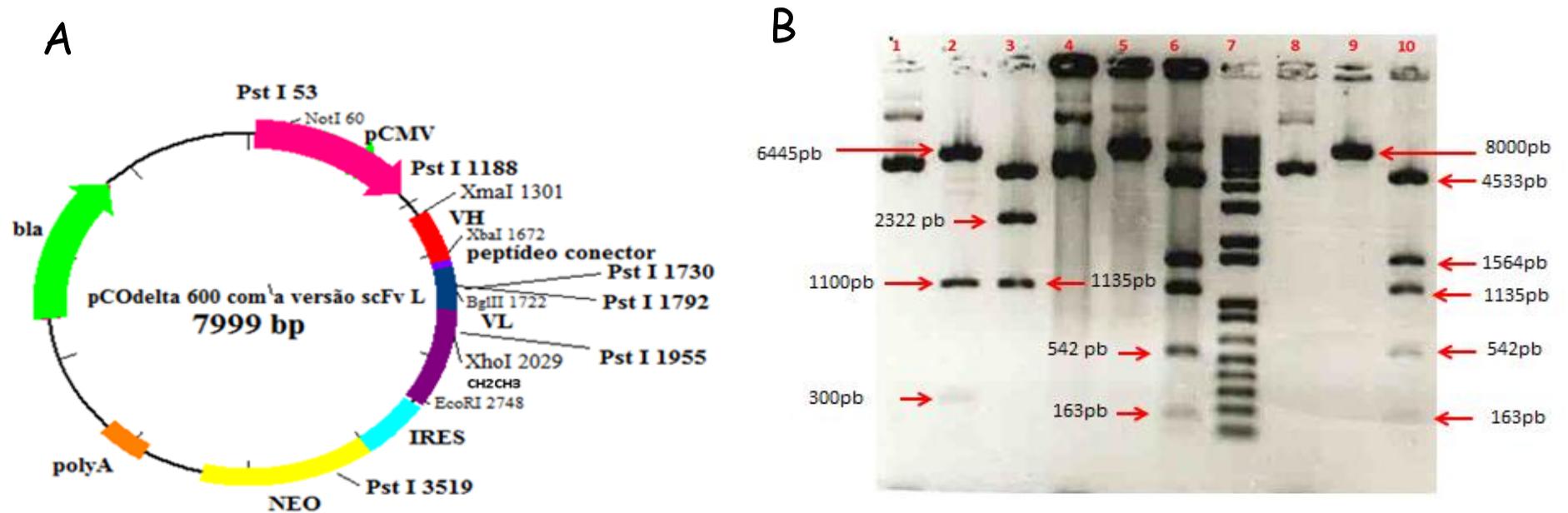


Figura 13. Desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv L e análise comparativa do perfil de restrição em gel de agarose. Em A desenho esquemático do vetor pCOMIRES Δ 600 com a versão humanizada scFv L (humanVH1-46/ V κ L1); B: foram realizadas digestões com as enzimas *Kpn* I e *Pst* I para diferenciar os clones recombinantes do plasmídeo parental original (pCOMIRES Δ 600 versão scFv anti- CD3). 1- pCOMIRES Δ 600 anti-CD3 intacto; 2- pCOMIRES Δ 600 anti-CD3 digerido com *Kpn* I (bandas: 6445, 1100, 300 pb); 3- pCOMIRES Δ 600 anti-CD3 digerido com *Pst* I (bandas:4533,2322,1135 pb). Dois clones recombinantes foram analisados, sendo os poços 4 a 6 referentes ao clone 1, e 8 a 10, ao clone 2. Todos foram digeridos com *Kpn* I (banda única de 8000 pb, poços 5 e 9) e com *Pst* I (bandas:4533, 1564, 1135, 542, 163, 62pb poços 6 e 10). Os clones recombinantes intactos são mostrados nos poços 4 e 8. O marcador de massa molecular 1kb DNA ladder Plus_ Invitrogen está mostrado no poço 7.

Após as análises do perfil de restrição dos clones recombinantes em comparação ao pCOMIRES Δ 600 com scFv anti- CD3, foram feitas as análises de PCR. As condições padrões para estas análises estão descritas em materiais e métodos. O objetivo foi verificar se os primers desenhados amplificavam os domínios VH e VL das versões scFvs. O primeiro par de primers *Xma* I e *Xba* I amplifica os domínios VH, enquanto que o segundo par de primers *Bgl* II e *Xho* I amplifica os domínios VL (Figura 16).

Como já descrito na Introdução, na humanização dos dois fragmentos scFvs das versões A e L, objetivou-se manter as CDRs murinas da molécula quimérica original. Logo, o desenho dos primers teve como base as CDRs 1 e 3 dos domínios VH e VL, uma vez que são idênticas nas três versões. A figura 14 mostra a estratégia para esta PCR, e a figura 15 mostra a análise em gel de agarose 1,5% do resultado da PCR das três versões.

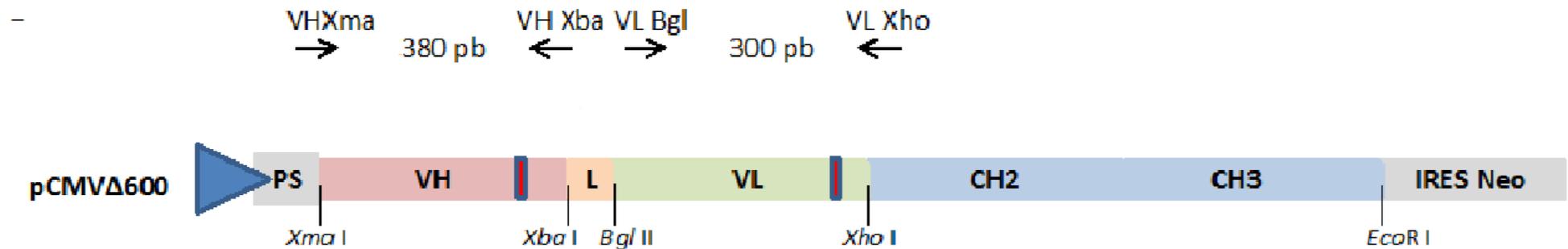


Figura 14: Desenho esquemático dos primers utilizados para a confirmação das clonagens por PCR.

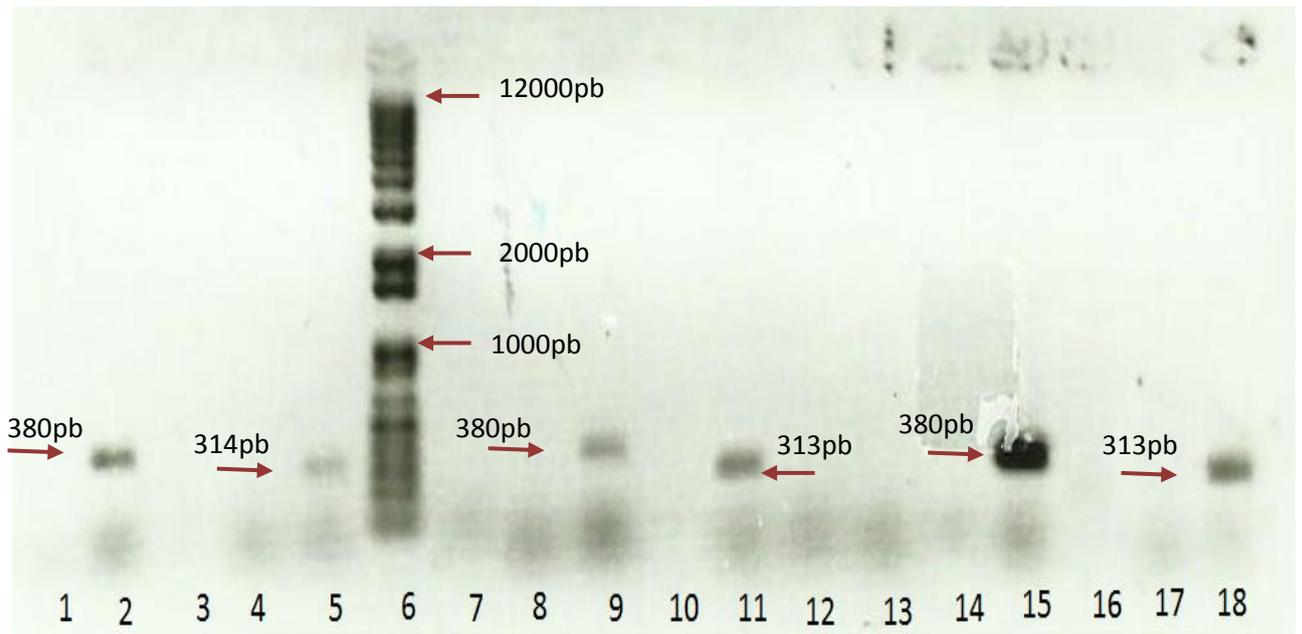


Figura 15: Análise em gel de agarose 1,5% com o resultado da PCR das três construções. No poço nº 2 a VH da versão O com 380 pb e no poço 5 a VL da versão O com 314 pb; no poço nº 9 a VH da versão A com 380 pb e no poço 11 a VL da versão A com 313 pb; no poço nº 15 a VH da versão L com 380 pb e no poço 18 a VL da versão L com aproximadamente 300 pb. No poço nº 6 o marcador 1kb DNA ladder plus da Invitrogen.

4.2 Obtenção de populações mistas de células CHO-K1 produtoras dos FvFc recombinantes.

Nesta etapa foram utilizadas células de ovário de hamster chinês versão K1 (CHO-K1), uma vez que, são consideradas um sistema de expressão heteróloga e produção eficiente para anticorpos (Gaillet et.al., 2010). Essas células epiteliais de morfologia fibroblastóide são aderentes e capazes de produzir os fragmentos FvFc com fidelidade em relação as modificações pós-traducionais, como por exemplo a glicosilação dessas proteínas (Gaillet et.al., 2010).

Como descrito em materiais e métodos as células CHO-K1 foram transfectadas quando atingiram uma confluência na placa entre 50 a 60%, essa confluência ocorria após 24 horas.

Estas células foram transfectadas na presença de 2µg de plasmídio com

lipossomas (JetPEI). Para tanto, dividimos as placas em três grupos de acordo com a versão do plasmídeo pCOMIRES Δ 600: placas A foram transfectadas com o plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão A (humanVH1-46/V κ A27), placas O com plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão O (VH J558.4/V κ am4) e, placas L com o plasmídeo pCOMIRES Δ 600 versão L (humanVH1-46/V κ L1).

Após 48 horas, as células transfectadas foram mantidas na presença do antibiótico geneticina para a seleção da população mista de células CHO-K1 produtores dos FvFcs recombinantes. A concentração de geneticina que melhor se adequou para manter as células transfectadas foi 600 ug/mL. Sendo que, nas primeiras 48 horas a pressão seletiva foi de 400 ug/ mL, depois as pressões seletivas foram de 600 ug/mL. Pois, a produção das proteínas recombinantes foi extremamente baixa nas concentrações 500 ug/ mL e 800 ug/mL.

Embora, a obtenção de clones estáveis seja a mais adequada para atingir altos níveis de produção, ela requer mais tempo, decidiu-se trabalhar com a população mista de células CHO- K1 produtoras dos FvFcs recombinantes, segundo Silva 2008, esta estratégia é possível embora não seja a mais eficaz. Assim que as células sobreviveram e atingiram a confluência de 60%, as células foram tripsinizadas e transferidas para garrafas de 15 cm². O sobrenadante de cultura foi avaliado quanto á presença de FvFc por meio de imunodeteção ELISA

O método “ELISA sanduíche” foi utilizado para confirmar a produção dos FvFcs recombinantes. O anticorpo de Cabra anti-IgG humana (H+L) utilizado na sensibilização das placas e o anticorpo de Cabra anti-Fc humana conjugado com fosfatase alcalina, mostram a fusão dos scFvs aos domínios CH2 e CH3 clonados no vetor pCOMIRES Δ 600, e que, também foi possível a expressão da molécula FvFc inteira. Os anticorpos utilizados e a metodologia estão descritos na seção de materiais e métodos.

Após esta etapa, antes das células serem transferidas para as garrafas de 75 cm², foi feita a contagem de células viáveis produtoras dessas proteínas recombinantes, para cada construção: L= $18 \cdot 10^5$, A= $19 \cdot 10^7$, e O= $17 \cdot 10^7$.

Como a quantidade de células era suficiente para o crescimento e produção dos FvFcs recombinantes, passamos a reduzir a concentração do SFB de 10% para

5% após 48h, depois de 5% para 2,5% após 48h no meio de cultura, depois para 1,25% com low IgG após 48h com. A utilização do soro fetal bovino em baixas concentrações no meio de cultura, se faz necessária para minimizar a contaminação com proteínas do soro fetal bovino, melhorando a purificação das proteínas recombinantes. Assim como foi necessário retirar a geneticina do meio de cultura, para diminuir o stress da célula.

Essa diminuição gradativa é relevante não só para adaptação das células que necessitam de SFB para aderirem, mas também para que o promotor CMV não se torne responsivo a quantidades reduzidas de SFB e passe a regular negativamente o processo de transcrição (Silva et.al., 2009). Logo, a cada 48h o sobrenadante era recolhido para análises por meio de imunodeteccção ELISA, para as avaliações quantitativas do sobrenadante com low IgG em relação a produção dos FvFcs recombinantes.

Tabela 4: Quantificação estimada do total de proteínas recombinantes em ng/mL, referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão O.

Garrafas	Média de Produção dos FvFcs em ng/mL	Total em mL	Semanas	Quantificação Total
O1	11,22 ng/mL \pm 0,019	45	3	504,9 ng/mL
O2	7,01 ng/mL \pm 0,015	90	6	630,9 ng/mL
O3	3,59 ng/mL \pm 0,008	150	10	538,5 ng/mL

Tabela 5: Quantificação estimada do total de proteínas recombinantes em ng/mL, referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão A.

Garrafas	Média de Produção dos FvFcs em ng/ mL	Total em mL	Semanas	Quantificação Total
A1	2,01 ng/mL \pm 0,003	150	10	301,5 ng/mL
A2	2,2 ng/mL \pm 0,012	120	8	264 ng/mL
A3	2,9 ng/mL \pm 0,012	135	9	391,5 ng/mL
A4	5,53 ng/mL \pm 0,025	45	3	249 ng/mL
A5	6,27 ng/mL \pm 0,006	75	5	470,25 ng/mL
A6	4,24 ng/mL \pm 0,020	90	6	381,6 ng/mL

Tabela 6: Quantificação estimada do total de proteínas recombinantes em ng/mL, referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa da versão L.

Garrafas	Média de Produção dos FvFcs em ng/ mL	Total em mL	Semanas	Quantificação Total
L1	15,59 ng/mL \pm 0,020	45	3	701,55 ng/mL
L2	11,76 ng/mL \pm 0,007	60	4	705,6 ng/mL
L3	7,06 ng/mL \pm 0,014	75	5	529,5 ng/mL

Estes sobrenadantes eram congelados semanalmente com inibidores de protease e posteriormente foram purificados.

Diante dos resultados apresentados, a melhor alternativa foi manter a pressão seletiva das células sempre que a produção caísse, e retirar esta pressão seletiva sempre que a quantidade de células aderidas com a morfologia fibroblastóide fosse muito reduzida e não houvesse mais produção das proteínas recombinantes. Com isso, foi feito o acúmulo de muito sobrenadante, durante algumas semanas.

As tabelas mostram a quantidade em mL que foi acumulada de cada garrafa e o número de semanas (uma vez que a troca de meio era realizada semanalmente), foi estimado a quantificação total em ng/mL referente ao acúmulo de sobrenadante de cada garrafa.

4.3 Produção e purificação das proteínas recombinantes

O sobrenadante de cultura, das proteínas recombinantes que foram produzidas a partir das culturas de populações mistas de células CHO-K1 transfectadas obtidas como descrito no item anterior, foram submetidos a uma cromatografia de afinidade, utilizando a coluna HITRAP protein A HP da GE, uma vez que a proteína A tem afinidade a Fc humana. Após a purificação as frações coletadas da coluna foram quantificadas por ELISA. Depois foram analisadas quanto ao grau de pureza destes fragmentos de

interesse por meio de SDS-PAGE e posteriormente Western-Blot. Após a purificação das proteínas recombinantes a quantidade estimada para cada versão foi de: 596 ng para versão A, 906 ng para versão O, e 1.273 ng para versão L.

Como podemos perceber o grande acúmulo de sobrenadante com baixas concentrações de proteínas, interfere na quantidade total de proteínas após a purificação, porque ocorreu uma perda substancial durante este processo. Embora a perda de proteínas recombinantes durante este processo foi baixa.

Após a purificação, os sobrenadantes foram concentrados utilizando a membrana de celulose Centricon da Millipore. Na construção L obtivemos a maior produção e concentração enquanto que na versão A não foi possível obter a mesma proporção após a purificação dos FvFcs recombinantes.

No caso, a proteína A produzida pelo *Staphylococcus aureus* tem alta afinidade a fração Fc da IgG 1 da imunoglobulina humana. Logo, o princípio desta técnica contribuiu muito para uma boa purificação. A figura 16 mostra o gel SDS- PAGE de poliacrilamida desnaturante com coloração prata e a figura 17 o gel Western Blot, os fragmentos FvFcs possuem 55 kDa.

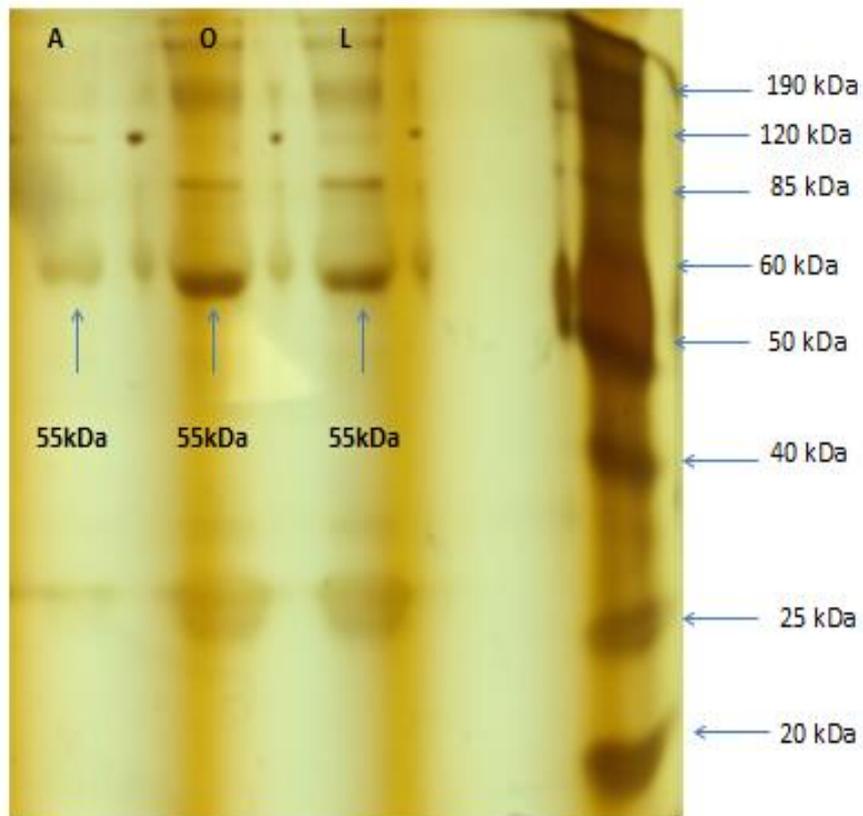


Figura 16 Gel SDS-PAGE mostrando as três construções, após os processos de purificação. Os fragmentos FvFcs possuem 55 kDa, respectivamente A, O e L. Ao lado o marcador de proteínas da Invitrogen BenchMark pre-stained.

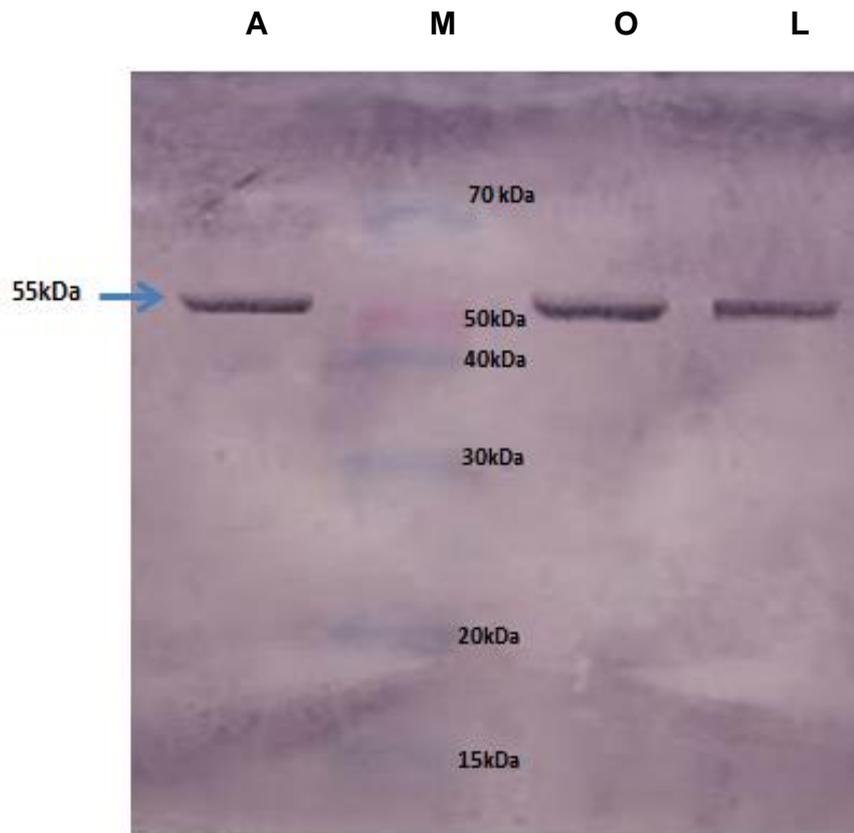


Figura 17 Análise por Western Blot dos fragmentos FvFcs A, O e L, após os processos de purificação. Os fragmentos FvFcs A, O e L, possuem 55 kDa. O M representa o marcador de proteínas Nexus Pointer Mid Range Dual Color da Bionexus.

Os resultados demonstram que os três plasmídios podem promover a expressão das proteínas recombinantes em células CHO- K1 e, é possível produzir essas proteínas trabalhando com populações mistas destas células.

Com esses resultados é possível concluir que o vetor influenciou positivamente no processo de produção das proteínas recombinantes. Foi demonstrado por Quilici e colaboradores (2013), que a versão truncada $\Delta 600$ do Intron A presente na posição downstream do promotor CMV deste vetor de expressão, pode melhorar a expressão heteróloga de fragmentos de anticorpos humanizados, uma vez que, este vetor quando utilizado na transfecção de células CHO- K1 e HepG2 aumentou a expressão gênica do gene repórter da Luciferase (dado também demonstrado por qPCR: aumento dos níveis de mRNA) (Quilici, *et.al.*

2013). Logo, o pCOMIRES Δ 600 é uma ótima alternativa para produção destas proteínas recombinantes.

Além do desempenho do vetor, as condições da cultura são extremamente relevantes para que as células CHO-K1 produzam as proteínas recombinantes. Segundo Kim e colaboradores (2012), o acúmulo de amônia e lactato durante a cultura de células CHO é capaz de afetar negativamente o crescimento celular e a qualidade do produto. Estes dois produtos de lixo tóxico são gerados a partir de fontes de energia, tais como glutamina e glicose. Sendo assim, é preciso que os meios de cultura não contenham excesso desses nutrientes e que, as trocas do meio sejam pelo menos semanais (Kim *et.al.*, 2012).

Segundo Omasa e colaboradores (2010), as células CHO necessitam de condições específicas para produzirem glicoproteínas recombinantes de forma fidedigna em relação aos processos pós traducionais, principalmente em relação a glicosilação. A glicosilação é considerada o processo pós traducional mais longo, diversos fatores podem interferir neste processo, resultando em impactos significativos na estrutura da molécula e na sua atividade biológica. Omasa e colaboradores descrevem que o teor de nutrientes, pH, temperatura, e as concentrações de oxigênio dissolvido ou de amônia podem ter um impacto significativo sobre a distribuição das estruturas de glicano. Além das condições ambientais e nutricionais da cultura de células CHO, a taxa específica de crescimento celular também pode afetar as estruturas de glicano (Omasa *et.al.*, 2010).

Na literatura são descritos vários fatores que podem melhorar os níveis de expressão destas proteínas, recentemente um outro trabalho do grupo, desenvolvido por Gullis e colaboradores (2014), propõe a solução para o problema do rápido acúmulo na produção de proteínas recombinantes e a quantidade de células viáveis. Os resultados deste trabalho mostram que a proteína XBP-1, relacionada com apoptose celular, pode ser downregulada por meio da co- transfecção com o plasmídeo do sistema T- Rex (Invitrogen). Este processo também associa a produção de proteínas recombinantes a temperatura mais baixa 30 °. As células transfectadas eram CHO- K1 aderentes, porém o trabalho não foi desenvolvido com a população mista de células e sim com clones estáveis, o vetor era similar ao que foi utilizado neste trabalho, o pCOMIRES, (sem a deleção de 600 pb no intron A). Pode ser que

esse processo seja reprodutível para população de células mistas, e que o vetor pCOMIRES $\Delta 600$ possa melhorar a produção dos FvFcs recombinantes propondo estas condições (Gullis *et.al.*, 2014).

Em 2010, Serpieri e colaboradores (2010), compararam o processo de produção de uma IgG anti-CD3 completa com o processo de produção de dois fragmentos FvFcs da mesma molécula, um dos resultados apresentados foi que não houveram diferenças significativas nos níveis de produção destas construções. Sendo assim, seria muito difícil que houvesse diferenças entre a produção do rituximabe e as versões FvFcs (Serpieri *et.al.*, 2010).

Segundo Datta e colaboradores (2013), é extremamente relevante clonar o gene de interesse num vetor de expressão adequado e realizar a transfecção e a otimização da integração do transgene no genoma do hospedeiro, para uma produção em larga escala da proteína recombinante. Os resultados aqui apresentados mostram esta proposta, logo podemos propor a possibilidade de se produzir essas proteínas recombinantes em larga escala, utilizando clones estáveis ou linhagens de células em suspensão (Datta *et.al.*, 2013).

Conclusão e Perspectivas

Pode-se concluir que é possível expressar e produzir fragmentos FvFcs anti-CD20 humanos, com populações mistas de células CHO-K1, utilizando o vetor de expressão em células de mamíferos pCOMIRES Δ 600. Este vetor possibilitou o processo de transfecção transiente das células e também a fusão gênica das versões scFvs aos domínios CH2 e CH3 de uma IgG humana. Uma vez que, os fragmentos mostrados no gel SDS-PAGE e no Western-Blot, correspondem a 55kDa.

Recentemente, foi determinada a capacidade de ligação das três construções por meio de citometria de fluxo, utilizando células RAJI (células que possuem o antígeno CD20 humano). As três versões FvFcs estabelecem ligações com o antígeno CD20 humano. Logo, podemos concluir o sucesso da construção e expressão dos fragmentos FvFcs anti-CD20 humanos e propor a obtenção de clones estáveis ou produção com linhagens de células em suspensão, para obtenção destas proteínas em larga escala utilizando as três construções com o plasmídeo pCOMIRES Δ 600. A figura 18 mostra uma análise destes resultados.

Com estes resultados é possível propor, avaliações das proteínas recombinantes produzidas quanto a estabilidade conformacional, e se podem exercer os mesmos mecanismos fisiológicos que o rituximabe. Demonstrando com isso que as CDRs murinas permaneceram no arcabouço das regiões scFvs e que a estrutura Fc humana é capaz de estabilizar o fragmento FvFc e recrutar as atividades efectoras: ADCC, CDC, ADP e PCD.

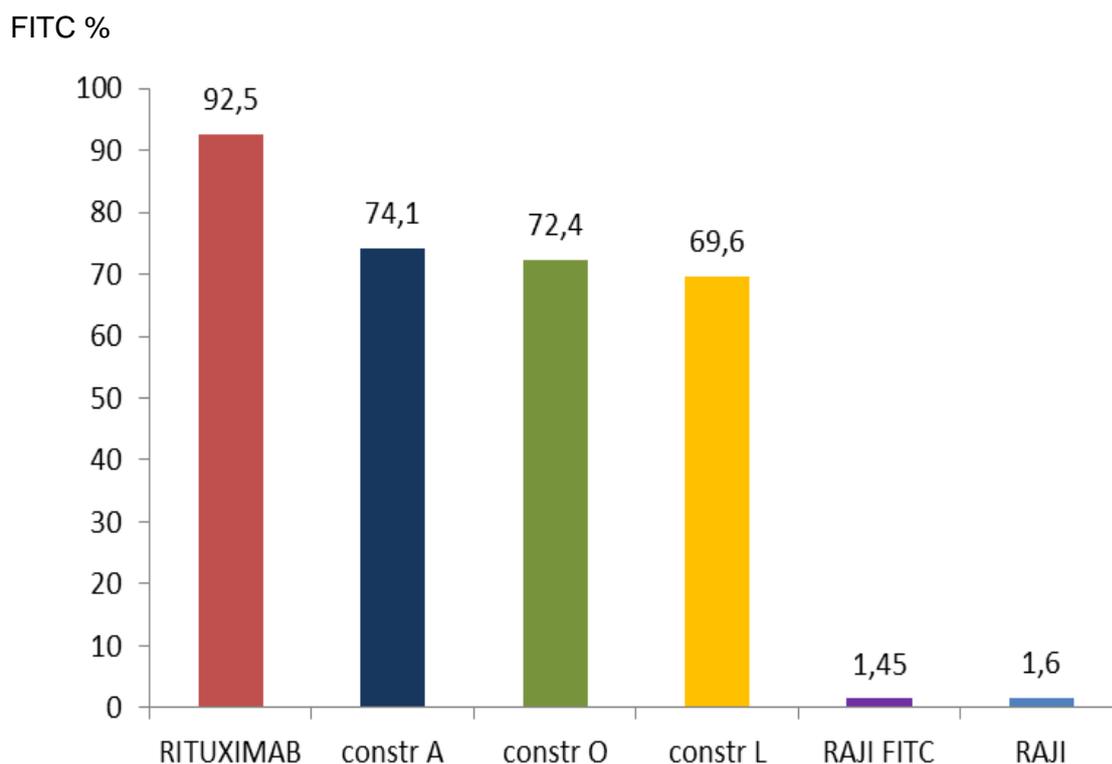


Figura 18 Capacidade de ligação á molécula CD20 das três construções FvFcs em comparação com o anticorpo rituximabe.

Esses dados sugerem que a capacidade de ligação das três construções é considerável com a atividade ligante do rituximabe. Pode-se observar que os FvFcs humanizados (construções A e L), possuem uma capacidade de ligação á molécula CD20 comparável com a capacidade de ligação da versão FvFc murina similar ao anticorpo quimérico rituximabe (construção O).

Referências Bibliográficas

Andrade E.V., Albuquerque, F.C., Moraes, L.M., Brígido, M.M., Santos-Silva MA., *Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, Pichia pastoris expression and antigen binding characterization.* **J. Biochem**, v.128, n.6, p. 891-895, 2000.

Andrade E.V., Albuquerque F.C., Moraes L.M., Brígido M.M., Santos-Silva M.A., *Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives,* **Biochim Biophys Acta**, vol. 128, n.6, p. 891-895, 2005.

Amoroso, A., Hafsi, S., Militello, L., Russo, A.E., Souza, Z., Mazzarino, M.C., Stivala, F., Libra, M., *Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy,* **Front Biosci.**, v16, p770-782, 2011.

Azevedo, M.O., Felipe, M.S.S., Brígido, M.M., Maranhão, A.Q., De-Souza M.T., *Técnicas Básicas em Biologia Molecular,* **UnB**, 2003.

Bacorro, E.A., Tehrani, R., *Stiff-person syndrome: persistent elevation of glutamic acid decarboxylase antibodies despite successful treatment with rituximab.,* **J. Clin Rheumatol**, v.16, n.5, p. 237-239, 2010.

Bassing C.H., Swart W., Alt F.W., *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination* **Cell**, vol. 109, p. S45-S55, 2002.

Binder, M., Otto, F., Mertelsmann, R., Veelken, H., Trepel, M., (2005). *The epitope recognized by rituximab.* **Blood**, v108, p1975-1978, 2006.

Bornstein, G.G, Quéva, C., Tabrizi, M., van Abbema, A., Chavez, C., Wang, P., Foord, O., Ahluwalia, K., Laing, N., Raja, S., Wen, S., Green, L.L., Yang, X., Webster, C., Stewart, R., Blakey, D., *Development of a new fully human anti- CD20 monoclonal antibody for the treatment of B-cell malignancies.* **Invest New Drugs**, v.28, p.561-574, 2009.

Brodsky R.A., *How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria,* **Blood**, v.25, June 25, p. 113- 139, 2009.

Caldas, C., Coelho, V.P., Ridgen, D.J., Neschich, G., Moro, A.M., Brígido, M.M., *Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen.* **Protein Eng.** v.13, p.353-360, 2000.

- Costa, P. Caracterização da Atividade Ligante de Domínios Variáveis Humanizados de um Anticorpo Anti-CD3 Humano. Universidade de Brasília, 2004.
- Campos-da-Paz, M.; Costa, C. S.; Quilici, L. S.; Simões, I. D.; Kyaw, C. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Production of Recombinant Human Factor VIII in Different Cell Lines and the Effect of Human XBP1 Co-Expression. *Mol Biotechnol.*, 2008.
- Datta P., Linhardt R.J., Sharfstein S.T., *An 'Omics Approach Towards CHO Cell Engineering*, **Biotechnol. Bioeng.** , vol. 110, p. 1255–1271, 2013.
- Ernst, J.A., Li H., Kim, H.S., Nakamura, G.R., Yansura, D.G., Vandlen, R.L, *Isolation and characterization of the B-Cell marker CD20*. **Biochemistry**, v.22, p.44-46, 2005.
- Fang, H., Miao, Q., Zhang, S., Cheng, X., Xiong, D., Zhen, Y., *Antitumor effects of an engineered and energized fusion protein consisting of an anti-CD20 scFv fragment and lidamycin*, **Sci China Life Sci.**, v54, n3, p255-262, 2011.
- Frank M.M., Austen K.F., Claman H.N., *Samter`s Immunologic Diseseases*, 5th ed., **Unanue ER**, 1995.
- Fonseca, A.S.D., *Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de duas versões humanizadas anti-CD3*, Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2000.
- Furger, A.; O'Sullivan, J. M.; Binnie, A.; Lee, B. A. e Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. **Genes and Development**, v.16, p.2792-99, 2002.
- Gellert M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 71, p. 101-132, 2002.
- Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D.; Carter, A. *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals*. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1151-1155, 2000.
- Gibson T.B., Ranganathan A., Grothey A., *Randomized Phase III Trial Results of Panitumumab, a Fully Human Anti—Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal*

Antibody, in Metastatic Colorectal Cancer, **Clinical Colorectal Cancer**, vol. 6, p. 29-31, 2006.

Gullis G., Simi R.C.K., Toledo R.R., Maranhão Q.A., Brígido M.M., *Optimização of heterologous protein production in Chinese hamster ovary cells under overexpression of spliced form of human X-box binding protein.*, **BMC Biotechnology** , vol 256, p. 14-26, 2014.

Houdebine, L.M.; Attal, J. *Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. Transgenic RES, Res*, v.8, n.157. 1999.

Holliger P, Hudson PJ., *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*, **Nat Biotechnol**, v.23, n.9, p.1126-1136, 2005.

Honjo T., Kinoshita K., Muramatsu M., Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*, vol 20, p. 165-196, 2002.

Jayapal, K.P.; Wlaschin, K.F.; Hu, W.S.; Yap, M.G. *Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting.* **Chem En Progr.** 103: 40-47, 2007.

Jens Nielsen. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. **Bioengineered**, v. 4 (4), pp. 1 – 5, 2013.

Jung D., *Unraveling V(D)J recombination: insights into gene regulation.* **Cell**, vol. 116, p. 299-311, 2004.

Krauss J. *Recombinant Antibodies for the Diagnosis and Treatment of Cancer*, **Molecular Biotechnology** , vol 25: 1-17, 2003.

Keating, G.M., *Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma*, **Drugs**, v.70, p.1445-1476, 2010.

Klein C., Lammens A., Schäfer W., Georges G., Schwaiger M., E. Mössner, Hopfner K.P., Umaña P., Niederfellner G., *Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties*, **Landes Bioscience**, v.5, p. 22-33, 2013.

Kim L.Y., Kim Y.G., Lee M.G., *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential*, **Microbiol Biotechnol**, vol. 93, p.917–930, 2012.

Kotani, T., Takeuchi, T., Kawasaki, Y., Hirano, S., Kagitani, M., Tabushi, M., Makino, S., Hanafusa, T., *Successful treatment of cold agglutinin disease with anti-CD20 antibody (rituximab) in a patient with systemic lupus erythematosus*. **Lupus**, v.15, p.683-685, 2006.

Kohler G., Milstein C., *Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity*. **Nature**, v.256:, p. 495-497, 1975.

Le Hir, H.; Nott, A. e Moore M.J. *How introns influence and enhance eukaryotic gene expression*. **Trends in Biochem. Sci**, p. 215-220. 2003.

Li, J.; Menzel, C.; Meier, D.; Zhang, C.; Dübel, S. e Jostock, T. *A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies*. **Blood**, JIM, v. 318, p.113-124. 2007.

Lim, S.H., Beers, S.A., French, R.R., Johnson P.W., Glennie, M.J., Cragg, M.S., *Anti-CD20 monoclonal antibodies: Historical and future perspectives*, **Haematologica**, v.10, p.10-42, 2010.

Liu, K.; Sandgren, E. P.; Pamiter, R. D. e Stein, A. *Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment in vitro and in transgenic mice*. **PNAS**, v.92, p.7724:28. 1995.

Litman G.W., Rast J.P., Fugmann S.D.. *The origins of vertebrate adaptive immunity*. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 543-553, 2010.

Maranhão, A.Q., Brígido, M.M., *Anticorpos humanizados*, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.23, p. 38-43, 2001

Mariati, N.Y.K.; Chao, S.H.; Yap, M.G.S.; Yang, Y. *Evaluating regulatory elements of human cytomegalovirus major immediate early gene for enhancing transgene expression levels in CHO-K1 and HEK293 cells*. **Journal of Biotechnol.** 147:160-3, 2010.

Marszal E., Fowler E., *Workshop on Predictive Science of the Immunogenicity Aspects of Particles in biopharmaceutical products*, **Jhournal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, n.10, p. 3555-3559, 2012 .

Mattanovich, Diethard; Branduardi, Paola; Dato, Laura; Gasser, Brigitte; Sauer, Michael and Porro, Danilo. *Recombinant Protein Production in Yeasts*. **Recombinant Gene Expression: Methods in Molecular Biology** ,Volume 824, pp 329-358, 2012.

Mayes S., Brown N., Illidge T.M., *New antibody drug treatments for lymphoma*. **Expert Opin Biol Ther.**, v11, n5, p623-40, 2011.

Measi P.J., *Adalimumab: an anti-TNF agent for the treatment of psoriatic arthritis*, **Expert Opin Biol Ther**, vol. 5, p. 1491-1504, 2005.

McLean, G. R.; Nakouzi, A.; Casadeval, A.; Green, N.S. Human and Murine immunoglobulin expression vector cassettes. **Molecular Immunology**. 37(14): 837-45, 2000.

Montraveta A., Torrent, Mónica X.S., Guerra L., Rosich L., Galán1 P.L., Salaverria I., Beà S., Kalko S.G., Frias M., Campàs C., Roué G., Colomer D., *Synergistic anti-tumor activity of acadesine (AICAR) in combination with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in in vivo and in vitro models of mantle cell lymphoma*, V.5, 726-739, **Impact Journals/Oncotarget**, 2014.

Nihiro H., Clark E.A., Regulation of B – cell fate by antigen- receptor signals. *Nature Reviews Immunology*, vol 2, p 945-956, 2002.

Oflazoglu, E., Audoly, L., *Evolution of anti CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology*, **Lande Biociencia**, v.12, p.14-19, 2010.

Ohyama, T. Intrinsic DNA bends: an organizer of local chromatin structure for transcription. **Bioessays**, 23:708-715, 2001.

Omasa T., Onitsuka M., Wook-Dong K., *Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells*, **Current Pharmaceutical Biotechnology**, vol. 11, p. 233-240, 2010.

Papavasiliou F.N., Shatz D.G., *Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity*. **Cell**, vol. 109, p. S35- S44, 2002.

Pateinakis P., Pyrpasopoulou A., *CD20+ B Cell Depletion in Systemic Autoimmune Diseases: Common Mechanism of Inhibition or Disease-Specific Effect on Humoral Immunity?*, **Hindawi**, v2014, p.5, 2014

Pievani, A., Belussi, C., Klein, C., Rambaldi, A., Golay, J., Introna, M., *Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies*. **Blood**, v117, p510-518, 2011.

Pinto M. C., Carrasco G.M., Ruiz V.V., Cole T.A., Guarneros M.M., Poblano J.C.S., Said E.P., Lemarroy A.A., Suarez J.F.L., Lara V.L., Alvarez G.R., Leyva R.J., Colomb A.L., *The impact of glucocorticoids and anti-cd20 therapy on cervical human papillomavirus infection risk in women with systemic lupus erythematosus*, **Clinical Science**, v.12, p. 1475-1480, 2013.

Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Krause-Steinrauf, H., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Golland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., McGee, P.F., Moran, A.M., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D., Wilson, D.M., Lachin, J.M., Skyler, J.S., *Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function*, **N. Engl J. Med.**, v.26, p. 2143-2152, 2009.

Presta L.G., *Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function*, **Adv Drug Deliv Review**, vol. 58, p. 640-656, 2006.

Quilici, L.S. Caracterização de elementos moduladores da expressão gênica em células de mamífero: estudo do Intron A do gene Precoce Imediato de Citomegalovírus. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Quilici, L.S. Estudo de elementos moduladores da expressão gênica em diferentes linhagens de células de mamífero. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Quilici L.S., Silva-Pereira I., Andrade A.C., Albuquerque F.C., Brigido M.M., Maranhão A.Q., *A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines*, **Biotechnol Lett**, vol.35, p.21–27, 2013.

Robak T., Robak E., *New anti-CD20 monoclonal antibodies for the treatment of B-cell lymphoid malignancies*, **Bio Drugs** v.25, p.13-25, 2011.

Ruggiero, L.A. Clonagem de anticorpos recombinantes e expressão em cultura de células de Ovírio de Hamster Chinês (CHO). Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2002.

Ruuls S. R., Jeroen J., van Bueren L., van de Winkel J.G.J., 1, *Novel human antibody therapeutics: The age of the Umabs*, **Biotechno**, vol. 3,p. 1157–1171, 2008.

Sarkar B.R.S., Philip C.J., Yadav P.C.D., *Transfusion medicine and solid organ transplant- Update and review of some current issues* , **Elsevier**, v169, p. 162-167, 2013.

Sercarz E.E., Berzofsky a., *Immunogenicity of Protein Antigens: Repertoire and Regulation*, **Annu Rev Immunol**, v.15, 821, 1987.

Serpieri F., Inocencio A., Oliveira J.M., Pimenta Jr A., Garbuio A., Kalil J., Brigido M.M., Moro A.M., *Comparison of Humanized IgG and FvFc Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Expressed in CHO Cells*, **Mol Biotechnol**, vol.45, p. 218–225, 2010.

Schatz D.G., Ji Y., *Recombination centers and the orchestration of V (D) J recombination*. **Nature Reviews Immunology**, vol.11, 2011.

Silva, H.M., Vieira, P.M., Costa, P.L., Pimentel, B.M., Moro, A.M., Kalil, J., Maranhão, A.Q., Coelho, V., Brígido, M.M., *Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells*, **Immunol Lett**, v.125, p.129-136, 2009.

van Oers M.H., Kersten M.J., *Treatment strategies in advanced stage follicular lymphoma*, **Best Pract Res Clin Haematol.**, v24, n2, p187-201, 2011.

Vincenti F., *Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation*. **N Engl J Med**, vol. 338, p. 161-165, 1998.

Waleed Alduaij and Tim M. Illidge *The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress?* **Lande Biociencia** v.117, p. 2993-3001, 2011.

Wang Y.Z., Tian F.F., Yan M., † Zhang J.M., Liu Q.M., Lu J.Y., Zhou W.B., Yang H., Li J., *Delivery of an miR155 inhibitor by anti-CD20 single-chain antibody into B cells reduces the acetylcholine receptor-specific autoantibodies and ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis*, **Clinical and Experimental Immunology**, v.176, p. 207-221, 2014.

Weiner L.M., Surana R., Wang S., *Monoclonal Antibodies versatile platforms for cancer immunotherapy*. **Nature Reviews Immunology**, v10, p 317-327, 2010.

Xinyu X., Yun S., Yun C., Quingqing Z., Fan Y., Heng C., Young G., Mei Z., Liping Y., Tao Y., *Inhibition of Increase Circulating Tfh cell by anti- CD20 monoclonal antibody in patients with Type 1 Diabetes*, **Plos One**, v 8, inssue11, 2013.

