



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo do perfil imunorregulatório de anticorpos humanizados anti-CD3

Maryani Andressa Gomes Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Brasília – DF

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estudo do perfil imunorregulatório de anticorpos humanizados anti-CD3

Maryani Andressa Gomes Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Tese apresentada ao
Departamento de Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília como
requisito parcial à obtenção do grau de
Doutor em Biologia Molecular

Brasília – DF

2014

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edmar Vaz Andrade (UFAM – Membro Externo)

Prof^ª. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca (UnB – Membro Interno)

Prof^ª. Dra. Cecília Beatriz Fiúza Favali (UnB – Membro Interno)

Dra. Galina Gulis (UnB – Membro Interno)

Dr. Rafael Trindade Burtet (UnB – Suplente)

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido (UnB – Orientador)

Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão (UnB – Co-orientadora)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular da Universidade de
Brasília, sob a orientação do Prof. Dr.
Marcelo de Macedo Brígido

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antônio e Osita, por sempre me darem
forças para lutar e por sempre
acreditarem nos meus sonhos...
Amo vocês!

“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende da nossa vontade e perseverança.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e determinação concedidas na hora certa. E também pela paciência de continuar tentando quando tudo dava errado.

À minha família, meus pais Antônio e Osita, minhas irmãs Dayanna e Claudenice, pelo carinho, paciência e apoio nos momentos de dificuldade e constante estresse. E também por comemorarem junto comigo, quando as coisas finalmente davam certo! A ao meu sobrinho Matheus, que fazia a alegria dos meus dias de descanso! Sem vocês eu não estaria aqui hoje! Amo vocês!

Agradeço profundamente aos meus orientadores e amigos Marcelo Brígido e Andréa Maranhão por terem me acolhido no grupo e terem feito desses 10 anos que passei no laboratório momentos maravilhosos e cheios de aprendizado. Obrigada pela paciência e pela presteza! Agradeço também ao CNPq pelo financiamento do estudo.

Aos amigos do Grupo de Imunologia Molecular:

Primeiramente, a minha grande amiga Kelly Simi! Minha companheira de projeto, de experimentos, de almoços e, porque não, de vida! É incrível como me tornei dependente de você, virou praticamente meu apêndice! E qual seria a graça de trabalhar tanto sem você para eu torrar a paciência, diariamente! Você me faz ser uma pessoa melhor a cada dia mais! E acho incrível como você ainda tem paciência comigo... Amo você!

Quero agradecer também à Isabel, minha “tiradora” de sangue oficial. Muito obrigada por todos os dias que acordou cedo mesmo quando não precisava, sempre disposta a ajudar. Agradeço profundamente pela sua amizade, carinho e pela alegria que traz para minha vida! Se tornou muito especial para mim! Amo!

Ao Rafa, meu vizinho de bancada e amigo. Muito obrigada por me alegrar e sempre conversar besteira comigo! À Galina, minha amiga russa e companheira de congresso. Sempre atenciosa e carinhosa. Adoro quando a gente para pra conversar e você me põe pra cima, além de me matar de rir! À Maria Paula, também sempre animada e atenciosa! Nossas conversas sobre a vida são ótimas! À Tarcila, minha “tiradora de sangue” suplente, apesar de me chamar de coisinha, também alegre meus dias no lab! Ao Thompson, que entrou agora no grupo, sempre muito atencioso e prestativo! E a todos que participam do grupo! Muito obrigada, adoro todos vocês!

À Barbarela e Fê, minhas grandes amigas que não estão mais no lab, mas que irão sempre fazer parte da minha vida. Dentre outras alegrias, agora me deram a honra de ser tia de duas princesas. Amo muito vocês!

À Isabella, Luana, Janaína, Flávia, Mariana e Yuri, que apesar de também não estarem mais no lab 1, estarão pra sempre no meu coração e na minha vida! Cada um com seu jeitinho peculiar, são muito especiais para mim, e terão para sempre a minha amizade e lugar cativo no meu coração! Amo vocês!

Às minhas amigas queridas Juliana, Andréa, Priscilla, Aline e Rafaella. Ultra especiais, estiveram presentes em quase todos os momentos da minha vida: farras, viagens, choros, gargalhadas... Amo vocês demais! E a todos os outros tantos amigos que não foram especialmente citados, obrigada por cada momento, palavra de conforto nas horas difíceis, cada alegria compartilhada... Sem vocês eu não seria a pessoa que sou hoje!

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular: Ildinete, Márcio, Lídia Pepe, Fernando Araripe, Sueli, Élide, pelas dicas e matérias ultraproveitosas.

A todos os amigos da Biomol! Resolvi não citar nomes porque iria esquecer-se de alguém com certeza, é gente demais!

Agradeço também a Dona Fátima e Dona Ivonildes por cuidarem do laboratório, dos nossos reagentes e material. E também pelo carinho e atenção!

À Ana da Secretaria, obrigada por sempre estarem à nossa disposição!

E obrigada a todos que porventura eu tenha deixado de mencionar, mas que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho!

Sumário

Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
Introdução.....	1
1.1 Anticorpos.....	2
1.2 Anticorpos na clínica.....	4
1.3 Anticorpo anti-CD3.....	7
1.4 Humanização do anticorpo anti-CD3.....	9
1.5 Mecanismos de regulação do sistema imune.....	14
Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
Material e Métodos.....	21
3.1 Material.....	22
3.1.1 Células.....	22
3.1.2 Plasmídios utilizados.....	23
3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento.....	24
3.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases.....	25
3.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias.....	25
3.1.6 Antibióticos.....	26
3.1.7 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos.....	27
3.1.8 Soluções e tampões de uso geral.....	30
3.1.9 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana.....	30
3.1.10 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	31
3.1.11 Tampões de Endonucleases de Restrição.....	32
3.1.12 Tampões de outras reações.....	32
3.1.13 Endonucleases de restrição.....	34
3.1.14 Outras enzimas.....	35

3.1.15 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	35
3.1.16 Soluções e material para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Western e Dot blot</i>).....	37
3.1.17 Resina e coluna para cromatografia de afinidade.....	38
3.1.18 Soluções para cromatografia de afinidade.....	38
3.1.19 Material utilizado para concentração dos anticorpos purificados.....	38
3.1.20 Marcadores moleculares para DNA e proteína.....	38
3.1.21 Kits comerciais.....	39
3.1.22 Soluções e material para os experimentos com citometria de fluxo....	40
3.1.23 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, <i>Western Blot, Dot Blot e FACS</i>	40
3.2 Métodos.....	43
3.2.1 Preparação de DNA plasmidial.....	43
3.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	45
3.2.3 Análise de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose.....	45
3.2.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	45
3.2.5 Ligação de fragmentos de DNA.....	46
3.2.6 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	46
3.2.7 Sequenciamento automático de DNA e análise de seqüências.....	48
3.2.8 Cultura de células de mamíferos.....	48
3.2.9 ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	53
3.2.10 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	54
3.2.11 Análise de proteínas por <i>Dot Blot</i>	54
3.2.12 Análise de proteínas por eletroforese em gel de SDS.....	55
3.2.13 Coloração do gel de SDS-PAGE.....	56
3.2.14 Análise de proteínas por <i>Western Blot</i>	56
3.2.15 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	56
3.2.16 Reação de Imunofluorescência para FACS (<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>).....	58
3.2.17 Aquisição da reação de FACS no citômetro de fluxo.....	62

3.2.18 Ensaio de proliferação de CMSPs com CFSE.....	63
3.2.19 Detecção quantitativa de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura.....	64
3.2.20 Ensaio para detecção de apoptose.....	64
3.2.21 Ensaio para análise da expressão de marcadores de Treg.....	65
Resultados e Discussão.....	66
4.1 Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL TVL IRES neo.....	67
4.2 Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL MUR IRES neo.....	69
4.3 Construção do vetor de expressão bicistrônico pMIRES FvFc MUR.....	72
4.4 Estabelecimento da melhor linhagem celular para produção dos anticorpos recombinantes.....	74
4.5 Produção, purificação e análise dos diferentes anticorpos anti-CD3 humano.....	75
4.6 Teste dos anticorpos recombinantes anti-CD3 em forma de FvFc quanto à capacidade de ligação a superfície de linfócitos T.....	77
4.7 Análise da especificidade dos anticorpos recombinantes pelo antígeno CD3 humano.....	82
4.8 Avaliação do potencial mitogênico dos FvFcs recombinantes.....	84
4.9 Análise do perfil de citocinas induzido pelos FvFcs recombinantes.....	88
4.10 Determinação de apoptose induzida pelos FvFcs recombinantes.....	89
4.11 Avaliação da presença de células expressando marcadores de células T regulatórias (Tregs) induzidas pelos FvFcs recombinantes.....	92
Conclusões e Perspectivas.....	97
Referências Bibliográficas.....	99
Anexo I – Artigo científico.....	113

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.....	3
Figura 2. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....	4
Figura 3. Diagrama esquemático do complexo receptor de linfócitos T (TCR).....	8
Figura 4. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.....	10
Figura 5. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos.....	12
Figura 6. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC.....	13
Figura 7. Expressão de <i>Foxp3</i> em CMSPs em resposta ao estímulo com OKT3 ou com os FvFcs humanizados versões R e T.....	14
Figura 8. Possível mecanismo iniciador da supressão mediada por Tregs.....	17
Figura 9. Esquema do vetor de expressão pMACIA HIL RVL IRES neo	23
Figura 10. Esquema do vetor de expressão pMIREs FvFc TVL.....	24
Figura 11. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL TVL IRES neo anti-CD3.....	68
Figura 12. Alinhamento dos vetores pMACIA HIL RVL IRES neo e pMACIA HIL TVL IRES neo.....	69
Figura 13. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL VH MUR IRES neo anti-CD3.....	70
Figura 14. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL MUR IRES neo anti-CD3.....	71
Figura 15. Confirmação da clonagem das porções VH e VL murinas no vetor pMACIA HIL IRES neo, dando origem a construção pMACIA HIL MUR IRES neo.....	72
Figura 16. Estratégia para construção do vetor bicistrônico pMIREs FvFc MUR anti-CD3.....	72
Figura 17. Confirmação da clonagem da porção scFv murina no vetor pMIREs FvFc TVL, dando origem a construção pMIREs FvFc MUR.....	74
Figura 18. Níveis de produção de anticorpos anti-CD3 em transfectomas de BHK-21, CHO-K1 E HEK293.....	75

Figura 19. Análise dos anticorpos anti-CD3 purificados a partir de transfectomas de CHO-K1.....	76
Figura 20. Controles do teste da capacidade de ligação.....	78
Figura 21. Análise de ligação dos anticorpos recombinantes a linfócitos T CD4 ⁺ humanos.....	79
Figura 22. Análise de ligação dos anticorpos recombinantes a linfócitos T CD8 ⁺ humanos.....	80
Figura 23. Histogramas do teste de capacidade de ligação.....	81
Figura 24. Inibição da ligação do anticorpo OKT3 conjugado a FITC à molécula CD3 humana pelos anticorpos recombinantes.....	83
Figura 25. Proliferação de CMSPs induzida pelos FvFcs recombinantes.....	86
Figura 26. Mudança de tamanho e granulosidade de linfócitos após cultura com anticorpo anti-CD3 humano.....	87
Figura 27. Perfil de citocinas induzido pelos FvFc recombinantes.....	89
Figura 28. Aumento da expressão de Fas induzida pelos FvFcs recombinantes de forma dose-dependente.....	91
Figura 29. FvFcs recombinantes aumentam a porcentagem de células CD25 e GARP positivas.....	93
Figura 30. FvFcs recombinantes aumentam a porcentagem de células CTLA-4 positivas.....	96

Índice de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA até 2013.....	5
Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.....	24
Tabela 3. Produtividade específica dos anticorpos anti-CD3.....	76
Tabela 4. Porcentagem de linfócitos T marcados com os FvFcs e IgGs recombinantes e respectivas medianas de intensidade de fluorescência (MIF) em relação ao CD3 (FITC).....	82
Tabela 5. Inibição da ligação do anticorpo OKT3 conjugado a FITC à molécula CD3 humana pelos FvFcs recombinantes.....	84
Tabela 6. Medianas de intensidade de fluorescência (MIF) de Fas nas populações CD4 ⁺ e CD8 ⁺	90
Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T CD25 ⁺ após cultura com os FvFcs recombinantes.....	94

Lista de abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos
AICD	Morte celular induzida por ativação
Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-Bromo-4Cloro-indolil fosfato
BHK	Células renais de <i>hamster</i> recém-nascidos
°C	Grau Celsius
CD	Marcador de superfície celular (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CHO	Células de ovário de <i>hamster</i> chinês
C κ	Porção constante <i>kappa</i> da cadeia leve
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
CMV	Citomegalovírus
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
dH ₂ O	Água destilada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimático
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL	Fluorescência
FR	Arcabouço (<i>Framework</i>)
Fv	Fragmento variável de anticorpo
g	Grama
<i>g</i>	Força gravitacional

h	Hora
HEK	Células embrionárias de rim humano
IA	Íntron A
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITAM	Motivos de ativação baseados no imunoreceptor tirosina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mAb	Anticorpo monoclonal
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
μ F	Micro Faraday
min	Minuto
μ g	Micrograma
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
mM	Milimolar
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazole</i>
ng	Nanograma
OD	Densidade óptica
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
ori	Origem de replicação
pb	Par de base
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerização
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PE	<i>R- Phycoerythrin</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável de anticorpo de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS
SFB	Soro fetal bovino
TE	Tampão Tris/EDTA
TCR	Receptor de célula T
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodimetilamina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
v	Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

Resumo

O anticorpo anti-CD3 humano OKT3 foi utilizado por décadas na prevenção da rejeição aguda em transplantes, mas por acarretar o desenvolvimento de uma resposta imunogênica severa, seu uso foi descontinuado. A humanização desse anticorpo e a engenharia molecular de sua porção Fc têm sido instrumentos valiosos para desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos anti-CD3 humano, os quais também vêm sendo considerados para o tratamento de doenças autoimunes. Os melhores candidatos deverão induzir a inativação de células T através de mecanismos não-líticos, promovendo apoptose, anergia e/ou expansão de células T regulatórias. Em nosso grupo, estamos trabalhando com anticorpos recombinantes anti-CD3 humanizados com potencial imunoregulatório. Nesse trabalho, buscamos aprofundar a caracterização das atividades ligante e efetora de versões humanizadas e quimera do anticorpo anti-CD3 humano na forma de FvFc e IgG. Todos os anticorpos recombinantes foram capazes de se ligar à superfície das células T CD4⁺ e CD8⁺. Somente os FvFcs recombinantes foram capazes de competir pela ligação à molécula CD3 com o anticorpo parental OKT3. As versões FvFc humanizadas apresentaram uma menor mitogenicidade em células T CD4⁺ e CD8⁺ comparadas à versão FvFc quimérica. Os FvFcs recombinantes induziram uma menor produção de citocinas inflamatórias comparada as do anticorpo OKT3. As versões FvFc R e FvFc M induziram o aumento da expressão de Fas nas populações CD4⁺ e CD8⁺ de forma dose-dependente, sendo a versão humanizada FvFc R a que revelou o maior aumento. Isso sugere que a humanização pode ter tornado o anticorpo anti-CD3 humano mais pró-apoptótico. A presença dos FvFcs recombinantes também aumentou o número de células positivas para alguns marcadores de células T regulatórias (CD25, GARP e CTLA-4) dentro das populações CD4⁺ e CD8⁺. A versão humanizada FvFc R foi a que revelou o maior aumento de células CD25⁺ GARP⁺, sugerindo a indução de um fenótipo imunoregulatório. Esses resultados mostram que anticorpos na forma de FvFc e a versão humanizada FvFc R do anticorpo anti-CD3 humano são promissoras em procedimentos onde um ambiente imunoregulatório é requerido.

Palavras-chave: anti-CD3, FvFc, humanizada e imunoregulatório.

Abstract

The anti-human CD3 antibody OKT3 had been used for decades on acute transplant rejection prevention, but due to its severe immunogenic reaction, its use was discontinued. Antibody humanization and molecular engineering of the Fc portion have been valuable tools in the development of a new generation of anti-human CD3 antibodies, that have also been considered for the treatment of autoimmune diseases. Best candidates may induce T-cell inactivation through non-lytic mechanisms, promoting apoptosis, anergy and/or regulatory T cell expansion. Our group is working with humanized recombinant anti-CD3 antibodies with immunoregulatory potential. In this work, we pursued the binding and effector activities characterization of humanized and chimeric versions of the anti-human CD3 antibody, in FvFc and IgG formats. All recombinant antibodies were capable of bind to CD4⁺ and CD8⁺ T cells surface. Only recombinant FvFc were able to compete to CD3 molecule with the parental antibody OKT3. The humanized FvFc versions showed low mitogenicity on CD4⁺ and CD8⁺ T compared to chimeric FvFc version. Recombinants FvFc induced lower production of inflammatory cytokines compared to OKT3 antibody one. FvFc R and FvFc M versions induced the increase of Fas expression on CD4⁺ and CD8⁺ populations in a dose-dependent manner, being the humanized FvFc R version the one with the highest increase. This suggests that the humanization may have turned the anti-human CD3 FvFc R more pro-apoptotic. Recombinant FvFc presence also increased the number of positive cells to some regulatory T cell markers (CD25, GARP e CTLA-4) inside CD4⁺ and CD8⁺ populations. The humanized FvFc R version was the one with the highest increase of CD25⁺ GARP⁺ cells, suggesting an immunoregulatory phenotype induction. These data shows that the FvFc molecules and the humanized FvFc R version are promising in procedures where an immunomodulatory environment is required.

Key words: anti-human CD3, FvFc, humanized and immunoregulatory.

Introdução

1.1 Anticorpos

Os anticorpos (Ab) são glicoproteínas produzidas por linfócitos B compostas por dois tipos de cadeias polipeptídicas: uma, chamada de cadeia pesada (H) e outra chamada de cadeia leve (L). Cada cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, já ligadas às cadeias leves, são associadas covalentemente, também por pontes dissulfeto, formando a estrutura monomérica do anticorpo (Abbas *et al.*, 2012) (Figura 1). Tanto a cadeia leve quanto a cadeia pesada consistem de domínios amino-terminais variáveis denominados VL e VH, respectivamente, e de regiões carboxi terminais constantes (C). A cadeia leve possui um único domínio constante (CL) enquanto que a cadeia pesada é composta de 3 ou 4 domínios constantes, dependendo da classe da imunoglobulina, chamados CH1, CH2 e assim por diante. A classe mais comum e abundante de imunoglobulina no soro é a IgG, sendo esta predominante entre os anticorpos de uso terapêutico (Kim *et al.*, 2005). Os domínios VH e VL juntos formam o fragmento variável (Fv), que é responsável pela região de ligação ao antígeno, e os domínios constantes CH2 e CH3 formam a fração cristalizável (Fc), sendo responsável por interagir com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, mediando a maioria das funções biológicas de um anticorpo (Abbas *et al.* 2012).

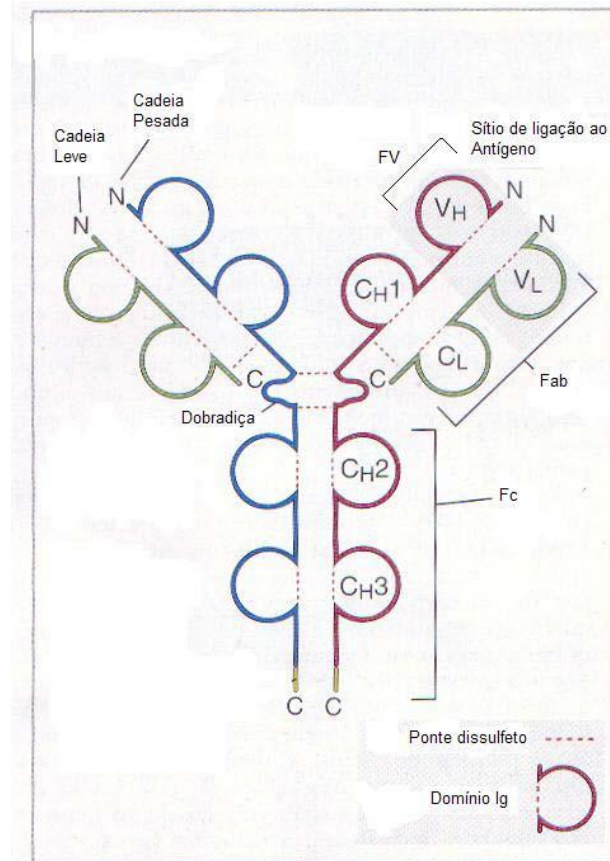


Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. Adaptada de (Abbas *et al.*, 2012).

As imunoglobulinas podem ser fragmentadas por proteólise. Uma molécula de IgG ao ser clivada proteoliticamente por papaína na região da dobradiça gera duas moléculas constituídas da cadeia leve ligada ao fragmento VH-CH1 da cadeia pesada. Essas moléculas são chamadas de fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *Fragment antigen binding*). Além disso, há a liberação do fragmento cristalizável (Fc) após a clivagem (revisto por Holliger e Hudson, 2005).

Além desses fragmentos gerados por proteólise, é possível por técnicas do DNA recombinante, manipulando sequências codificadoras dos fragmentos de anticorpos, gerar novas possibilidades de fragmentos como alternativas para utilização na clínica. Um dos formatos mais populares é o scFv, o qual consiste no VH ligado ao VL por um conector polipeptídico flexível como por exemplo $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$, onde se mimetiza a região Fv do anticorpo com a mesma especificidade original. Foi descrita também a junção do scFv à região Fc formando o fragmento FvFc (Andrade *et al.*, 2000), que alia em parte as vantagens do scFv, uma penetrabilidade maior em tecidos quando comparado com o anticorpo inteiro e a facilidade de manipulação gênica, às funções efetoras do fragmento Fc (Figura 2).

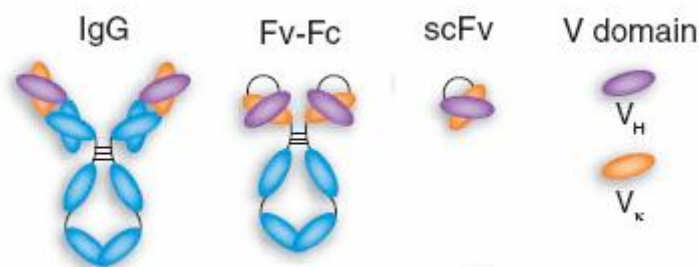


Figura 2. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

As moléculas de imunoglobulinas são classificadas como glicoproteínas devido ao seu processamento pós-traducional onde ocorre a adição de resíduos de açúcares na sua estrutura. Todos os anticorpos possuem carboidratos em posições conservadas nas regiões constantes das cadeias pesadas, sendo que cada classe vai ter um arranjo específico de açúcares N-ligados, influenciando no dobramento, secreção e função da proteína (revisto por Wright e Morrison, 1997). A glicosilação da porção Fc do anticorpo possui papel fundamental no desempenho das funções efetoras dessa molécula (Rudd *et al.*, 2001), e sua manutenção em moléculas recombinantes é importante para o sucesso terapêutico de um novo biofármaco.

1.2 Anticorpos na clínica

A indústria biotecnológica tem aumentado seus investimentos em engenharia de anticorpos, desenvolvendo anticorpos recombinantes de última geração, assim como os fragmentos de anticorpos e imunoconjugados (Presta, 2006). Nesse sentido, o desenvolvimento de novas imunoglobulinas recombinantes tornou-se a principal novidade no tratamento de diversas doenças, como o Câncer, e mais recentemente as doenças autoimunes. Esse sucesso dos anticorpos recombinantes se dá em parte pela sua especificidade característica, que faz com que atuem como “balas mágicas” em um alvo específico; mas também por conta de novas tecnologias que tornam a molécula recombinante mais segura na clínica médica.

A utilização clínica de anticorpos monoclonais data de mais de vinte anos. O primeiro, um anticorpo murino anti-CD3 humano, Orthoclone OKT3, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – EUA) em 1986, foi utilizado no tratamento da rejeição aguda de transplantes renais e, subsequentemente, no tratamento da rejeição de transplantes cardíacos e hepáticos (Webster *et al.*, 2006). Existem atualmente no mercado de biofármacos 37

anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA, e mais de 200 em fase de testes clínicos (Beerli e Rader, 2010; e Holstein e Hohl, 2012) (Tabela 1). Destes, existem anticorpos dos mais variados tipos: em forma de fragmentos, conjugados a toxinas, marcados com radioisótopos, humanizados, humanos, derivados de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos, dentre outros (Yamashita *et al.*, 2007). Esses anticorpos formam um mercado que movimenta bilhões de dólares anualmente (Walsh, 2010).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA até 2013. *

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	Angioplastia Coronária Percutânea Transluminal	Centocor	1994
Panorex (Edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer Colorectal	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 (Oralimumab)	IgE	Humanizado	Asma	Genentech	2003

Bexxar (Tositumomab- I131)	CD20	Murino	Linfoma Non- Hodgkins	Corixa	2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Genentech	2003
Erbitux (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer colorrectal	Imclone Systems	2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer colorrectal, 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 colorrectal	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 reumatóide	Johnson & Johnson	2009
Ilaris (Canakinumab)	IL-1 β	Humano	Síndromes Periódicas Associadas a Criopirina	Novartis	2009
Stelara (Ustekinumab)	IL-12 e IL- 23	Humano	Psoríase	Johnson & Johnson	2009
Arzerra (Ofatumumab)	CD20	Humano	Leucemia linfocítica crônica	Genmab	2010
Prolia (Denosumab)	RANKL	Humano	Osteoporose	Amgen	2010
Benlysta (Belimumab)	BLys	Humano	Lupus eritematoso sistêmico	GlaxoSmithKline	2011
Vedotin (Brentuximab)	CD30	Quimérico	Linfoma Hodgkin	Seattle Genetics	2011
Ipi (Ipilimumab)	CTLA-4	Humano	Melanoma metastático	Bristol	2011

Yervoy (Brentuximab)	CD30	Quimérico	Linfoma Hodgkin	Bristol	2012
Perjeta (Pertuzumab)	HER2	Humanizado	Câncer de mama	Roche	2012
Pending (Raxibacumab)	<i>B. anthraxis</i> PA	Humano	Infecção por antraz	Human Genome	2012
Kadcyla (Ado-Trastuzumab emtansine)	HER2	Humano	Câncer de mama	Genentech	2013
Gazyva (Obinutuzumab)	CD20	Humanizado	Leucemia linfocítica crônica	Genentech	2013

*Adaptada de (Reichert e Pavlou, 2004; Kim *et al.*, 2005; Walsh, 2005; Cohen e Wilson, 2009; Beerli e Rader, 2010; Nelson *et al.* 2010; Seeman *et al.*, 2011; Ahmad *et al.* 2012; de Claro *et al.* 2012; Holstein e Hohl, 2012; Navarra *et al.*, 2012; Traynor, 2012; Traynor, 2013; Traynor, 2013)

1.3 Anticorpo anti-CD3

O único anticorpo anti-CD3 humano já aprovado pelo FDA para uso clínico é o OKT3. Sua molécula alvo é o CD3, componente do complexo receptor de célula T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*). Esse complexo, também formado pelas cadeias ζ e pelo próprio TCR, é responsável pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), presente na superfície de células humanas (Weiss e Littman, 1994) (Figura 3).

Após o reconhecimento do antígeno pelo TCR ocorre a fosforilação dos domínios ITAMs presentes no CD3 e nas cadeias ζ . Essa fosforilação envolve a ação da quinases *Lck* e, potencialmente, *Fyn*, induzindo uma variedade de vias de sinalização que ativam o influxo de cálcio e fatores de transcrição como NF- κ B, NF-AT e AP-1, que estimulam a produção de IL-4 e IL-2, sendo esta última uma citocina envolvida na proliferação de linfócitos T. Já na ligação de um anticorpo anti-CD3 ao TCR, ocorre uma fosforilação parcial das cadeias ζ , devido a um recrutamento insuficiente de *Lck*. Assim, a ativação das vias de sinalização fica prejudicada, resultando no bloqueio da expressão de IL-2, e com isso da toxicidade celular (revisto por Smith e Bluestone, 1997).

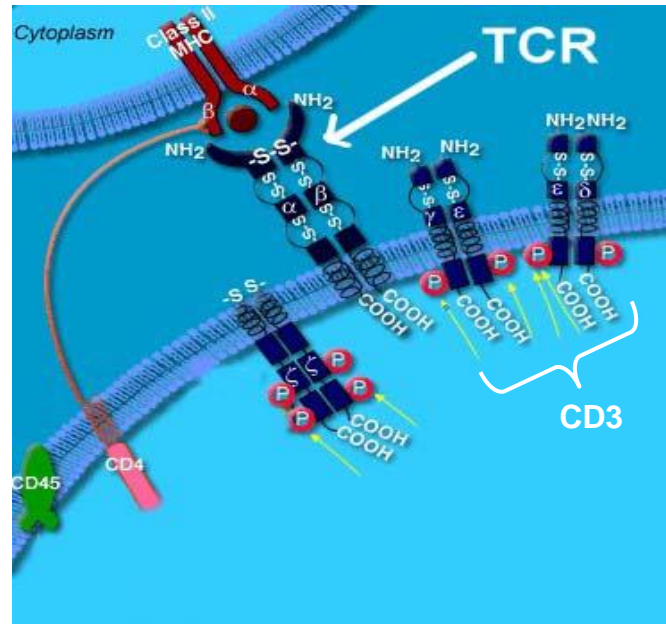


Figura 3. Diagrama esquemático do complexo receptor de linfócitos T (TCR). Este é constituído pelo TCR, cadeias ζ e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias ζ e do CD3 apresentam uma sequência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), indicada pelas setas amarelas, a qual irá agir no processo de transdução de sinal. Adaptado de (<http://www.detectingdesign.com/immunesystem.html>).

A ligação de anticorpos anti-CD3 gera uma resposta diferente daquela realizada via complexo TCR e esta é responsável pelos efeitos observados durante o tratamento com esses imunobiológicos. Esses efeitos podem ser: depleção de linfócitos T dependente do sistema complemento ou uma toxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC); lise da célula alvo, aproximando-a de um linfócito T citotóxico (Wong e Colvin, 1991); indução de apoptose por meio de uma transdução de sinal direta, particularmente em linfócitos T ativados (Carpenter *et al.*, 2000); depleção de linfócitos T por morte celular induzida por ativação (AICD, do inglês, *Activated Induced Cell Death*); ou ainda o desenvolvimento de um estado de não-resposta ao estímulo chamado de anergia clonal (Smith *et al.*, 1997). Dados atuais de anticorpos anti-CD3 humano demonstram que o tratamento em curto prazo pode induzir um estado de tolerância operacional (estado de tolerância a um determinado antígeno que é sustentado sem o uso de imunossuppressores). Como exemplo pode-se citar o tratamento da diabetes Tipo 1 (Keymeulen *et al.*, 2005; Herold *et al.*, 2013), e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Utset *et al.*, 2002; van der Woude *et al.*, 2010). Demonstram também um novo mecanismo de imunossupressão baseado no aumento de uma população particular de células T, as células T regulatórias (You *et al.*, 2008).

Porém, o uso clínico do anticorpo monoclonal OKT3 foi descontinuado (Jassen-Cilag, 2010). Por se tratar de um anticorpo murino, um produto heterólogo, causa o desenvolvimento de uma resposta imunogênica no paciente, caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*) (Kimball *et al.*, 1995). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas (IgM e IgG) contra anticorpos produzidos em camundongo promovendo uma rápida remoção e neutralização do OKT3, limitando o seu uso prolongado, comum no tratamento a rejeição a transplantes, bem como a extensão do seu uso a outras áreas clínicas como a autoimunidade. Além disso, provoca uma ativação de linfócitos T generalizada, culminando na liberação de altos níveis de citocinas inflamatórias (Abramowicz *et al.*, 1989; Norman, *et al.*, 1993; Kimball *et al.*, 1995).

Para resolver este problema, a humanização desse anticorpo e a engenharia molecular da sua porção Fc têm sido um instrumento valioso no desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos específicos ao CD3 humano (Silva *et al.*, 2009; Baumgart *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 2010; van der Woude *et al.*, 2010; Malcom *et al.*, 2012; Herold *et al.*, 2013). Os melhores candidatos deverão induzir a inativação de células T através de mecanismos não-líticos, promovendo apoptose, anergia e/ou expansão de células T regulatórias (Martin, *et al.*, 2013).

1.4 Humanização do anticorpo anti-CD3

Em 1997, o Grupo de Imunologia Molecular da UnB iniciou o processo de humanização do anticorpo monoclonal OKT3 de acordo com a técnica de *CDR grafting* (citado por Maranhão e Brígido, 2001). Para tal, foram escolhidos arcabouços humanos para cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) que possuíam a maior similaridade com a sequência do anticorpo murino, visando, assim, reter a especificidade de ligação característica do OKT3 (Figura 4).

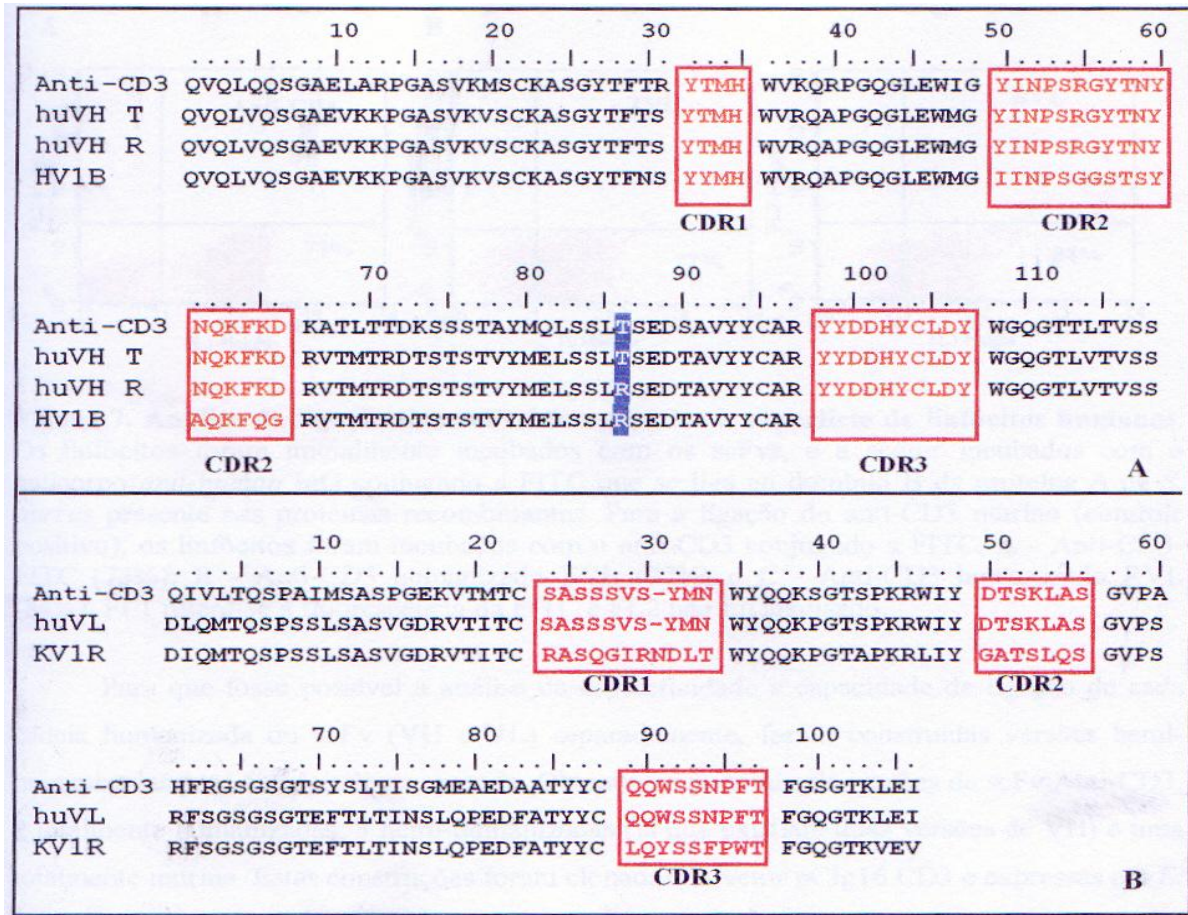


Figura 4. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3. Seqüência codificadora do OKT3 (anti-CD3), versões humanizadas do anti-CD3 para as cadeias pesada (huVH T e R) e leve (huVL) e seqüências humanas utilizadas como arcabouço para as CDRs do anti-CD3 (HV1B e KV1R). **A-** Cadeia pesada. **B-** Cadeia leve. São destacadas em vermelho as seqüências das CDRs 1, 2 e 3 de cada cadeia e em branco com fundo azul o resíduo 86 que diferencia as duas versões de VH humanizados (Fonseca, 2000).

Na humanização da cadeia variável pesada foi utilizada uma seqüência germinal humana que possuía a maior similaridade com a VH do OKT3, a HV1B, tendo uma identidade de 71,4% com a VH do OKT3. Para análise do impacto estrutural do transplante das CDRs do OKT3 nessa seqüência germinal, foram realizadas análises a partir da estrutura cristalográfica do anticorpo murino 1MRC depositada no banco de dados de proteína (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*). A partir dessa análise, o resíduo 86 (presente no arcabouço 3 [FR3, do inglês, *framework 3*]) da cadeia variável pesada foi considerado estruturalmente importante, pois se situa na base das CDRs 2 e 3. Essa análise possibilitou a criação de duas versões da cadeia variável pesada (Figura 4), uma com o resíduo murino treonina (huVH^{T86}) e outra com o resíduo humano arginina (huVH^{R86}) (Fonseca, 2000).

Já para a humanização da cadeia variável leve foi adotada uma estratégia um pouco diferente. Primeiro, cada fragmento do arcabouço da sequência do VL murino foi utilizado como base na procura de um anticorpo humano, ao contrário da cadeia pesada, na qual foi utilizada toda a sequência do anticorpo murino, incluindo-se as CDRs. Dentre as sequências escolhidas, a KV1R possui uma maior quantidade desses resíduos considerados importantes, com 64,3% de identidade com o arcabouço murino. Logo, essa foi a sequência escolhida para o transplante de CDR (Fonseca, 2000).

Para verificação da manutenção da atividade ligante dos anticorpos humanizados, foram construídas seis versões de scFvs recombinantes: duas humanizadas, uma com o huVH^{T86} e outra com o huVH^{R86}; três versões hemi-humanizadas, duas compostas das respectivas cadeias pesadas humanizadas em conjunto com a cadeia leve murina e outra contendo a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada; e por último, uma versão totalmente murina, todas expressas de forma heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Essas construções permitiriam verificar se o processo de humanização dos fragmentos variáveis foi bem sucedido e, no caso de perda de afinidade da ligação ao antígeno, seria possível visualizar qual cadeia sofreu com a perda de afinidade (Costa, 2004).

Em ensaios de ligação direta utilizando citometria de fluxo, observou-se que todas as versões possuem capacidade de ligação ao antígeno, exceto a versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado (Figura 5), sugerindo que a humanização do VL não foi bem sucedida. Além disso, foi possível visualizar que as versões hemi-humanizada com o huVH^{R86} e VL murino e a totalmente murina tiveram uma capacidade de ligação melhor que as outras versões, indicando que a manutenção do resíduo arginina na posição 86 da cadeia pesada favorece a manutenção do paratopo do anticorpo no processo de transplante da CDR (Costa, 2004).

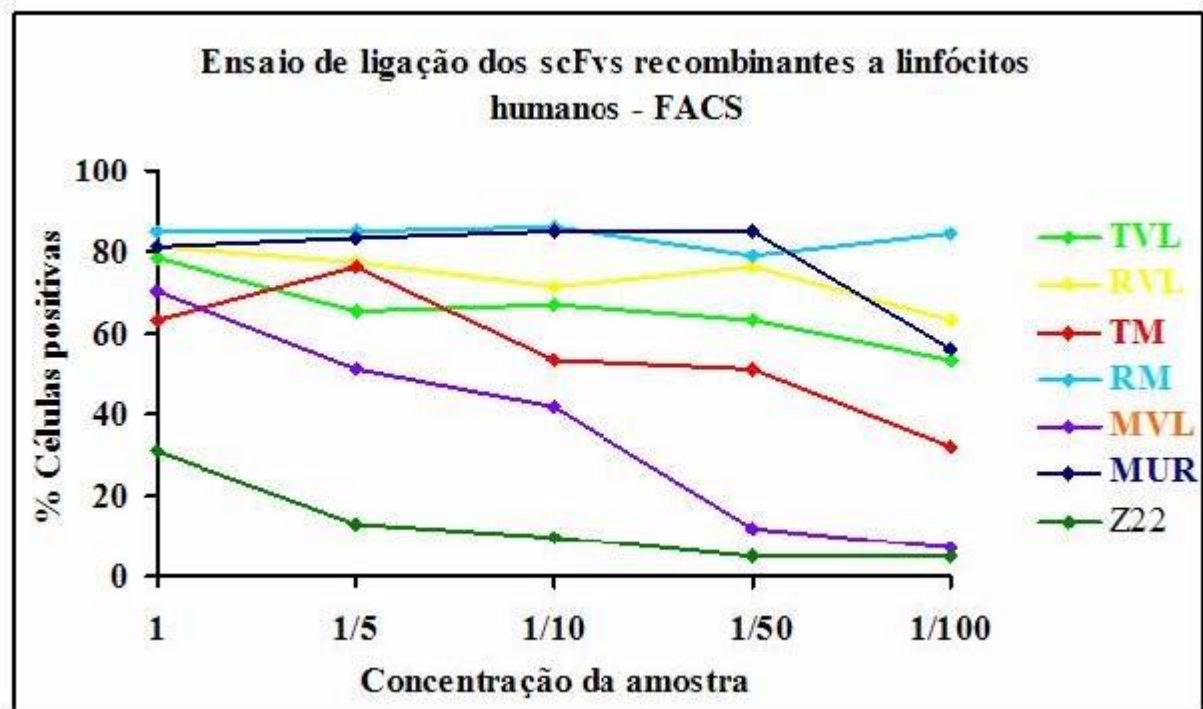


Figura 5. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas pelos scFvs recombinantes. TVL e RVL, versões humanizadas com os huVH^{T86} e huVH^{R86}, respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os huVH^{T86} e huVH^{R86}, respectivamente. MVL, versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado. MUR, versão murina. Z22, anticorpo anti-DNA na conformação Z utilizado como controle negativo (Costa, 2004).

Assim, foi realizada uma nova humanização da cadeia variável leve (hVL), adotando-se como estratégia a técnica de transplante de CDR por melhor encaixe. Dessa forma, buscou-se sequências germinais humanas que possuíam maior similaridade com a sequência do anticorpo murino, visando a manutenção da especificidade de ligação característica do OKT3. A procura resultou no anticorpo humano CAB37836 (L6), sendo este o escolhido para o procedimento de transplante de CDR (Silva, 2008).

Com essa nova proposta em mãos, e com o intuito de verificar a eficácia desse novo processo de humanização, foram construídas versões recombinantes humanizadas com as cadeias variáveis pesadas huVH^{T86} e huVH^{R86} em conjunto com a nova cadeia leve (hVL) na forma de FvFc (fragmento de anticorpo na forma de scFv conectado ao Fc de IgG1 humana), gerando duas novas versões totalmente humanizadas, FvFc T e FvFc R, que foram produzidas em células de mamífero (CHO) (Silva, 2008).

A especificidade ao antígeno desses FvFcs foi analisada por citometria de fluxo em um ensaio de bloqueio de ligação utilizando o anticorpo monoclonal OKT3 conjugado a FITC. Assim, se os FvFcs conseguissem bloquear eficientemente a ligação do anticorpo OKT3 conjugado a FITC à superfície de linfócitos, seria observada uma diminuição da

intensidade de fluorescência. Essas versões humanizadas mostraram ligação ao CD3 humano, competindo com o anticorpo comercial OKT3, porém com uma menor afinidade (Figura 6). Além disso, foi mostrado que a versão R possui uma capacidade maior de ligação e bloqueio que a versão T, indicando que os trabalhos anteriores realizados pelo grupo estavam corretos e que a cadeia pesada com a arginina possui atividade ligante similar a da cadeia murina (Silva, 2008).

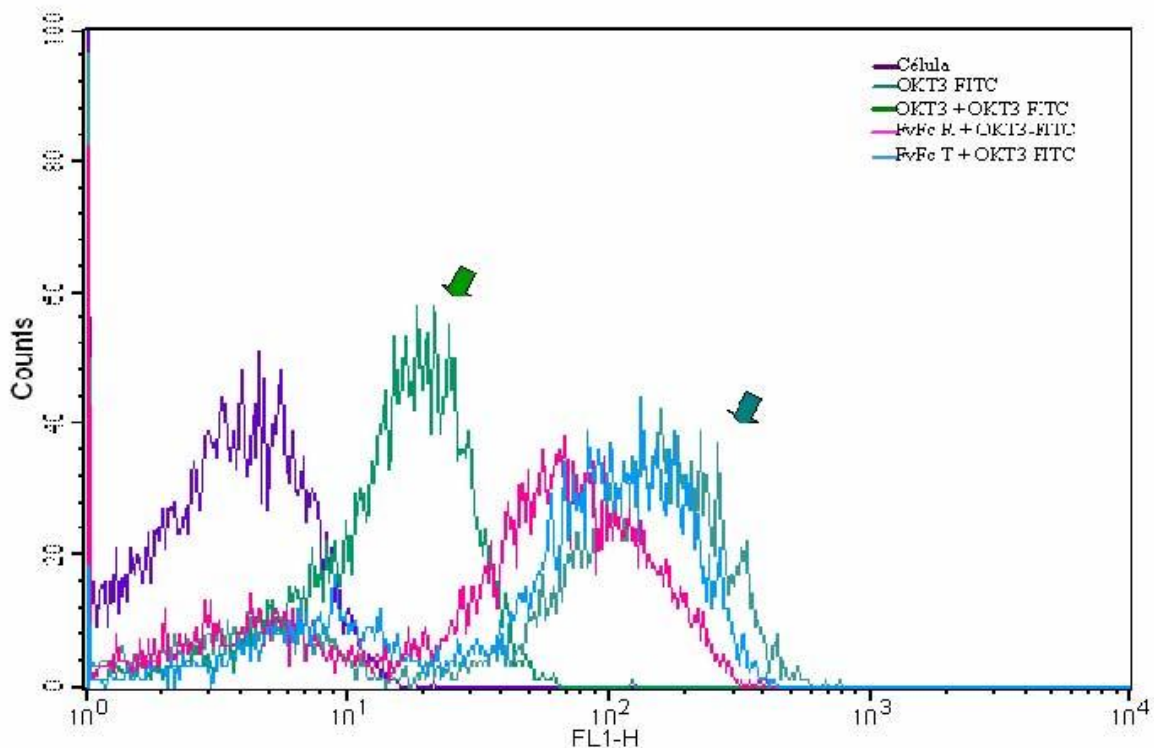


Figura 6. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC. Os linfócitos foram incubados inicialmente com os FvFcs humanizados T e R ou com o OKT3 não conjugado e posteriormente com o OKT3-FITC. Seta azul indicando a fluorescência da reação do OKT3-FITC sem bloqueio. Seta verde indicando o deslocamento da intensidade de fluorescência provocada pelo bloqueio utilizando o OKT3 não marcado. FL1: Intensidade de fluorescência emitida por FITC (530 nm); Counts: número de células. (Silva, 2008)

Por outro lado, esses anticorpos foram capazes de induzir um perfil de citocinas regulatórias em contraste ao perfil inflamatório, não desejado, induzido pelo OKT3 em experimentos *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico humano (CMSPs). Este perfil imunoregulatório foi evidenciado pela comparação da produção de IL-10 e IFN- γ . A razão IL-10/IFN- γ , citocina anti-inflamatória/citocina pró-inflamatória, é bem maior nas células cultivadas na presença das versões humanizadas do que naquelas cultivadas com o anticorpo OKT3. Além disso, a presença dos anticorpos humanizados foi capaz de induzir a

expressão do gene FOXP3 (marcador de células T regulatórias), sugerindo que os anticorpos anti-CD3 humanizados provavelmente estimulam o desenvolvimento de células T com atividade regulatória (Silva *et al.* 2009) (Figura 7). Bezerra, em 2009, construiu um vetor tricistrônico para a expressão da molécula inteira de um anticorpo humanizado anti-CD3 humano em células de mamíferos, a partir da versão de FvFc R. Essa construção, pMACIA HIL IRES neo, produziu eficientemente a molécula inteira do anticorpo.

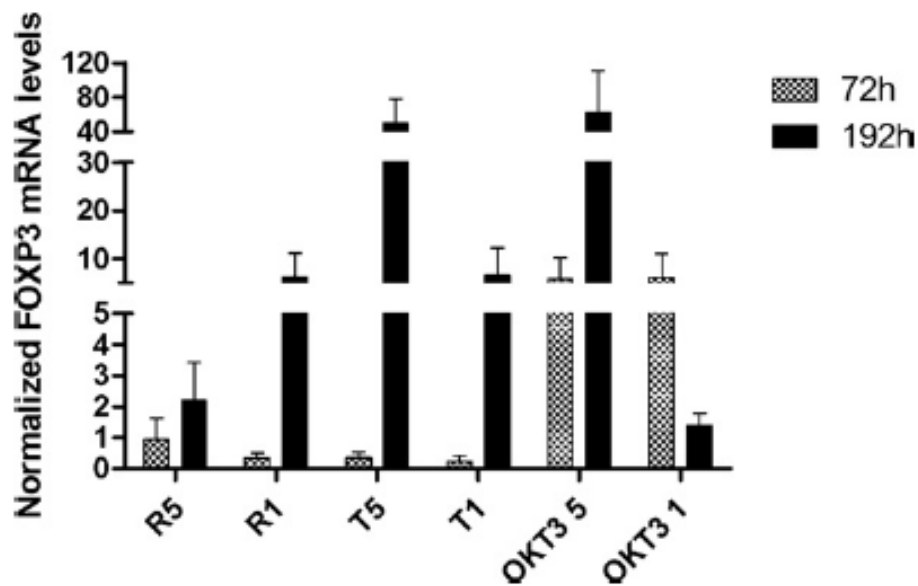


Figura 7. Expressão de *Foxp3* em CMSPs em resposta ao estímulo com OKT3 e com os FvFcS humanizados versões R e T. As CMSPs foram incubadas por 72h e 192h na presença de OKT3 e os FvFcS humanizados versões R e T nas concentrações de 5µg/mL (OKT3 5, R5, T5) ou 1µg/mL (OKT3 1, R1, T1, respectivamente). As amostras de cDNA foram preparadas a partir das CMSPs tratadas e submetidas a análise por PCR em tempo real quantitativa usando primers específicos para *Foxp3* e *GAPDH*. A quantidade relativa de *Foxp3* em cada amostra foi normalizada pela quantidade relativa de *GAPDH* utilizando o método Pfaffl (Silva *et al.*, 2009).

1.5 Mecanismos de regulação do sistema imune

O sistema imune protege o hospedeiro de inúmeros microrganismos patogênicos e, ao mesmo tempo, controla respostas imunes aberrantes ou excessivas que são prejudiciais ao primeiro. Com isso, a homeostase do organismo é alcançada. O controle dos linfócitos se dá, por exemplo, por apoptose dos linfócitos imaturos auto-reativos ou pela morte celular induzida por ativação de linfócitos efetores maduros estimulados por antígeno. Uma subpopulação de linfócitos T, chamadas células T regulatórias (Tregs), participa desse

controle suprimindo ativamente respostas imunes fisiológicas e patológicas, contribuindo desse modo para a manutenção da tolerância imunológica. Essas Tregs são produzidas fisiologicamente pelo timo como uma população funcionalmente madura e distinta, expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), e suas funções dependem da expressão do fator de transcrição FOXP3 (Miyara e Sakaguchi, 2007).

Além das Tregs naturais descritas acima, existe também outra população de Tregs, as chamadas adaptativas. Elas são induzidas a partir de células T imaturas por modos específicos de estimulação antigênica, especialmente num ambiente particular de citocinas (Roncarolo *et al.*, 2006). Essas células incluem as células T regulatórias que secretam IL-10 (Tr1), células T auxiliares que secretam TGF- β (Th3), células T CD4⁻CD8⁻ expressando as cadeias γ/δ do receptor de célula T (TCR) e células T CD8⁺CD28⁻ (Miyara *et al.*, 2011).

Vários estudos vêm demonstrando o papel do fator de transcrição FOXP3 nas vias de sinalização de células T. Mantel e colaboradores, em 2006, demonstraram que as vias de sinalização de NFAT e AP-1 estão envolvidas na transdução do TCR e sinais co-estimulatórios, e a expressão de FOXP3 foi observada seguida da ativação do TCR em células T naïve humanas, mas não murinas. Bettelli e colaboradores, em 2005, demonstraram que FOXP3 é repressor da transcrição de IL-2, IL-4 e IFN- γ através de interações físicas com os fatores nucleares NF- κ B e NFAT. Wu e colaboradores, em 2006, demonstraram que o complexo NFAT-FOXP3 é requerido para a atividade supressora de Tregs, e que esse complexo também aumenta a expressão de CD25 e CTLA-4. Foxp3 também pode interagir com o fator de transcrição Eos e induzir modificações na cromatina resultando em silenciamento de genes em Tregs (Pan *et al.*, 2009).

Enquanto Foxp3 determina o desenvolvimento das Tregs naturais, foi demonstrado por Sakaguchi e colaboradores, em 2008, que ele não é requerido para o desenvolvimento das Tr1 ou Th3. Também foi observado que a expressão de Foxp3 em humanos não é exclusiva de Tregs. Células T efectoras expressam Foxp3 de forma transitória após ativação do TCR, mas não adquirem atividade supressora (Allan *et al.*, 2007). As células T CD4⁺ Foxp3⁺ humanas são compostas de células Tregs imaturas ou em repouso (CD25⁺⁺CD45RA⁺Foxp3^{low}), Tregs efectoras ou ativadas (CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻Foxp3^{high}) e células T não-supressoras e secretoras de citocinas (CD25⁺⁺CD45RA⁻Foxp3^{low}). Em humanos, células T totalmente diferenciadas e altamente supressivas (CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻Foxp3^{high}) são as únicas que expressam o antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) constitutivamente ((Miyara *et al.*, 2009).

Muitos fenótipos para Tregs humanas e murinas são reconhecidos, mas nenhuma correspondência exata entre essas espécies é conhecida (Shevach, 2002; Horwitz *et al.*, 2008; Sakaguchi *et al.*, 2008, Zhou *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 2012). Moléculas que definem as Tregs humanas fenotipicamente e funcionalmente ainda não foram totalmente caracterizadas. Marcadores como FOXP3, CD25, IL-10, CD62L, CTLA-4 e CD127, são modificados durante a ativação ou diferenciação de células T, e sob condições de ativação imune crônica, não podendo ser utilizados para discriminar Tregs de células T recentemente ativadas adequadamente (Sakaguchi *et al.*, 2008; Vignali *et al.*, 2008).

O mecanismo de supressão das Tregs ainda não foi completamente elucidado também. Sakaguchi e colaboradores, em 2009, sugeriram um mecanismo iniciador de supressão dependente de CTLA-4 que é compartilhado por todas as Tregs Foxp3⁺, em qualquer localização, e sua interrupção causa uma quebra na homeostase e na tolerância ao próprio (Figura 8). A expressão de CD25 induz a morte das células T efetoras por privação de IL-2 e a expressão constitutiva de CTLA-4 está envolvida de forma crucial na prevenção da maturação de células dendríticas *in vitro* e *in vivo* promovendo a prevenção de uma autoimunidade sistêmica (Miyara *et al.*, 2011).

Tregs ativadas podem diminuir a expressão de CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno (APCs), assim como estimular células dendríticas a expressar a enzima indoleamina 2 3-dioxigenase (IDO). IDO cataboliza a conversão do aminoácido essencial triptofano para quinurenina, que é tóxica para as células T vizinhas. Esse processo parece ser dependente de CTLA-4 expresso na superfície das Tregs (Oderup *et al.*, 2006). Através de contato celular, as Tregs podem matar as células T efetoras por um mecanismo granzima ou perforina-dependente, ou por meio de um sinal negativo, levando a inibição da proliferação destas últimas (Cao *et al.*, 2007).

Após estimulação via TCR, Tregs carregam a forma latente de TGF-β1 na sua superfície (Nakamura *et al.*, 2004). Isso ocorre através da ligação a GARP, uma proteína transmembrana com um grande domínio extracelular contendo 20 repetições ricas em leucina (Stockis *et al.*, 2009). GARP favorece a clivagem do precursor pro-TGF-β1 e aumenta a quantidade de TGF-β1 secretada. GARP está presente em Tregs humanas estimuladas, mas não em outras células T (Gauthy *et al.*, 2013). Além disso, a expressão de GARP identifica seletivamente Tregs Foxp3⁺ supressivas ativadas, permitindo a discriminação de células T CD4⁺ CD25⁺ secretoras de IL-10 (Wang *et al.*, 2009).

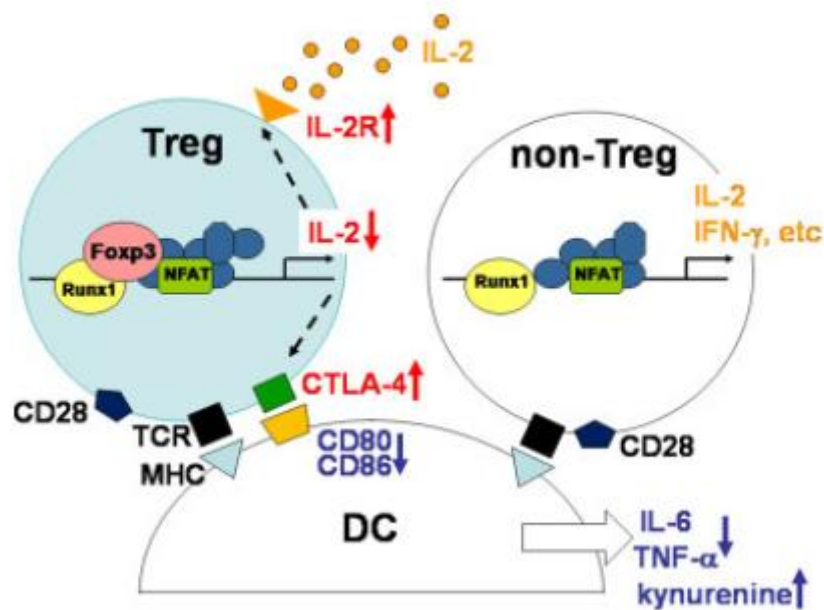


Figura 8. Possível mecanismo iniciador da supressão mediada por Tregs. Adaptado de (Sakaguchi *et al.*, 2009). Após estimulação antigênica, Tregs $Foxp3^+$ diminuem a função das APCs (DC) por um mecanismo dependente de CTLA-4 (por exemplo, diminuição de CD80/CD86, indução de IDO e produção de quinurenina, e supressão de IL-6 e outras citocinas nas APCs). Tregs $Foxp3^+$ também podem contribuir na absorção de IL-2 do meio. Células T efetoras (non-Treg) tornam-se anérgicas ou morrem por apoptose por conta da perda da co-estimulação das APCs modulada pelas Tregs. Non-Treg: células T efetoras; DC: células dendríticas; Kynurenine: quinurenina.

Desde a descoberta desse tipo supressor de células T, alguns grupos de pesquisa estão elucidando os mecanismos que levam a essa atividade. Tregs $CD4^+CD25^+$ requerem estimulação antigênica via TCR para exercer sua função supressiva *in vitro*. Uma vez ativadas por um antígeno específico, elas apresentam supressão antígeno inespecífica da ativação/expansão das outras células T (Takahashi *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* e *in vivo* com um tipo específico de anticorpos anti-CD3, com regiões Fc mutadas ou não ligantes a receptores de Fc (FcR), têm favorecido a aparição de Tregs. Herold e colaboradores, em 2003, numa tentativa de tratamento de pacientes com diabetes tipo 1, demonstraram que o anticorpo anti-CD3 humano, incapaz de interagir com o receptor celular de Fc, o hOKT3 γ 1 (Ala-Ala), humanizado a partir do anticorpo comercial OKT3, induziu o surgimento de uma população heterogênea de células T $CD4^+ IL-10^+$, sugerindo a indução de uma população de Tregs. A alteração estrutural na molécula do anticorpo durante a humanização e mutação resultaram num anticorpo anti-CD3 com propriedades distintas do OKT3 sugerindo um mecanismo imunomodulatório para o anticorpo. O mesmo grupo mais tarde estudou a ação desse anticorpo no mesmo modelo de doença, confirmando seu perfil imunomodulatório. Eles

observaram a ativação de células T regulatórias CD8⁺ CD25⁺. Essas células também eram CTLA4⁺ e Foxp3⁺, sugerindo um mecanismo potencial desse anticorpo na indução de uma população de células T regulatórias CD8⁺ (Bisikirska *et al.*, 2005).

Ao contrário dos anticorpos monoclonais anti-CD3 murinos que induzem a ativação de células T pela ligação a receptores de Fc e o recrutamento de células apresentadoras de antígeno, anticorpos monoclonais anti-CD3 não ligantes ao FcR não ativam células T e induzem portanto uma menor toxicidade causada pela liberação de citocinas *in vivo*. Carpenter e colaboradores, em 2002, demonstraram que em pacientes com doença do enxerto *versus* hospedeiro (GVHD, do inglês *graft-versus-host disease*), o anticorpo humanizado anti-CD3 humano não ligante a FcR, o Visilizumab, induziu apoptose seletiva de células T e se dissociava rapidamente, causando pouca internalização do TCR. Desta forma, novos imunoterápicos capazes de induzir a formação de células regulatórias que levem o indivíduo a um estado de tolerância induzida (operacional), são de grande importância para a terapêutica de doenças que demandem a participação de mecanismos imunoregulatórios. Recentemente, tem sido mostrado que terapias com anti-CD3 não necessariamente induzem o aparecimento de Tregs, mas depletam células efetoras preservando as regulatórias (Peneranda *et al.*, 2013).

Tendo em vista os resultados obtidos com as versões FvFc humanizadas do anticorpo anti-CD3 humano e a produção do anticorpo inteiro (IgG) a partir da versão FvFc R (HIL R), foi proposto continuar este estudo durante o programa de Doutorado, com a introdução das versões T na forma de IgG e quimeras na forma de FvFc e IgG (scFv murino e Fc humano - M). Com isso, buscamos aprofundar a caracterização das atividades ligante e efetora desses anticorpos recombinantes, através do estudo dos efeitos proliferativo e apoptótico, além dos mecanismos envolvidos na resposta imunoregulatória já observada.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterização dos anticorpos recombinantes anti-CD3 humano (versões T, R e M), na forma de FvFc e IgG, quanto à indução de proliferação, apoptose, produção de citocinas, bem como a análise do efeito desses anticorpos na geração de células T com atividade regulatória.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Construção dos novos vetores para expressão da versão humanizada T na forma de IgG (pMACIA HIL TVL IRES neo) e das versões quimera na forma de FvFc e IgG (pMIREs FvFc MUR e pMACIA HIL MUR IRES neo).
- 2.2.2 Transfecção e estabelecimento de populações estáveis de todas as versões do anticorpo anti-CD3 humano (versões T, R e M na forma de FvFc e IgG) na linhagem celular CHO-K1.
- 2.2.3 Purificação dos anticorpos recombinantes a partir dos sobrenadantes de cultura por cromatografia de afinidade.
- 2.2.4 Análise dos anticorpos recombinantes por SDS-PAGE e *Western Blot* e quantificação por ELISA.
- 2.2.5 Teste da capacidade de ligação dos anticorpos recombinantes à superfície de linfócitos T através de ensaio de ligação direta a células mononucleares de sangue periférico humano por citometria de fluxo.
- 2.2.6 Análise da especificidade dos anticorpos recombinantes pelo antígeno CD3 humano através de ensaio de competição com o anticorpo comercial OKT3 conjugado a FITC por citometria de fluxo.
- 2.2.7 Avaliação do potencial mitogênico dos FvFcs recombinantes através de ensaio de proliferação de células mononucleares de sangue periférico marcadas com CFSE por citometria de fluxo.

- 2.2.8 Análise do perfil de citocinas induzido pelos FvFcs recombinantes após cultura destes com células mononucleares de sangue periférico, através de detecção quantitativa no sobrenadante de cultura no por citometria de fluxo.
- 2.2.9 Determinação de apoptose induzida pelos FvFcs recombinantes após cultura destes com células mononucleares de sangue periférico, através da investigação da expressão de Fas, FasL e ligação de Anexina V.
- 2.2.10 Avaliação da presença de células expressando marcadores de Tregs após cultura de células mononucleares de sangue periférico humano com os FvFcs recombinantes, através da investigação da presença de CD25, GARP, CTLA-4, dentre outros.

Material e Métodos

3.1 Material

3.1.1 Células

3.1.1.1 Linhagens Bacterianas

- **XL1-Blue (Stratagene®)** - *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ M15Tn10 (Tet^R)]* (Sambrook e Russel, 2001).

- **XL10-gold (Stratagene®)** - Tet^fD(*mcrA*)183 D(^{mcr}CB-*hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tet^f) Amy Cam^r]*. Os genes listados indicam alelos mutantes. Esta linhagem de *E. coli* foi desenvolvida para a transformação de plasmídios com mais de 7,0 kb com alta eficiência.

- **DH5α (Invitrogen®)** – F- /*endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção das versões do anticorpo anti-CD3 humano.

3.1.1.2 Linhagens de Células de Mamíferos

- **HEK-293** (ATCC n° CRL-1573) – é uma linhagem derivada de células de rim embrionário humano que contêm o genoma do adenovírus tipo 5. As células foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 5% (v/v).

- **BHK-21** (ATCC n° CCL-10) – é uma linhagem derivada de células renais de hamsters recém-nascidos (*Mesocricetus auratus*). As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 5% (v/v).

- **CHO-K1** (ATCC n° CCL-61) – é uma 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*. As células foram cultivadas em meio HAM-F12 (GIBCO) contendo SFB a uma concentração de 5% (v/v).

3.1.1.3 Linfócitos humanos

Os linfócitos humanos utilizados na realização deste trabalho foram obtidos do sangue periférico de um doador saudável, para avaliação da ligação das proteínas recombinantes ao antígeno CD3.

3.1.2 Plasmídios Utilizados

- **pMACIA HIL RVL IRES neo** – 10,2 kb, contém as cadeias leves e pesadas inteiras do anticorpo humanizado anti-CD3 humano versão RVL (Bezerra, 2009). Derivado do vetor pMAC com substituição do promotor mínimo de CMV pelo promotor/*enhancer* de CMV com intron A, íntron de imunoglobulina no interior da primeira sequência líder codificadora do peptídeo sinal, um elemento IRES sintético, NEO^R, sinal de poliadenilação SV40 polyA, Amp^R, ori ColE1 (Figura 10). Utilizado para substituição das porções VH e VL do anticorpo anti-CD3, gerando as novas versões humanizada e quimérica na forma de IgG, pMACIA HIL TVL IRES neo e pMACIA HIL MUR IRES neo, respectivamente.

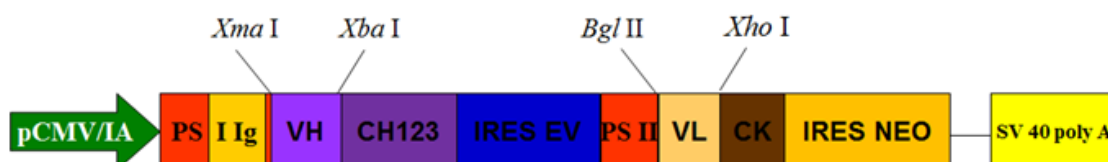


Figura 9. Esquema do vetor de expressão pMACIA HIL RVL IRES neo. Siglas – *pCMV/IA*: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *PS I*: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *I Ig*: íntron de imunoglobulina presente dentro da sequência de PS I; *VH*: cadeia variável pesada humanizada versão R; *CH123*: cadeias constantes pesadas 1, 2 e 3; *IRES EV*: IRES sintético; *PS II*: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; *VL*: cadeia variável leve humanizada; *CK*: cadeia constante pesada kappa; *IRES NEO*: resistência a geneticina e *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação. Os sítios de restrição utilizados para a clonagem das porções variáveis pesada e leve do anticorpo anti-CD3 humano foram evidenciados.

- **pMIREs FvFc TVL** – 7,6 kb, contém o FvFc do anticorpo humanizado anti-CD3 versão TVL (Silva, 2008). Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, peptídeo sinal de imunoglobulina, sítio de entrada ribossomal interno (IRES), NEO^R, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da β -lactamase (*bla*). Utilizado como doador da porção VH versão T e como aceptor do scFv MUR, gerando a versão FvFc

quimérica pMIREs FvFc MUR.

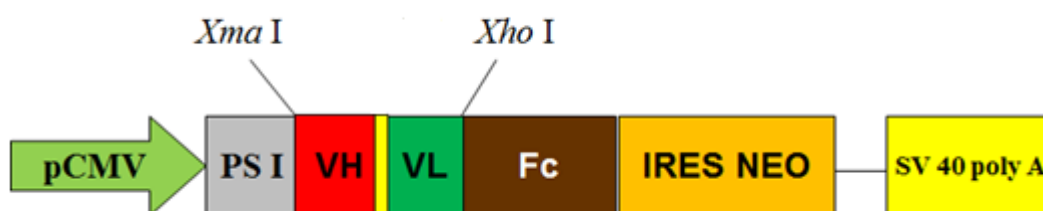


Figura 10. Esquema do vetor de expressão pMIREs FvFc TVL. Siglas – *pCMV*: promotor de citomegalovírus; *PS I*: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *VH*: cadeia variável pesada humanizada versão T; *VL*: cadeia variável leve humanizada; *Fc*: cadeias constantes pesadas 2 e 3; *IRES NEO*: resistência a geneticina e *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação Os sítios de restrição utilizados para a clonagem das porções variável pesada e scFv do anticorpo anti-CD3 humano foram evidenciados.

- **pUC57 scFv MUR** – 3,0 kb, contém o scFv murino do anticorpo anti-CD3, Amp^R, rep (pMB1), múltiplos sítios de clonagem. Utilizado como doador da porção VH e VL versões murinas, gerando as construções quiméricas pMIREs FvFc MUR e pMACIA HIL MUR IRES neo,.

- **pGFP/NEO** – 11,2 kb, Possui promotor de timidina quinase (pTK), NEO^R, sítio múltiplo de clonagem, sinal de poliadenilação TkpA, promotor pRSV-LTR, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da β-lactamase (bla). Utilizado para visualização da eficiência das transfecções por possuir o gene repórter que codifica a proteína fluorescente verde (GFP, do inglês, Green Fluorescent Protein).

3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela IDT[®] e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 pmoles/μL. A tabela 2 mostra as sequências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Sequência	Utilização
pMacHIL-5154 F	5' TCTGTTTGCAGGTGTACATTGTG 3'	Sequenciamento da porção VH da cadeia pesada clonada no plasmídeo pMACIA HIL IRES neo. Anela no promotor CMV.

pMacHIL- 7306 F	5' GATCAGTGCCTCAGTCATAATTGAC 3'	Sequenciamento da porção VL da cadeia leve clonada no plasmídio pMACIA HIL IRES neo. Anela na região IRES EV.
pMacHIL- 5728 R	5' GCTGCTGAGGGAGTAGAGTC 3'	Sequenciamento da porção VH da cadeia pesada clonada no plasmídio pMACIA HIL IRES neo. Anela na região CH1.
pMacHIL- 7817 R	5' CTCGGAGTTACCCGATTGGA 3'	Sequenciamento da porção VL da cadeia leve clonada no plasmídio pMACIA HIL IRES neo. Anela na região Cκ.

3.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

Solubilizado em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína etc. Adicionar a uma concentração final de 1 mM.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Solubilizado em água, pH 8-9, estocado a 4 °C por até 6 meses. É um inibidor de metaloproteases. Adicionar a uma concentração final de 5 mM.

3.1.5 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.

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C por 20 min.

3.1.6 Antibióticos

Ampicilina

A ampicilina liofilizada foi ressuspensa 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 μ m. 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 ressuspensa 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. 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.

3.1.7 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos

Meio HAM-F12 com L-glutamina a 2 mM (Invitrogen[®], n° catálogo: 21700-075)

Meio Base	1 pacote
NaHCO ₃	1,176 g
dH ₂ O q.s.p	1 L
pH 7,4	

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen[®], n° catálogo: 12800-017)

Meio Base	1 pacote
NaHCO ₃	3,7 g
dH ₂ O q.s.p	1 L
pH 7,4	

Meio RPMI 1640 com L-glutamina a 2 mM Suplementado (Invitrogen[®], n° catálogo: 31800-022)

Meio Base	1 pacote
NaHCO ₃	2 g
Peflacin 1:4	10 mL
Piruvato de sódio 100 mM	10 mL
Aminoácidos não essenciais 100X	20 mL
Solução de Vitaminas 100X	10 mL
Gentamicina	1 mL
dH ₂ O q.s.p	1 L
pH 7,4	

Meio de Congelamento de Células

DMEM	75% (v/v)
Soro Fetal Bovino	20% (v/v)
DMSO	5% (v/v)

Solução salina balanceada sem Cálcio e Magnésio (BSS.CMF)

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	0,048 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Glicose	1 g
Vermelho de fenol	0,01 g
dH ₂ O q.s.p.	1 L

pH 7,4

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

Tripsina	2,5 g
EDTA	0,38 g
BSS.CMF qsp	1 L

pH 8,0

Solução de aminoácidos não essenciais 10 mM 100X (Invitrogen[®], n^o catálogo: 11140-050)

pH 0,6 a 1,7.

Estocar de 2 a 8 °C.

Solução de Vitaminas 100X (Invitrogen[®], n^o catálogo: 11120-052)

pH 5,4 a 7,7.

Estocar de -5 a -20 °C.

Solução de Piruvato de Sódio 100 mM 100X (Invitrogen[®], n^o catálogo: 11360-070)**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 1,25%, 2,5%,

5% ou 10% (v/v).

Soro Fetal Bovino, Ultra low – IgG (Invitrogen[®], n^o catálogo: 16250-086)

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura Ham-F12 com L-glutamina à concentração de 1,25% (v/v).

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina	10.000 U
Estreptomicina	10.000 µg
Anfotericina B	25 µg/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 (GIBCO)

A geneticina liofilizada foi ressuspensa em água Mili-Q na concentração de 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 4 °C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção em transfecções estáveis para plasmídios que continham o gene de resistência a geneticina (NEO^R).

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán 400 mg

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

Reagente de transfecção Lipofectamine LTXTM (Invitrogen[®], n^o de catálogo 15338-100)

É um lipídio catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamífero, com uma grande eficiência e baixa toxicidade.

3.1.8 Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

Esta solução era utilizada para a conservação dos tampões PBS e PBS-T e nas soluções estoque dos anticorpos em concentração final de 0,05% (p/v).

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Tampão Tris

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

Glicogênio

Glicogênio 20 mg/mL

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

Tampão PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 10X, pH 7,4

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

Tampão PBST 1X, pH 7,4

PBS 1X acrescido de Tween 20 na concentração final de 0,1% (v/v)

3.1.9 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana

Solução de CaCl₂

CaCl₂ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4° C

Solução de CaCl₂ + 15% de Glicerol (v/v)CaCl₂ 50 mM

Glicerol 15%

Esterilizada por filtração e estocada a 4° C

3.1.10 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 ARNase A (Invitrogen[®], n° 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

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Isopropanol 100%

Isopropanol 100% (v/v)

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.

3.1.11 Tampões de Endonucleases de Restrição

3.1.11.1 Fermentas[®]:

Tango[™] (10X)

Tris-Acetato pH 7,9 33 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 66 mM

BSA 0,1 mg/mL

Fast Digest Buffer[™] (10X)

3.1.11.2 New England Biolabs[®]:

NEBuffer 1 (1X)

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 2 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 3 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 150 mM

MgCl₂ 10 mM

NaCl 100 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 4 (1X)

Tris-Acetato pH 7,9 20 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 50 mM

DTT 1 mM

3.1.12 Tampões de outras reações

Tampão de Reação 5X da T4 DNA ligase (Invitrogen®)

Tris-HCl 250 mM

MgCl₂ 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25% (p/v)

pH 7,6

Tampão de Reação 10X da T4 DNA ligase (Biolabs®)

Tris-HCl pH 7,5 500 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

Tampão de Reação 10X da T4 DNA ligase (Promega®)

Tris-HCl pH 7,6	300 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM

3.1.13 Endonucleases de restrição**3.1.13.1 Fermentas®:**

<i>Bgl</i> II (5 U/μL)
<i>Cfr</i> 9 I (1,5 U/μL)
<i>Eco</i> R I (5 U/μL)
<i>Nhe</i> I (1 U/μL)
<i>Pst</i> I (1,5 U/μL)
<i>Sma</i> I (1,2 U/μL)
<i>Xba</i> I (1,5 U/μL)

3.1.13.2 New England Biolabs®:

<i>Bam</i> H I (20 U/μL)
<i>Bgl</i> II (10 U/μL)
<i>Eco</i> R I (20 U/μL)
<i>Kpn</i> I (10 U/μL)
<i>Nhe</i> I (10 U/μL)
<i>Pvu</i> II (5 U/μL)
<i>Sma</i> I (20 U/μL)
<i>Xba</i> I (20 U/μL)
<i>Xho</i> I (20 U/μL)
<i>Xma</i> I (10 U/μL)

3.1.13.3 Promega®:

<i>Pst</i> I (10 U/μL)

3.1.14 Outras enzimas

T4 DNA Ligase (1 U/ μ L) (Invitrogen[®])

T4 DNA Ligase (1 U/ μ L) (New England Biolabs[®])

3.1.15 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA pH 8,0 0,02 M

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA pH 8,0 0,05 M

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X 50% (v/v)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,1% (p/v)

Xileno Cianol 0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo 10 mg/mL

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base 125 M

Glicina 125 mM

SDS 0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10% (p/v)
Glicerol	50% (v/v)
β-mercaptoetanol	10% (v/v)
Azul de bromofenol	0,5% (p/v)

Acrilamida 30% (29:1)

Acrilamida	145 g
Bis-acrilamida	5 g
dH ₂ O q.s.p.	500 mL

Estocar a 4 °C ao abrigo da luz.

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Tris	36,34 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8

Tris	12,11 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

SDS 10%

SDS	10 g
dH ₂ O q.s.p.	100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)**Gel Concentrador SDS-PAGE**

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)

APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	10% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

3.1.16 Soluções e material para os ensaios imunológicos (ELISA, *Western* e *Dot blot*)

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

Tris-HCl pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

Trizma-base	48 mM
Glicina	39 mM
SDS	0,037% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado 5% (p/v)
Dissolvido em PBST 1X

Solução Reveladora para ELISA

pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL
Dissolvido em APB

Solução Reveladora para *Western* e *Dot blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) eram preparados numa solução estoque de 50 mg/mL. O NBT solubilizado em N,N-dimetil

formamida e o BCIP , em água. Para preparar 10 mL da solução reveladora, 66 µL do estoque de NBT eram adicionados em 10 mL de APB e em seguida 33 µL do estoque de BCIP. Esta ordem deve ser respeitada para se evitar a precipitação dos reagentes.

Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra (Amersham[®] Bioscience n.º. catálogo. RPN 303E)

Placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços com fundo chato para ELISA

(Nunc[®] Maxisorp, n.º catálogo: 456537)

3.1.17 Resina e coluna para cromatografia de afinidade

ImmunoPure Plus Immobilized Protein A 25 mL

(Pierce, n.º. catálogo 22812). Para purificação dos anticorpos recombinantes.

Coluna K9/15

(GE Healthcare, n.º. catálogo 19-0870-01)

3.1.18 Soluções para cromatografia de afinidade

Protein A Binding Buffer 3,75 L

(Pierce, n.º. catálogo. 21007)

Protein A Elution Buffer 3,75 L

(Pierce, n.º. catálogo. 21009)

3.1.19 Material utilizado para concentração dos anticorpos purificados

Concentradores Amicon[®] Bioseparations:

- Centricon YM-30 (n.º. catálogo. 4209)
- Centricon YM-50 (n.º. catálogo 4225)

3.1.20 Marcadores moleculares para DNA e proteína

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.

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 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 20; 10 e 5 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 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder Plus (Invitrogen® n.º catálogo 10748-010)

Fragmentos de proteínas em kDa: 190; 120; 85; 60; 50; 40; 25; 20, 15 e 10.

3.1.21 Kits comerciais

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

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25) – Para preparação plasmidial em larga escala (Qiagen®, n.º catálogo 12163).

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®, n.º catálogo 42600).

PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE Healthcare, n.º catálogo. 17-1150-01).

Kit BCA Ácido Bicíntrico - para quantificação de proteínas (Pierce®, n.º catálogo 23225)

3.1.22 Soluções e material para os experimentos com citometria de fluxo

Todas as soluções preparadas no laboratório eram posteriormente filtradas em membranas de 0,2 µm.

Solução Salina 0,9%

NaCl 9 g

dH₂O q.s.p. 1 L

Tampão de lavagem para reação de FACS

Soro fetal bovino 2% (v/v)

Ázida Sódica 0,02% (p/v)

Dissolvidos em PBS 1X

Solução Salina Isotônica G 20 L (FACSflow) (BD Pharmigen[®], n^o catálogo: 990992)

Ficoll-PaqueTM (GE lifescience, n^o catálogo: 17-1440-02)

5(6)-Carboxyfluorescein diacetate n-succinimidyl ester (CFSE) (Sigma, n^o catálogo: 21888-25MG-F)

Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience[®], n^o catálogo: BMS817FF)

Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (eBioscience[®], n^o catálogo: 85-8007-74)

Placas de microtitulação de 96 poços com fundo em U não estéril

3.1.23 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, *Western Blot*, *Dot blot* e FACS.

Anti-IgG humana (H + L) feito em cabra (KPL[®], n^o catálogo: 01-10-06)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:1000 (ELISA)

Anti-IgG humana (Fc específico) feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina (Sigma[®], n^o catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:5000 (ELISA) e 1:2500 (Western blot e Dot blot)

Anti-IgG de camundongo feito em cabra conjugado a FITC (Sigma[®], n^o catálogo: F0257)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:100 (FACS)

Anti-IgG humana feito em camundongo conjugado a FITC (BD[®], n^o catálogo: 555786)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:10 (FACS)

Anti-GARP humano feito em rato conjugado a PE (eBioscience[®], n^o catálogo: 12-9882-42)

Clone: G14D9

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD3 humano feito em camundongo conjugado a FITC (eBioscience[®], n^o catálogo: 11-0037-73)

Clone: OKT3

Titulação de uso: 1:50 e 1:500 (FACS)

OKT3[®], Anti-CD3 humano feito em camundongo (muronomab – CD3) (eBioscience[®], n^o catálogo: 14-0037-82)

Concentração 1 mg/mL

Utilizado como controle positivo nos ensaios de ligação, bloqueio e competição dos anticorpos recombinantes .

Anti-CD4 humano feito em camundongo conjugado a PE (eBioscience[®], n^o catálogo: 12-0048-042)

Clone: OKT4

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD4 humano feito em camundongo conjugado a APC (eBioscience[®], n^o catálogo: 12-0048-042)

Clone: OKT4

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD8 humano feito em camundongo conjugado a PE (BD Pharmigen[®], n^o catálogo: 557086)

Clone: RPA-T8

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD8 humano feito em camundongo conjugado a APC (eBioscience[®], n^o catálogo: 17-0086-42)

Clone: OKT8

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD25 humano feito em camundongo conjugado a PE-Cyanine5 (eBioscience[®], n^o catálogo: 15-0259-42)

Clone: BC96

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD95 humano feito em camundongo conjugado a PE-Cyanine5 (eBioscience[®], n^o catálogo: 15-0259-42)

Clone: BC96

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti-CD152 humano feito em camundongo conjugado a PE-Cyanine5 (BD[®], n^o catálogo: 555458)

Clone: eBioRDR5

Titulação de uso: 1:25 (FACS)

Anti-CD178 humano (Fas ligante) feito em camundongo conjugado a PE (eBioscience[®], n^o catálogo: 12-9919-42)

Clone: NOK-1

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

IgG Humana (Pierce[®], n^o catálogo: 31154)

Concentração: 11,3 mg/mL

Utilizado à 22,6 ou 113 ng/mL como padrão nos experimentos de ELISA.

FcR Blocking Reagent (MACS[®], n^o catálogo: 130-059-901)

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anexina V conjugada a APC (eBioscience[®], n^o catálogo: 88-8007-74)

Titulação de uso: 1:25 (FACS)

7-AAD (eBioscience[®], n^o catálogo: 00-6993)

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de DNA plasmidial

3.2.1.1 Em pequena escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1- Aproximadamente 3 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídio de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37 °C, eram coletados por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.

2- O sedimento era ressuspendido em 200 µL de Solução I. Incubava-se as amostras no gelo por 5 min.

3- Eram adicionados 400 µL de Solução II e as amostras eram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes, e estas eram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.

4- Eram adicionados 300 µL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização era repetido, e as amostras eram incubadas no gelo por 10 min.

5- As amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C.

6- Ao sobrenadante eram adicionados 5 µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37 °C.

7- Eram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, as amostras eram

centrifugadas por 5 min a 5.000 g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

8- Eram adicionados 300 μ L de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta eram repetidos.

9- Eram adicionados 2v de etanol absoluto gelado e as amostras eram incubadas a -20 °C por no mínimo 2 horas.

10- As amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. O sobrenadante era desprezado.

11- Era adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras eram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante era desprezado.

12- O sedimento era seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.

13- O sedimento era ressuspendido em 50 μ L de TE e as amostras conservadas a -20 °C.

3.2.1.2 Em larga escala (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1- Duzentos mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídio de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 μ g/mL) durante 16 horas a 37 °C, eram coletados por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.

2- O sedimento era ressuspendido em 5 mL de Solução I sob forte agitação. As amostras eram incubadas no gelo por 10 min.

3- Eram adicionados 10 mL de Solução II e as amostras eram homogeneizadas, por meio de inversão do tubo várias vezes. Estas eram incubadas à temperatura ambiente por 5 min.

4- Eram adicionados 7,5 mL de Solução III, o mesmo procedimento de homogeneização era repetido, e as amostras eram incubadas no gelo por 10 min.

5- As amostras eram centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4 °C.

6- O sobrenadante era filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante 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.

7- O sobrenadante era descartado e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento era ressuspendido em 500 μ L de TE ao qual eram adicionados 10 μ L de RNase A. As amostras eram incubadas por 1 hora a 37 °C.

8- Era adicionado 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

9- O passo anterior era repetido mais uma vez.

10- Era adicionado então 1v de clorofil e o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta eram repetidos.

11- Eram adicionados 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% gelado e as amostras eram incubadas por, no mínimo 2 horas a -20 °C.

11- As amostras eram centrifugadas a 12.000 rpm por 45 min a 4 °C. O sobrenadante era desprezado.

12- Era adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e as amostras eram novamente centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante era desprezado.

13- O sedimento era seco a vácuo ou por simples exposição ao ar.

14- O sedimento era ressuspenso em 200 µL de TE. E as amostras conservadas a -20 °C.

3.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

As digestões dos plasmídios utilizados com enzimas de restrição eram realizadas 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.

3.2.3 Análise de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001).

A agarose foi preparada numa concentração de 0,7 a 1,0% em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA eram aplicadas com tampão de amostra para gel de agarose no gel e eram submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização do DNA luz ultravioleta eram incididas no gel utilizando um transluminador (Pharmacia-LKB[®]) e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação.

3.2.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

Após eletroforese os fragmentos de DNA a serem eluídos foram cortados do gel de agarose. A eluição do DNA do gel submetendo-o ao Freeze-Squeeze:

1 – A banda do gel contendo o DNA era cortada e transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm. As duas extremidades da bolsa eram reunidas e seladas com o auxílio da parte cônica de um microtubo de 1,5 mL. A banda era inserida dentro da bolsa pela parte não selada.

- 2 – A bolsa contendo o fragmento era congelada a -40 °C.
- 3 - Após o total congelamento, a porção plana da tampa de um microtubo de 1,5 mL era utilizada para macerar o fragmento até se liquefazer.
- 4 – O líquido e o gel eram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore®).
- 5 – O material era centrifugado por 5 min a 12.000 x g a temperatura ambiente.
- 6 - Após a centrifugação o material era precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. As amostras eram incubadas a -20 °C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

3.2.5 Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor e inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento, sendo normalmente uma razão molar que variou de 1:1 a 1:5, aplicando-se a seguinte fórmula:

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

As reações de ligação eram preparadas em tampão de ligase 1X contendo 1U de T4 DNA ligase. Os sistemas possuíam 10 a 20 µL de volume final, sendo incubados por 16 horas a 16 °C ou 4 °C, dependendo do tipo de extremidade do DNA. Após este período, o sistema era transformado em células competentes de *E. coli*.

3.2.6 Preparação de células competentes e transformação bacteriana

3.2.6.1 Por choque térmico-CaCl₂ (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Eram inoculados 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. O inóculo era incubado a 37 °C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD₆₀₀) de 0,1 a 0,3.
- 2- O inóculo era centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante era desprezado. (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).

- 3- O sedimento era ressuspendido em 10 mL de solução de CaCl_2 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4- Era feita uma centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante era desprezado.
- 5- O sedimento era ressuspendido em 1 mL de solução de CaCl_2 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo, as células eram aliqotadas e estas podiam ser utilizadas por um período máximo de 24 horas.
- 7- Eram incubados de 100 a 200 μL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- O choque térmico era realizado por meio de incubação do sistema de transformação em banho a 42 °C por 3 min.
- 9- Era adicionado imediatamente 1 mL de meio LB e o sistema era incubado por 1 h a 37 °C.
- 10- Eram semeadas quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As placas eram mantidas na estufa a 37 °C por 16 horas.

3.2.6.2 Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Uma colônia isolada da célula de interesse era 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.
- 2- Era inoculado 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. O inoculo era incubado a 37 °C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600} de 0,7 a 0,9.
- 2- O inóculo era centrifugado a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante era desprezado e a célula era mantida sempre gelada a partir desse momento.
- 3- O sedimento era ressuspendido em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir eram adicionados mais 75 mL de glicerol 10% gelado.
- 4- Era feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, repetindo a etapa anterior.
- 5- 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.
- 6- 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.

7- Para a transformação, o plasmídeo era adicionado, já em um tubo resfriado previamente, à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioAgency[®]) também já resfriada.

8- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω , no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessa condições é de 4,0 a 5,0 milisegundos.

9- 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.

10- Após uma incubação de 1 h a 37 °C e 220 rpm, diluições da transformação eram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 μ g/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37 °C por 16 horas.

3.2.7 Sequenciamento automático de DNA e análise de sequências.

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios eram sequenciados utilizando o sequenciador automático MegaBACE 500Plus (Molecular Dynamics[®]). Foram utilizadas de 150 a 200 ng do vetor, 5 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

As sequências obtidas por meio do sequenciamento automático eram analisadas utilizando ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as sequências eram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com sequências já depositadas no *GenBank*. As sequências também eram manipuladas e analisadas com sequências, depositas em um banco de dados pessoal, utilizando o programa BioEdit Sequence Aligment Editor (Hall, 2007).

3.2.8 Cultura de células de mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células eram observadas em microscópio invertido Leica DMIL e incubava-se em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 70% de umidade.

3.2.8.1 Congelamento de células de mamíferos – Criopreservação (Ruggiero, 2002).

- 1 – As células em cultura aderente eram lavadas 3 vezes com BSS.CMF. Após esse procedimento, eram adicionados 5 mL de tripsina para que as células se soltassem da garrafa de cultura.
- 2 – A suspensão celular era então transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL, ao qual eram adicionados 5 mL 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 130 x g por 8 min.
- 4 – O sobrenadante era descartado e o sedimento era ressuspendido no meio de cultura remanescente do tubo.
- 5 – As células eram distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos, onde 500µL de meio de congelamento eram adicionados.
- 6 – Os criotubos eram incubados a 4°C por 30 min, depois a – 20°C por 30 min 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.

3.2.8.2 Descongelamento de células de mamíferos (Ruggiero, 2002).

- 1 – Os criotubos eram transferidos para um banho de 37°C até o total descongelamento das células.
- 2 – As células eram plaqueadas em densidade de 2×10^2 células por garrafa de 25cm² em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB.

3.2.8.3 Tripsinização, passagem das células e formação de monocamada celular (Ruggiero, 2002).

Quando as células atingiam a confluência total e cobriam 100% de toda superfície da placa de cultura, elas deveriam ser repicadas.

- 1 – O meio de cultura da garrafa era descartado.
- 2 – Eram adicionados à garrafa 5 mL de tripsina numa concentração de 1:250.
- 3 – Após 3 min, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu.

- 4 – A tripsina era neutralizada com cerca de 5 mL de meio acrescido de 10% de SFB.
- 5 – A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 50 mL, e centrifugados a 130 x g por 8 min.
- 6 – O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspense em 3 mL de meio acrescido de SFB.
- 7 – Era transferida toda a população células por garrafas de 75 cm² ou 150 cm² contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

3.2.8.4 Estimativa do número de células por meio de contagem em câmara de Neubauer (adaptado de Spector *et al.*, 1998).

- 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 quadrantes. Em seguida, era utilizada a fórmula:

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

3.2.8.5 Determinação Viabilidade celular (adaptado de Spector *et al.*, 1998).

- 1 – As células eram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15 mL, ao qual se adicionou 5 mL de meio com SFB.
- 2 – As células eram centrifugadas a 130 x g por 8 min.
- 3 – O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 3 mL de meio de cultura remanescente.
- 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. Após a contagem, era estabelecida a porcentagem de células viáveis.

3.2.8.6 Transfecção de células CHO-K1 utilizando o reagente Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, n° de catálogo 15338-100)

- 1 – Em uma placa de cultura de 6 poços eram semeadas cerca de $4,2 \times 10^5$ células por poço, e em seguida eram adicionados 2 mL de meio contendo SFB.
- 2 – As células eram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência de 90%.
- 3 – No dia seguinte, o DNA a ser transfectado era diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 6 poços, a quantidade a ser utilizada é: 2,5 µg de DNA por poço, para um volume final de 500µL, completado com meio sem soro.
- 4 – Era adicionado o reagente Lipofectamine LTX™ à solução de DNA. Para placas de 6 poços, a quantidade do reagente a ser utilizada é 6,25 µL.
- 5 – A solução era incubada por 30 min à temperatura ambiente.
- 6 – Enquanto o complexo era formado, o meio dos poços do dia anterior era trocado por 2mL de meio sem soro.
- 7 – Após este período, a mistura era adicionada lentamente sobre o poço em movimentos cruciformes (no total, foram adicionados 500 µL da mistura por poço).
- 8 – As células eram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade.
- 9 – Transcorridas de 4 a 6 horas após a transfecção, o meio de cultura sem soro era trocado para um meio de cultura com soro. Em seguida, a placa era incubada durante a noite nas mesmas condições descritas no passo 7.
- 10 – No tempo de 48 e 72 horas pós-transfecção, o meio de cultura era coletado e verificava-se a presença dos anticorpos recombinantes.

3.2.8.7 Seleção de células transfectadas utilizando Geneticina® (G418-Sulfato)

Como as construções bicistrônicas (pMIREs) e tricistrônicas (pMACIA) utilizadas para expressão dos anticorpos recombinantes apresentam o gene de resistência a geneticina (NEO^R), após o processo de transfecção os vetores possibilitaram que fosse feita a seleção das células transfectadas e eliminação daquelas que não estavam produzindo as proteínas recombinantes.

1 - Após 72h da transfecção o sobrenadante de cultura era coletado para verificação da expressão de proteínas recombinantes e o meio era repostado adicionado de geneticina a uma concentração final de 600 µg/mL em todos os poços transfectados com o plasmídeo e também no poço com as células não transfectadas, utilizadas como controle.

2 - O meio de cultura a partir de então era trocado a cada 48h nas mesmas condições descritas anteriormente e visualizava-se, ao microscópio ótico, a morte celular no poço controle de células não transfectadas.

3- Quando era constatado que houve a morte das células não transfectadas (elas mudam sua morfologia de elípticas para esféricas e perdem a aderência à placa de cultura) permanecia-se mais uma semana com o procedimento descrito acima e a partir de então as células eram consideradas selecionadas e somente células transfectadas estavam presentes no poço.

3.2.8.8 Propagação das células transfectadas selecionadas para aumento da expressão.

Quando as células transfectadas selecionadas atingiam a confluência máxima no poço era então procedido à propagação das células para aumento da cultura e conseqüentemente da quantidade de proteína recombinante expressa.

1 – O meio de cultura do poço era descartado.

2 – Eram adicionados 500 µL de tripsina ao poço.

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

5 – A tripsina era neutralizada com cerca de 1 mL de meio acrescido de 10% SFB.

6 – A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 15 mL, e centrifugados a 130 x g por 8 min.

7 – O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso em 3 mL de meio Ham-F12 acrescido de SFB.

8 – Transferia-se toda a população células para garrafas de 75 cm² contendo 10 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina na concentração já citada.

9 – Quando as células chegavam novamente a uma confluência máxima as células eram então passadas para garrafas de 150 cm² contendo 30 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina. A partir de então, as células transfectadas eram mantidas nessas condições, trocando-se o meio a cada 7 dias nas mesmas condições e coletando-se o sobrenadante para

acumulo de quantidade suficiente para purificação dos anticorpos recombinantes e realização dos ensaios biológicos.

3.2.9 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Eram realizados ensaios do tipo ELISA sanduíche para detecção e quantificação das proteínas recombinantes. Após cada lavagem as placas de microtitulação (Nunc[®]) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções. Os anticorpos utilizados estão detalhados no tópico 3.1.23 do Material.

- 1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com 150 μ L por poço com o anticorpo anti-IgG humana H+L feito em cabra, diluído em PBS 1X 1:1.000, e eram incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2- Os poços eram lavados 3X com PBST 1X, 200 μ L por poço.
- 3- Os poços eram bloqueados com 180 μ L por poço de solução de bloqueio, e eram incubados durante 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
- 4- Estes eram lavados 3X com PBST 1X e o sobrenadante de cultura das células transfectadas eram adicionados. Eram feitas diluições seriadas de fator comum 3 dos anticorpos em PBS, onde o volume final era de 100 μ L por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243. A mesma diluição era realizada para todas as amostras. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada na concentração especificada no material (diluída na mesma solução/meio que as proteínas recombinantes). As reações eram feitas em triplicatas e eram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.
- 5- Os poços foram lavados novamente 3X com PBST 1X e 150 μ L por poço do anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina feito em cabra na diluição de 1:5.000 eram incubados por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Os poços eram lavados 3X com PBST 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB).
- 7- O ensaio era revelado com 100 μ L por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB. Este era incubado por 20 a 30 min a temperatura ambiente. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “Microplate Reader BioRad[®]” modelo 450 a um

comprimento de onda de 405 nm.

Os cálculos de concentração eram feitos baseados na curva padrão de IgG humana.

3.2.10 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

A purificação dos FvFcs e IgGs recombinantes era realizada por meio da resina ImmunoPure Plus Immobilized Protein A (Pierce®) de acordo com o protocolo do fabricante.

1 – Os microtubos de coleta da eluição eram preparados adicionando 100 µL de Tris-HCl 1M pH 9,0 por mL de fração a ser coletado.

2 – Era preparada a bomba peristáltica preenchendo-a de tampão de ligação. A tampa da parte superior da coluna era retirada e a mangueira da bomba peristáltica era conectada à coluna cromatográfica gota a gota.

3 - A coluna era lavada com 5 volumes de tampão de ligação mantendo uma taxa de passagem do tampão pela coluna em 2 mL/min.

4 – O sobrenadante de cultura filtrado e concentrado era aplicado.

5 – A coluna era lavada com 15 volumes de tampão de ligação.

6 – Os anticorpos recombinantes ligados eram eluidos com 20 volumes de tampão de eluição, sempre coletando as amostras nos microtubos de coleta preparados com Tris-HCl.

7 – A coluna era lavada com mais 5 volumes de tampão de ligação.

8 – Eram aplicados 5 volumes de água MiliQ com 0,02% de azida sódica, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.

Imediatamente após o fim da coleta, 5 µL de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blot*, seguindo o protocolo do item 3.2.11 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas nas colunas Centricon YM-30 e YM-50 (Amicon®), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 30 e 50 kDa, respectivamente, para diálise e concentração.

3.2.11 Análise de proteínas por *Dot Blot* (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

1 - 5 µL das frações obtidas durante o processo de purificação eram adicionadas diretamente a uma membrana de nitrocelulose.

2 - Com a membrana seca, contendo os anticorpos recombinantes ligados, era procedido o bloqueio utilizando solução de bloqueio por 1h a temperatura ambiente ou durante a noite a

4 C. 3 - Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBST 1X.

4 – A membrana era incubada com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina ou com o anticorpo anti-Ck humano na diluição de 1:2.500 por 1h a temperatura ambiente. (Quando utilizado o anticorpo anti-Ck humano, após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBST 1X e incubada com o anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a fosfatase alcalina).

5 - Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS – T 1X e uma vez com APB.

6 – A solução reveladora (NBT/BCIP) era então adicionada. O aparecimento de pontos coloridos era controlado visualmente. Após a reação, a membrana era lavada com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. A membrana seca era preservada sobre papel filtro.

3.2.12 Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

Após a purificação dos anticorpos recombinantes era procedida a análise em gel desnaturante de poliacrilamida.

1 – Inicialmente o gel separador era preparado em concentração de 10% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.

2 – Uma vez polimerizado o gel separador, o pente era introduzido para permitir a formação dos poços.

3 – A partir daí, o gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v) era vertido, tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.

4 – Uma vez polimerizado o gel ele era acoplado ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços eram lavados com tampão de corrida.

5 – Imediatamente antes da aplicação das amostras (já preparadas com o tampão de amostra), estas eram fervidas em banho-maria a 100 °C por 10 min.

5 – Era procedida a aplicação das amostras e iniciada a corrida do gel a 20 mA por gel.

6- Após a corrida do gel, este era submetido à coloração com prata ou transferência para membrana de nitrocelulose para realização do *Western Blot*, especificada no item 3.2.17 de métodos.

3.2.13 Coloração do gel de SDS-PAGE

A coloração com prata era feita com o kit PlusOne Silver Staining kit Protein (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante.

3.2.14 Análise de proteínas por *Western Blot* (adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

Após a corrida, o gel de poliacrilamida era transferido para a membrana de nitrocelulose utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite (Pharmacia-LKB[®]).

1 – Conforme instruções do fabricante, era feito um "sanduíche" de papéis de filtro, previamente embebidos em tampão de transferência contendo, nessa ordem, 5 papéis de filtro, a membrana, o gel e mais 5 papéis de filtro.

2 – O "sanduíche" era colocado entre os eletrodos de grafite e submetido a uma corrente elétrica de 0,8 mA/cm² de membrana por 1h e 45 min.

3 – Após este procedimento, a membrana, contendo as proteínas transferidas, era embebida em solução de bloqueio e incubada por 1h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C.

4 – A solução de bloqueio era removida e a membrana era lavada 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.

5- A membrana era incubada com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente.

6 – Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS – T 1X e uma vez com APB.

7 – A solução reveladora (NBT/BCIP) era então adicionada. O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, a membrana era lavada com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. A membrana seca era preservada sobre papel filtro.

3.2.15 Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (Boyum, 1968).

A separação de CMSP foi feita por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque, que se baseia nas diferenças de densidade entre as células mononucleares e os outros elementos do sangue. Após a centrifugação, as CMSPs e plaquetas, por serem menos densas que a solução de Ficoll ($d < 1,077$ g/L), ficavam localizadas acima da solução de Ficoll-Hypaque, enquanto as hemácias e as células polimorfonucleares (granulócitos), que

têm maior densidade, ficam localizadas abaixo. O sangue obtido de doador saudável deve render de 1 a 2 x 10⁶ células/mL. Aproximadamente 30% das células são linfócitos com viabilidade de 95%.

Todas as soluções e material que entraram em contato com as células estavam estéreis. Se a separação visava somente o ensaio de FACS a separação podia ser realizada fora do fluxo. De outra forma, todos os procedimentos eram realizados em ambiente estéril. Para retirada do sangue de doador foram utilizados tubos com EDTA, para evitar a coagulação do sangue. Todas as centrifugações devem ser realizadas em rotores swing.

- 1 – Diluía-se o sangue 1:2 com solução salina 0,9% estéril.
- 2- Adicionavam-se 9 mL dessa solução sobre um volume de 3 mL de Ficoll – Hypaque utilizando uma pipeta pasteur, bem delicadamente e pelas bordas, de forma que o sangue formasse uma camada acima do Ficoll. Importante utilizar tubos transparentes para na próxima etapa facilitar a coleta das células.
- 3 – Centrifugava-se a 1800 rpm por 25 min a 20 °C.
- 4 – Após a centrifugação formavam-se 3 fases, na interface da 1^o (plasma) com a 2^o (Ficoll) encontrava-se uma nuvem com as células mononucleares. Procedia-se a coleta dessa nuvem com uma pipeta pasteur transferindo-as para outro tubo de 50 mL.
- 5 – Completava-se o volume do tubo com as células com solução salina 0,9%.
- 6 – Centrifugava-se a 2000 rpm (400 g) por 10 min a 20 °C.
- 7 – Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o botão celular com 10 mL de solução salina 0,9% para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.
- 8 - Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 8 min a 20 °C.
- 9 - Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o botão celular com 10 mL de solução salina 0,9% para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.
- 10 - Centrifugava-se a 1100 rpm por 8 min a 20 °C. A baixa rotação era para eliminar as plaquetas.

11 - Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se as células em 3 mL de tampão de lavagem de FACS, para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.

12 – Procedia-se a contagem das células na câmara de Neubauer.

3.2.16 Reação de Imunofluorescência para FACS (*Fluorescent Activated Cell Sorter*)

3.2.16.1 Ensaio de ligação direta ao antígeno

Nesse experimento evitava-se ao máximo a exposição à luz direta.

1 – Adicionava-se 4×10^5 CMSPs por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.

2 – Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4 °C por 5 min.

3 – Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

4 – Ressuspensavam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.

5 – Adicionavam-se 50 µL do bloqueador de Fc aos poços. 6 – Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.

7 – Adicionavam-se 150 µL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.

8 – Repetia-se o processo de lavagem por 2x.

9 – Adicionavam-se 50 µL dos anticorpos recombinantes na concentração de interesse.

10 – Repetia-se o processo de lavagem por 3x.

11 – Adicionavam-se 50 µL dos anticorpos secundários conjugados a FITC (anti-IgG humana ou anti-IgG de camundongo) na concentração de interesse.

12 – Repetia-se o processo de lavagem por 3x.

13 – Ressuspendiam-se as células em 400 µL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

14 – A aquisição da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.16.2 Ensaio de competição pelo antígeno

Nesse experimento evitava-se ao máximo a exposição à luz direta.

1 – Adicionava-se 4×10^5 CMSPs por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.

2 – Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4 °C por 5 min.

3 – Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

4 – Ressuspendiam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.

5 – Adicionavam-se 50 µL do anticorpo comercial OKT3 conjugado a FITC na concentração de interesse.

6 – Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.

7 – Adicionavam-se 150 µL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.

8 – Repetia-se o processo de lavagem por 2x.

9 – Adicionavam-se 50 µL dos anticorpos recombinantes na concentração de interesse.

10 – Repetia-se o processo de lavagem por 3x.

11 – Ressuspendiam-se as células em 400 µL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

12 – A aquisição da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.16.3 Marcação para o ensaio de proliferação

Esta marcação era realizada após o experimento descrito no item 3.2.18.

- 1 – Adicionava-se 4×10^5 CMSPs já marcadas com CFSE, incubadas com cada anticorpo recombinante, por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.
- 2 – Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4°C por 5 min.
- 3 – Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.
- 4 – Ressuspendiam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.
- 5 – Adicionavam-se 50 μL do anticorpos anti-CD4 conjugado a PE e anti-CD8 conjugado a APC na concentração de interesse, para discriminação entre as populações de linfócitos T.
- 6 – Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.
- 7 – Adicionavam-se 150 μL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.
- 8 – Repetia-se o processo de lavagem por 2x.
- 9 – Ressuspendiam-se as células em 400 μL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.
- 10 – A aquisição da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.16.4 Marcação para o ensaio para detecção de apoptose

Esta marcação era realizada após o experimento descrito no item 3.2.20.

- 1 – Adicionava-se 4×10^5 CMSPs, incubadas com cada anticorpo recombinante, por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.
- 2 – Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4°C por 5 min.

3 – Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

4 – Ressuspendiam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.

5 – Adicionavam-se 50 µL do anticorpos na concentração de interesse:

Mix 1: anti-CD95L conjugado a PE, anti-CD95 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 conjugado a APC.

Mix 2: anti-CD95L conjugado a PE, anti-CD95 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD8 conjugado a APC.

Mix 3: anti-CD4 conjugado a PE.

Mix 4: anti-CD8 conjugado a PE.

6 – Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.

7 – Adicionavam-se 150 µL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.

8 – Repetia-se o processo de lavagem por 2x.

9 – Após a marcação com os Mix 3 e 4, era procedida a análise da ligação da Anexina V. Essa era realizada com o kit Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (eBioscience) segundo instruções do fabricante.

10 – Ressuspendiam-se as células em 400 µL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

11 – A aquisição da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.16.5 Marcação para o ensaio de análise da expressão de marcadores de Tregs

Esta marcação era realizada após o experimento descrito no item 3.2.21.

1 – Adicionava-se 4×10^5 CMSPs, incubadas com cada anticorpo recombinante, por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.

2 – Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4 °C por 5 min.

3 – Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

4 – Ressuspendiam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.

5 – Adicionavam-se 50 µL do anticorpos na concentração de interesse:

Mix 1: anti-GARP conjugado a PE, anti-CD25 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 conjugado a APC.

Mix 2: anti-GARP conjugado a PE, anti-CD25 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD8 conjugado a APC.

Mix 3: anti-CD152 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 conjugado a APC.

Mix 4: anti-CD152 conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD8 conjugado a APC.

6 – Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.

7 – Adicionavam-se 150 µL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.

8 – Repetia-se o processo de lavagem por 2x.

10 – Ressuspendiam-se as células em 400 µL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

11 – A aquisição da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.17 Aquisição da reação de FACS no citômetro de fluxo

1 – O citômetro de fluxo utilizado foi o FACSCalibur ou o FACSVerse (BD Biosciences®). O software utilizado para a análise dos dados foi o FlowJo versão 7.6.5 (Trestar).

2 – As células eram adquiridas e selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade de maneira a analisar a população de linfócitos, e a seguir eram adquiridas de 10.000 células para cada amostra dentro da região de linfócitos.

3 – Os dados eram obtidos a partir da análise dos histogramas ou gráficos de pontos fornecidos pelo programa. Os resultados eram expressos em porcentagem de células positivas

para cada proteína em estudo. Outro parâmetro considerado era a mediana de intensidade de fluorescência.

4 – Nos ensaios de competição, a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) nas amostras foi comparada e a porcentagem de inibição da ligação foi acessada com a fórmula:

$$\frac{\text{MIF (OKT3 conjugado a FITC)} - \text{MIF (FvFcs ou IgGs)}}{\text{MIF (OKT3 conjugado a FITC)} - \text{MIF (OKT3)}} \times 100 = \% \text{ inibição da ligação}$$

3.2.18 Ensaio de proliferação de CMSPs com CFSE

Toda a reação era realizada evitando-se ao máximo a exposição a luz direta. A reação de proliferação de células mononucleares do sangue periférico era realizada em placas de 12 poços onde eram adicionadas 4×10^5 células por poço, com cada poço contendo 1 mL de meio de cultura.

1 – Antes da marcação, a quantidade das CMSPs necessárias eram lavadas com PBS + BSA 0,1% e centrifugadas a 1.800 rpm por 8 min. Aproximadamente 10^6 das CMSPs eram separadas para o controle negativo.

2 – Para marcação com CFSE as células deveriam estar a uma concentração de 2×10^7 células por mL.

Primeiramente, era feita uma diluição intermediária do CFSE, diluindo 1 μ L do CFSE estoque a 5 mM em 2 mL de PBS + BSA 0,1%. Dessa maneira, esta solução estaria a 2,5 mM. O sedimento era ressuspenso diretamente nessa solução já diluída.

3 – As CMSPs marcadas eram incubadas por 10 min a 37 °C, agitando-as bem a cada 5 min.

4 – A reação era interrompida adicionando 5 volumes de meio RPMI 1640 suplementado acrescido de 10% de SFB gelado e incubando por 5 min no gelo.

5 – As CMSP eram então centrifugadas a 1.800 rpm por 8 min.

6 – O sobrenadante era descartado e 3 mL de PBS + BSA 0,1% era adicionado.

7 – Os procedimentos 5 e 6 eram repetidos mais duas vezes para lavagem das células.

8 – As CMSPs marcadas eram ressuspenso em meio RPMI suplementado acrescido de 10% de SFB nas condições desejadas e adicionava-se 4×10^5 células por poço do

experimento.

9 – Eram então adicionados os anticorpos de interesse (FvFcs e IgGs recombinantes, e OKT3) nas concentrações desejadas.

10 – Logo após, eram incubadas a 37 °C por 8 dias (192 h).

11 – Passada a incubação, as CMSPs eram retiradas dos poços, lavadas com tampão de lavagem de FACS e centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min a 4 °C. Esse procedimento de lavagem era repetido mais 2 vezes.

12 – Em seguida era realizada uma reação de imunofluorescência para FACS, para avaliação da população de células de interesse, seguindo os protocolos dos itens 3.2.16.3 e 3.2.17.

3.2.19 Detecção quantitativa de citocinas liberadas no sobrenadante de cultura

As CMSPs eram incubadas com 62,5 ng/mL de cada anticorpo de interesse, a 37 °C por 5 dias (120h). Essa incubação era realizada em placas de 12 poços onde eram adicionadas 4×10^5 células por poço, com cada poço contendo 1 mL de meio de cultura.

1 – Após a incubação, o meio de cultura era então coletado por centrifugação, 1800 rpm por 5 min.

2 – O processo para a detecção quantitativa de citocinas era realizado com o kit Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex Kit FlowCytomix (eBioscience) segundo instruções do fabricante.

3.2.20 Ensaio para detecção de apoptose

As CMSPs eram incubadas com cada anticorpo de interesse, na concentração desejada, a 37 °C por 5 dias (120h). Essa incubação era realizada em placas de 12 poços onde eram adicionadas 4×10^5 células por poço, com cada poço contendo 1 mL de meio de cultura.

1 – Passada a incubação, as CMSPs eram retiradas dos poços, lavadas com tampão de lavagem de FACS e centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min a 4 °C. Esse procedimento de lavagem era repetido mais 2 vezes.

2 – Em seguida era realizada uma reação de imunofluorescência para FACS, para avaliação

da população de células de interesse com os marcadores de apoptose, seguindo os protocolos dos itens 3.2.16.4 e 3.2.17.

3.2.21 Ensaio para análise da expressão de marcadores de Tregs

As CMSPs eram incubadas com cada anticorpo de interesse, na concentração desejada, a 37 °C por 8 dias (192h). Essa incubação era realizada em placas de 12 poços onde eram adicionadas 4×10^5 células por poço, com cada poço contendo 1 mL de meio de cultura.

1 – Os anticorpos recombinantes eram adicionados 4 vezes, a cada 48h, sendo o último pulso no sexto dia.

2 – No oitavo dia, as CMSPs eram retiradas dos poços, lavadas com tampão de lavagem de FACS e centrifugadas a 1.800 rpm por 5 min a 4 °C. Esse procedimento de lavagem era repetido mais 2 vezes.

2 – Em seguida era realizada uma reação de imunofluorescência para FACS, para avaliação da população de células de interesse com os marcadores de Tregs, seguindo os protocolos dos itens 3.2.16.5 e 3.2.17.

Resultados e Discussão

4.1 Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL TVL IRES neo

Para a construção da nova versão humanizada do anticorpo anti-CD3 humano na forma de IgG (versão HIL T), o vetor bicistrônico pMIREs FvFc TVL foi utilizado como doador da porção VH da cadeia pesada versão T e o vetor tricistrônico pMACIA HIL RVL IRES neo como acceptor dessa porção. Os dois vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Xba* I, proporcionando a liberação do VH versão T (humanizada) e VH versão R (humanizada), respectivamente (Figura 11). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados por meio de sequenciamento automático e com o posterior alinhamento das sequências das porções VH, foi confirmada a clonagem da porção VH versão T com a presença da treonina na posição 86 do VH. A clonagem assim foi considerada bem sucedida, originando o vetor tricistrônico pMACIA HIL TVL IRES neo (Figura 12).

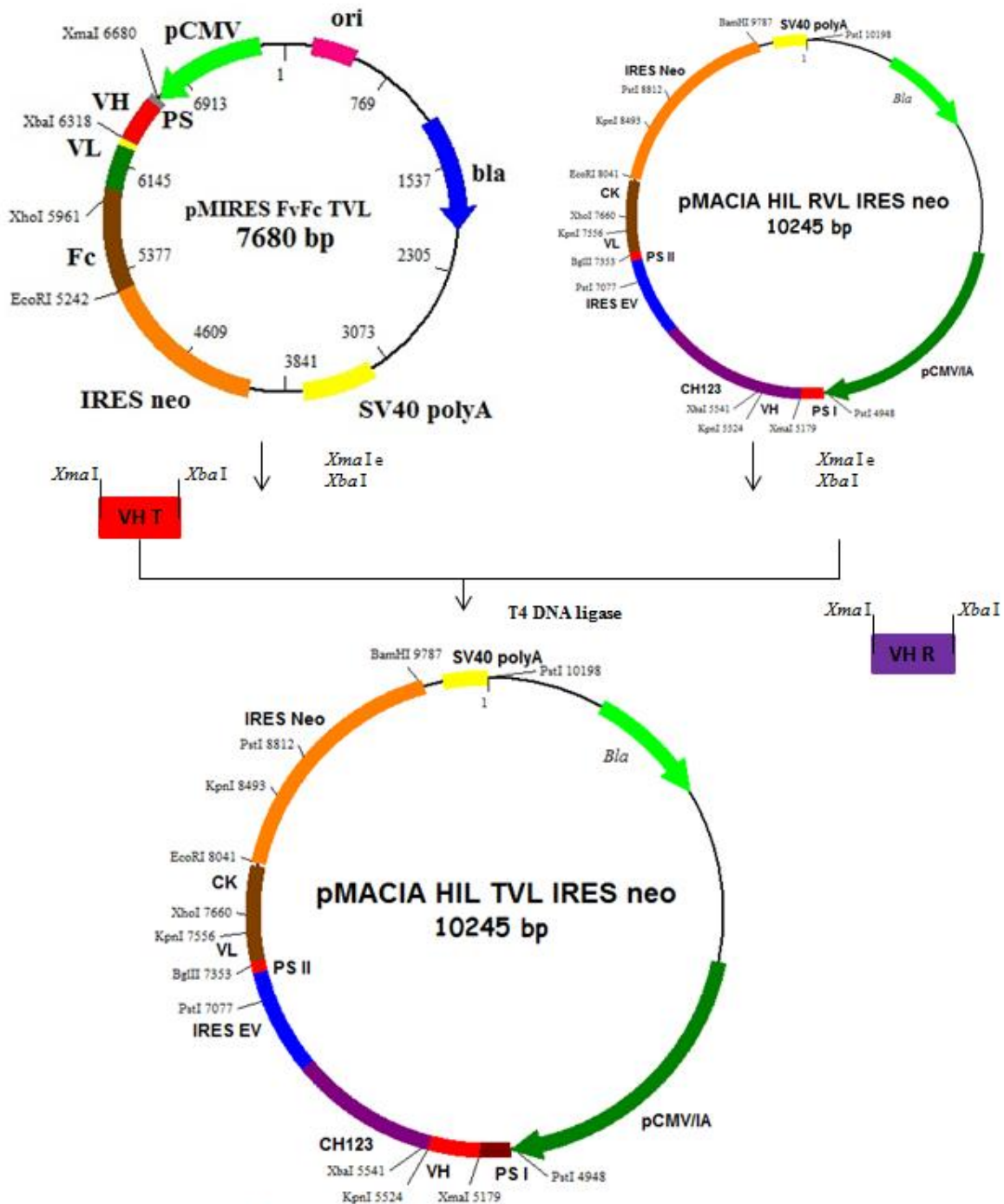


Figura 11. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL TVL IRES neo anti-CD3. Para troca da porção VH humanizada versão R pela porção VH humanizada versão T, os vetores pMIREs FvFc TVL e pMACIA HIL RVL IRES neo foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xba* I para liberação dos fragmentos gênicos VH. Com isso a porção VH T e o restante do vetor pMACIA HIL RVL IRES neo foram ligados com a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem a construção tricistrônica pMACIA HIL TVL IRES neo anti-CD3. Siglas – bla: gene da enzima β -lactamase; pCMV: promotor de citomegalovírus; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; SV40 polyA: sinal de poliadenilação; PS I: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; PS II: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; IRES EV: IRES sintético; IRES neo: marca de resistência à geneticina.

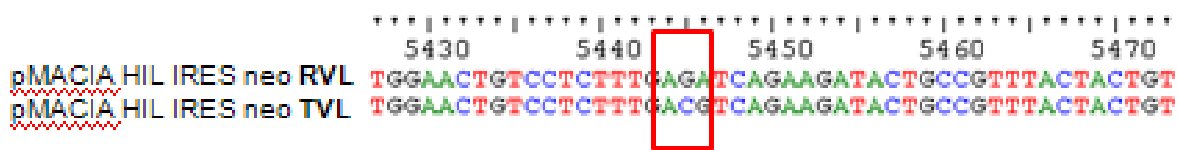


Figura 12. Alinhamento dos vetores tricistrônicos pMACIA HIL RVL IRES neo e pMACIA HIL TVL IRES neo. A porção VH dos vetores pMACIA HIL IRES neo RVL e pMACIA HIL IRES neo TVL foram alinhadas e a região onde ocorreu a substituição da arginina pela treonina por meio da substituição da porção VH do anticorpo está indicada em vermelho.

4.2 Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL MUR IRES neo

Já para a construção da versão quimérica do anticorpo na forma de IgG (versão quimérica HIL M), o vetor pUC 57 scFv CD3 MUR foi utilizado como doador das porções VH da cadeia pesada e VL da cadeia leve murinas e o vetor tricistrônico pMACIA HIL RVL IRES neo como acceptor dessas porções. Primeiramente foi feita a clonagem da porção VH M (murina). Os dois vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Xba* I, proporcionando a liberação do VH versão M e VH versão R, respectivamente (Figura 13). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Pst* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida, originando o vetor tricistrônico pMACIA HIL VH MUR IRES neo.

A partir deste último vetor, foi feita a clonagem da porção VL M (murina). Os vetores pUC 57 scFv CD3 MUR e pMACIA HIL VH MUR IRES neo foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xho* I, proporcionando a liberação da VL versão M e da VL humanizada, respectivamente (Figura 14). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Pst* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor tricistrônico pMACIA HIL MUR IRES neo (Figura 15).

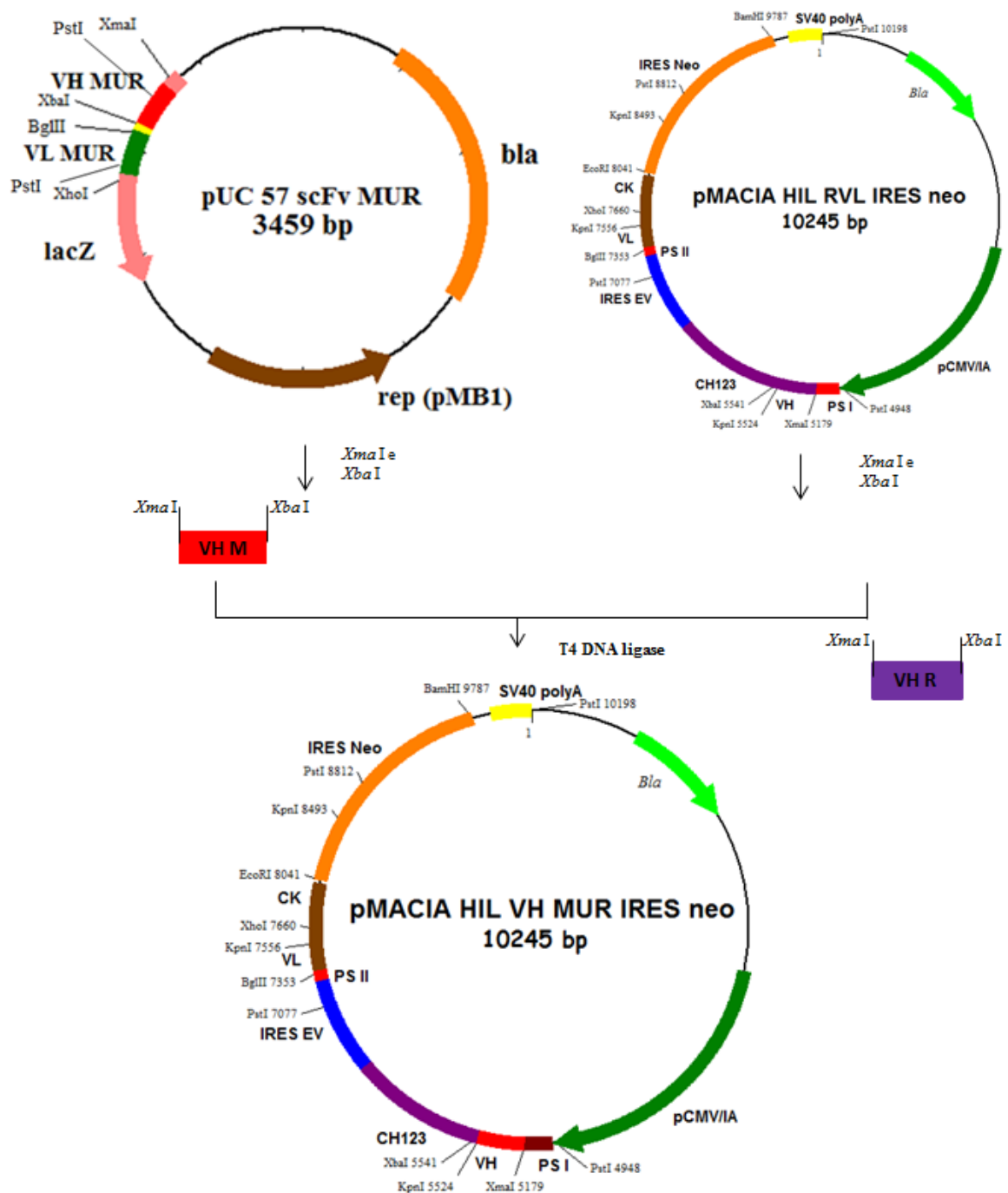


Figura 13. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL VH MUR IRES neo anti-CD3. Para troca da porção VH humanizada versão R pela porção murina VH MUR, os vetores pUC 57 scFv MUR e pMACIA HIL RVL IRES neo foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xba* I para liberação dos fragmentos gênicos VH. Com isso a porção VH M e o restante do vetor pMACIA HIL RVL IRES neo foram ligados com a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem a construção tricistrônica pMACIA HIL VH MUR IRES neo anti-CD3. Siglas – bla: gene da enzima β -lactamase; pCMV: promotor de citomegalovírus; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; SV40 polyA: sinal de poliadenilação; PS I: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; PS II: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; IRES EV: IRES sintético; IRES neo: marca de resistência à geneticina; lacZ: gene da β -galactosidase; rep (pMB1): origem de replicação.

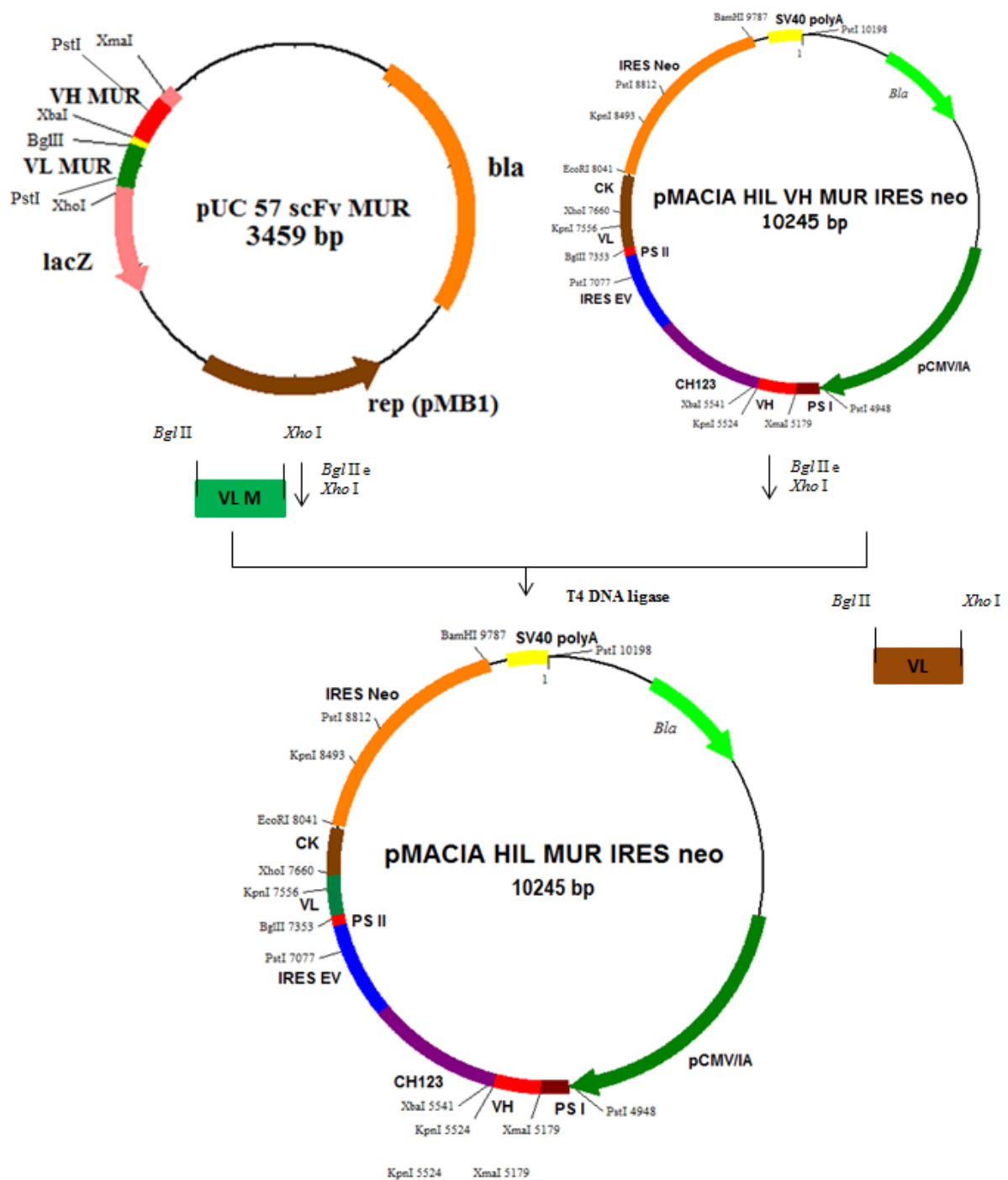


Figura 14. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL MUR IRES neo anti-CD3. Para troca da porção VL humanizada pela porção murina VL MUR, os vetores pUC 57 scFv MUR e pMACIA HIL VH MUR IRES neo foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I para liberação dos fragmentos gênicos VL. Com isso a porção VL M e o restante do vetor pMACIA HIL VH MUR IRES neo foram ligados com a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem a construção tricistrônica pMACIA HIL MUR IRES neo anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; *pCMV*: promotor de citomegalovírus; *pCMV/IA*: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; SV40 polyA: sinal de poliadenilação; PS I: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; PS II: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; IRES EV: IRES sintético; IRES neo: marca de resistência à geneticina; *lacZ*: gene da β -galactosidase; *rep (pMB1)*: origem de replicação.

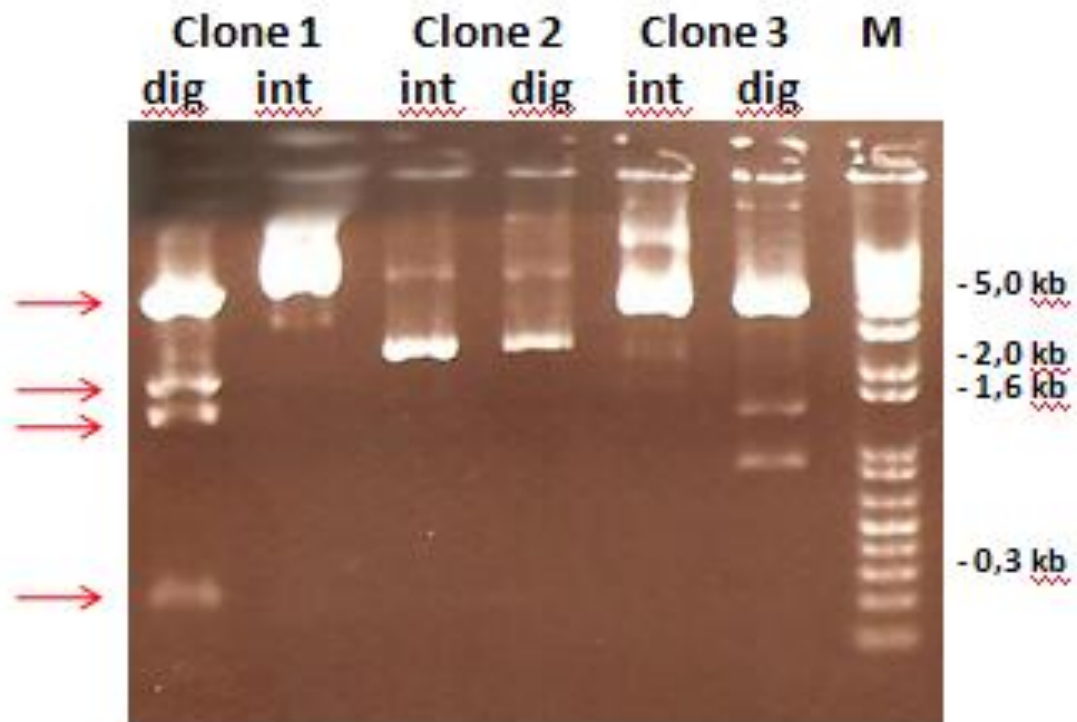


Figura 15. Confirmação da clonagem das porções VH e VL murinas no vetor pMACIA HIL IRES neo, dando origem a construção pMACIA HIL MUR IRES neo. Perfil de restrição com a enzima *Pst* I no clone 1. Setas vermelhas indicando os fragmentos liberados com a digestão de aproximadamente 4995 pb, 1880 pb, 1457 pb e 255 pb. Clones 1 a 3. int: plasmídeo intacto; dig: plasmídeo digerido pela enzima de restrição *Pst* I; M: 1 kb Plus ladder Invitrogen®.

4.3 Construção do vetor de expressão bicistrônico pMIREs FvFc MUR

Para a construção da versão quimérica do anticorpo na forma de FvFc (versão FvFc M), o vetor pUC 57 scFv CD3 MUR foi utilizado como doador da porção scFv murina (VH e VL murinos) e o vetor pMIREs FvFc TVL como acceptor dessa porção. Os dois vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Xho* I, proporcionando a liberação do scFv murino e scFv humanizado TVL, respectivamente (Figura 16). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Pst* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor bicistrônico pMIREs FvFc MUR (Figura 17).

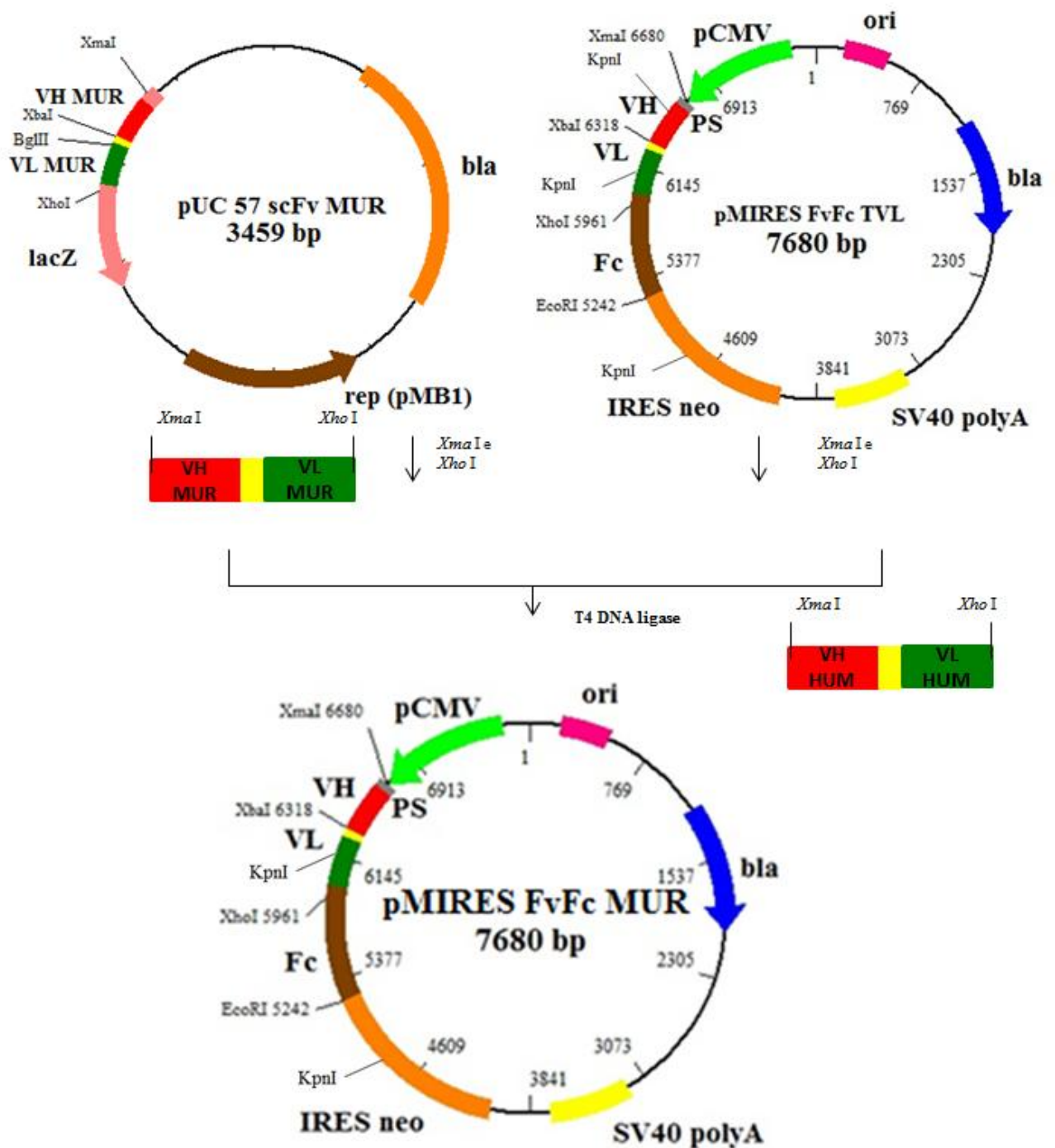


Figura 16. Estratégia para construção do vetor bicistônico pMIREs FvFc MUR anti-CD3. Para troca da porção scFv humanizada TVL pela porção scFv murina, os vetores pUC 57 scFv MUR e pMIREs FvFc TVL foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xho* I para liberação dos fragmentos gênicos scFvs (VH e VL). Com isso a porção scFv murina e o restante do vetor pMIREs FvFc TVL foram ligados com a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem a construção bicistônica pMIREs FvFc MUR anti-CD3. Siglas – bla: gene da enzima β -lactamase; pCMV: promotor de citomegalovírus; pCMV: promotor de citomegalovírus; SV40 polyA: sinal de poliadenilação; PS: sequência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; IRES neo: marca de resistência à geneticina; lacZ: gene da β -galactosidase; rep (pMB1): origem de replicação.

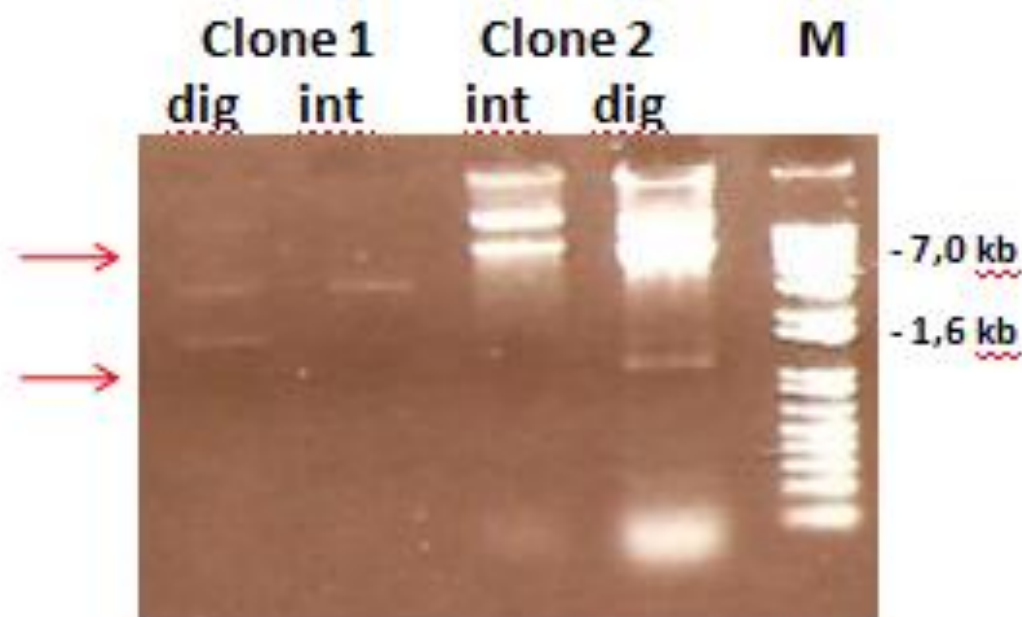


Figura 17. Confirmação da clonagem da porção scFv murina no vetor pMIREs FvFc TVL, dando origem a construção pMIREs FvFc MUR. Perfil de restrição com as enzima *Kpn* I no clone 2. Setas vermelhas indicando os fragmentos liberados com a digestão de aproximadamente 6307 pb e 1373 pb. Clones 1 e 2. int: plasmídeo intacto; dig: plasmídeo digerido pela enzima de restrição *Kpn* I; M: 1 kb Plus ladder Invitrogen®.

4.4 Estabelecimento da melhor linhagem celular para produção dos anticorpos recombinantes

Em paralelo ao processo de construção dos novos vetores foram realizadas transfecções de forma transitória em três linhagens celulares, BHK-21, CHO-K1 e HEK293, para escolha da melhor linhagem para produção dos anticorpos (Figura 18). Nessas transfecções foram utilizados os vetores de expressão que já haviam sido construídos em trabalhos prévios: pMIREs FvFc TVL, pMIREs FvFc RVL e pMACIA HIL RVL IRES neo (Silva, 2008; Bezerra, 2009). Apesar dos maiores níveis de produção terem sido observados na linhagem BHK-21, a linhagem CHO-K1 foi a escolhida para a adição de agente seletivo ao meio de cultura e produção estável dos anticorpos nas diferentes versões. Nessa escolha foi levado em conta a constância de produção nessa linhagem e o sucesso da produção de anticorpos recombinantes, dentro do grupo de Imunologia Molecular (Silva, 2008).

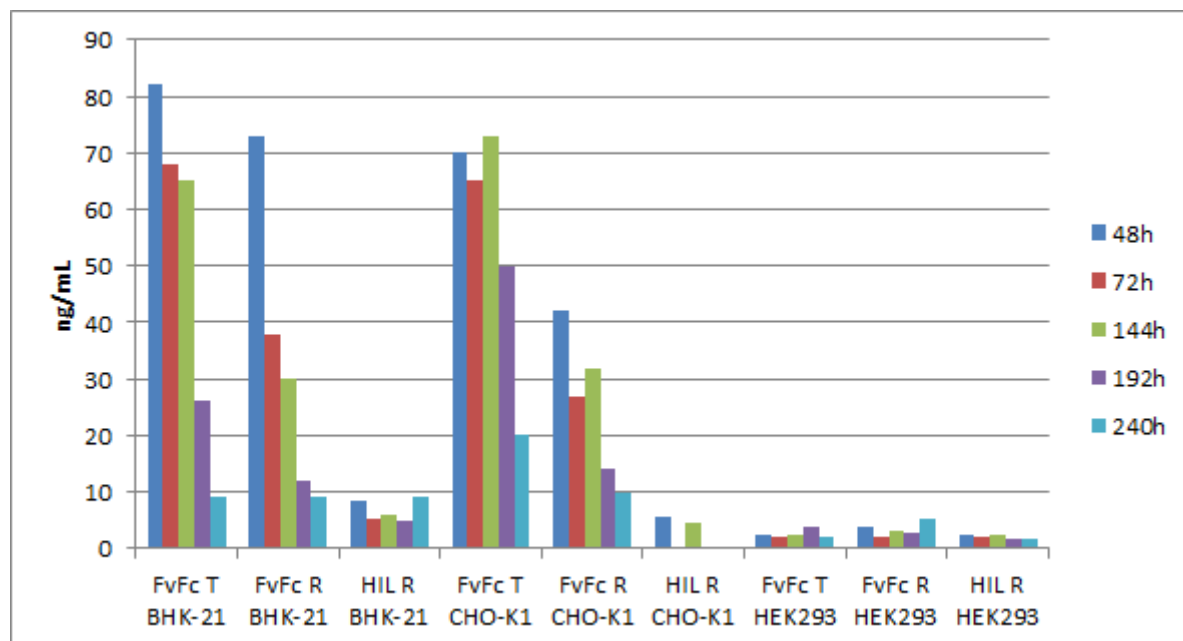


Figura 18. Níveis de produção de anticorpos anti-CD3 em transfectomas de BHK-21, CHO-K1 E HEK293. Os sobrenadantes de cultura foram coletados de forma não-cumulativa nos tempos indicados e os níveis de anticorpos foram determinados por ELISA, a partir da comparação com uma curva-padrão de IgG humana. FvFc T: anticorpo na forma de FvFc versão T, produzido pelo vetor bicistrônico pMIREs FvFc TVL; FvFc R: anticorpo na forma de FvFc versão R, produzido pelo vetor bicistrônico pMIREs FvFc RVL; HIL R: anticorpo na forma de IgG versão R produzido pelo vetor tricistrônico pMACIA HIL RVL IRES neo.

4.5 Produção, purificação e análise dos diferentes anticorpos anti-CD3 humano

Após a escolha da linhagem celular CHO-K1, todas as diferentes construções dos anticorpos em forma de FvFc e IgG (T, R e M) foram transfectadas estavelmente na linhagem celular CHO-K1. Os sobrenadantes de cultura de cada transfectoma foram acumulados e a produtividade específica de cada construção foi avaliada (Tabela 3). Os resultados foram obtidos a partir da quantificação por ELISA dos anticorpos presentes nos sobrenadantes dos diferentes transfectomas, acumulados por um período de 7 dias, e da contagem das células viáveis em câmara de Neubauer pelo método de exclusão do corante vital azul de tripan.

As construções em forma de FvFc foram as que apresentaram maiores produtividades específicas sendo a construção FvFc T a com a maior produtividade específica. Já nas construções em forma de IgG (HIL) essa mesma produtividade não foi observada, sendo a construção HIL R a melhor produtora.

Tabela 3. Produtividade específica dos anticorpos anti-CD3.

Construção	Concentração (ng/mL)	Quantidade de células por garrafa de 150 cm ²	Produtividade específica (pg/dia/célula)
FvFc T	251	3,28 x 10 ⁶	14
FvFc R	140	1,443 x 10 ⁶	18
FvFc M	193	2,25 x 10 ⁶	10
HIL T	11	2,147 x 10 ⁶	0,002
HIL R	128	2,3 x 10 ⁶	0,9
HIL M	39	2,537 x 10 ⁶	0,1

Após o acúmulo dos anticorpos presentes nos sobrenadantes de cada transfectoma, estes foram purificados por cromatografia de afinidade em resina de proteína A, concentrados e dialisados em tampão PBS. Os anticorpos foram submetidos a SDS-PAGEs seguidos por coloração com prata e *Western Blot* para a verificação da presença e integridade destes. Os fragmentos referentes às cadeias pesadas e leves dos anticorpos recombinantes podem ser observadas em torno de 55 kDa e 27 kDa (no caso das IgGs), respectivamente (Figura 19).

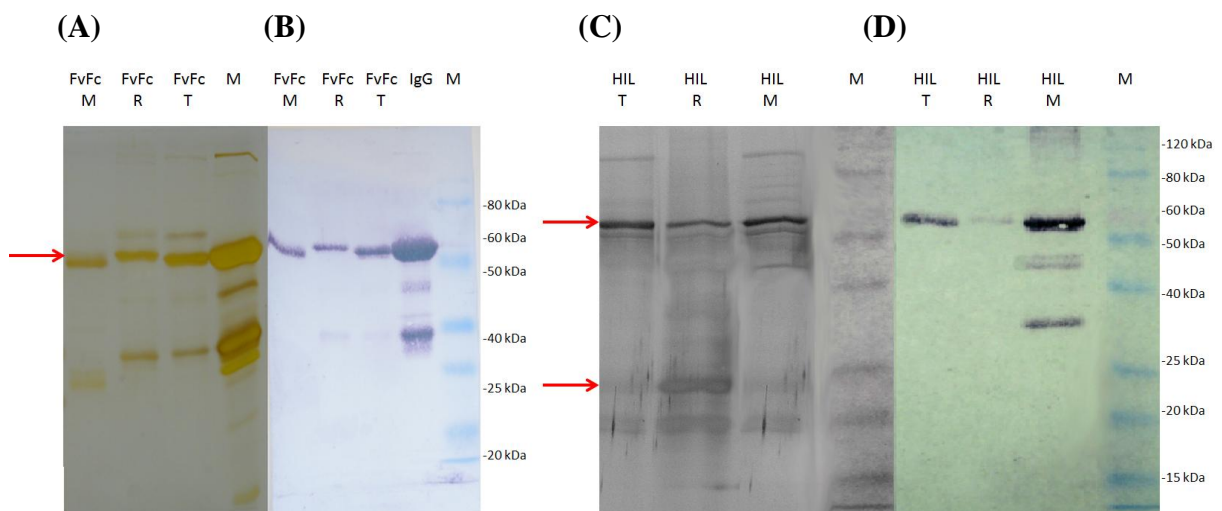


Figura 19. Análise dos anticorpos anti-CD3 purificados a partir de transfectomas de CHO-K1. Foi realizada uma eletroforese em gel SDS 12%, de forma reduzida, para separação dos anticorpos purificados. Foi feita coloração com prata utilizando o kit Plus One Silver Staining Protein (GE Lifescience) e *Western Blot* revelado com um anticorpo anti-Fc humano conjugado com fosfatase alcalina. **(A e C):** Coloração com prata. **(B e D):** *Western blot*. **IgG:** 500 ng de IgG humana não- reduzida. **M:** Marcador BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen®). Setas vermelhas destacando as bandas correspondentes às cadeias pesada e leve (no caso das IgGs) reduzidas, respectivamente.

4.6 Teste dos anticorpos recombinantes anti-CD3 humano quanto à capacidade de ligação a superfície de linfócitos T

Após confirmação da integridade dos anticorpos purificados, foi iniciada a caracterização *in vitro* dos anticorpos recombinantes. Foi analisada a capacidade de ligação dos anticorpos em forma de FvFc e IgG (HIL) ao CD3 humano presente na superfície de linfócitos T (CD4⁺ ou CD8⁺). Assim, realizou-se um ensaio de ligação direta às células mononucleares de sangue periférico (CMSPs). As células foram incubadas com 62,5 ng/mL dos anticorpos recombinantes e foram utilizados anticorpos anti-IgG humana conjugados a FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), anti-CD4 conjugados a PE (do inglês, *R-Phycoerythrin*) e anti-CD8 conjugados a APC (do inglês, *allophycocyanin*) como marcações secundárias. O anticorpo comercial OKT3 foi utilizado como controle positivo da ligação. A análise da ligação foi feita por citometria de fluxo (Figuras 20 a 23).

Levando em conta os quadrantes duplo positivos, que indicam os linfócitos T CD4⁺ (CD3 e CD4 positivos) e T CD8⁺ (CD3 e CD8 positivos), todos os anticorpos anti-CD3 humano se mostraram capazes de se ligar à superfície dos linfócitos T (Figuras 21 e 22). O anticorpo comercial OKT3 foi o que apresentou maiores porcentagens de células duplo positivas e maiores valores de MIF, em ambas as populações. Porém, ele foi utilizado apenas como controle positivo do teste, pois, por ser murino, o anticorpo secundário utilizado para sua detecção foi diferente do anticorpo secundário utilizado para detecção dos anticorpos recombinantes (anti-IgG humana), não podendo assim ser utilizado na comparação na capacidade de ligação. A versão utilizada para essa comparação é a versão quimera (versão M), pois retém o scFv murino do anticorpo parental OKT3, mas possui o Fc humano, garantindo o mesmo tipo de detecção dos anticorpos recombinantes humanizados.

Foi observado que as porcentagens de células marcadas e as MIFs das construções humanizadas (versões T e R) foram bem próximas às porcentagens de ligação da versão quimera (versão M), indicando que a humanização não alterou a capacidade de ligação dos anticorpos ao CD3 humano (Tabela 4). De uma forma geral, os anticorpos na forma de IgG (HIL) apresentaram uma maior porcentagem de células duplo positivas que os anticorpos na forma de FvFc. Já na medida da mediana da intensidade de fluorescência (MIF), que indica a quantidade de anticorpo adsorvido à superfície das células, os anticorpos na forma de FvFc apresentaram um maior valor que os anticorpos na forma de IgG. Também foram observados, maiores valores de MIF na população T CD8⁺ (Tabela 4).

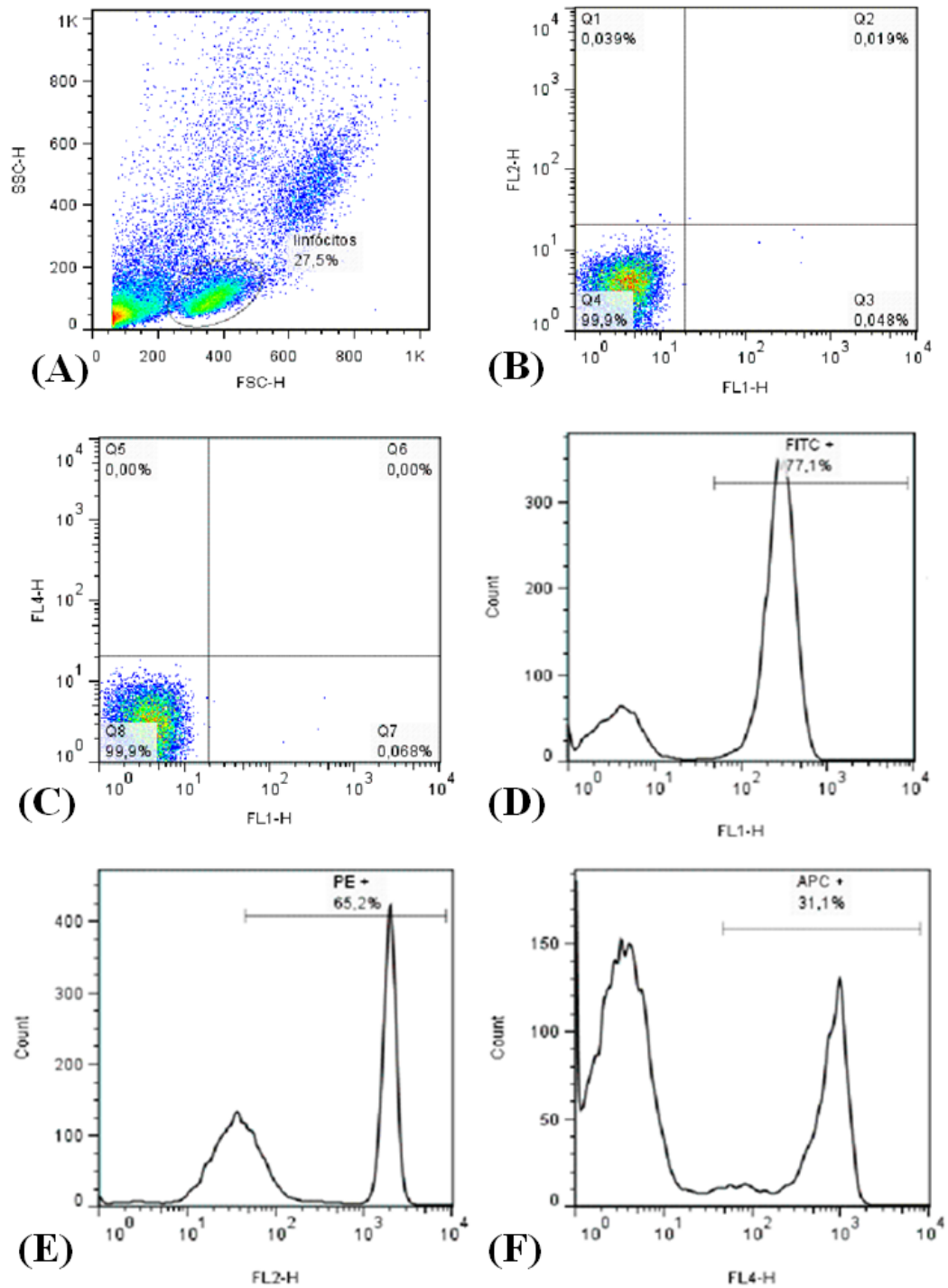


Figura 20. Controles do teste da capacidade de ligação. **A:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSP; **B:** Dot-plot de controle negativo para FITC (FL1) e PE (FL2): células não marcadas; **C:** Dot-plot de controle negativo para FITC (FL1) e APC (FL4): células não marcadas; **D:** Histograma de controle positivo para FITC (OKT3 conjugado a FITC); **E:** Histograma de controle positivo para PE (anti-CD4 conjugado a PE); **F:** Histograma de controle positivo para APC (anti-CD8 conjugado a APC); Gráficos mostrados em porcentagem de células positivas para FITC (FL1) *versus* porcentagem de células positivas para PE (FL2) ou APC (FL4). FSC-H: dispersão frontal (forward scattering), que indica o tamanho das células; SSC-H: dispersão lateral (side scattering), que indica a granulocidade das células.

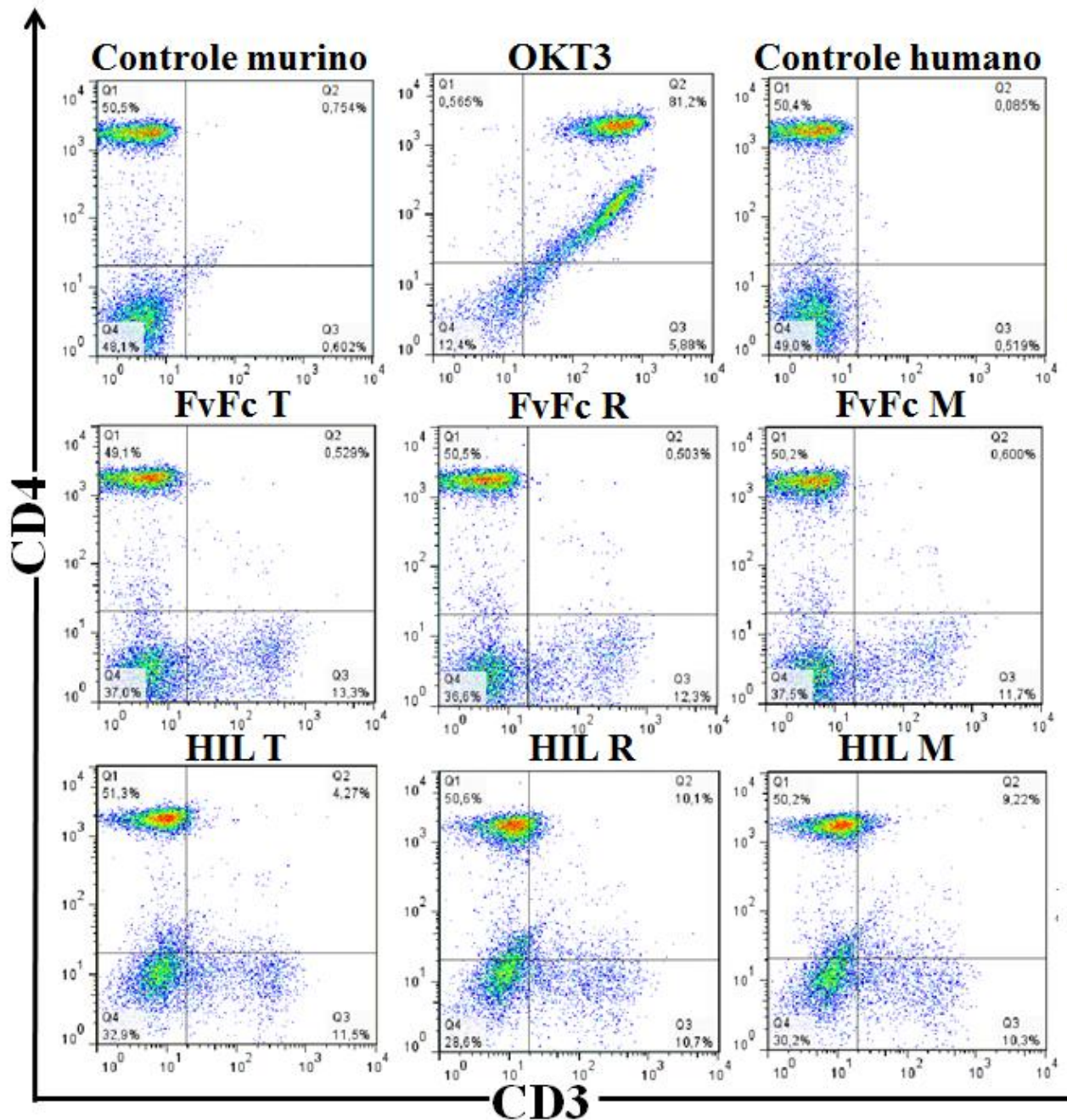


Figura 21. Análise de ligação dos anticorpos recombinantes a linfócitos T CD4⁺ humanos. Os linfócitos foram inicialmente incubados com 62,5 ng/mL dos FvFc's e IgGs recombinantes ou com o anticorpo comercial OKT3, separadamente. A seguir foram incubados com o anticorpo anti-IgG humana FITC ou anti-IgG de camundongo FITC. Logo após, foram incubados com o anticorpo anti-CD4 humano PE. Controles murino e humano: anti-IgG de camundongo FITC + anti-CD4 PE e anti-IgG humana FITC + anti-CD4 PE, utilizados para verificar alguma inespecificidade na ligação dos anticorpos secundários. Gráficos mostrando a porcentagem de células positivas para CD3 versus porcentagem de células positivas para CD4.

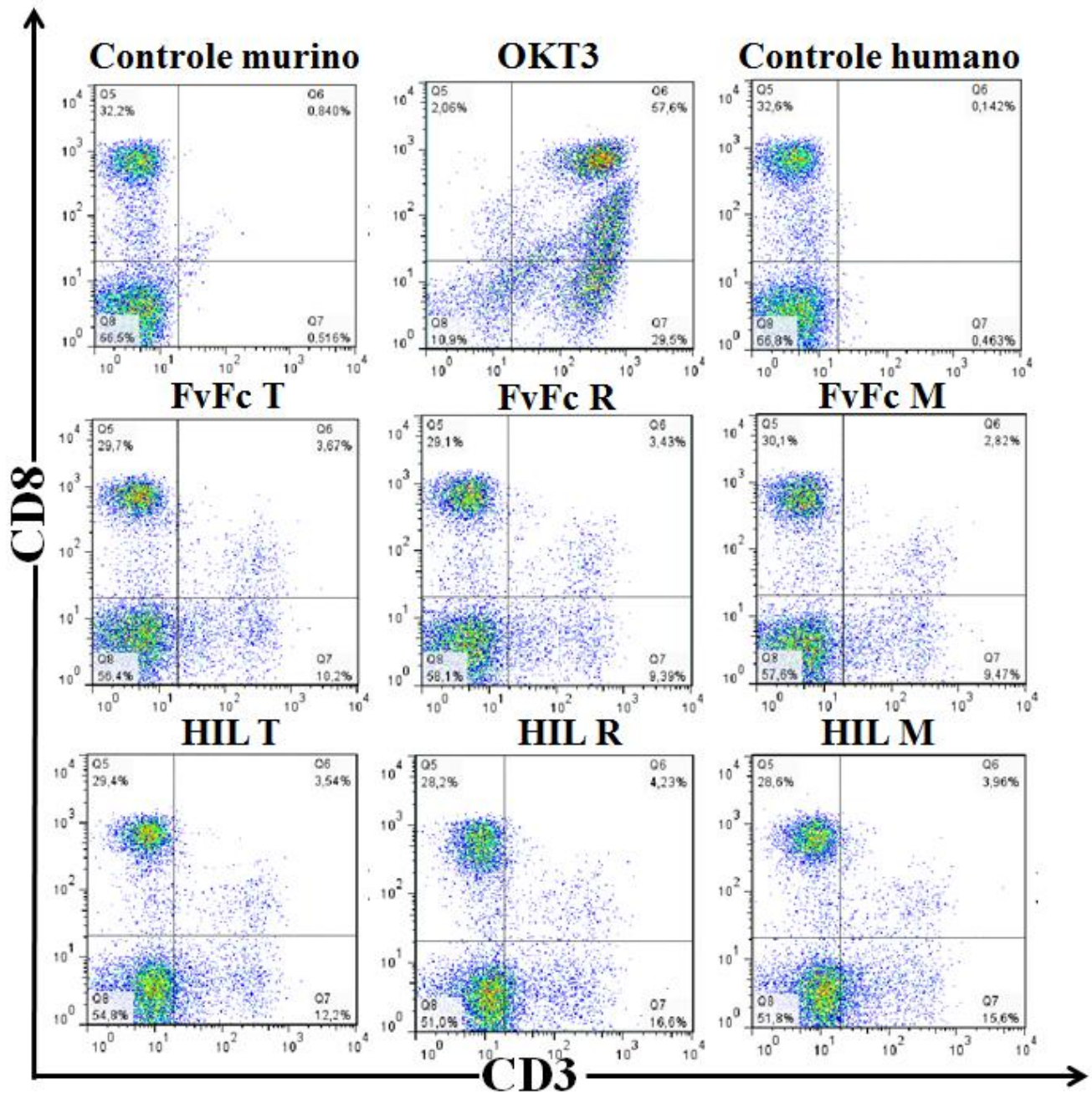


Figura 22. Análise de ligação dos anticorpos recombinantes a linfócitos T CD8⁺ humanos. Os linfócitos foram inicialmente incubados com 62,5 ng/mL dos FvFc's e IgGs recombinantes ou com o anticorpo comercial OKT3, separadamente. A seguir foram incubados com o anticorpo anti-IgG humana FITC ou anti-IgG de camundongo FITC. Logo após, foram incubados com o anticorpo anti-CD8 humano APC. Controles murino e humano: anti-IgG de camundongo FITC + anti-CD8 APC e anti-IgG humana FITC + anti-CD8 APC, utilizados para verificar alguma inespecificidade na ligação dos anticorpos secundários. Gráficos mostrando a porcentagem de células positivas para CD3 *versus* porcentagem de células positivas para CD8.

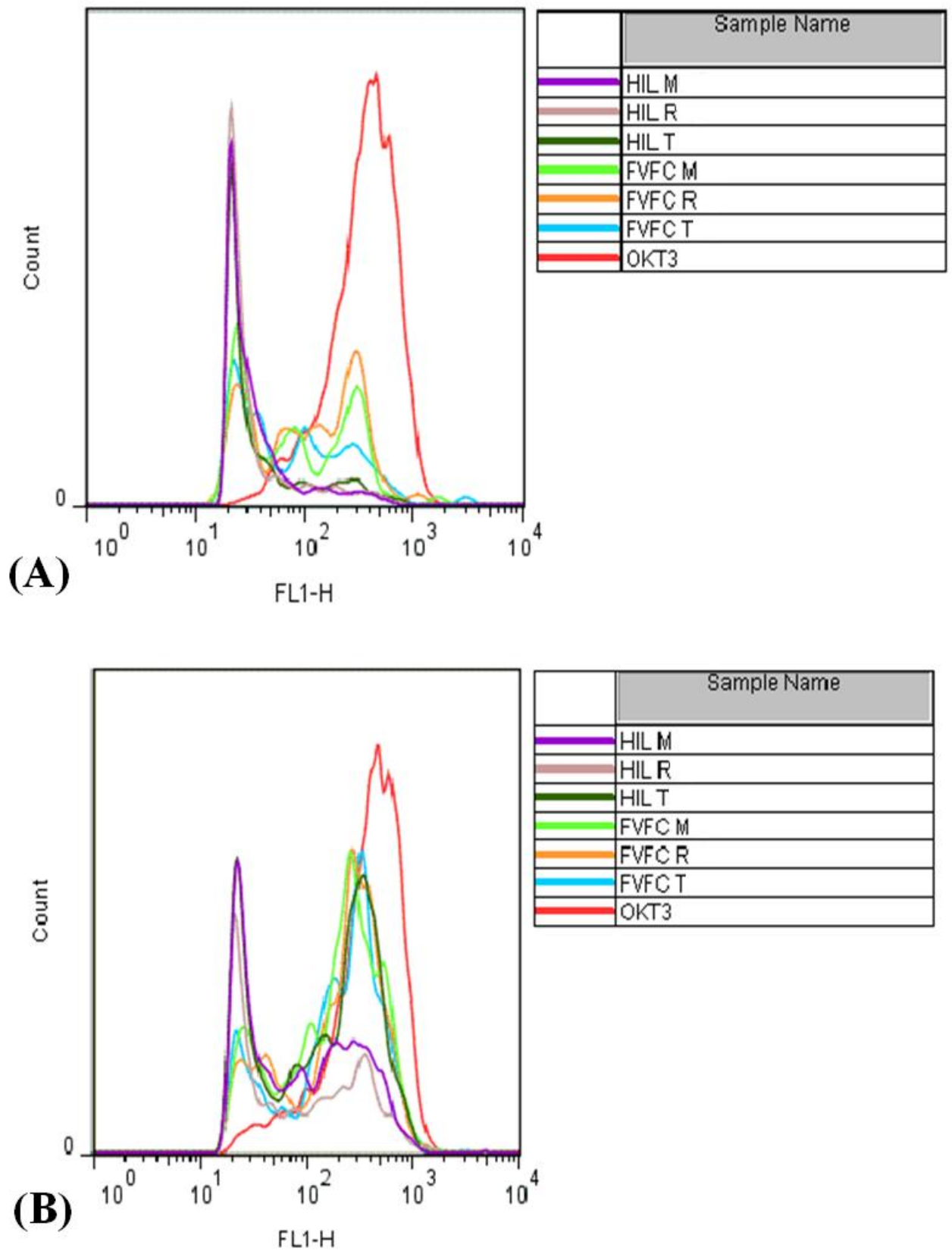


Figura 23. Histogramas do teste de capacidade de ligação. A: Sobreposições dos histogramas das populações positivas para CD3 e CD4 em relação ao CD3 (FITC). **B:** Sobreposições dos histogramas das populações positivas para CD3 e CD8 em relação ao CD3 (FITC). FL1-H: canal FITC.

Tabela 4. Porcentagem de linfócitos T marcados com os FvFcs e IgGs recombinantes e respectivas medianas de intensidade de fluorescência (MIF) em relação ao CD3 (FITC).

	CD4		CD8	
	Freq.	MIF	Freq.	MIF
FvFc T	0,53%	66	3,67%	233
FvFc R	0,50%	115	3,43%	243
FvFc M	0,60%	75	2,82%	215
HIL T	4,27%	26	3,54%	189
HIL R	10,10%	25	4,23%	81
HIL M	9,22%	27	3,96%	83
OKT3	81,20%	373	57,60%	406

4.7 Análise da especificidade dos anticorpos recombinantes pelo antígeno CD3 humano

Para verificar se a ligação dos anticorpos recombinantes a superfície dos linfócitos estava ocorrendo na molécula CD3 humana, foi realizado um experimento de competição pelo CD3 em CMSPs humanas por citometria de fluxo. As CMSPs foram incubadas primeiramente com 62,5 ng/mL do anticorpo comercial OKT3 conjugado a FITC. Em seguida, foram incubadas com 312,5 ng/mL dos anticorpos recombinantes (5x a mais). A competição pela molécula CD3 foi avaliada pela diminuição da fluorescência de FITC (Figura 24).

Todas as versões dos FvFcs anti-CD3 humanos foram capazes de competir pela molécula CD3 presente na superfície dos linfócitos T com o anticorpo OKT3 conjugado a FITC. Os níveis de inibição da ligação foram 84% para o FvFc T, 87% para FvFc R e 93% para o FvFc M (Tabela 5). O formato de FvFc é biologicamente valioso e pode ser um substituto para as moléculas de IgG normalmente utilizadas para imunoterapia. A versão quimérica FvFc M foi a que melhor competiu pelo epítopo CD3, o que era esperado devido à preservação do paratopo murino original do OKT3. Fragmentos de anticorpo similares a estes FvFcs também estão sendo testados (Nickerson-Nutter *et al.*, 2011).

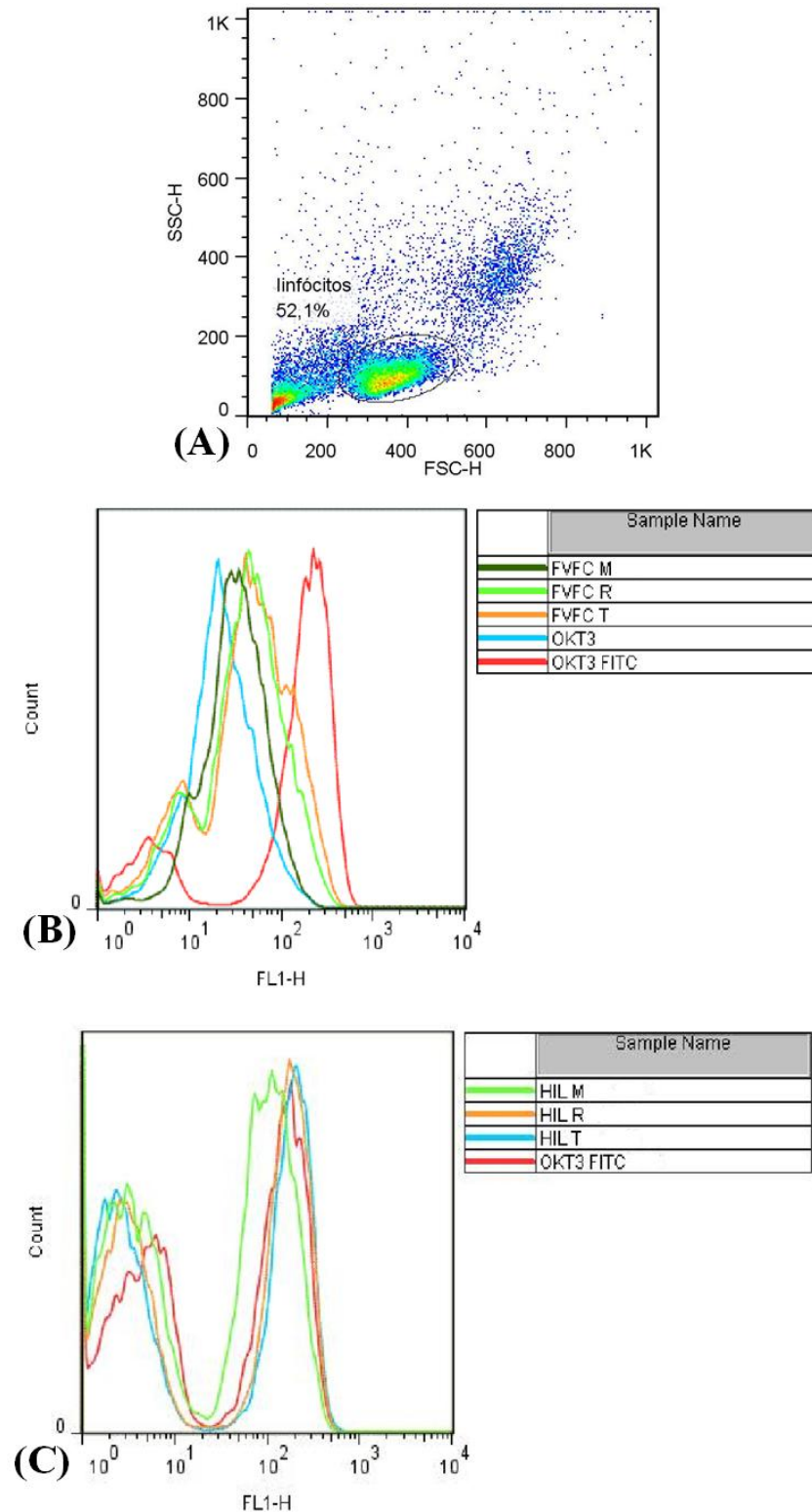


Figura 24. Inibição da ligação do anticorpo OKT3 conjugado a FITC à molécula CD3 humana pelos anticorpos recombinantes. As CMSPs foram inicialmente incubadas com o anticorpo comercial OKT3 conjugado a FITC e em seguida com os anticorpos recombinantes. A ligação dos anticorpos anti-CD3 humano foi plotada em forma de histograma. A diminuição da fluorescência reflete a inibição da ligação do OKT3 conjugado a FITC. **A:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSP; **B:** Sobreposição do OKT3 e FvFcs recombinantes; **C:** Sobreposição das IgGs recombinantes (HILs). FL1-H: canal FITC (CD3).

Os anticorpos recombinantes na forma de IgG (HIL) não compartilharam dessa mesma capacidade, sendo a versão quimérica, HIL M, a única que foi capaz de competir com o OKT3 conjugado a FITC, mostrando uma inibição de ligação de 41%. Diante desses resultados e dos valores de MIFs maiores no teste de capacidade de ligação, foi decidido seguir apenas com os anticorpos recombinantes na forma de FvFc para a caracterização do perfil imunoregulatório.

Tabela 5. Inibição da ligação do anticorpo OKT3 conjugado a FITC à molécula CD3 humana pelos FvFcs recombinantes.

Anti-CD3 humano	Mediana de intensidade de fluorescência (FITC)	% de inibição do OKT3 FITC	Anticorpo adicionado (ng/mL)
FvFc T	45.8	84%	312.5
FvFc R	41.4	87%	312.5
FvFc M	31.7	93%	312.5
OKT3 não conjugado	21.6	100%	312.5
OKT3 conjugado a FITC	173	–	62.5

4.8 Avaliação do potencial mitogênico dos FvFcs recombinantes

O efeito mitogênico do OKT3 é correlacionado com a sua toxicidade, principalmente pela indução de citocinas pró-inflamatórias (Chatenoud *et al.* 1990). A redução da mitogenicidade de anticorpos anti-CD3 humano pode levar a um imunofarmacêutico mais seguro. Com isso, o potencial mitogênico dos FvFcs recombinantes foi examinado, realizando um ensaio de proliferação de CMSPs com a medida da diluição do fluoróforo CFSE por citometria de fluxo. A cada divisão celular a intensidade de fluorescência do CFSE se divide por dois devido ao aumento da produção de proteínas e a divisão entre as duas células. Assim, a fluorescência máxima é observada em células não divididas e à medida que se dividem a fluorescência diminui. As CMSPs foram marcadas com CFSE e incubadas com 62,5 ng/mL dos FvFcs recombinantes por 8 dias. Após a incubação, essas células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 conjugados a PE e anti-CD8 conjugados a APC para discriminação das populações.

A versão quimérica FvFc M apresentou o maior potencial mitogênico entre os FvFcs, com uma resposta proliferativa comparável a do anticorpo OKT3 (Figura 25). FvFc M induziu uma proliferação de 91% na população CD4⁺ e 92,3% na população CD8⁺, enquanto

o anticorpo OKT3 induziu uma proliferação de 87% na população CD4⁺ e 88,7% na população CD8⁺. Aparentemente, os domínios constantes da IgG2a murina do anticorpo OKT3 ou da IgG1 dos FvFcs não interferiram no potencial mitogênico da porção Fv do OKT3.

Por outro lado, as versões FvFc humanizadas apresentaram um menor potencial mitogênico comparadas à versão quimérica, mesmo todas essas versões compartilhando a mesma porção Fc. A versão FvFc T foi praticamente incapaz de induzir a diluição do CFSE nas duas populações de células T, com proliferações de 6,26% na população CD4⁺ e 18,1% na população CD8⁺, enquanto a versão FvFc R induziu uma proliferação de 66% na população CD4⁺ e 74,1% na população CD8⁺. A diferença entre as versões T e R é a substituição de um único aminoácido na posição 86. Essa posição não é relacionada com o paratopo do anticorpo, mas pode ser importante para sua flexibilidade e para a conformação do arcabouço (Silva *et al.* 2009).

Foi observada uma maior proliferação na população CD8⁺ que na população CD4⁺ com todos os anticorpos testados, corroborando com a maior intensidade de fluorescência na ligação destes à primeira população (Tabela 4). Similarmente, Bisikirska e colaboradores, em 2005, observaram que o anticorpo humanizado anti-CD3 [hOKT3γ1 (Ala-Ala)] foi mais mitogênico para os linfócitos T CD8⁺ que para os linfócitos T CD4⁺. Neste caso o anticorpo era não ligante a FcR, o que reduz seu potencial mitogênico. Os FvFcs recombinantes não possuem modificação na porção Fc e a diminuição da mitogenicidade somente pode ser explicada pelo processo de humanização, sendo que a diferença entre as versões está nas porções Fv. É possível que o processo de humanização tenha reduzido a afinidade dos anticorpos humanizados, reduzindo a sua capacidade de induzir ativação. Apesar do fato de que todos os FvFcs recombinantes puderam competir pela molécula CD3 com o anticorpo OKT3 conjugado a FITC, a versão FvFc T foi a que apresentou a menor mitogenicidade. Essa versão também apresentou a maior diferença de proliferação entre as populações CD4⁺ e CD8⁺, isso pode ser importante para o mecanismo de ação desses FvFcs desde que está sendo proposto que células CD8⁺ ativadas podem desenvolver um fenótipo regulatório (Bisikirska *et al.* 2005; Glandt, *et al.* 2003).

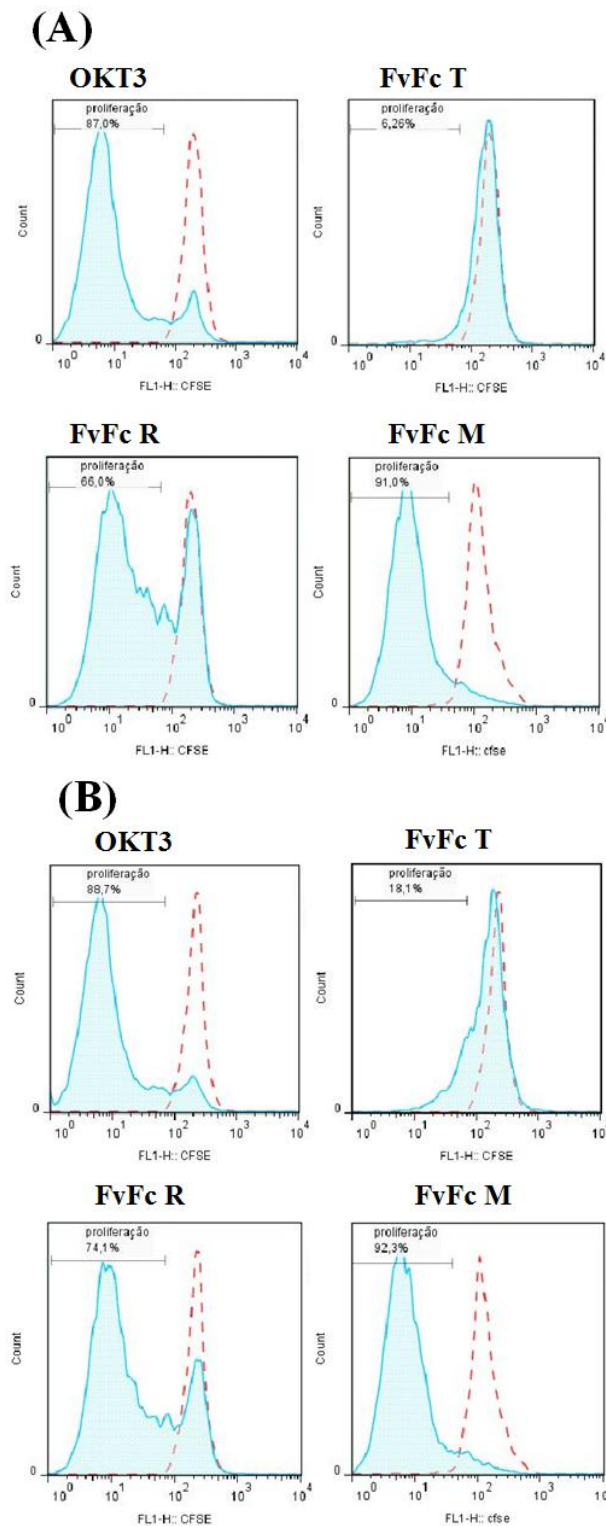


Figura 25. Proliferação de CMSPs induzida pelos FvFcs recombinantes. CMSPs marcadas com CFSE foram incubadas na presença dos FvFcs recombinantes ou do anticorpo OKT3 por 8 dias. A população de interesse nas CMSPs marcadas foi selecionada por tamanho e granulosidade. Para detectar as populações CD4⁺ e CD8⁺ as células foram marcadas com anti-CD4 humano conjugado a PE **(A)** ou anti-CD8 humano conjugado a APC **(B)**. O perfil de CFSE obtido com cada anticorpo foi plotado em forma de histograma (azul) e comparado ao perfil de CFSE de CMSPs não estimuladas (tracejado vermelho).

Foi observado também que após a cultura das CMSPs com os anticorpos anti-CD3, os linfócitos mudavam sua morfologia, aumentando o tamanho e a granulosidade. Por este motivo, a seleção da população de linfócitos foi feita de forma diferente dos testes anteriores, a região selecionada se tornou maior. A Figura 26 mostra a nova forma de seleção da população de linfócitos que a partir desse momento começou a ser utilizada, mostrando a diferença de tamanho e granulosidade de linfócitos não estimulados e estimulados com anticorpos anti-CD3, e a seleção utilizada para discriminação das populações de linfócitos T.

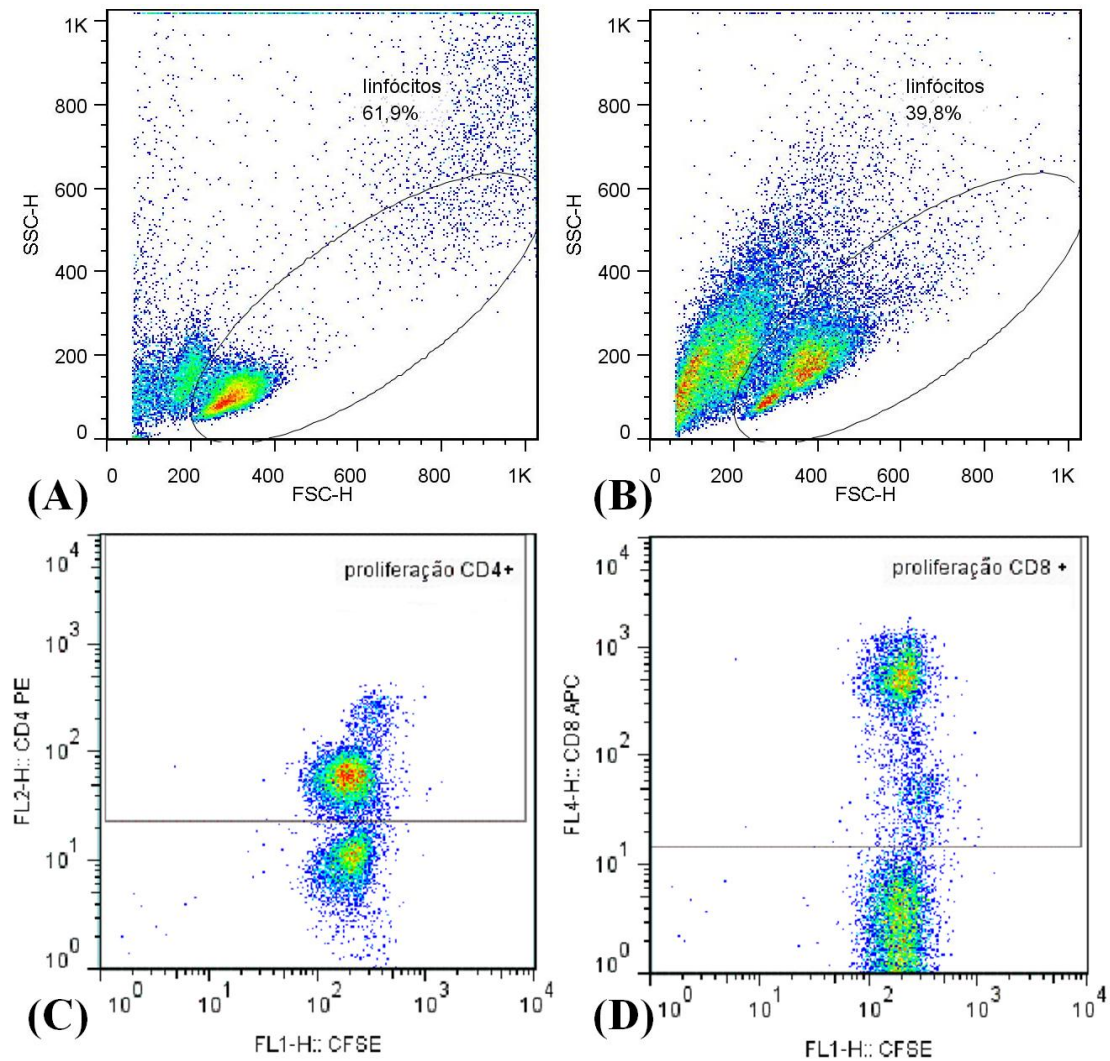


Figura 26. Mudança de tamanho e granulosidade de linfócitos após cultura com anticorpo anti-CD3 humano. **A:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSPs não estimuladas; **B:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSPs estimuladas com anticorpo anti-CD3 humano (FvFc RVL); **C e D:** Controle negativos: Dot-plots de CMSPs não estimuladas marcadas com CFSE e anti-CD4 humano PE (C) ou anti-CD8 humano APC (D). FSC-H: dispersão frontal (forward scattering), que indica o tamanho das células; SSC-H: dispersão lateral (side scattering), que indica a granulosidade das células.

4.9 Análise do perfil de citocinas induzido pelos FvFcs recombinantes

As citocinas são moléculas que podem afetar várias funções celulares permitindo a comunicação entre diferentes tipos de células. Muitas citocinas possuem múltiplas fontes e alvos, um ampla gama de atividades que se sobrepõem, funcionando como uma complexa rede de sinalização (Romagnani, 1994). Diante disso, o perfil de citocinas induzido pelos FvFcs recombinantes quando em cultura com CMSPs foi também estudado. As CMSPs foram incubadas com 62,5 ng/mL dos FvFcs recombinantes por 5 dias e as citocinas foram dosadas no sobrenadante de cultura por meio de um ensaio de detecção quantitativa por citometria de fluxo.

Os FvFcs recombinantes induziram uma menor produção de TNF- α que o anticorpo OKT3. Eles também induziram uma menor produção de IL17-A e IL-6 comparado a esse anticorpo. IFN- γ e IL-1 β foram similarmente produzidos com os anticorpos testados, com exceção da versão FvFc T que apresentou uma produção consideravelmente inferior. O anticorpo OKT3 induziu uma maior produção de IL-13 que as versões FvFc R e FvFc M, uma vez que a versão FvFc T não induziu a produção dessa citocina (Figura 27). A produção de IL-10 também foi analisada, mas os valores estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado. Silva e colaboradores, em 2009, observaram a produção desta última citocina quando utilizados 1 μ g/mL ou 5 μ g/mL dos FvFcs humanizados. Os valores de IL-10 estarem abaixo do limite de detecção pode ser explicado pela quantidade de anticorpo utilizado nesse experimento ser bem mais baixa (62,5 ng/mL).

Walter e colaboradores, em 2013, reportaram que células T regulatórias humanas expostas a um ambiente pró-inflamatório mostraram um aumento na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias. Essas células mantinham seu fenótipo de Tregs e exerciam um efeito supressor na proliferação e produção de citocinas por células T aumentados. Também foi reportado que Tregs CD8⁺ requeriram TNF para a sua indução. Anticorpos anti-TNF preveniram o aumento de CD25 em células T CD8⁺ e a indução de sua função regulatória. (Ablamunits *et al.*, 2010). Deste modo, os resultados obtidos sugeriram que os FvFcs recombinantes podem ser considerados menos pró-inflamatórios que o anticorpo parental OKT3 e podem estar induzindo um ambiente imunoregulatório.

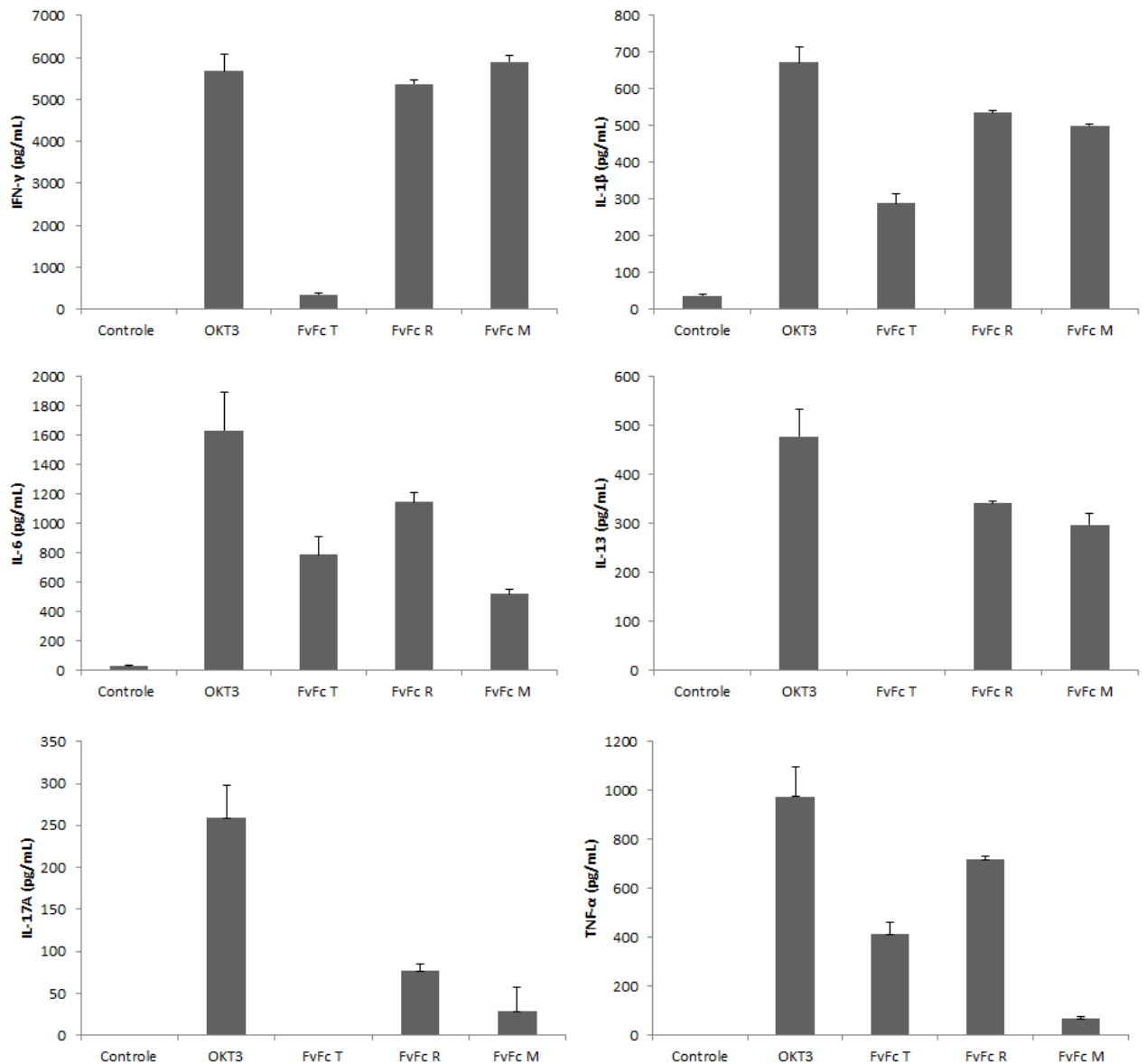


Figura 27. Perfil de citocinas induzido pelos FvFc recombinantes. CMSPs foram incubadas na presença dos FvFcs recombinantes ou do anticorpo OKT3 por 5 dias. O sobrenadante de cultura foi coletado e a concentração das citocinas foi obtida através da medida em triplicata em cada condição, por um método de detecção quantitativa por citometria de fluxo. Controle: cultura de CMSPs não estimuladas.

4.10 Determinação de apoptose induzida pelos FvFcs recombinantes

A apoptose, ou morte celular programada, exerce controle em respostas imunes desenvolvidas através de estimulação antigênica de linfócitos T e a integridade das vias apoptóticas é requerida para a manutenção da tolerância periférica (Strauss *et al.*, 2009). Assim, a morte por apoptose é essencial para diferenciação e crescimento dos linfócitos. Fas,

também conhecido como APO-1 ou CD95, pertence a um subgrupo da família de receptores do fator de necrose tumoral que contém um “domínio de morte” intracelular. A apoptose mediada por Fas é desencadeada pelo seu ligante fisiológico, FasL ou CD95L, que é um membro da correspondente família da citocina TNF (Strasser *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação de anticorpos anti-CD3 humano como imunossupressores não recai apenas na indução de células T regulatórias. A apoptose induzida pela ativação do TCR também é proposta como mecanismo (Wang *et al.*, 2001; Huo *et al.*, 2010). Na tentativa de verificar se os FvFcs recombinantes eram capazes de tornar CMSPs mais suscetíveis à apoptose mediada por Fas, a expressão de Fas e FasL foram investigadas. Os FvFcs recombinantes foram utilizados em duas concentrações diferentes (62,5 ng/mL ou 250 ng/mL). A expressão de Fas aumentou equivalentemente entre as populações CD4⁺ e CD8⁺ com as versões FvFc R e FvFc M em diferentes concentrações (Tabela 6). A versão FvFc R induziu o maior aumento de expressão de Fas, mostrando MIFs de 916 ou 1214 na população CD4⁺, e MIFs de 1125 ou 1338 na população CD8⁺. Isso sugere que a humanização pode ter tornado o anticorpo anti-CD3 humano mais pró-apoptótico e que a versão FvFc R pode ser considerada para avaliação de atividade imunossupressiva *in vivo*.

A versão FvFc M mostrou MIFs de 389 ou 602 nas células CD4⁺ Fas⁺, e MIFs de 323 ou 515 nas células CD8⁺ Fas⁺. Já a versão FvFc T não mostrou aumento da expressão de Fas na população CD4⁺ com MIFs de 347 ou 357, mas mostrou um pequeno aumento da expressão na população CD8⁺ com MIFs de 232 ou 239 (Figura 28). Esses resultados sugerem que os FvFcs recombinantes aumentaram a expressão de Fas em CMSPs de forma dose-dependente, o que pode tê-los tornado mais suscetíveis à apoptose mediada por Fas.

Tabela 6. Medianas de intensidade de fluorescência (MIF) de Fas nas populações CD4⁺ e CD8⁺ após cultura com os FvFcs recombinantes.

	CD4 ⁺ Fas ⁺		CD8 ⁺ Fas ⁺	
	62,5 ng/mL	250 ng/mL	62,5 ng/mL	250 ng/mL
FvFc T	347	357	232	239
FvFc R	916	1214	1125	1338
FvFc M	389	602	323	515

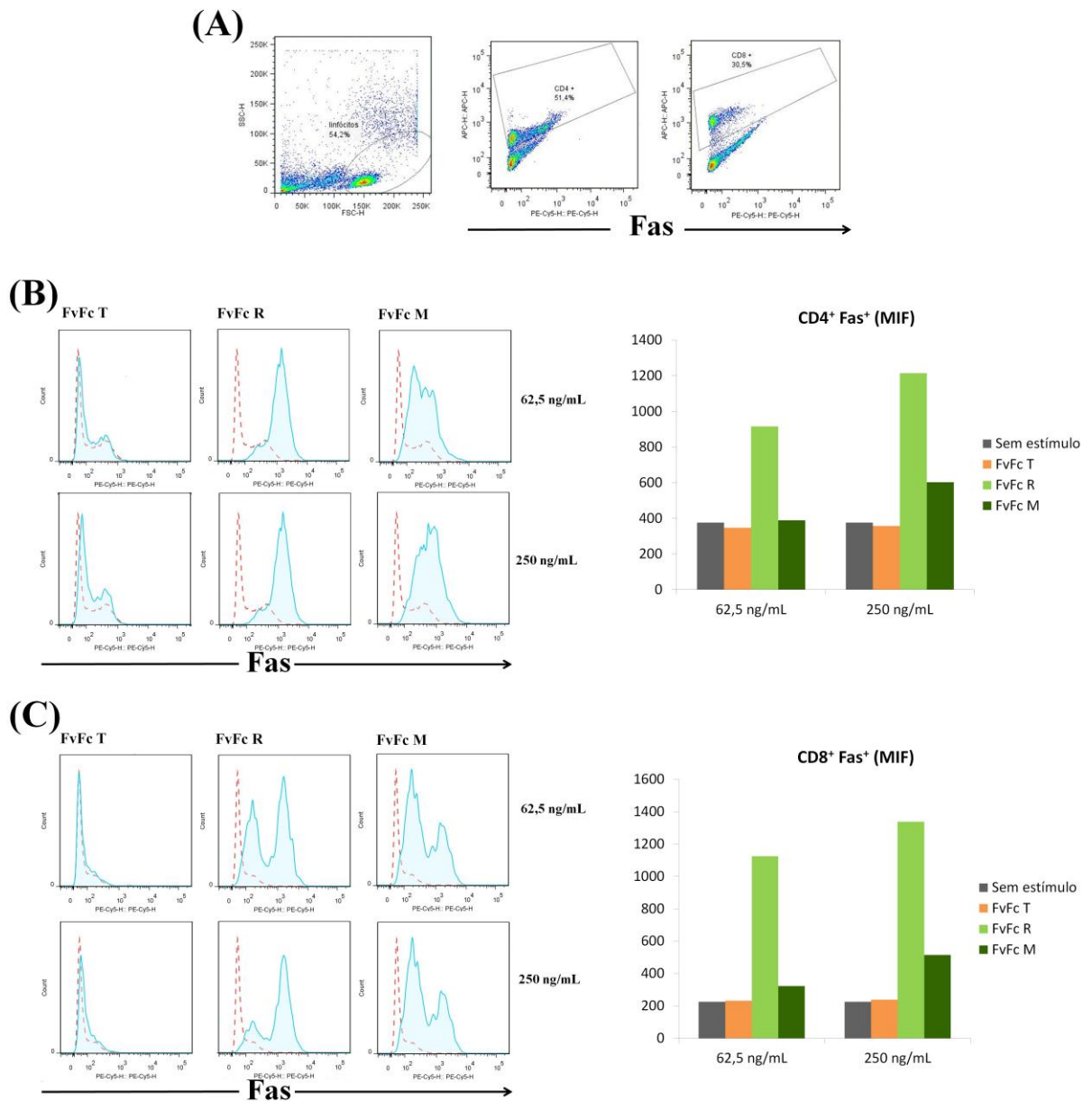


Figura 28. Aumento da expressão de Fas induzida pelos FvFcs recombinantes de forma dose-dependente. CMSPs humanas foram incubadas na presença dos FvFcs recombinantes por 5 dias. A população de interesse nas CMSPs foi selecionada por tamanho e granulosidade. **A:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSPs não estimuladas e controles negativos: dot-plots de CMSPs não estimuladas marcadas com anti-CD95 (APO-1/Fas) humano PE-Cyanine5 e anti-CD4 humano APC ou anti-CD8 humano APC. Para detectar as populações CD4⁺ Fas⁺ e CD8⁺ Fas⁺ as células foram marcadas com anti-CD95 (APO-1/Fas) humano conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 humano conjugado a APC (**B**) ou anti-CD8 humano conjugado a APC (**C**). O perfil de Fas obtido com cada anticorpo foi plotado em forma de histograma (azul) e comparado ao perfil de Fas de CMSPs não estimuladas (tracejado vermelho). Os gráficos de coluna mostram as MFIs da expressão de Fas de cada anticorpo em diferentes concentrações. PE-Cy5H: canal do PE-Cyanine5 (Fas).

Não foi observada diferença na expressão de FasL após cultura com os FvFcs recombinantes. Strauss e colaboradores, em 2009, observaram que após estímulo com OKT3

e IL-2 *in vitro*, a expressão de Fas era aumentada em células T CD4⁺ e CD8⁺, e era altamente expresso em Tregs CD4⁺ CD25^{high}. Já a expressão de FasL era aumentada apenas discretamente em células T CD4⁺ e CD8⁺ com o mesmo estímulo.

A apoptose induzida pelos FvFcs recombinantes também foi analisada através da ligação de anexina V em resíduos de fosfatidilserina externalizados nesse processo. Não foi observado aumento da ligação de anexina V após cultura com os FvFcs recombinantes. De fato, foi observada uma ligação de anexina V maior em CMSPs não estimuladas em cultura. Em diversas culturas foi observado ao final um menor número de células totais em CMSPs não estimuladas do que em CMSPs estimuladas com algum anticorpo anti-CD3 humano. A falta de estímulo pode estar contribuindo para a morte das CMSPs em cultura, o que explica a maior ligação de anexina V, devido a maior exposição de resíduos de fosfatidilserina.

4.11 Avaliação da presença de células expressando marcadores de células T regulatórias (Tregs) induzidas pelos FvFcs recombinantes

Estudos pré-clínicos e clínicos indicam que a depleção de células T não é o único mecanismo dos anticorpos anti-CD3 humanos, propondo que Tregs também podem estar sendo induzidas nesse ambiente (Chatenoud *et al.*, 1990; Belghith *et al.*, 2003; Ablamunits *et al.*, 2008; Ablamunits *et al.*, 2010). Para avaliar se os FvFcs recombinantes também induziam esse tipo peculiar de células T, foi avaliada a presença de células que expressavam marcadores de Tregs após cultura de CMSPs na presença dos FvFcs recombinantes, em duas concentrações diferentes (62,5 ng/mL ou 250 ng/mL).

CD25, a cadeia alfa do receptor de IL-2, é um marcador de ativação de células T conhecido e seu aumento após estímulo com anticorpos anti-CD3 vem sendo reportado (Lv *et al.*, 2010). Após cultura com os FvFcs recombinantes, o número de células CD25⁺ aumentaram 3 a 20 vezes comparadas a CMSPs não estimuladas (Figura 29 a-c). Foram observadas 42,6% ou 31,7% de células CD4⁺ CD25⁺, e 31,7% ou 20,1% de células CD8⁺ CD25⁺ quando utilizada a versão quimérica FvFc M; 30,5% ou 27,6% de células CD4⁺ CD25⁺, e 39,4% ou 17,2% de células CD8⁺ CD25⁺ utilizando a versão humanizada FvFc T; e, por último, 22,5% ou 27,8% de células CD4⁺ CD25⁺, e 25,7% ou 26% de células CD8⁺ CD25⁺ quando a versão humanizada FvFc R foi utilizada (Tabela 7). Nas células sem estímulo, 11,1% e 1,72% eram CD4⁺ CD25⁺ e CD8⁺ CD25⁺, respectivamente.

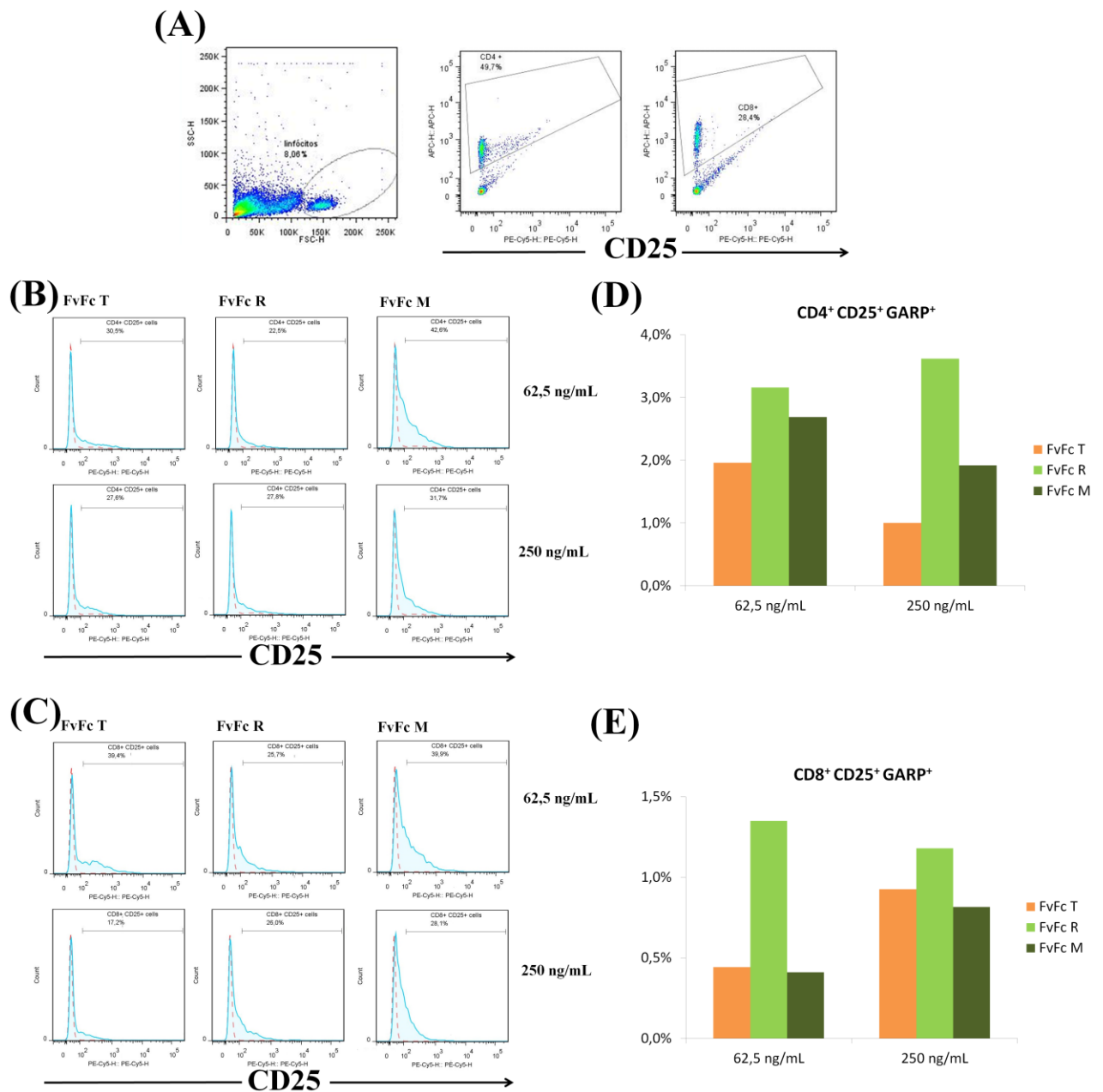


Figura 29. FvFcs recombinantes aumentam a porcentagem de células CD25 e GARP positivas. CMSPs humanas foram incubadas na presença dos FvFcs recombinantes por 8 dias. A população de interesse nas CMSPs foi selecionada por tamanho e granulosidade. **A:** Seleção da população de linfócitos na análise da dispersão de CMSPs não estimuladas e controles negativos: dot-plots de CMSPs não estimuladas marcadas com anti-CD25 humano PE-Cyanine5 e anti-CD4 humano APC ou anti-CD8 humano APC. Para detectar as populações CD4⁺ CD25⁺ e CD8⁺ CD25⁺ as células foram marcadas com anti-CD25 humano conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 humano conjugado a APC (**B**) ou anti-CD8 humano conjugado a APC (**C**). O perfil de CD25 obtido com cada anticorpo foi plotado em forma de histograma (azul) e comparado ao perfil de FCD25 de CMSPs não estimuladas (tracejado vermelho). As CMSPs também foram marcadas com anti-GARP humano conjugado a PE e as porcentagens de células positivas dentro da população CD25⁺ foram plotadas em gráficos de coluna (**D** e **E**). PE-Cy5H: canal do PE-Cyanine5 (CD25).

Tabela 7. Porcentagem de linfócitos T CD25⁺ após cultura com os FvFcs recombinantes.

	CD4 ⁺ CD25 ⁺		CD8 ⁺ CD25 ⁺	
	62,5 ng/mL	250 ng/mL	62,5 ng/mL	250 ng/mL
FvFc T	30,5%	27,6%	39,4%	17,2%
FvFc R	22,5%	27,8%	25,7%	26%
FvFc M	42,6%	31,7%	31,7%	20,1%

Esses achados não são consistentes com as observações de Bisikirska e colaboradores, em 2005. Seus resultados mostraram um aumento da expressão de CD25 em células T CD8⁺ ativadas, mas não em células T CD4⁺ após tratamento com uma versão humanizada do anticorpo OKT3 não ligante a FcR. Também não são consistentes com os achados de Malcom e colaboradores, em 2012, que observaram o efeito oposto em camundongos SCID (do inglês *Severe Combined Immunodeficient*) injetados com CMSPs humanas e tratados com o anticorpo OKT3, onde foi observado um aumento de células CD4⁺ CD25⁺ mas não de células CD8⁺ CD25⁺. É possível que parte da ativação vista em nossos experimentos foram derivadas dos efeitos mediados pelo FcR disparados pelos domínios CH2 e CH3 da IgG1 na molécula de FvFc.

Silva e colaboradores, em 2009, reportaram que estes FvFcs humanizados induziam a expressão do gene FOXP3, sinalizando um possível perfil imunoregulatório. O receptor proteico transmembrânico GARP vem sendo relacionado à indução da expressão de FOXP3 (Probst-Kepper *et al.*, 2009). GARP é encontrado em células T regulatórias (Tregs) após estimulação do TCR, mas não em outras células T (Probst-Kepper *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010; Oo *et al.*, 2010; Ukena *et al.*, 2011). Ele foi detectado na superfície de Tregs humanas policlonais CD4⁺ CD25⁺ ativadas, mas não foi detectado na superfície de nenhuma Treg em repouso ou em células T efetoras (Tran *et al.*, 2009; Stockis *et al.*, 2009). Portanto, a presença de GARP dentro dessa população CD25⁺ também foi estudada.

O número de células GARP⁺ também aumentaram após cultura com os FvFc recombinantes, especialmente na população CD4⁺ CD25⁺ comparada a população CD8⁺ CD25⁺, exceto com a versão FvFc T (Figura 29 d-e). Foram observadas 3,16% ou 3,62% de células CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺, e 1,35% ou 1,18% de células CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺ quando a versão humanizada FvFc R foi utilizada; 2,69% ou 1,92% de células CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺, e 0,4% ou 0,8% de células CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺ quando a versão quimérica FvFc M foi utilizada; e, por último, 1,96% ou 1% de células CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺, e 0,4% ou 0,9% de células CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺ utilizando a versão humanizada FvFc T.

O antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês, *Citotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), uma molécula de superfície muito similar à estrutura do CD28, é encontrado constitutivamente em Tregs CD4⁺ CD25⁺ e sua expressão é controlada por FOXP3 (Hori *et al.*, 2003). Mas contrariamente ao CD28, a ligação de CTLA-4 aos receptores CD80/CD86 resulta na supressão da ativação imune (Takahashi *et al.*, 2000). Com isso, também foi avaliada a presença de células CTLA-4⁺ em CMSPs após cultura com os FvFcs recombinantes. O número de células CTLA-4⁺ aumentaram discretamente comparadas a CMSPs não estimuladas (Figura 30). Foram observadas 0,92% ou 1,63% de células CD4⁺ CTLA-4⁺, e 3,11% e 2,12% de células CD8⁺ CTLA-4⁺ quando a versão humanizada FvFc R foi utilizada; 1,35% e 1,85% de células CD4⁺ CTLA-4⁺, e 1,02% e 2,41% de células CD8⁺ CTLA-4⁺ quando a versão quimérica FvFc M foi utilizada; e, por último, 0,66% e 0,95% de células CD4⁺ CD25⁺ CTLA-4⁺, e 1,14% e 0,65% de células CD8⁺ CD25⁺ CTLA-4⁺ utilizando a versão humanizada FvFc T.

Uma variedade de marcadores celulares para identificar Tregs humanas vem sendo sugeridos, as quais são mais frequentemente definidas como células T CD4⁺ expressando altos níveis de CD25 e Foxp3. Contudo, CD25, como muitos outros marcadores de superfície atribuídos a Tregs (CTLA-4, GITR e CD127) são tanto aumentados ou suprimidos em células T não regulatórias após estimulação do TCR, tornando-os inapropriados para o uso como marcadores de Tregs durante a ativação de células T (Wang *et al.*, 2009).

Foxp3 também não é completamente restrito a Tregs, células T convencionais também podem induzir a expressão de Foxp3 transientemente durante sua ativação, não adquirindo função supressora (Shevach *et al.*, 2008). Todavia, GARP vem sendo identificado como um marcador útil, pois é aumentado em Tregs após a ativação do TCR (Shevach *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2008).

Como nas células CD25⁺, também foi observado um aumento de células GARP⁺ e CTLA-4⁺ nas populações CD4⁺ e CD8⁺. A versão humanizada FvFc R mostrou um discreto aumento nas porcentagens de células CD25⁺ GARP⁺ em relação a versão quimérica FvFc M. Talvez a pequena população de células CD25⁺ GARP⁺ e CTLA-4⁺ encontrada sugere que um segundo estímulo, como a suplementação com IL-2 ou co-estimulação com anti-CD28, seja necessário para adquirir um fenótipo mais estável. Por fim, esses resultados indicam que os FvFcs recombinantes aumentam a porcentagem de células positivas para alguns marcadores de Tregs, de forma dose-independente, sugerindo a indução de um fenótipo imunoregulatório.

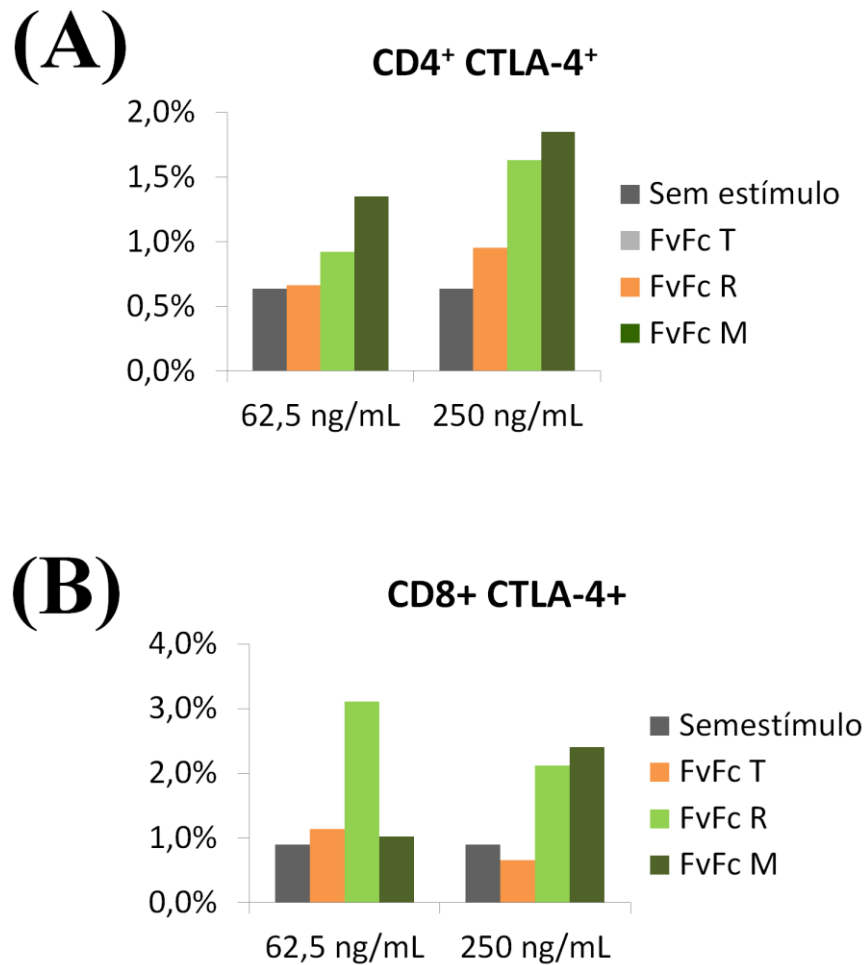


Figura 30. FvFcs recombinantes aumentam a porcentagem de células CTLA-4 positivas. CMSPs humanas foram incubadas na presença dos FvFcs recombinantes por 8 dias. A população de interesse nas CMSPs foi selecionada por tamanho e granulocidade. Para detectar as populações CD4⁺ CTLA-4⁺ e CD8⁺ CTLA-4⁺ as células foram marcadas com anti-CD152 (CTLA-4) humano conjugado a PE-Cyanine5 e anti-CD4 humano ou anti-CD8 humano conjugados a APC. Os gráficos de coluna mostram as porcentagens de células positivas dentro da população CD4⁺ CTLA-4⁺ (A) e CD8⁺ CTLA-4⁺ (B).

O uso de anticorpos anti-CD3 humanos como agentes imunossupressivos depende de propriedades como pouco potencial mitogênico e atividade supressora eficiente em células T (Martin *et al.*, 2013). De todas as versões dos FvFcs recombinantes, a versão FvFc R foi a que mostrou a maior capacidade de indução de Fas e GARP, sugerindo que esse anticorpo humanizado pode induzir imunossupressão, com uma menor mitogenicidade. Uma futura modificação da molécula FvFc para a remoção de possíveis afinidades ao receptor de Fc (Woodle, *et al.*, 1998), pode tornar o anticorpo FvFc R um bom candidato a novo farmacêutico imunossupressivo.

*Conclusões e
Perspectivas*

No presente trabalho foi iniciada a caracterização das atividades ligante e efetora de versões humanizadas e quimera do anticorpo anti-CD3 humano (T, R e M, respectivamente) na forma de FvFc e IgG. Todos os anticorpos recombinantes foram capazes de se ligar à superfície dos linfócitos T, com maiores medianas de intensidade de fluorescência nas células T CD8⁺. Quanto à especificidade dessa ligação, somente os anticorpos na forma de FvFc foram capazes de competir pela molécula CD3 presente na superfície de linfócitos T com o anticorpo parental OKT3 conjugado a FITC. Esses resultados mostram que o formato de FvFc é biologicamente valioso e pode ser um substituto para as moléculas de IgG normalmente utilizadas para imunoterapia.

As versões FvFc humanizadas apresentaram uma menor mitogenicidade comparadas à versão FvFc quimérica, mesmo todas essas versões compartilhando a mesma porção Fc. A versão humanizada FvFc T foi a que apresentou o menor potencial mitogênico. Foi observada uma maior proliferação na população CD8⁺ que na população CD4⁺ com todos os anticorpos testados, corroborando com a maior intensidade de fluorescência na ligação observada. Além disso, os FvFcs recombinantes induziram uma menor produção de citocinas inflamatórias que o anticorpo parental OKT3, sugerindo a indução de um ambiente imunoregulatório por estes.

Os FvFcs recombinantes aumentaram a expressão de Fas nas populações CD4⁺ e CD8⁺ de forma dose-dependente, podendo tê-las tornado mais suscetíveis à apoptose mediada por Fas. A versão humanizada FvFc R mostrou o maior aumento da expressão de Fas, sugerindo que a humanização pode ter tornado o anticorpo anti-CD3 humano mais pró-apoptótico.

A presença dos FvFcs recombinantes também aumentou o número de células positivas para alguns marcadores de células T regulatórias (CD25, GARP e CTLA-4) dentro das populações CD4⁺ e CD8⁺. A versão humanizada FvFc R mostrou um discreto aumento nas porcentagens de células CD25⁺ GARP⁺ em relação a versão quimérica FvFc M, sugerindo a indução de um fenótipo imunoregulatório. Todos juntos, esses resultados mostram que anticorpos na forma de FvFc e a versão humanizada FvFc R do anticorpo anti-CD3 humano são promissoras em procedimentos onde um ambiente imunoregulatório é requerido.

Como perspectivas para esse trabalho temos a modificação da molécula FvFc para a remoção de possíveis afinidades ao receptor Fc e análise metódica da molécula de IgG recombinante, para descobrir o porquê da perda de especificidade por essas versões. Além disso temos a confirmação da indução do fenótipo imunoregulatório observado, com análises de atividade supressora e exploração de vias de transdução de sinal envolvidas na estimulação do TCR pelos FvFcs recombinantes.

*Referências
bibliográficas*

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H; Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders. 2012.

Ablamunits, V.; Bisikirska, B. C.; Herold, K. C. Human regulatory CD8 T cells. *Ann N Y Acad Sci.*, v.1150, p.234–238. 2008.

Ablamunits, V.; Bisikirska, B.; Herold, K. C. Acquisition of regulatory function by human CD8+ T cells treated with anti-CD3 antibody requires TNF. *Euro J Immunol*, v. 40, n.10, p. 2891-2901. 2010.

Abramowicz, D.; Schandene, L.; Goldman, M.; Crusiaux, A.; Vereerstraeten, P.; De Pauw, L.; Wybran, J.; Kinnaert, P.; Dupont, E.; Toussaint, C. Release of tumor factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation*, v. 47, n. 4, p. 606-608. 1989.

Ahmad, Z. A.; Yeap, S. K.; Ali, A. M.; Ho, W. Y.; Banu, N.; Alitheen, M. e Hamid, M. ScFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.

Allan, S. E.; Crome, S. Q.; Crellin, N. K.; Passerini, L.; Steiner, T. S.; Bacchetta, R.; Roncarolo, M. G. e Levings, M. K. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.*, v.19, n.4, p.345-354. 2007.

Andrade, E. V.; Albuquerque, F. C.; Moraes, L. M.; Brigido, M. M.; Santos-Silva, M. A. 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.

Azevedo, M. O.; Felipe, M. S. S.; Brígido, M. M.; Maranhão, A. Q. e Teixeira, M. T. D-S. *Técnicas básicas em Biologia molecular*. Editora UnB. 2003.

Baumgart, D. C.; Targan, S. R.; Dignass, A. U.; Mayer, L.; van Assche, G.; Hommes, D. W.; Hanauer, S. B.; Mahadevan, U.; Reinisch, W.; Plevy, S. E.; Salzberg, B. A.; Buchman, A. L.; Mechkov, G. M.; Krastev, Z. A.; Lowder, J. N.; Frankel, M. B.; Sandborn, W. J. Prospective

randomized open-label multicenter phase I/II dose escalation trial of visilizumab (HuM291) in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, v. 16, n. 4, p. 620-629. 2010.

Beerli, R. R. e Rader, C. Mining human antibody repertoires. *mAbs*, v.2, n.4, p.1-14. 2010.

Belghith, M.; Bluestone, J. A.; Barriot, S. Megret, J.; Bach, J. F.; Chatenoud, L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.*, v. 9 p.1202–1208. 2003.

Bettelli, E.; Dastrange, M. e Oukka, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *PNAS*, v. 102, n. 14. 2005.

Bezerra, M. A. G. Estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamífero. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

Bisikirska, B.; Colgan, J.; Luban, J.; Bluestone, J. A. e Herold, K. C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 10. 2005.

Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian journal of clinical laboratory investigation*, v.21, p.97. 1968.

Cao, X.; Cai, S. F.; Fehninger, T. A.; Song, J.; Collins, L. I.; Piwnica-Worms, D. R. e Ley, T. J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, v. 27, n.4, p.635-646. 2007.

Carpenter, P. A.; Tso, J. Y.; Press, O. W.; Yu, X. e Anasetti, C. Non-FcR-binding, humanized anti-CD3 antibody Hu291 induces apoptosis of human T cells more effectively than OKT3 and is immunosuppressive in vivo. *Transplant Proc*, v.32, n.7, Nov, p.1545-1546. 2000.

Carpenter, P. A.; Appelbaum, F. R.; Corey, L. H.; Deeg, H. J.; Doney, K.; Gooley, T.; Krueger, J.; Martin, P.; Pavlovic, S.; Sanders, J.; Slattery, J.; Levitt, D.; Storb, R.; Woolfrey,

A. e Anasetti, C. A humanized non-FcR-binding anti-CD3 antibody, visilizumab, for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Blood*, v.99, n.8. 2002.

Chatenoud, L.; Ferran, C.; Legendre, C.; Thouard, I.; Merite, S.; Reuter, A.; Gevaert, Y.; Kreis, H.; Franchimont, P.; Bach, J. F. In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation*, v. 49, n. 4, p. 697-702. 1990.

Cohen, J. e Wilson, A. New challenges to medicare beneficiary access to mAbs. *mAbs*, v.1, n.1, p.56-66. 2009.

Costa, P. L. N. Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

de Claro, R. A.; McGinn, K.; Kwitkowski, V.; Bullock, J.; Khandelwal, A.; Habtemariam, B.; Ouyang, Y.; Saber, H.; Lee, K.; Koti, K.; Rothmann, M.; Shapiro, M.; Borrego, F.; Clouse, K.; Chen, X. H.; Brown, J.; Akinsanya, L.; Kane, R.; Kaminskas, E.; Farrell, A.; Pazdur R. U.S. Food and Drug Administration approval summary: brentuximab vedotin for the treatment of relapsed Hodgkin lymphoma or relapsed systemic anaplastic large-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.*, v. 18, n. 21, p. 5845-5849. 2012.

Fonseca, A. S. D. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

Gauthy, E.; Cuende, J.; Stockis, J.; Huygens, C.; Lethé, B.; Collet, J.; Bommer, G.; Coulie, P. G.; Lucas, S. GARP Is Regulated by miRNAs and Controls Latent TGF- β 1 Production by Human Regulatory T Cells. *Plos One*, v. 8, n. 9, e76186. 2013.

Glandt, M.; Hagopian, W.; Herold, K. C. Treatment of type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody. *Rev Endocr Metab Disord*, v. 4, p. 361-368. 2003.

Hale, G.; Rebello, P.; Al Bakir, I.; Bolam, E.; Wiczling, P.; Jusko, W. J.; Vandemeulebroucke, E.; Keymeulen, B.; Mathieu, C.; Ziegler, A. G.; Chatenoud, L;

Waldmann, H. Pharmacokinetics and antibody responses to the CD3 antibody oteelixizumab used in the treatment of type 1 diabetes. *J Clin Pharmacol*, v. 50, n. 11, p. 1238-1248. 2010.

Herold, K. C.; Burton, J. B.; Francois, F.; Poumian-Ruiz, E.; Glandt, M. e Bluestone, J. A. Activation of human T cells by FcR nonbinding anti-CD3 mAb, hOKT3 γ 1 (Ala-Ala). *The Journal of Clinical investigation*, v.111, n.3. 2003.

Herold, K. C.; Gitelman, S. E.; Willi, S. M.; Gottlieb, P. A.; Waldron-Lynch, F., Devine, L.; Sherr, J., Rosenthal, S. M.; Adi, S.; Jalaludin, M. Y.; Michels, A. W.; Dziura, J. e Bluestone, J. A. Teplizumab treatment may improve C-peptide responses in participants with type 1 diabetes after the new-onset period: a randomised controlled trial. *Diabetologia.*, v.56, n.2, p.391-400. 2013.

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

Holstein, S. A. e Hohl, R. J. Therapeutic Additions and Possible Deletions in Oncology in 2011. *Clinical pharmacology & Therapeutics*, v.91, n.1, p.15-18. 2012.

Hori, S.; Nomura, T.; Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, v. 299, p. 1057–1061. 2003.

Horwitz, D. A.; Zheng, S. G.; Gray, J. D. Natural and tgf-beta-induced foxp3(+) $cd4(+)$ $cd25(+)$ regulatory t cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol*, v.29, p. 429-435. 2008.

<http://www.detectingdesign.com/immunesystem.html>, acessado em 29 de janeiro de 2009.

Huo, J.; Xu, S.; Lam, K. Fas Apoptosis Inhibitory Molecule Regulates T Cell Receptor-mediated Apoptosis of Thymocytes by Modulating Akt Activation and Nur77 Expression. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 11827-11835. 2010.

Keymeulen, E.; Vandemeulebroucke, A. G.; Ziegler, C.; Mathieu, L.; Kaufman, G.; Hale, F.; Gorus, M.; Goldman, M.; Walter, S.; Candon, L.; Schandene, L.; Crenier, C.; De Block, J.

M.; Seigneurin, P.; De Pauw, D.; Pierard, I.; Weets, P.; Rebello, P.; Bird, E.; Berrie, M.; Frewin, H.; Waldmann, J. F.; Bach, D.; Pipeleers, L. e Chatenoud, L. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med*, v.352, p.2598–2608. 2005.

Janssen-Cilag. Orthoclone®OKT3 muromonab-CD3—Worldwide discontinuation [press release], January 4, 2010. www.cochrane-renal.org/docs/Newsletter_October_2010.pdf

Kim, S. J.; Park, Y. e Hong, H. J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*, v.20, n.1, Aug 31, p.17-29. 2005.

Kimball, J. A.; Norman, D. J.; Shield, C. F.; Schroeder, T. J.; Lisi, P.; Garovoy, M.; O'Connell, J. B; Stuart, F.; McDiarmid, S. V. e Wall, W. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl Immunol*, v. 3, n. 3, p. 212-221. 1995.

Lan, Q.; Fan, H.; Quesniaux, V.; Ryffel, B.; Liu, Z.; Zheng, S. G. Induced foxp3(+) regulatory t cells: A potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol*, v. 4, p. 22-28. 2012.

Lim, H. W.; Broxmeyer, H. E.; Kim, C. H. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3+ regulatory T cells. *J Immunol*, v. 177, p. 840–851. 2006.

Lv, M.; Qiao, C.; Lin, Z.; Yu, M.; Hou, M.; Sun, Y.; Li, Y.; Feng, J.; Shen, B. The novel non-mitogenic anti-CD3 antibody, mini-yCD3, delivers a partial TCR signal. *International Immunopharmacology*, p. 200–206. 2010., P.; Ouaked, N.; Rückert, B.; Karagiannidis, C.; Welz, R.; Blaser, K. e Schmidt-Weber, C. B. Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *The Journal of Immunology*, v.176, p.3593–3602. 2006.

Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. IV. 2001.

Malcolm, S. L.; Smith, E. L.; Bourne, T.; Shaw, A. A humanised mouse model of cytokine release: Comparison of CD3-specific antibody fragments. *Journal of Immunological Methods*. 384:33–42. 2012.

Martin, A.; Tisch, R. M.; Getts, D. R. Manipulating T cell-mediated pathology: Targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clinical Immunology*, v. 148, p. 136–147. 2013.

Miyara, M. e Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med*, v.13, p.108-116. 2007.

Miyara, M.; Yoshioka, Y.; Kitoh, A.; Shima, T., Wing, K.; Niwa, A.; Parizot, C., Taflin, C.; Heike, T.; Valeyre, D.; Mathian, A.; Nakahata, T.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M.; Amoura, Z.; Gorochov, G. e Sakaguchi, S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, v.30, n.6, p.899-911. 2009.

Miyara, M.; Gorochov, G.; Ehrenstein, M.; Musset, L.; Sakaguchi, S. e Amoura, Z. Human Foxp3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, v.10, p.744-755. 2011.

Nakamura, K.; Kitani, A.; Fuss, I.; Pedersen, A.; Harada, N.; Nawata, H.; Strober, W. TGF- β 1 plays an important role in the mechanism of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol*, v. 172, p. 834-842. 2004.

Navarra, S. V.; Guzmán, R. M.; Gallacher, A. E.; Hall, S.; Levy, R. A.; Jimenez, R. E.; Li, E. K.; Thomas, M.; Kim, H. Y.; León, M. G.; Tanasescu, C.; Nasonov, E.; Lan, J. L.; Pineda, L.; Zhong, Z. J.; Freimuth, W. e Petri, M. A. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, v. 26, n.377, p. 721-731. 2011.

Nelson, A. L.; Dhimolea, E.; Reichert, J. M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, v. 9, n. 10, p. 767-774. 2010.

Nickerson-Nutter, C.; Tchistiakova, L.; Seth, N. P.; Kasaian, M.; Sibley, B.; Olland, S.; Zollner, R.; Brady, W. A.; Mohler, K. M.; Baum, P.; Wahl, A.; Herber, D.; Vugmeyster, Y.; Wensel, D.; Wolfman, N. M.; Gill, D.; Collins, M.; Dunussi-Joannopoulos, K. Distinct in vitro binding properties of the anti-CD20 small modular immunopharmaceutical 2LM20-4 result in profound and sustained in vivo potency in cynomolgus monkeys. *Rheumatology*, v.50, p. 1033-1044. 2011.

Norman, D. J.; Chatenoud, L.; Cohen, D.; Goldman, M.; Shield, C. F. 3rd. Consensus statement regarding OKT3-induced cytokine-release syndrome and human antimouse antibodies. *Transplant Proc*, v. 25, n. 2 Suppl 1, p. 89-92. 1993.

Oderup, C.; Cederbom, L.; Makowska, A; Cilio, C. M. e Ivars, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, v.118, n.2, p.240-249. 2006.

Oo, Y. H.; Weston, C. J.; Lalor, P. F.; Curbishley, S. M.; Withers, D. R.; Reynolds, G. M.; Shetty, S.; Harki, J.; Shaw, J. C.; Eksteen, B.; Hubscher, S. G.; Walker, L. S.; Adams, D. H. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol*, v. 184, p.2886–2898. 2010.

Pan, F.; Yu, H.; Dang, E. V.; Barbi, J.; Pan, X.; Grosso, J. F.; Jinasena, D.; Sharma, S. M.; McCadden, E. M., Getnet, D.; Drake, C. G.; Liu, J. O.; Ostrowski, M. C. e Pardoll, D. M. Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4⁺ regulatory T cells. *Science*, v.325, n.5944, p.1142-1146. 2009.

Penaranda, C.; Tang, Q.; Bluestone, J. A. Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J Immunol*, v. 187, n. 4, p. 2015–2022. 2011.

Probst-Kepper, M.; Geffers, R.; Kroger, A.; Viegas, N.; Erck, C.; Hecht, H. J.; Lünsdorf, H.; Roubin, R.; Moharregg-Khiabani, D.; Wagner, K.; Ocklenburg, F.; Jeron, A.; Garritsen, H.; Arstila, T. P.; Kekäläinen, E.; Balling, R.; Hauser, H.; Buer, J.; Weiss, S. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med*, v. 13, p. 3343–3357. 2009.

Presta, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev*, v.58, n.5-6, Aug 7, p.640-656. 2006.

Reichert, J. e Pavlou, A. Monoclonal antibodies market. *Nature Reviews*, v.3, p.383-384. 2004.

Romagnani, S. Lymphokine production by human t cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol*, v. 12, p. 227-257. 1994.

Roncarolo M. G.; Gregori S.; Battaglia M.; Bacchetta R.; Fleischhauer K e Levings M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.*, v. 212, p.28-50. 2006.

Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A. e Dwek, R. A. Glycosylation and the immune system. *Science*, v.291, n.5512, Mar 23, p.2370-2376. 2001.

Ruggiero, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2002.

Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T. e Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, v.133, n.5, p.775-787. 2008.

Sakaguchi, S.; Wing, K. e Yamaguchi, T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur. J. Immunol*, v.39, p.2331-2336. 2009.

Sakaguchi, S.; Miyara, M.; Constantino, C. M. e Hafler, D. A. Foxp3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, v.10, n.7, p.490-500. 2010.

Sambrook, J. e Russel, D. W. *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3ª edição. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2001.

Seeman, E.; Delmas, P. D.; Hanley, D. A.; Sellmeyer, D.; Cheung, A. M.; Shane, E.; Kearns, A.; Thomas, T.; Boyd, S. K.; Boutroy, S. Bogado, C.; Majumdar, S. Fan, M.; Libanati, C. e

Zanchetta, J. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res*, v. 25, n. 8, p. 1886-1894. 2010.

Shevach, E. M. Cd4+ cd25+ suppressor t cells: More questions than answers. *Nat Rev Immunol*, v. 2, p. 389-400. 2002.

Shevach, E. M.; Tran, D. Q.; Davidson, T. S. Andersson, J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol.*, v. 38, p. 915–917. 2008.

Silva, H. M. Caracterização da atividade ligante e da função efetora de anticorpos humanizados anti-CD3 humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Silva, H. M.; Vieira, P. M.; Costa, P. L.; Pimentel, B. M.; Moro, A. M.; Kalil, J.; Maranhão, A. Q.; Coelho, V. e Brigido, M. M. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters*, v.125, n.2, p.129-136. 2009.

Smith, J. A. e Bluestone, J. A. T cell inactivation and cytokine deviation promoted by anti-CD3 mAbs. *Current Opinion in Immunology*, v. 9, p.648-654. 1997.

Smith, J. A.; Tso, J. Y.; Clark, M. R., Cole, M. S. e Bluestone, J. A. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. *J Exp Med*, v. 185, n. 8, p.1413-1422. 1997.

Stockis, J.; Colau, D.; Coulie, P. G.; Lucas, S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- β on the surface of activated human Treg. *Eur. J. Immunol.*, v. 39, p. 3315–3322. 2009.

Strasser, A.; Jost, P. J. e Nagata, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, v. 30, n. 2, p. 180–192. 2009.

Strauss, L.; Bergmann, C. e Whiteside, T. L. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, v. 182, p. 1469-1480. 2009.

Takahashi, T.; Kuniyasu, Y.; Toda, M.; Sakaguchi, N.; Itoh, M.; Iwata, M.; Shimizu, J. e Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, v.10, n.12, p.1969-1980. 2000.

Tran, D. Q.; Shevach, E. M. Therapeutic potential of FOXP3(+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells. *Hum. Immunol.*, v. 70, p. 294–299. 2009.

Traynor, K. FDA approves pertuzumab for breast cancer. *Am J Health Syst Pharm.*, v. 69, n. 14, p. 1178. 2012.

Traynor, K. Ado-trastuzumab emtansine approved for advanced breast cancer. *Am J Health Syst Pharm.*, v. 70, n. 7, p. 562. 2013.

Traynor, K. Obinutuzumab approved for CLL: Monoclonal antibody product is first FDA-approved breakthrough therapy. *Am J Health Syst Pharm.*, v. 70, n. 24, p. 2162. 2013.

Ukena, S. N.; Velaga, S.; Geffers, R.; Grosse, J.; Baron, U.; Buchholz, S.; Stadler, M.; Bruder, D.; Ganser, A.; Franzke, A. Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, v. 118 p. e82–92. 2011.

Utset, T. O.; Auger, J. A.; Peace, D.; Zivin, R. A.; Xu, D.; Jolliffe, L.; Alegre, M. L.; Bluestone J. A. e Clark M. R. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol*, v.29, n.9, Sep, p.1907-1913. 2002.

van der Woude, C. J.; Stokkers, P.; van Bodegraven, A. A.; Van Assche, G.; Hebzda, Z.; Paradowski, L.; D'Haens, G.; Ghosh, S.; Feagan, B.; Rutgeerts, P.; Dijkstra, G.; de Jong, D. J.; Oldenburg, B.; Farhan, M.; Richard, T.; Dean, Y. e Hommes, D. W. Phase I, double-blind, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study of NI-0401 (a fully human anti-CD3

monoclonal antibody) in patients with moderate to severe active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.*, v.16, n.10, p.1708-16. 2010

van Duijnhoven H. L. P.; Creemers, J. W. M.; Kranenborg, M. G. C.; Timmer, E. D. J.; Groeneveld, A., van den Ouweland, A. M. W.; Roebrok, A. J. M. e van de Ven, W. J. M. Development and characterization of a panel of monoclonal antibodies against the novel subtilisin-like proprotein processing enzyme furin. *Hybridoma*, v. 11, p. 71-86. 1992.

Vignali, D. A.; Collison, L. W.; Workman, C. J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, v. 8, p. 523–532. 2008.

Wang, R.; Kozhaya, L.; Mercer, F.; Khaitan, A.; Fujii, H.; Unutmaz, D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *PNAS*, v. 106, n.32, p. 13439–13444. 2009.

Wang, R.; Wan, Q.; Kozhaya, L.; Fujii, H.; Unutmaz, D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS ONE*, v. 3, p. e2705. 2008.

Wang, R.; Zhang, L.; Zhang, X.; Moreno, J.; Luo, X.; Tondravi, M.; Shi, Y. Differential Regulation of the Expression of CD95 Ligand, Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL), TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), and TNF- α During T Cell Activation. *J Immunol*, v. 166, p. 1983-1990. 2001.

Walsh, G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *TRENDS in Biotechnology*, v.23, n.11. 2005.

Walsh, G. Biopharmaceuticals benchmark 2010. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 9, p. 917-927. 2010.

Walter, G. J.; Evans, H. G.; Menon, B.; Gullick, N. J.; Kirkham, B. W.; Cope, A. P.; Geissmann, F.; Taams, L. S. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells. *Arthritis & Rheumatism*, v. 65, n. 3, p. 627-638. 2013.

Webster, A.; Pankhurst, T.; Rinaldi, F.; Chapman, J. R. e Craig, J. C. Polyclonal and monoclonal antibodies for treating acute rejection episodes in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 19, n. 2. 2006.

Weiss, A. e Littman, D. R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, v.28, n. 76, p. 263-274. 1994.

Wong, J. T. e Colvin, R. B. Selective reduction and proliferation of the CD4+ and CD8+ T cell subsets with bispecific monoclonal antibodies: evidence for inter-T cell-mediated cytotoxicity. *Clin Immunol Immunopathol*, v.58, n.2, Feb, p.236-250. 1991.

Woodle, E. S.; Bluestone, J. A.; Zivin, R. A.; Jolliffe, L. K.; Auger, J.; Xu, D.; Thistlethwaite, J. R. Humanized, nonmitogenic OKT3 antibody, huOKT3 gamma(Ala-Ala): initial clinical experience. *Transplant Proc.*, v. 30, p. 1369-1370. 1998.

Wright, A. e Morrison, S. L. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol*, v.15, n.1, Jan, p.26-32. 1997.

Wu, Y.; Borde, M.; Heissmeyer, V.; Feuerer, M.; Lapan, A. D.; Stroud, J. C.; Bates, D. L.; Guo, L.; Han, A.; Ziegler, S. F.; Mathis, D.; Benoist, C.; Chen, L. e Rao, A. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* v.126, p.375–387. 2006.

Yamashita, M.; Katakura, Y. e Shirahata, S. Recent advances in the generation of human monoclonal antibody. *Cytothechnology*, v.55, p.55-60. 2007.

You, S.; Candon, S.; Kuhn, C.; Bach, J. F.; Chatenoud, L. CD3 antibodies as unique tools to restore self-tolerance in established autoimmunity their mode of action and clinical application in type 1 diabetes. *Adv Immunol*, v. 100, p. 13-37. 2008.

Zhou, X.; Kong, N.; Zou, H.; Brand, D.; Li, X.; Liu, Z.; Zheng, S. G. Therapeutic potential of tgf- β -induced cd4(+) foxp3(+) regulatory t cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, v. 44, p. 43-50. 2011.

Anexo I

HUMANIZED ANTI-CD3 ANTIBODY FRAGMENTS INDUCE A PRO-APOPTOTIC AND REGULATORY PHENOTYPE IN HUMAN T CELLS

Bezerra MAG¹, Simi KCR¹, Silva HM^{2,3}, Coelho V^{2,4}, Kalil J^{2,4}, Maranhão AQ^{1,2}, Brígido MM^{1,2*}.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

²Institute for Investigation in Immunology - National Institute of Science and Technology (iii-INCT).

³Molecular Pathogenesis Program, Kimmel Center for Biology and Medicine at the Skirball Institute, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA

⁴Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author at: Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, 70910-900 Brasília, DF, Brazil.

E-mail address: brigido@unb.br

Abstract

OKT3 had been used for decades to reverse acute transplant rejection, but its severe side effects have limited its application. The humanization of this antibody improved its druggability, leading to a new generation of anti-human CD3 antibodies that have also been considered for the treatment of autoimmune diseases. We analyzed some functional effects of recombinant FvFc anti-human CD3 antibodies in a homodimeric antibody fragment format. All recombinant antibodies were able to bind specifically to CD3 molecules present on T cell surface. The humanized FvFc forms exhibited lower mitogenic capacities for CD4 and CD8 T

cells – than the chimeric form – and increased the expression of Fas and the number of CD25⁺ and GARP⁺ cells, suggesting the induction of a regulatory phenotype. Taken together, these data indicate that FvFc molecules, particularly the humanized FvFc R form, are promising for use as immunomodulatory agents in transplantation or autoimmune diseases.

Key words: Anti-human CD3, humanized, FvFc, immunoregulation.

1. Introduction

Therapies targeting the CD3 molecule have been effective in reversing acute transplant rejection and have great potential for the treatment of autoimmune diseases [1, 2]. To date, OKT3 is the only anti-human CD3 antibody that has been approved by the FDA. Its effects were first attributed to the transient elimination of T cells from circulation, even though only a fraction was depleted from the tissues. More recently, a new mechanism of immunosuppression based on the enhancement of a particular subset of T cells, regulatory T cells, was proposed [3, 4].

However, OKT3 is no longer available for clinical use [5]. One of its biggest drawbacks is its heterologous murine origin and its generalized T cell activation, which triggers an immunogenic reaction *in vivo* that culminates in the release of high levels of inflammatory cytokines [6-8]. The humanization and molecular engineering of the Fc portion have been used to overcome these effects, and a new generation of anti-human CD3 antibodies is being developed [9-14]. The most promising candidates induce T-cell inactivation through non-lytic mechanisms, thereby promoting apoptosis, anergy, and/or regulatory T cell expansion [15].

Regulatory T cells play an essential role in the maintenance of homeostasis, preventing autoimmune responses and suppressing exacerbated inflammatory processes [16]. Many different regulatory phenotypes are recognized in both human and mice T cells [17-21]. Molecules that define human regulatory T cells phenotypically and functionally still need further characterization. Thus far, the most commonly used combination of surface markers for human-derived regulatory T cells are CD4, the high expression of CD25, the low expression of CD127, and among others, more recently, GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant), a protein that anchors mTGF β on the surface of Tregs, favouring their suppressor activity [19, 22, 23]. The expression of these markers is considered together with the expression of the transcription factor FOXP3, the master regulator of regulatory T cell function [16]. The effect of anti-CD3 therapy on regulatory T cells is not thoroughly understood, and many types of T cell subpopulations have been shown to be affected by the treatment. CD4⁺ CD25⁺, CD4⁺ IL10⁺, and CD8⁺ CD25⁺ T cells have all been proposed to be responsible for attaining peripheral tolerance for transplanted organs in autoimmune disorders [22, 24]. Recently, it has been shown that anti-CD3 therapy does not necessarily induce regulatory T cells but rather depletes effector cells and preserves the regulatory cells [25].

We have previously reported on humanized anti-CD3 antibodies that induce FOXP3 gene expression and a markedly higher IL-10/IFN- γ ratio than does OKT3 [13]. In this study, we further functionally characterized these humanized antibodies and a chimeric form of OKT3 in the FvFc format, an antibody fragment containing a single chain Fv (scFv) linked to a human IgG1 Fc. The humanized FvFc forms induced lower proliferation of CD4 and CD8 T cells than the chimeric form. All of the FvFc forms were able to increase the expression of Fas in a dose-dependent manner. In addition, they increased the percentage of CD25⁺ and GARP⁺ cells, suggesting the induction of a regulatory phenotype. Taken together, these data indicate that FvFc molecules are promising as novel anti-CD3 immunopharmaceuticals.

2. Material and methods

2.1. Construction of humanized and chimeric expression vectors

To generate the chimeric FvFc form of the anti-CD3 sequence, murine VH and VL coding sequences were cloned in a FvFc expression vector (pMIREs). The humanized FvFc forms were previously generated by our group [13]. To generate the humanized and chimeric IgG forms of the anti-CD3 sequences, VH and VL coding sequences were cloned in an IgG vector (pMACIA-HIL). pMACIA-HIL is a mammalian tricistronic expression vector for the production of IgGs that contains a CMV/Intron A promoter, two Ig leader sequence, a synthetic EMCV-IRES element between the two chains [26], an EMCV-IRES-NEO element from the pLIXN vector (Clontech, Palo Alto, CA), and an SV40 polyadenylation sequence (Supplementary Figure 1). All plasmids were constructed using standard cloning methods [27].

2.2. Transfection and selection of expressing populations

CHO-K1 cells (ATCC number: CCL-61) were grown in six-well flat-bottom tissue culture plates (TPP, Switzerland), cultured in HAM-F12 medium (Hyclone, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin and transfected using Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's protocol. Stable populations producing the different forms of the anti-CD3 FvFc and IgG antibodies were obtained by G418 selection (600 µg/ml) beginning 48h after transfection. Isolated populations were then expanded to 150 cm² flasks, grown in HAM-F12 medium supplemented with 1.25% Ultra-low IgG fetal bovine serum until the necessary amount of antibody was produced for use in experiments.

2.3. Recombinant IgG and FvFc production measurement

The recombinant IgG and FvFc forms present in cell culture supernatants were quantified by sandwich ELISA. Ninety-six-well microtiter plates (Nunc, USA) were coated with polyclonal goat anti-human IgG (KPL, USA). Serial dilutions of the culture supernatants were performed and recombinant antibodies were detected using goat anti-human IgG (Fc specific) conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, USA). A standard curve was generated using known concentrations of human IgG.

2.4. Recombinant IgG and FvFc purification

The recombinant IgG and FvFc forms were purified using the ImmunoPure Plus Immobilized Protein A resin (Pierce, USA) according to the manufacturer's protocol. Relevant 2 ml fractions were pooled after analysis by 12% SDS-PAGE and dialyzed against PBS. Each antibody concentration was determined by sandwich ELISA, as described above. IgG and FvFc antibodies were analyzed by reducing SDS-PAGE with silver staining and by Western blotting using anti-human IgG (Fc specific) conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, USA), and the corresponding antibody heavy chain fragments were visualized as monomeric 55 kDa bands.

2.5. Direct binding capacity assays of recombinant IgG and FvFc forms

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from one healthy volunteer were acquired by Ficoll-Hypaque (GE HealthCare) density gradient centrifugation. Approximately 4×10^5 human PBMCs were incubated with 62.5 ng of the different recombinant IgG and FvFc antibodies for 30 min at 4° C, washed three times in PBS + 2% FBS, and spun down. To detect the direct binding of humanized and chimeric IgG and FvFc antibodies to the human T cell surface, the PBMCs were submitted to a second incubation with FITC-conjugated mouse

anti-human IgG (BD Bioscience, USA). To select the T cell subpopulations, PE-conjugated mouse anti-human CD4 and APC-conjugated mouse anti-human CD8 monoclonal antibodies (eBioscience, USA) were used. All of the samples were acquired using a FACSCalibur cytometer (BD Bioscience, USA) and analyzed using FlowJo software 7.6.5 version (Treestar, USA).

2.6. Competition ability of recombinant FvFc forms

To test the ability of the recombinant FvFc forms to compete for the binding to surface CD3 molecules with the parental OKT3 antibody (eBioscience, USA), approximately 4×10^5 human PBMCs were initially incubated with the FITC-conjugated OKT3 for 30 min at 4° C. They were then washed and incubated with five-fold of the FvFc or unconjugated OKT3 antibodies (eBioscience, USA). The median fluorescence intensity (MFI) was compared among the samples, and the percentage of binding inhibition was determined using the following formula:

$$\frac{\text{MFI (FITC conjugated OKT3)} - \text{MFI (FvFc)}}{\text{MFI (FITC conjugated OKT3)} - \text{MFI (unconjugated OKT3)}} \times 100 = \% \text{ binding inhibition}$$

The data were acquired using a FACSCalibur cytometer as described above.

2.7. Proliferation assays

To evaluate the mitogenic profile induced by the recombinant FvFc forms, proliferation assays were performed. Human PBMCs were washed in PBS, resuspended at 10^7 cells/ml, and incubated with 2.5 μM of carboxyfluorescein diacetate 5,6 succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich, USA). The cells were then incubated at 37 °C while protected from light for 8 min under gentle agitation, and then five volumes of cold RPMI 1640 (Invitrogen, USA) supplemented with 10% FBS were added for 5 min on ice to stop the reaction. The

labeled cells were washed three times and resuspended in culture medium. Approximately 4×10^5 CFSE-labeled human PBMCs were incubated with 62.5 ng of the recombinant FvFc forms or with OKT3 for 8 days at 37 °C. On the eighth day, the cells were harvested, washed and incubated with PE-conjugated mouse anti-human CD4 and APC-conjugated mouse anti-human CD8 (eBioscience, USA) for 30 min at 4 °C. The data were acquired using a FACSCalibur cytometer as described above.

2.8. Fas-mediated apoptosis

To determine whether the recombinant FvFc forms were able to make PBMCs more susceptible to Fas-mediated apoptosis, approximately 4×10^5 human PBMCs were incubated with 62.5 ng or 250 ng of the different recombinant FvFc forms for 5 days at 37 °C. On the fifth day, the cells were harvested, washed, and incubated with PE-Cyanine5-conjugated mouse anti-human CD95 (APO-1/Fas) and APC-conjugated mouse anti-human CD4 or anti-human CD8 (eBioscience, USA) for 30 min at 4 °C. The data were acquired using a FACSVerse cytometer (BD Bioscience, USA) and analyzed using FlowJo software 7.6.5 version (Treestar, USA).

2.9. Regulatory T cell phenotype

To determine whether the recombinant FvFc forms increased the number of cells expressing some regulatory T cell markers, approximately 4×10^5 human PBMCs were incubated with 62.5 ng or 250 ng of the different recombinant FvFc forms for 8 days at 37 °C. The recombinant antibodies were added every 48 hours for a total of four times, with the last pulse occurring on the sixth day. On the eighth day, cells were harvested, washed, and incubated with PE-Cyanine5-conjugated mouse anti-human CD25, PE-conjugated rat anti-human GARP, and APC-conjugated mouse anti-human CD4 or anti-human CD8

(eBioscience, USA) for 30 min at 4 °C. The data were acquired using a FACSVerser cytometer as described above.

3. Results

3.1. Production of humanized and chimeric anti-human CD3 antibodies

Humanized and chimeric constructions were obtained from stably transfected CHO-K1 cells. Antibodies were purified from cell culture supernatants by affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting (Figure 1). The FvFc chimeric form, named FvFc M, preserves the murine scFv from the parental antibody OKT3 fused to human IgG1 Fc. The two humanized versions, named R and T, are single residue mutants [13, 28]. FvFc is a homodimeric antibody fragment [29].

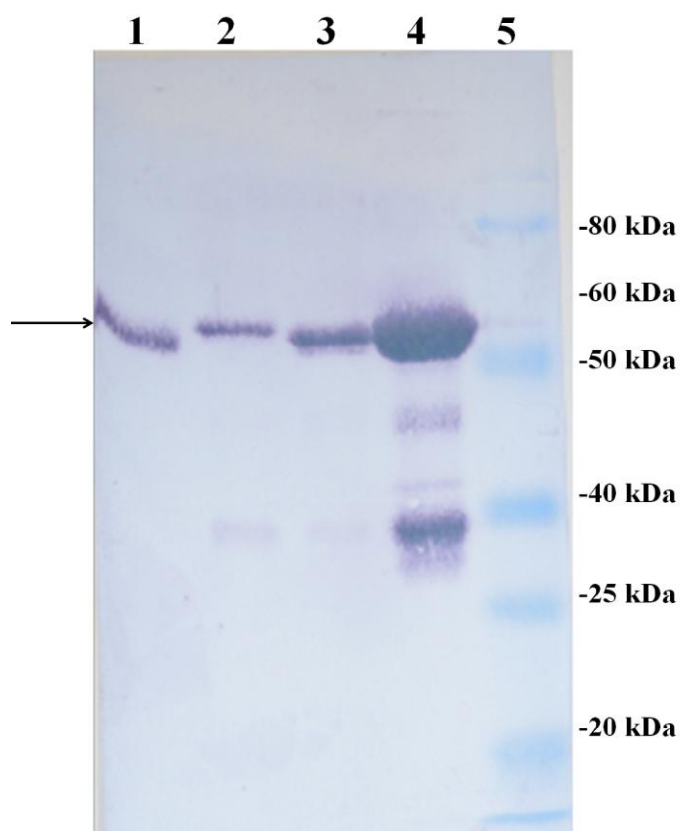


Figure 1. FvFc antibody heavy chains migrate as monomeric 55 kDa bands. 12% SDS-PAGEs followed by Western blotting using anti-human IgG (Fc specific) conjugated with alkaline phosphatase. Lane 1: FvFc T; lane 2: FvFc R; lane 3: FvFc M; lane 4: human IgG (Pierce, USA); lane 5: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, USA). Arrows indicate the FvFc heavy chains bands.

3.2. Antibodies bind specifically to the CD3 molecule on CD4 and CD8 T cells

The direct binding capacity of the humanized and chimeric antibodies to CD3 present on the surface of human T cells was analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), by flow cytometry (Table 1). All FvFc forms presented similar cell-binding capacities within the CD8 T cell population, with median fluorescence intensities (MFIs) of

233 for FvFc T, 243 for FvFc R, and 215 for FvFc M. On the CD4 T cells, the MFIs observed were 66.1, 115, and 74.7 respectively.

Table 1

Direct binding of anti-human CD3 antibodies to human T cells.

Anti-human CD3	Median fluorescence intensity	
	T CD4 cells	T CD8 cells
FvFc T	66.1	233
FvFc R	115	243
FvFc M	74.7	215

Human PBMCs were incubated with 62.5 ng of the recombinant antibodies, washed, and incubated with FITC-conjugated anti-human. They were then washed and incubated with PE-conjugated anti-human CD4 or APC-conjugated anti-human CD8 and analyzed by flow cytometry. The FITC median fluorescence intensities of the gated cells are shown.

The ability of the FvFc forms to compete for binding to the surface CD3 molecules with a FITC-conjugated OKT3 antibody was also evaluated by flow cytometry. The FvFc forms exhibited equivalent levels of binding inhibition: 84% for FvFc T, 87% for FvFc R, and 93% for FvFc M (Figure 2 and Table 2). These results suggest that the anti-human CD3 FvFc forms were able to compete for binding to the CD3 molecule with the parental antibody OKT3.

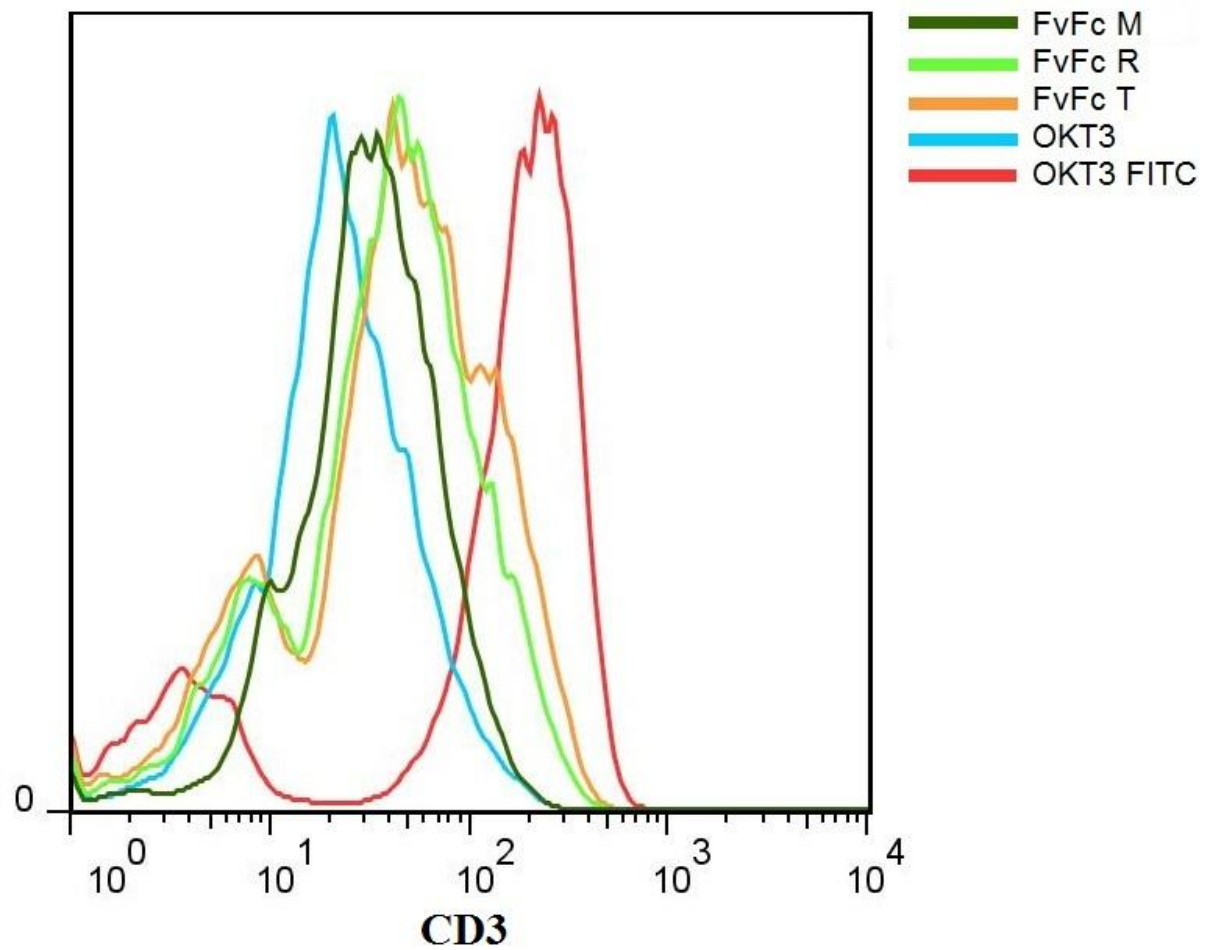


Figure 2. Recombinant FvFc forms compete with OKT3 antibody for binding to the CD3 surface molecules on human PBMCs. Lymphocytes were gated in a forward versus side scatter dot plot, and the binding of the anti-human CD3 antibodies was plotted as a histogram. The decreased median fluorescence intensity reflects the inhibition of the FITC conjugated OKT3.

Table 2

Inhibition of OKT3 binding to CD3 molecules in human PBMCs by FvFc forms.

Anti-human CD3	FITC median fluorescence intensity	% of FITC conjugated OKT3 binding inhibition	Antibody added (ng)
FvFc T	45.8	84%	312.5
FvFc R	41.8	87%	312.5
FvFc M	31.7	93%	312.5
Unconjugated OKT3	21.6	100%	312.5
FITC conjugated OKT3	173	-	62.5

Human PBMCs were incubated with FITC-conjugated OKT3, washed, incubated with the FvFc forms or unconjugated OKT3 and analyzed by flow cytometry. The percentage of FITC conjugated OKT3 binding inhibition reflects the decrease in FITC median fluorescence intensity when cells were exposed to anti-human CD3 antibodies.

3.3. Humanized anti-human CD3 FvFc forms are less mitogenic than the chimeric form

The mitogenic capacity of the humanized and the chimeric FvFc forms for both CD4⁺ and CD8⁺ populations was compared using a proliferation assay with CFSE-labeled PBMCs. The CD8⁺ population proliferated slightly more than did the CD4⁺ with all antibodies tested (Figure 3a and 3b). The chimeric form FvFc M induced proliferation of 91% and 92.3% in the CD4⁺ and CD8⁺ populations, respectively. FvFc T presented the lowest mitogenic capacity, 6.26% and 18.1% proliferating cells, in the CD4⁺ and CD8⁺ populations, respectively. Stimulation with FvFc R resulted in 66% CD4⁺ proliferating cells and 74.1% CD8⁺ proliferating cells. The proliferation pattern after culture with OKT3 showed that 87% of the CD4⁺ population and 88.7% of the CD8⁺ population proliferated after the stimulus. These results suggest that humanized FvFc forms present lower mitogenic capacity on both CD4 and CD8 T cells than the chimeric FvFc and the parental antibody OKT3.

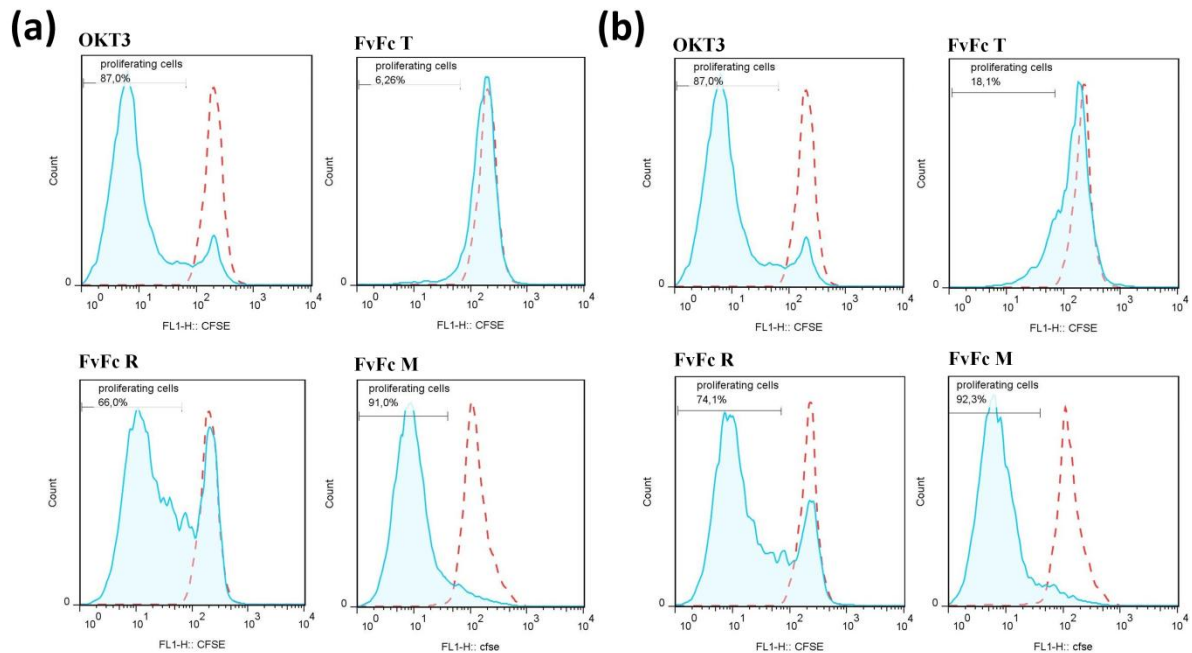


Figure 3. Humanized FvFc forms exhibit a lower mitogenic capacity on CD4 and CD8 T cells. CFSE-labeled human PBMCs were gated in a forward versus side scatter dot plot. To detect CD4⁺ and CD8⁺ populations, a second gate was made for cells stained with PE-conjugated anti-human CD4 (a) or APC-conjugated anti-human CD8 (b). The CFSE patterns obtained for each antibody were plotted as histograms (solid lines) and compared to the CFSE pattern of unstimulated PBMCs (dashed lines).

3.4. Anti-human CD3 FvFc forms increase Fas expression in a dose-dependent manner

Apoptosis due to partial TCR signaling has been proposed as a mechanism for anti-CD3 antibody suppression [30]. To test whether anti-human CD3 FvFc forms were capable of making PBMCs more susceptible to Fas-mediated apoptosis, Fas expression was analyzed following incubation with the different antibodies. The expression of Fas increased in a similar manner in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells, at different concentrations of the FvFc R and FvFc M forms (Figure 4a to 4d). The FvFc R form induced the highest expression of Fas, with MFIs of 916 or 1214 in the CD4⁺ population, and MFIs of 1125 or 1338 in the CD8⁺

population. The FvFc M form displayed MFIs of 389 or 602 in CD4⁺ Fas⁺ cells against MFIs of 323 or 515 in CD8⁺ Fas⁺ cells. Finally, the FvFc T form did not induce an increase of Fas expression in the CD4⁺ population, with MFIs of 347 or 357, and it induced a slight increase of Fas expression in the CD8⁺ population, with MFIs of 232 or 239. These results showed that recombinant FvFc R and M increase the expression of Fas on CD4 and CD8 positive T cells, in a dose-dependent manner, making them more susceptible to Fas-mediated apoptosis.

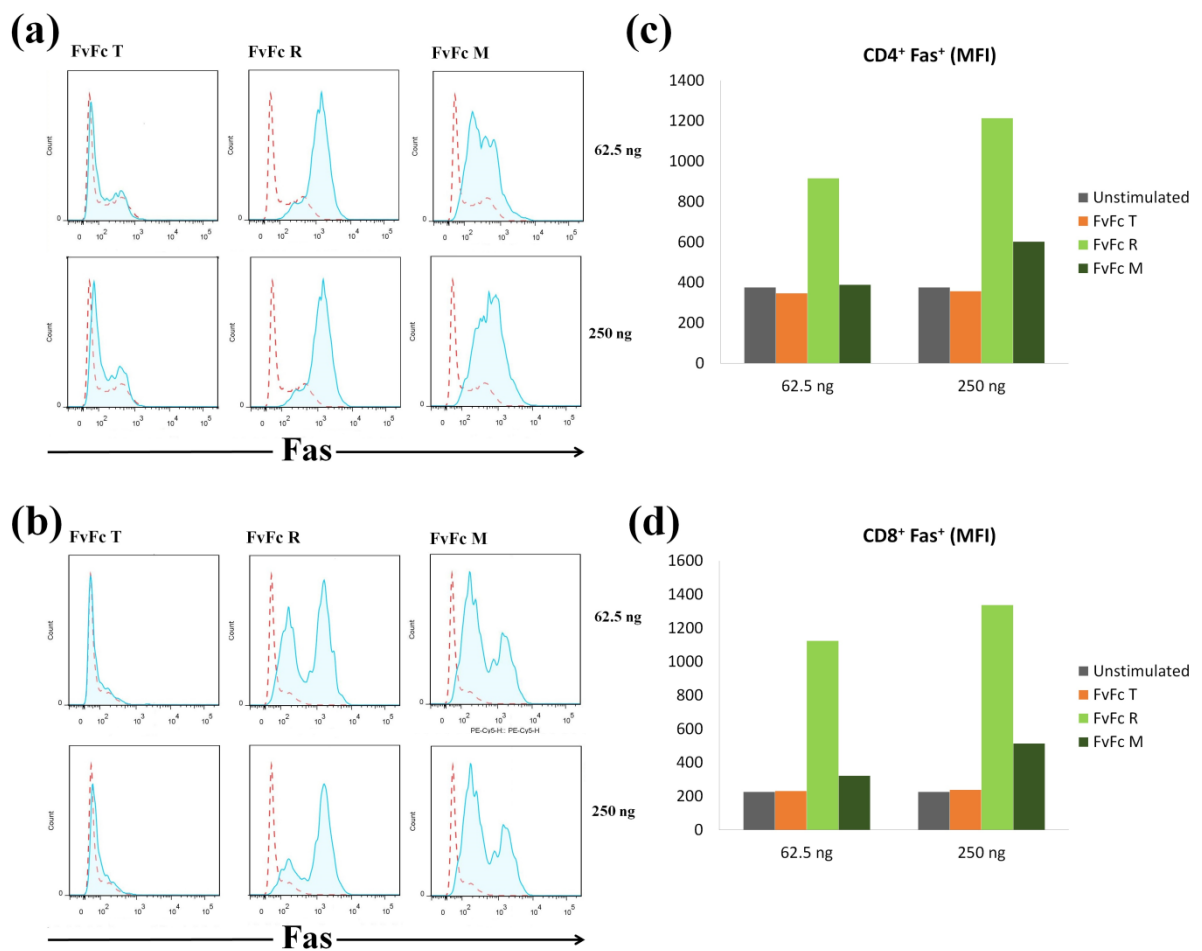


Figure 4. Increased Fas expression induced by recombinant FvFc forms in a dose-dependent manner. Human PBMCs were gated in a forward versus side scatter dot plot. To detect CD4⁺ and CD8⁺ populations, a second gate was made for cells stained with PE-Cyanine5-conjugated anti-human CD95 (APO-1/Fas), and APC-conjugated anti-human CD4 (a) or

APC-conjugated anti-human CD8 (b). Fas patterns for each antibody were plotted as histograms (solid lines) and compared to unstimulated PBMCs (dashed lines) and the MFIs were plotted as column graphics (c and d).

3.5. Anti-human CD3 FvFc forms increase the numbers of CD25 and GARP positive cells

Anti-CD3 antibodies have been reported to increase the levels of CD25, the alpha chain of the IL-2 receptor, which is a well-known activation marker of T cells [31]. The recombinant FvFc antibodies induced a 3-20 fold increase in the number of both CD4 and CD8 T cells expressing the CD25 molecule, in relation to unstimulated PBMC (Figure 5a and 5b). When the FvFc M form was used, 42.6% or 31.7% of the cells were CD4⁺ CD25⁺, while 31.7% or 20.1% of the cells were CD8⁺ CD25⁺. When the FvFc T form was used, 30.5% or 27.6% of the cells were CD4⁺ CD25⁺ while 39.4% or 17.2% of the cells were CD8⁺ CD25⁺. Finally, when the FvFc R form was used, 22.5% or 27.8% of the cells were CD4⁺ CD25⁺ cells while 25.7% or 26% of the cells were CD8⁺ CD25⁺. With unstimulated cells, 11.1% and 1.72% of them were CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD25⁺, respectively.

We previously reported that the humanized anti-CD3 FvFc forms induced a higher IL-10/IFN- γ ratio than did OKT3, along with an induction of FOXP3 gene expression, indicating an immunoregulatory profile [13]. The transmembrane receptor protein GARP has been correlated with FOXP3 induction [23]; therefore, the presence of GARP within the CD25⁺ population was also explored. The number of GARP⁺ cells increased after culture with the FvFc forms at different concentrations, with the exception of FvFc T version, especially in the CD4⁺ CD25⁺ population compared with the CD8⁺ CD25⁺ population (Figure 5c and 5d). A slightly higher increase was observed with the FvFc R form – 3.16% or 3.62% of the cells were CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺, while 1.35% or 1.18% of the cells were CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺.

When the FvFc M form was used, 2.69% or 1.92% of the cells were CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺ cells, while 0.4% or 0.8% of the cells were CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺. Finally, when the FvFc T form was used, 1.96% or 1% of the cells were CD4⁺ CD25⁺ GARP⁺, while 0.4% or 0.9% of the cells were CD8⁺ CD25⁺ GARP⁺. The expression of CTLA-4, CD127 and Foxp3 were also analyzed by flow cytometry, but no differences were observed (data not shown). These results indicated that recombinant FvFc forms increase some regulatory T cell markers in both populations, in a dose-independent manner, suggesting that the anti-human CD3 antibodies induce an immunoregulatory phenotype.

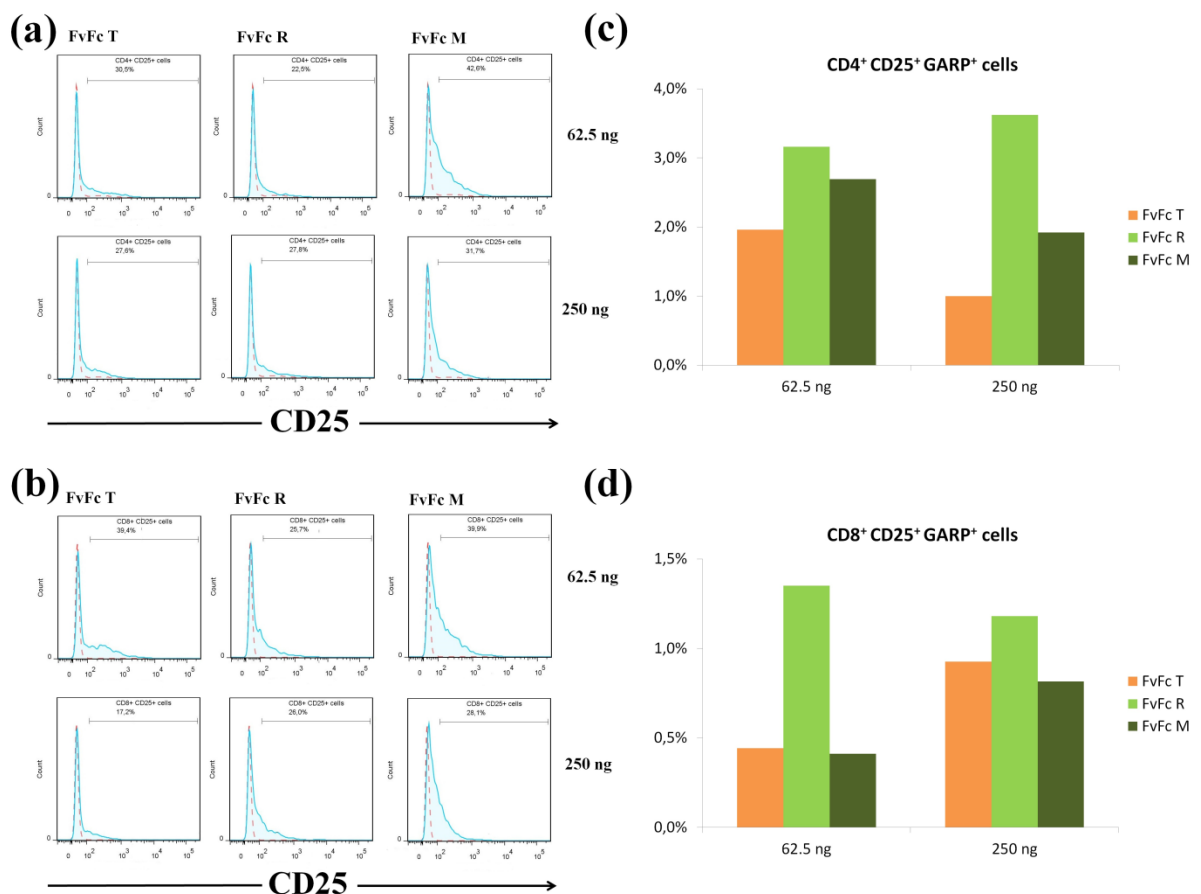


Figure 5. Recombinant FvFc forms increase CD25- and GARP-positive cells. Human PBMCs were gated in a forward versus side scatter dot plot. To detect CD4⁺ and CD8⁺ populations, a second gate was made for cells stained with PE-Cyanine5-conjugated anti-

human CD25, and APC-conjugated anti-human CD4 (a) or APC-conjugated anti-human CD8 (b). CD25 patterns obtained for each antibody were plotted as histograms (solid lines) and compared to the CD25 pattern of unstimulated PBMCs (dashed lines). PBMCs were also labeled with PE-conjugated anti-human GARP and the percentages of positive cells inside the CD25⁺ population were plotted as column graphics (c and d).

4. Discussion

Anti-human CD3 antibodies have been used as immunosuppressive pharmaceuticals for treating graft rejection and, more recently, autoimmunity [32]. A new generation of anti-CD3 antibodies is now available to replace the long-used OKT3, which has been discontinued [5]. Several Fc-modified anti-human CD3 antibodies were created in an attempt to modify the risk-benefit ratio, including chimeric and humanized forms, to substitute OKT3 in treatments for transplants and autoimmune diseases such as type 1 Diabetes [12, 33-35].

We have previously reported on recombinant humanized anti-CD3 antibodies fragments produced as FvFc [13]. In the present work, we functionally compared these humanized forms with a chimeric form of the OKT3 antibody. These recombinant antibodies were able to bind specifically to the human CD3 molecules present in T cells, as observed by the marked displacement of the FITC-conjugated OKT3 (Figure 2 and Table 2). We had also tested the full IgG forms of FvFc R, FvFc T and FvFc M. All of the forms bound to CD4⁺ and CD8⁺ cells; however, the FvFc forms exhibited higher cell-binding capacities than did IgG forms (Supplementary Table 1) and were able to compete for CD3 present in the surface of T cells with the monoclonal OKT3 antibody (Figure 2 and Table 2). The chimeric FvFc was the best competitor for the CD3 epitope, as expected due to the preservation of the parental murine OKT3 paratope. It is worth noting that other antibody fragments similar to our FvFc have been tested [36].

The mitogenic effect of the OKT3 is correlated with its reported toxicity *in vivo*; which is primarily due to the induction of cytokine release [37]. Reducing the mitogenicity of anti-human CD3 antibodies is likely to provide a more secure immunopharmaceutical. The mitogenic capacity of the humanized FvFc forms in lymphocytes has already been verified [13]. To characterize this mitogenic capacity in CD4⁺ and CD8⁺ populations, the mitogenic capacity of the FvFc forms, including the chimeric FvFc M form, was therefore evaluated (Figure 3a and 3b). The chimeric form was the most mitogenic FvFc and produced a proliferative response comparable to that for the OKT3 mAb. Neither murine IgG2a (OKT3) or human IgG1 (FvFc) constant domains interfered with the mitogenic capacity of the OKT3 Fv. Interestingly, the humanized forms displayed weaker mitogenic capacities than the chimeric form FvFc M, even though they share the same Fc. The FvFc T form was almost unable to induce proliferation of either T cell population. The difference between the R and T forms is a single amino acid substitution at position 86. This position is not related to the paratope but may be of important for its flexibility and framework conformation [13]. The CD8⁺ population proliferated more than the CD4⁺ population under humanized antibody treatment (Figure 3a and 3b), consistent with the higher binding of the antibodies to the CD8 population (Table 1). Similarly, Bisikirska et al. observed that a humanized anti-CD3 antibody [hOKT3 γ 1 (Ala-Ala)] was more mitogenic for CD8⁺ T cells than it was for CD4⁺ cells [24]. In this case, however, the anti-human CD3 antibody was a non-FcR binder, which reduces the mitogenic capacity. Here, the Fc is not modified, and the loss of mitogenicity can only be explained by the humanization process because the only difference among the molecules is in the Fv. It is possible that the humanization process reduced the affinity of the humanized antibodies, explaining the reduced capacity to induce activation. Despite the fact that all recombinant FvFc forms can compete with FITC-conjugated OKT3 for CD3 molecules (Figure 2 and Table 2), the weakest competitor, FvFc T, also displayed the lowest

mitogenicity. This form also had the largest difference between CD4⁺ and CD8⁺ proliferation (6.26% for CD4⁺ and 18.1% for CD8⁺). A lower affinity may underlie the mechanism of action of these FvFc forms, as it has been proposed that activated CD8⁺ cells may develop a regulatory phenotype [24, 38].

The mechanism of action of anti-human CD3 antibodies as immunosuppressors does not necessarily rely upon the induction of T regulatory cells, but it rather may result from apoptosis induced by TCR activation [39, 40]. Strauss et al. observed that after *in vitro* stimulation with OKT3 and IL-2, Fas was up-regulated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells and was also highly expressed in fresh CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells [41]. Our data support the hypothesis that the anti-human CD3 FvFc R and M forms increase the expression of Fas on PBMCs in a dose-dependent manner (Figure 4a to 4d). The Fas expression levels of the CD4⁺ and CD8⁺ populations were equivalent, and the humanized FvFc R form resulted in a higher increase than did the chimeric FvFc M form. As programmed cell death is recognized as a mechanism for anti-CD3 immunosuppression [42], the FvFc R form should be studied further to assess its immunosuppressive properties, both *in vitro* and *in vivo*. These data also suggest that humanization may have made the anti-human CD3 FvFc R more pro-apoptotic, making PBMCs more susceptible to Fas-mediated apoptosis.

Preclinical and clinical studies have indicated that T cell depletion alone is an unlikely mechanism of anti-human CD3 antibodies, suggesting that regulatory T cells may indeed have been induced [37, 43-45]. To evaluate whether the anti-human CD3 FvFc forms also induce this particular subset of cells, we searched for cells expressing regulatory T cell markers after the culture of PBMCs with the antibodies (Figure 5a and 5b). The number of CD25-positive cells increased after exposure to the FvFc recombinant antibodies, in both the CD4⁺ and CD8⁺ populations. The humanized forms FvFc T and FvFc R resulted in an increase of CD25-positive cells that was similar to that of the chimeric form FvFc M. These

findings are not consistent with the observations of Bisikirska et al. [24]; their data showed an increase in the expression of CD25 on activated CD8⁺ T cells but not on CD4⁺ T cells after treatment with an FcR-non binder humanized form of the OKT3 antibody. The data are also not consistent with those of Malcolm et. al, who observed the opposite effect after treating human PBMC-injected SCID-mice with OKT3; their data showed an increase in CD4⁺ CD25⁺ but not CD8⁺ CD25⁺ T cells [14]. It is possible that part of the activation we observed in our experiments derives from the FcR-mediated effects triggered by the IgG1 CH2 and CH3 domains in FvFc. It is worth noting that the OKT3 reagent, a known FcR binder, also induced CD25⁺ cells in both CD4⁺ and CD8⁺ populations (data not shown).

We also evaluated the presence of GARP within the CD25⁺ population (Figure 5c and 5d). The GARP protein was found after TCR stimulation in human regulatory T cells, but not in other T lymphocytes [23, 46-48], and is considered to be a more reliable human regulatory T cell marker [49]. It was detected on the surface of activated polyclonal human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells but it was not detected on the surface of any resting regulatory T cell or T effector clones [50, 51]. We observed that the number of GARP-positive cells also increased in both CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD25⁺ cells treated with recombinant anti-human CD3 FvFc forms, except for the FvFc T form. The humanized FvFc R form resulted in slightly higher numbers than did the chimeric FvFc M form. The rather small CD25⁺ GARP⁺ population found suggests that a secondary stimulus, such as IL-2 supplementation, is necessary to attain a stable phenotype. Additionally, other regulatory markers, such as the surface expression of CTLA-4, CD127 and the intracellular expression of Foxp3, were also analyzed, but we did not observe differences between stimulated and unstimulated PBMCs (data not shown).

A variety of cell surface markers have been suggested to identify the human regulatory T cell subset, which are most often defined as CD4⁺ T cells expressing high levels of CD25 and Foxp3. However, CD25 and many other human regulatory T cell-attributed cell surface

markers (such as CTLA-4, GITR, and CD127) are either up-regulated or down-regulated in non-regulatory T cells after TCR stimulation, rendering them inappropriate as markers for regulatory T cells during T-cell activation [52]. Foxp3 is also not completely restricted to human regulatory T cells; conventional T cells can transiently express Foxp3 during activation without acquiring a suppressive function [53]. However, GARP has been identified as a useful marker to identify activated human regulatory T cells because it is up-regulated on regulatory T cells post-TCR activation [52, 54]. The use of anti-human CD3 antibodies as immunosuppressive agents depends on properties such as low mitogenic capacity and efficient suppressor activity toward T cells [15]. The FvFc R form exhibited a higher capacity for Fas and GARP induction, suggesting that this humanized antibody can induce immunosuppression with less mitogenicity. A further modification of the FvFc molecule to remove affinity towards Fc receptors [55] might make the FvFc R form a immunosuppressive pharmaceutical candidate.

5. Conclusion

We have characterized humanized and chimeric fragments that are able to bind to the CD3 molecule on the surface of human T cells. Humanized FvFc forms have lower mitogenic capacities for both CD4 and CD8 T cells than the chimeric form while increasing the expression of Fas and the percentage of CD25- and GARP-positive cells, suggesting the induction of a regulatory phenotype. Further studies are necessary to confirm whether these recombinant anti-human CD3 antibodies induce T cells with suppressive activity, and to explore the molecular pathways involved in their activation. These data suggest that the FvFc molecules and the humanized FvFc R form are promising agents to promote immunoregulation in inflammatory conditions such as in transplantation and autoimmune diseases.

Abbreviations

CFSE: Carboxyfluorescein Diacetate 5,6 Succinimidyl Ester; CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; FOXP3: Forkhead box P3; GARP: Glycoprotein-A Repetitions Predominant; mAb: Monoclonal antibody; PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell.

Acknowledgements

We thank CNPq for the provided studentship. This work was supported by grants from MCTI/INCT and CAPES.

6. References

1. Cosimi AB, Burton RC, Colvin RB, Goldstein G, Delmonico FL, LaQuaglia MP, Tolloff-Rubin N, Rubin RH, Herrin JT, Russell PS. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation*. 1981. 32(6):535-539.
2. Herold KC, Gitelman SE, Ehlers MR, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Hagopian W, Boyle KD, Keyes-Elstein L, Aggarwal S, Phippard D, Sayre PH, McNamara J, Bluestone JA; the AbATE Study Team. Teplizumab (anti-CD3 mAb) treatment preserves C-peptide responses in patients with new-onset type 1 diabetes in a randomized controlled trial: Metabolic and immunologic features at baseline identify a subgroup of responders. *Diabetes*. 2013. 62(11):3766-3774.
3. Hooks MA, Wade CS, Millikan WJ Jr. Muromonab CD-3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation. *Pharmacotherapy*. 1991. 11(1):26-37.

4. You S, Candon S, Kuhn C, Bach JF, Chatenoud L. CD3 antibodies as unique tools to restore self-tolerance in established autoimmunity their mode of action and clinical application in type 1 diabetes. *Adv Immunol.* 2008. 100:13-37.
5. Janssen-Cilag. Orthoclone®OKT3 muromonab-CD3—Worldwide discontinuation [press release], January 4, 2010. www.cochrane-renal.org/docs/Newsletter_October_2010.pdf
6. Norman DJ, Chatenoud L, Cohen D, Goldman M, Shield CF 3rd. Consensus statement regarding OKT3-induced cytokine-release syndrome and human antimouse antibodies. *Transplant Proc.* 1993. 25(2 Suppl 1):89-92.
7. Kimball JA, Norman DJ, Shield CF, Schroeder TJ, Lisi P, Garovoy M, O'Connell JB, Stuart F, McDiarmid SV, Wall W. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl Immunol.* 1995. 3(3):212-221.
8. Abramowicz D, Schandene L, Goldman M, Crusiaux A, Vereerstraeten P, De Pauw L, Wybran J, Kinnaert P, Dupont E, Toussaint C. Release of tumor factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1989. 47(4):606-608.
9. Hale G, Rebello P, Al Bakir I, Bolam E, Wiczling P, Jusko WJ, Vandemeulebroucke E, Keymeulen B, Mathieu C, Ziegler AG, Chatenoud L, Waldmann H. Pharmacokinetics and antibody responses to the CD3 antibody oteelixizumab used in the treatment of type 1 diabetes. *J Clin Pharmacol.* 2010. 50(11):1238-1248.

10. Herold KC, Gitelman SE, Willi SM, Gottlieb PA, Waldron-Lynch F, Devine L, Sherr J, Rosenthal SM, Adi S, Jalaludin MY, Michels AW, Dziura J, Bluestone JA. Teplizumab treatment may improve C-peptide responses in participants with type 1 diabetes after the new-onset period: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2013. 56(2):391-400.
11. Baumgart DC, Targan SR, Dignass AU, Mayer L, van Assche G, Hommes DW, Hanauer SB, Mahadevan U, Reinisch W, Plevy SE, Salzberg BA, Buchman AL, Mechkov GM, Krastev ZA, Lowder JN, Frankel MB, Sandborn WJ. Prospective randomized open-label multicenter phase I/II dose escalation trial of visilizumab (HuM291) in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010. 16(4):620-629.
12. van der Woude CJ, Stokkers P, van Bodegraven AA, Van AG, Hebzda Z, Paradowski L, et al. Phase I, double-blind, randomized, placebocontrolled, dose-escalation study of NI-0401 (a fully human anti-CD3 monoclonal antibody) in patients with moderate to severe active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2010. 16(10):1708–1716.
13. Silva HM, Vieira PM, Costa PL, Pimentel BM, Moro AM, Kalil J, Maranhão AQ, Coelho V, Brigido MM. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Lett*. 2009. 125(2):129-136.
14. Malcolm SL, Smith EL, Bourne T, Shaw A. A humanised mouse model of cytokine release: Comparison of CD3-specific antibody fragments. *Journal of Immunological Methods*. 2012. 384:33–42.

15. Martin A, Tisch RM, Getts DR. Manipulating T cell-mediated pathology: Targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clinical Immunology*. 2013. 148:136–147.
16. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010. 10:490–500.
17. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and tgf-beta-induced foxp3(+)cd4(+) cd25(+) regulatory t cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol*. 2008. 29:429-435.
18. Shevach EM. Cd4⁺ cd25⁺ suppressor t cells: More questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2:389-400.
19. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory t cells and immune tolerance. *Cell*. 2008. 133:775-787.
20. Lan Q, Fan H, Quesniaux V, Ryffel B, Liu Z, Zheng SG. Induced foxp3(+) regulatory t cells: A potential new weapon to treat autoimmune and inflammatory diseases? *J Mol Cell Biol*. 2012. 4:22-28.
21. Zhou X, Kong N, Zou H, Brand D, Li X, Liu Z, Zheng SG. Therapeutic potential of tgf- β -induced cd4(+) foxp3(+) regulatory t cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2011. 44: 43-50.
22. Walter GJ, Evans HG, Menon B, Gullick NJ, Kirkham BW, Cope AP, Geissmann F, Taams LS. Interaction With Activated Monocytes Enhances Cytokine Expression and

Suppressive Activity of Human CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low} Regulatory T Cells. *Arthritis & Rheumatism*. 2013. 65(3):627–638.

23. Probst-Kepper M, Geffers R, Kroger A, Viegas N, Erck C, Hecht HJ, Lünsdorf H, Roubin R, Moharregg-Khiabani D, Wagner K, Ocklenburg F, Jeron A, Garritsen H, Arstila TP, Kekäläinen E, Balling R, Hauser H, Buer J, Weiss S. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med*. 2009. 13:3343–3357.

24. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8 T cell population and induces CD8CD25 Tregs. *J Clin Invest*. 2005. 115:2904–2913.

25. Penaranda C, Tang Q, Bluestone JA. Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J Immunol*. 2011. 187(4): 2015–2022.

26. Hotta A, Kamihira M, Itoh K, Morshed M, Kawabe Y, Ono K, Matsumoto H, Nishijima K, Iijima S. Production of anti-CD2 chimeric antibody by recombinant animal cells. *J Biosci Bioeng*. 2004. 98(4):298-303.

27. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

28. Costa PLN, Fonseca AS, Souza DP, Caldas CA, Coelho V, Moro AM, et al. Humanization and binding activity of humanized/murine hybrid anti-CD3 scFvs. *Mol Cell Proteomics*. 2003. 2:760.
29. Andrade EV, Albuquerque FC, Moraes LM, Brigido MM, Santos-Silva MA. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *J Biochem*. 2000. 128(6):891-895.
30. Carpenter PA, Pavlovic S, Tso JY, Press OW, Gooley T, Yu XZ, Anasetti C. Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. *J Immunol*. 2000. 165(11):6205-6213.
31. Lv M, Qiao C, Lin Z, Yu M, Hou M, Sun Y, Li Y, Feng J, Shen B. The novel non-mitogenic anti-CD3 antibody, mini- γ CD3, delivers a partial TCR signal. *International Immunopharmacology*. 2010. 200–206.
32. Weinshenker BG, Bass B, Karlik S, Ebers GC, Rice GP. An open trial of OKT3 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1991. 41(7):1047–1052.
33. Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2002. 346(22):1692–1698.
34. Sprangers B, Van der Schueren B, Gillard P, Mathieu C. Otelixizumab in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Immunotherapy*. 2011. 3(11):1303–1316.

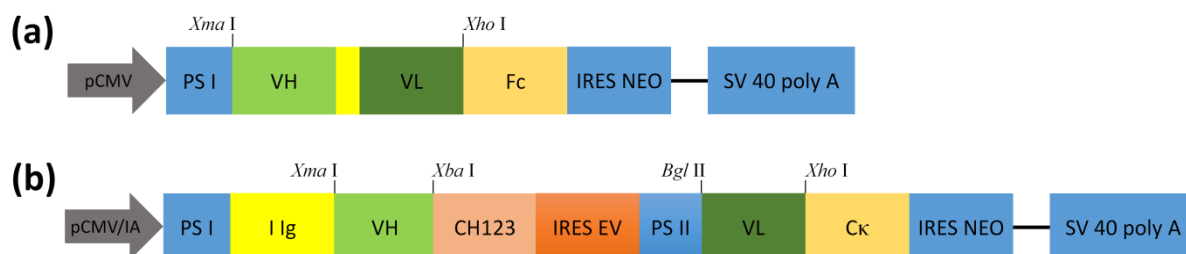
35. Plevy S, Salzberg B, Van AG, Regueiro M, Hommes D, Sandborn W, et al. A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2007. 133(5):1414–1422.
36. Nickerson-Nutter C, Tchistiakova L, Seth NP, Kasaian M, Sibley B, Olland S, Zollner R, Brady WA, Mohler KM, Baum P, Wahl A, Herber D, Vugmeyster Y, Wensel D, Wolfman NM, Gill D, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. Distinct in vitro binding properties of the anti-CD20 small modular immunopharmaceutical 2LM20-4 result in profound and sustained in vivo potency in cynomolgus monkeys. *Rheumatology*. 2011. 50:1033-1044.
37. [Chatenoud L](#), [Ferran C](#), [Legendre C](#), [Thouard I](#), [Merite S](#), [Reuter A](#), [Gevaert Y](#), [Kreis H](#), [Franchimont P](#), [Bach JF](#). In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation*. 1990. 49(4):697-702.
38. Glandt M, Hagopian W, Herold KC. Treatment of type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody. *Rev Endocr Metab Disord*. 2003. 4:361–368.
39. Wang R, Zhang L, Zhang X, Moreno J, Luo X, Tondravi M, Shi Y. Differential Regulation of the Expression of CD95 Ligand, Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL), TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), and TNF- α During T Cell Activation. *J Immunol*. 2001. 166:1983-1990.

40. Huo J, Xu S, Lam K. Fas Apoptosis Inhibitory Molecule Regulates T Cell Receptor-mediated Apoptosis of Thymocytes by Modulating Akt Activation and Nur77 Expression. *J. Biol. Chem.* 2010. 285:11827-11835.
41. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2009. 182:1469-1480.
42. Tang Q, Smith JA, Szot GL, Zhou P, Alegre ML, Henriksen KJ, Thompson CB, Bluestone JA. CD28/B7 Regulation of Anti-CD3-Mediated Immunosuppression In Vivo. *J Immunol.* 2003. 170:1510-1516.
43. Ablamunits V, Bisikirska BC, Herold KC. Human regulatory CD8 T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. 1150:234–238.
44. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Megret J, Bach JF, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med.* 2003. 9:1202–1208.
45. Ablamunits V, Bisikirska B, and Herold KC. Acquisition of regulatory function by human CD8⁺ T cells treated with anti-CD3 antibody requires TNF. *Eur J Immunol.* 2010. 40(10): 2891–2901.
46. Lim HW, Broxmeyer HE, Kim CH. Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2006. 177:840–851.

47. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, Curbishley SM, Withers DR, Reynolds GM, Shetty S, Harki J, Shaw JC, Eksteen B, Hubscher SG, Walker LS, Adams DH. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol*. 2010. 184:2886–2898.
48. Ukena SN, Velaga S, Geffers R, Grosse J, Baron U, Buchholz S, Stadler M, Bruder D, Ganser A, Franzke A. Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2011. 118:e82–92.
49. Battaglia M, Roncarolo MG. The Tregs' world according to GARP. *Eur. J. Immunol*. 2009. 39: 3296–3300
50. Tran DQ, Shevach EM. Therapeutic potential of FOXP3(+) regulatory T cells and their interactions with dendritic cells. *Hum. Immunol*. 2009. 70: 294–299.
51. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- β on the surface of activated human Treg. *Eur. J. Immunol*. 2009. 39: 3315–3322.
52. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *PNAS*. 2009. 106(32):13439–13444.
53. Shevach EM, Tran DQ, Davidson TS, Andersson J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2008. 38:915–917.

54. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. PLoS ONE. 2008. 3:e2705.

55. Woodle ES, Bluestone JA, Zivin RA, Jolliffe LK, Auger J, Xu D, Thistlethwaite JR. Humanized, nonmitogenic OKT3 antibody, huOKT3 gamma(Ala-Ala): initial clinical experience. Transplant Proc. 1998. 30:1369-1370.



Supplementary Figure 1. Schematic representation of pMIREs and pMACIA-HIL expression cassettes. (a) pMIREs expression cassette: contains a CMV promoter, an Ig leader sequence, an EMCV-IRES-NEO and an SV40 polyadenylation sequence. Fc is composed of a hinge and the CH2 and CH3 domains of the human IgG1; (B) pMACIA HIL expression cassette: contains a CMV/Intron A promoter, two Ig leader sequences, a synthetic EMCV-IRES element between the heavy and light chains, an EMCV-IRES-NEO and an SV40 polyadenylation sequence. CH123 is composed of the whole constant domain of human IgG1. Restriction enzyme sites show where the variable heavy and light chains were cloned.

Supplementary Table 1

FITC median fluorescence intensities of anti-human CD3 direct binding to human PBMCs.

Anti-human CD3	FITC median fluorescence intensity	
	T CD4 cells	T CD8 cells
HIL T	25.9	189
HIL R	24.8	80.6
HIL M	26.7	82.6

Human PBMCs were incubated with 62.5 ng recombinant antibodies, washed, and incubated with FITC-conjugated anti-human. They were then washed and incubated with PE-conjugated anti-human CD4 or APC-conjugated anti-human CD8 and analyzed by flow cytometry. The FITC median fluorescence intensities of the gated cells are shown.