



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

***DESENVOLVIMENTO DE NOVOS  
ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS  
ANTI-CD3***

**Nestor Fabian Leyton Castro**

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

Brasília – DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

LL685d Leyton-Castro, Nestor F.  
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS  
ANTI-CD3 / Nestor F. Leyton-Castro; orientador Andrea Q.  
Maranhão; co-orientador Marcelo M. Brígido. -- Brasília, 2019.  
109 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --  
Universidade de Brasília, 2019.

1. Phage display. 2. Anti-CD3. 3. Imunosupressor. 4. OKT  
3. 5. Anticorpos monoclonais. I. Maranhão, Andrea Q.,  
orient. II. Brígido, Marcelo M., co-orient. III. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

***DESENVOLVIMENTO DE NOVOS  
ANTICORPOS MONOCLONAIS HUMANOS  
ANTI-CD3***

**Nestor Fabian Leyton Castro**

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília – DF

2019

**Banca Examinadora:**

**Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão (UnB – Orientadora)**

**Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido (UnB – Co-orientador)**

**Profa. Dra. Maria Cristina Mattar da Silva  
(EMBRAPA/Cenargem – Membro Externo)**

**Profa. Dra. Janice Lisboa De Marco (UnB – Membro Externo)**

**Prof. Dr. Marcus de Melo Teixeira (UnB – Membro Interno)**

**Dra. Isabel Garcia Sousa (UnB – Suplente)**

Trabalho desenvolvido no  
Laboratório de Imunologia Molecular da  
Universidade de Brasília, sob a orientação da  
Profa. Dra. Andrea Queiroz Maranhão.

Dedico este trabalho à minha família, por sempre me darem forças para lutar e por sempre acreditarem nos meus sonhos, e especialmente à minha mãe, por ser um exemplo de coragem e determinação. Amo vocês.

“Que grande livro poderia escrever-se com o que é conhecido. ¡Outro muito maior escrever-se-ia com o desconhecido!”

Júlio Verne.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Dora E. Castro e Carlos A. Leyton por seu amor incondicional, pelo apoio constante, por estarem presentes nos momentos bons e ruins, por me darem força para perseguir meus sonhos e por me ajudarem a alcançá-los, especialmente a minha mãe, por ter me mostrado o valor e a coragem para afrontar a vida.

Ao meu irmão David J. Leyton, por seu amor e compreensão, por me impulsionar a ser melhor cada dia, pelos risos e conversas, pela força nas horas difíceis e pela amizade eterna.

A toda a minha grande família, meus tios e primos, por todos os anos de apoio e preocupação e pela sua ajuda entregue incondicionalmente.

À professora Ph.D. Andrea Queiroz Maranhão, por me receber no seu grupo de pesquisa e me permitir aprender tantas coisas novas; pela amizade, paciência e compreensão, pelos ensinamentos e conselhos, por seus aportes no desenvolvimento desta pesquisa. Muito obrigado.

Ao professor Ph.D. Marcelo de Macedo Brígido, por me acolher no grupo de pesquisa, pela amizade e pelos ensinamentos e aportes no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu amigo Juan F. Riasco pela sua amizade sincera ao longo de todos esses anos, pelos risos e conversas, pela força nos momentos ruins e por compartilhar os bons, por ser mais que um amigo, um irmão que a vida me deu.

Aos meus amigos queridos, Miguel Guevara, Karen Robles, Johan Caicedo, por sua amizade sincera nesses anos, pelos conselhos e pelo carinho, pelos risos e cuidados, por me apoiar nessa grande aventura.

A Natalia Gil Jaramillo, por sua amizade e carinho nesses anos, pelas conversas sobre ciência, música e tantas outras coisas.

Ao grupo de pesquisa em Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, por me permitir trabalhar em seu laboratório, e aos meus companheiros e amigos, Rafael Burtet, Ronny Araujo, Isabel Garcia, Manuela Maragno, Fernanda Borges, Ana Paula Costa, Maria José Chiabai, Jacylene Medeiros, Renato Kaylan, Mariana Azevedo, Camila Sugiura, pelas conversas sobre ciência e pelos seus aportes no desenvolvimento desta pesquisa, por sua amizade, compreensão e carinho.

À Graziela Mendes Medeiros e à sua família, Mary Mendes, Antônio Medeiros, Rafaella Mendes, por seu carinho e apoio na consecução desta meta, por terem sido minha família adotiva em Brasília.

Aos amigos que a vida me deu durante esses anos, Noemia Morais, Marina Kohl, Verenice Paredes, Osmel Fleitas, Fabian Hurtado, William Cuellar, Laura Rojas, Sarah Tomé, Alaiane Vieira, pela amizade, ajuda e carinho quando precisava.

À Universidade de Brasília por ter me acolhido durante este tempo e por me permitir avançar na minha carreira de cientista.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa.

Também agradeço a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na consecução e realização deste grande sonho.



## SUMÁRIO

Lista de Figuras .....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Anticorpos.....	1
1.2 Anticorpos monoclonais .....	7
1.3 Receptor TCR-CD3 .....	11
1.4 Cristalização do mAB murino OKT3 ligado ao fragmento scFv CD3 $\epsilon\gamma$ ..	14
1.5 Humanização do anticorpo anti-CD3 .....	15
1.6 Phage Display .....	23
1.7 Uso do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) junto ao Phage Display .....	26
1.8 Expressão de peptídeos em células bacterianas.....	27
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral: .....	32
3. MÉTODOS.....	33
3.1 Extração de DNA plasmidial em pequena e média escala. ....	33
3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição.....	33
3.3 Análise de DNA em gel de agarose (segundo DE-SOUZA, 2016).....	33
3.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose .....	33
3.5 Ligação de fragmentos de DNA .....	34
3.6 Preparação de células competentes e transformação bacteriana. ....	34
3.6.1 Por choque térmico-CaCl <sub>2</sub> (adaptado de MARANHÃO, 2016).....	34
3.6.2 Por eletroporação (adaptado de MARANHÃO, 2016).....	35
3.7 Amplificação das sequências variáveis leves humanas (VLs) por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36

3.8 Seleção da biblioteca .....	37
3.8.1 Preparação do Fago Auxiliar VCSM13. (Adaptado de BARBAS III et al., 2001).....	37
3.8.2 Amplificação de Placas de Lise .....	37
3.8.3 Determinação do Título da Preparação de Fagos Auxiliares.....	38
3.8.4 Ligação da Biblioteca de sequências codificadoras de cadeias variáveis (VLs).....	38
3.8.5 Sequenciamento de colônias transformadas com o vetor pGEM®-T Easy.....	39
3.8.6 Digestão e ligação do inserto sintético contendo a sequência scFvRVL-gen 3 no fagomídeo pCIg316.....	39
3.8.7 Ligação da Biblioteca de VLs no vetor pCIg316-scFvRVL-gen 3 e transformação por eletroporação.....	40
3.8.8 Amplificação da biblioteca inicial de fagos recombinantes .....	41
3.8.9 Seleção da biblioteca de VLs ligantes ao antígeno CD3 sintético por Phage display.....	42
3.8.10 Titulação dos fagos de entrada (input) e de saída (output) .....	44
3.9 Sequenciamento de alto desempenho (NGS – Next generation sequencing) .....	45
3.10 Análise do sequenciamento e seleção das melhores VLs.....	45
3.11 Expressão das proteínas recombinantes .....	45
3.12 Purificação das proteínas recombinantes.....	48
3.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	49
3.14 Imunodeteção das proteínas (Western Blot).....	49
3.15 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	50
4. RESULTADOS .....	52
4.1 Amplificação dos Segmentos Gênicos Codificadores de Domínios Variáveis Leves Humanas (hVLs) .....	52
4.2 Construção do Fagomídeo pCIg316-scFvRVL-gen3 .....	55

4.3	Seleção da biblioteca de sequências hVL por Phage Display .....	59
4.4	Preparação de DNA para sequenciamento de alto desempenho (NGS) .....	60
4.6	Produção e purificação dos fragmentos scFv .....	62
4.7	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	68
5	DISCUSSÃO.....	70
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	76
7	BIBLIOGRAFIA.....	78

## Lista de Figuras.

Figura 1: Estrutura Básica de um anticorpo. ....	2
Figura 2: Representação esquemática do rearranjo gênico que resulta na formação de genes de cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas.....	5
Figura 3: Estrutura das regiões variáveis VH e VL.....	6
Figura 4: Representação esquemática de diferentes fragmentos de anticorpos.....	9
Figura 5: Sinalização intracelular mediada pelo complexo TCR-CD3. ....	12
Figura 6: Modelos propostos de sinalização precoce de células T após a ligação do CD3 ao TCR $\alpha\beta$ .....	15
Figura 7: Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.....	16
Figura 8: Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos.....	18
Figura 9: Análise da ligação direta dos anticorpos anti-CD3 à superfície celular dos linfócitos humanos por citometria de fluxo. ....	19
Figura 10: Expressão de Foxp3 em PBMCs em resposta ao estímulo com OKT3 ou com os FvFcs humanizados versões R e T. ....	20
Figura 11: Análise quantitativa das alterações na expressão do miRNA nas células T CD3 + após estimulação com anticorpo anti-CD3 humano. ....	21
Figura 12: Efeitos da estimulação com anti-CD3 na expressão de genes envolvidos na diferenciação de células T CD4+. ....	22
Figura 13: Bacteriófago M13, usado para Phage display. ....	23
Figura 14: Representação esquemática de um ciclo típico de Phage Display.....	25
Figura 15: Expressão convencional de anticorpos em <i>E. coli</i> . ....	29
Figura 16: Representação esquemática dos plasmídeos utilizados para obter o vetor e o inserto, para criar o vetor de expressão pCIg316-scFvRVL-gen 3.....	40

Figura 17: Vetor otimizado para produção de proteína em bactérias.....	46
Figura 18: Amplificação de fragmentos VL por PCR.....	52
Figura 19: Alinhamento da sequência de proteína de um clone.....	53
Figura 20: Análise de matriz de identidade de 20 clones aleatórios. ....	54
Figura 21: Estratégia de obtenção do vetor pCIg316-scFvRVL-gen3. ....	56
Figura 22: Confirmação da obtenção do fagomídio pCIg316-scFvRVL-gen3.....	57
Figura 23: Análise eletroforética da eluição do vetor pCIg316-scFvRVL-gen3 e do pGEM®-T Easy. A).....	59
Figura 24: Análise da extração do DNA dos fagomídios e amplificação das VLs em gel de poli-acrilamida 0,8%. A).....	61
Figura 25: Alinhamento das sequências de proteínas das cadeias leves (VLs) humanas selecionadas por Phage Display.....	62
Figura 26: Análise da produção da proteína recombinante RH1, nas linhagens BL21(DE3) e <i>SHuffle</i> , por SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> .....	63
Figura 27: Imunodeteção das proteínas recombinantes produzidas em BL21(DE3) e <i>SHuffle</i> , crescidas a 30 °C e induzidas com diferentes concentrações de IPTG.....	64
Figura 28: Imunodeteção das proteínas recombinantes produzidas em BL21(DE3) e <i>SHuffle</i> , crescidas a 20 °C e induzidas com diferentes concentrações de IPTG.....	65
Figura 29: Análise da purificação da proteína RH1 por SDS-PAGE.....	66
Figura 30: Imunodeteção da proteína RH1 produzida em células <i>SHuffle</i> e purificada.....	67
Figura 31: Imunodeteção da purificação das 4 proteínas recombinantes..	67
Figura 32: Análise da ligação direta dos anticorpos scFv ao antígeno CD3εγ.....	69

## Lista de Tabelas.

Tabela 1: Ligação da Biblioteca de sequências codificadoras de cadeias variáveis (VLs) no vetor pGEM®-T Easy.....	38
Tabela 2: Título dos fagos obtidos durante a seleção por Phage display. ....	60
Tabela 3: Concentração das proteínas calculada com o coeficiente de extinção molar. ....	68

## Lista de abreviaturas

AmpR	Gene de resistência à ampicilina ( $\beta$ -lactamase)
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-Bromo-4Cloro-indolil fosfato
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
CD	Marcador de superfície celular (Cluster of differentiation)
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
C $\kappa$	Porção constante kappa da cadeia leve
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
dH <sub>2</sub> 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	Fluorescence Activated Cell Sorter
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
FDA	Food and Drug Administration (EUA)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL	Fluorescência
FR	Arcabouço (Framework)
Fv	Fragmento variável de anticorpo
g	Gramas
g	Força gravitacional
h	Hora
Ig	Imunoglobulina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -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
min	Minuto
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	Nitro Blue Tetrazole
ng	Nanograma
OD	Densidade óptica
OKT3	Anticorpo monoclonal anti CD3 clone OKT3
Ori	Origem de replicação
pb	Par de base
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
rpm	Rotações por minuto
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 complexo CD3 está envolvido na ativação de células T durante a resposta imune, o que o torna um alvo importante para terapia imunossupressora. O anticorpo monoclonal (mAb) murino anti-CD3, OKT3, foi o primeiro mAb aprovado para uso clínico na terapia de rejeição de transplantes. Esse anticorpo foi descontinuado no início do século devido às suas características heterólogas que comprometiam a sua eficácia, já que promovia uma liberação de citocinas e ainda pelo fato de estimular o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, numa resposta conhecida como HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*). Portanto, o desenvolvimento de novos mAbs anti-CD3 humano, com imunogenicidade e toxicidade reduzidas é importante para utilização em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes. O grupo de Imunologia Molecular da UnB realizou a humanização do anticorpo OKT3. Os domínios humanizados apresentaram capacidade de reconhecimento do antígeno CD3 e foram capazes de induzirem um perfil imunorregulatório em linfócitos T tratados, apesar de mostrarem uma aparente perda de afinidade, quando comparado ao anticorpo parental. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo a obtenção de novos domínios VL humanos capazes de, em conjunto com o VH humanizado, reconhecerem o antígeno hCD3. As sequências de VLs (domínios variáveis da cadeia leve) foram amplificadas por PCR a partir de uma biblioteca de genes de anticorpos humanos. Os VLs foram clonados no fagomídeo pCIg 316, vetor que permite a fusão dos scFvs à proteína III do fago M13, e sua posterior apresentação na superfície de fagos filamentosos (*Phage Display*). Os fagomídeos contendo um domínio de VH previamente humanizado e a biblioteca de VL no formato de scFvs, foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli*, linhagem XL1-Blue. Na transformação obteve-se um total de  $1 \times 10^7$  clones, foram escolhidos 20 clones aleatórios e a sua variabilidade foi confirmada por sequenciamento e alinhamento. As células transformadas foram utilizadas para a produção de fagos de fusão. Fagos apresentando os diferentes scFvs foram produzidos de acordo com protocolos já estabelecidos. Cinco ciclos de seleção foram realizados, utilizando-se como ligante um peptídeo sintético que contém os domínios extracelulares  $\gamma\epsilon$  da molécula do CD3 (CD3 $\gamma\epsilon$ ) humano associados por um peptídeo conector. Os ciclos foram realizados aumentando-se sucessivamente as lavagens para eliminação dos fagos não ligados. Após a seleção, foi obtido um enriquecimento na ordem de 315 vezes. Os domínios de VLs selecionados foram amplificados por PCR e sequenciados por *Next*

*Generation Sequencing* (NGS). Após a análise por bioinformática, utilizando um *pipeline* desenvolvido pelo grupo, duas sequencias foram escolhidas para melhor caracterização. Assim, dois scFvs contendo o VH humanizado e os dois domínios de VL humanos selecionados foram construídos e clonados no vetor de expressão pET28a. Células de *E. coli*, da linhagem *SHuffle* foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram obtidas a partir da fração solúvel de extratos citoplasmáticos de células induzidas. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). A capacidade de reconhecimento ao antígeno CD3 $\gamma\epsilon$  humano foi confirmada por ELISA de ligação direta. Os resultados mostraram que as proteínas selecionadas durante o *Phage display* ligavam ao antígeno numa proporção maior que o controle murino (VH-VL do OKT3). Como perspectiva deste trabalho esses novos anticorpos anti-CD3 devem ser melhor caracterizados em ensaios de competição com o OKT3 e também quanto à indução de reposta imunorregulatória.

## ABSTRACT

The CD3 complex is involved in T cell activation during the immune response, which makes it an important target for immunosuppressive therapy. The murine anti-CD3 monoclonal antibody (mAb), OKT3, was the first mAb approved for clinical use in transplant rejection therapy. This antibody was discontinued at the beginning of the century, because of its heterologous characteristics that compromised its effectiveness as it promoted cytokine release and stimulated the development of neutralizing antibodies in a response known as HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies). Therefore, the development of novel anti-human CD3 mAbs with reduced immunogenicity and toxicity is important for use in organ transplants and the treatment of autoimmune diseases. The UnB Molecular Immunology group carry out the humanization of the OKT3 antibody. The humanized domains showed CD3 antigen recognition capability and were able to induce an immunoregulatory profile in treated T lymphocytes, despite showing an apparent loss of affinity when compared to the parental antibody. Thus, this study aimed to obtain new human VL domains capable, together with humanized VH, to recognize the hCD3 antigen. VL sequences (light chain variable domain) were amplified by PCR from a human antibody gene library. The VLs were cloned into pCIg 316 phagemid, a vector that allows fusion of scFvs to phage M13 protein III, and their subsequent display on the surface of filamentous phages (Phage Display). Phagemids containing a previously humanized VH domain and the VL library in a scFv-shaped were used to transform *Escherichia coli* XL1-Blue electrocompetent cells. In the transformation a total of  $1 \times 10^7$  clones were obtained, 20 random clones were picked and their variability was confirmed by sequencing and alignment. Transformed cells were used for fusion phage production. Phages displaying the different scFvs were produced according to established protocols. Five rounds of selection were performed using a synthetic peptide containing the  $\gamma\epsilon$  extracellular domains of the human CD3 molecule (CD3 $\gamma\epsilon$ ) associated with a connector peptide. The cycles were performed by successively increasing the washes to remove unbound phage. After selection, an enrichment of 315 fold was obtained. The selected VL domains were PCR amplified and sequenced by Next Generation Sequencing (NGS). After bioinformatics analysis, using a pipeline developed by the group, two sequences were chosen for better characterization. Thus, two scFvs containing the humanized VH and the two selected human VL domains were constructed and cloned into the pET28a

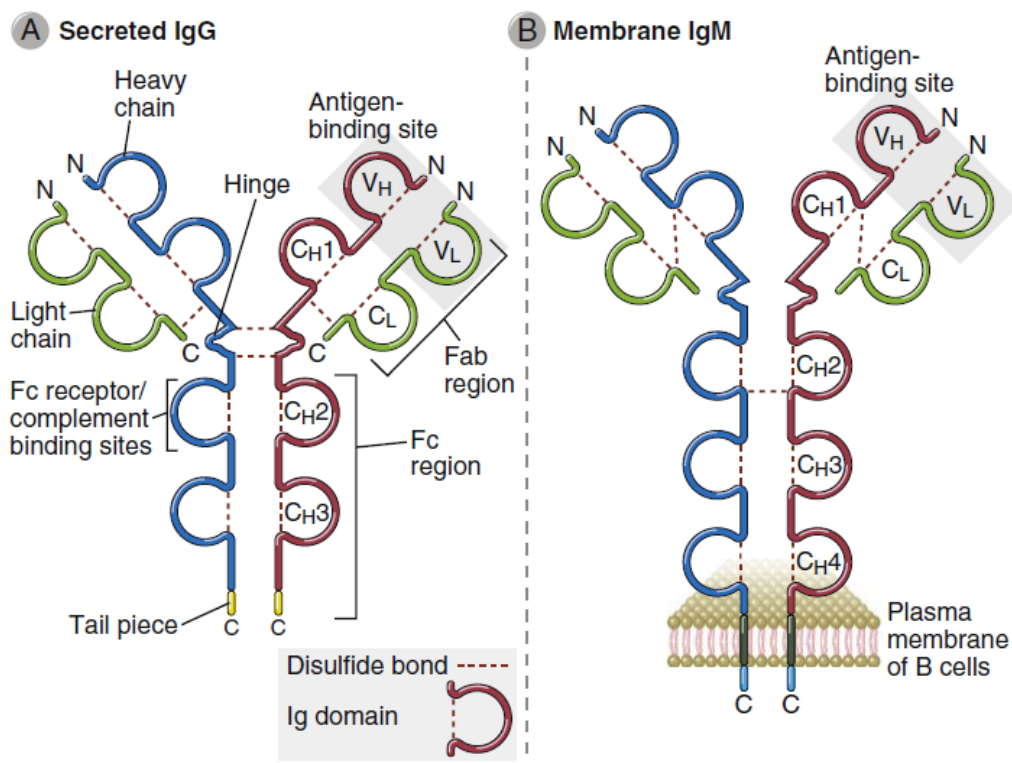
expression vector. *E. coli* cells of *SHuffle* strain were used for expression of recombinant proteins. Recombinant proteins were obtained from the soluble fraction of cytoplasmic extracts of induced cells. Purification was by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). The ability to recognize human CD3 $\gamma\epsilon$  antigen was confirmed by direct binding ELISA. The results showed that the proteins selected during the Phage display bound the antigen to a greater extent than the murine control (OKT3 VH-VL). As a perspective of this study, these new anti-CD3 antibodies should be better characterized in competition tests with OKT3 and also in the induction of immunoregulatory response.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Anticorpos

Os anticorpos (Ac) também chamados de Imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas, produzidas em vertebrados em resposta à exposição a moléculas endógenas ou exógenas, conhecidas como antígenos. Os anticorpos são incrivelmente diversos e específicos na sua capacidade de reconhecer essas estruturas moleculares, e são os principais mediadores da imunidade humoral contra todas as classes de micróbios (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Os anticorpos são sintetizados apenas por células da linhagem de linfócitos B, sua função principal é reconhecer substâncias e agentes patogênicos, para finalmente serem eliminados, ajudando a manter a homeostase dos organismos (JANEWAY et al., 2001; MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001; ACTOR, 2012).

Todas as moléculas de anticorpos compartilham as mesmas características estruturais básicas, mas apresentam uma variabilidade notável nas regiões que ligam nos antígenos (ACTOR, 2012). O anticorpo é uma estrutura polipeptídica tetramérica, sua estrutura básica consiste em duas cadeias pesadas (H: *Heavy*) e duas cadeias leves (L: *Light*) idênticas; onde a cadeia L pode ser uma cadeia  $\kappa$  (kappa) ou  $\lambda$  (lambda); interligadas por uma extensiva rede de interações não-covalentes, estabilizadas por pontes dissulfeto intra e inter cadeias (Figura 1) (SCHROEDER; CAVACINI, 2010; ROSENTHAL; TAN, 2011; ACTOR, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). A diferença entre os dois tipos de cadeias leves está na sequência de aminoácidos do domínio da região constante, a proporção global dos dois tipos de cadeia leve nas imunoglobulinas humanas é de aproximadamente 60%  $\kappa$  e 40%  $\lambda$  (ACTOR, 2012). Os domínios das cadeias leves e pesadas são unidades com aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos, que se dobram de forma independente em um motivo globular denominado domínio Ig (JANEWAY et al., 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).



**Figura 1: Estrutura Básica de um anticorpo.** **A:** Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. Os sítios de ligação ao antígeno (*Antigen-binding site*) são formados pelos domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub>. Os sítios de ligação ao receptor Fc e ao complemento dentro da cadeia pesada encontram-se no domínio CH<sub>2</sub>. **B:** Diagrama esquemático de uma molécula de IgM ligada à membrana na superfície de um linfócito B. A molécula de IgM possui mais um domínio CH do que a IgG, e também possui porções transmembranais e citoplasmáticas no C-terminal que ancoram a molécula na membrana plasmática. Domínios Ig que formam os anticorpos, também as regiões Fab (*fragment, antigen-binding*) e Fc (*Fragment crystallizable*). (Descrito em Abbas et al., 2015.)

Ambas as cadeias possuem na sua porção N-terminal regiões hipervariáveis denominadas domínios V<sub>H</sub> (variável pesada) e V<sub>L</sub> (variável leve); as quais participam no reconhecimento do antígeno, e de regiões carboxi terminais constantes (C); as regiões C das cadeias pesadas mediam as funções efetoras (ACTOR, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Nas cadeias pesadas, a região variável (VH) é composta de um domínio Ig (Imunoglobulina), e a região constante (C) é composta de três ou quatro domínios Ig dependendo da classe da Imunoglobulina, chamados de CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e CH<sub>4</sub>, enquanto que cada cadeia leve é composta por um domínio Ig de região V (V<sub>L</sub>) e um domínio Ig de região C (C<sub>L</sub>) (Figura 1) (JANEWAY et al., 2001).

A região do Fragmento Cristalizável (Fc) determina o mecanismo usado para destruir ou eliminar o antígeno, interage com outras moléculas efetoras e células do

sistema imunológico e, portanto, medeia a maioria das funções biológicas dos anticorpos. Os anticorpos são divididos em cinco isotipos ou classes principais, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; as cadeias pesadas são denominadas por letras maiúsculas correspondentes às letras gregas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , e  $\mu$ , respectivamente, com base na estrutura da região constante e sua função imune, e diferem nas suas propriedades biológicas, locais funcionais e capacidade de reconhecer os diferentes tipos de antígenos.

Os anticorpos encontram-se em duas formas: uma forma secretada, solúvel no sangue e outros fluidos corporais (Figura 1A), e de forma ligada à membrana celular e ancorada na superfície dos linfócitos B (Figura 1B). Os anticorpos solúveis são secretados por um linfócito B ativado (na forma de plasmócito) para se ligarem ao antígeno e, se for o caso, sinalizar para a resposta efetora do sistema imune. Além disso podem exibir a capacidade de neutralização; formando um complexo antígeno-anticorpo. A forma ligada à membrana de um anticorpo pode ser chamada de imunoglobulina de superfície (sIg) ou imunoglobulina de membrana (mIg), constituindo-se no receptor de células B (BCR), que permite que a célula B detecte quando um antígeno específico está presente no corpo e desencadeia a ativação de células B. Associados ao BCR existem proteínas, denominadas Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$  que são capazes de fazer uma transdução de sinal quando ocorre o reconhecimento do antígeno. Sabe-se que uma célula B primária conta com mais de 120.000 complexos de BCR na sua superfície com sítios de ligação ao antígeno idênticos. Se pensar no tamanho pequeno das células, 6-7  $\mu\text{m}$  de diâmetro, isso significa que a superfície da célula B encontra-se densamente coberta com esses receptores, e em algumas ocasiões formam *clusters* de receptores, o que pode melhorar a eficiência da resposta imune (ACTOR, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; KUOKKANEN; ŠUŠTAR; MATTILA, 2015; RETH et al., 2015).

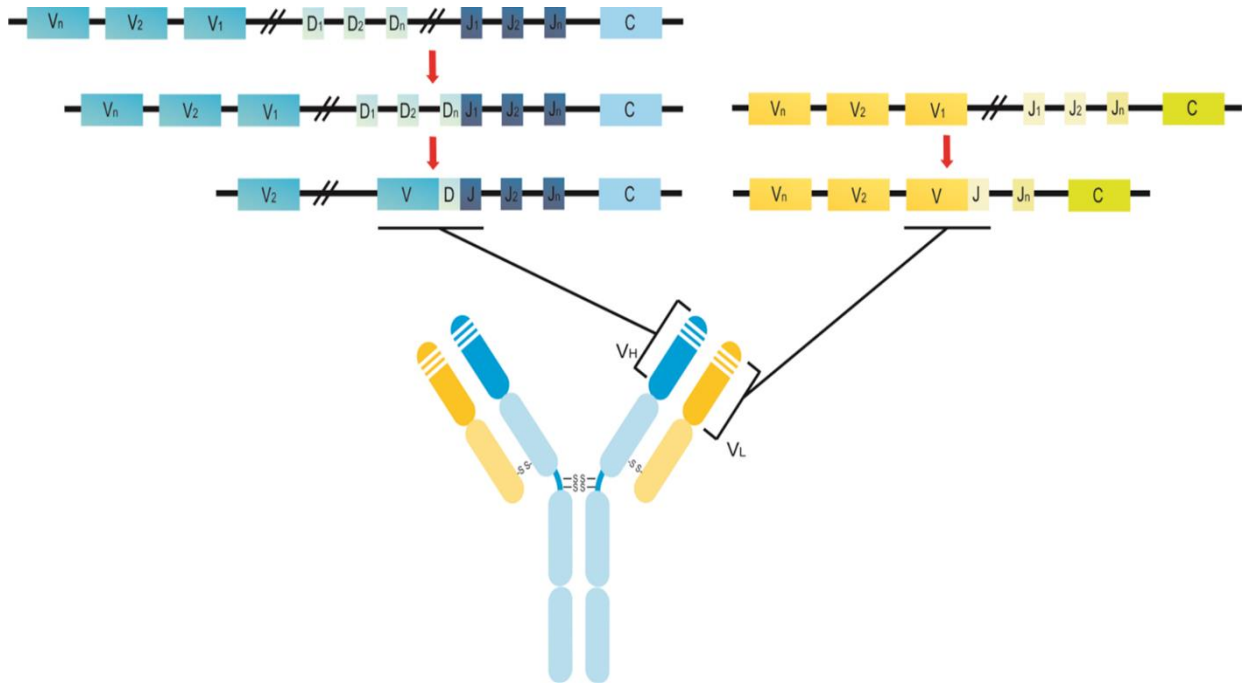
Os genes para anticorpos e receptores de células T dos vertebrados têm uma estrutura única. Eles aparecem no genoma como segmentos gênicos lineares que requerem uma recombinação para formar sequências de codificação funcionais. Os genes se encontram divididos em segmentos chamados de variabilidade (V), de diversidade (D) e de junção (J), razão pela qual esse processo é conhecido como recombinação V(D)J. Esse processo de recombinação genética ocorre apenas no desenvolvimento de linfócitos durante os estágios iniciais da maturação das células T e B, envolve a recombinação somática e resulta em um repertório altamente diversificado de anticorpos/imunoglobulinas (Igs) e receptores de células T (TCRs) encontrados em células B e

células T, respectivamente (GELLERT, 2002; JUNG et al., 2006; MORGAN et al., 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A cadeia variável pesada (VH) é formada pela recombinação de 3 segmentos gênicos  $V_H$ ,  $D_H$  e  $J_H$ , e os exons que codificam a região constante (C) do anticorpo. Existem cerca de 100 sequências diferentes para a região  $V_H$  e codificam os primeiros 97 resíduos de aminoácidos, outras 23 sequências codificam de 3-14 aminoácidos da região  $D_H$ , e 5 sequências  $J_H$  diferentes codificam os últimos 15-17 aminoácidos da cadeia variável pesada (VH) (Figura 2) (MARKET; PAPAVALIIOU, 2003; JUNG et al., 2006; SCHATZ; SWANSON, 2011; MARANHÃO et al., 2014; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). No caso da cadeia variável leve (VL), a recombinação se dá entre os segmentos  $V_L$  e  $J_L$ . O primeiro segmento gênico,  $V_L$ ; o qual possui aproximadamente 30-35 sequências diferentes no genoma, codifica os primeiros 97 aminoácidos da região variável da cadeia leve (VL), enquanto que o segundo segmento,  $J_L$ ; do qual existem 5 sequências  $\kappa$  e 7 sequências  $\lambda$ , codificam os últimos 15-17 resíduos de aminoácidos da região variável (MARKET; PAPAVALIIOU, 2003).

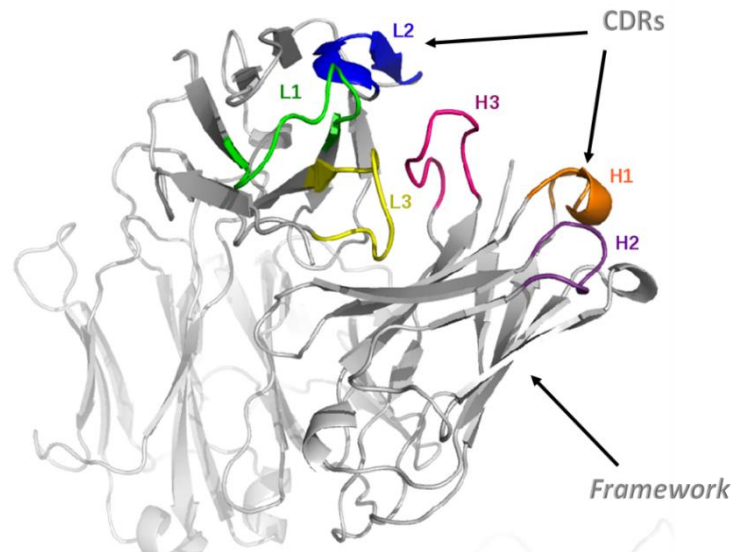
Uma das partes importantes no processo de recombinação, e que influi diretamente na variabilidade dos anticorpos é a sequência sinal de recombinação (RSS, *recombination signal sequence*), a qual está formada por 3 partes, um heptâmero, um nonâmero e uma sequência espaçadora; que pode ser de 12 ou 23 pares de bases, as quais correspondem a uma ou duas voltas da hélice do DNA, respectivamente (MARKET; PAPAVALIIOU, 2003; SCHATZ; SWANSON, 2011). Essas sequências espaçadoras são importantes para aproximar dois heptâmeros distintos e que fiquem acessíveis às enzimas que catalisam o processo de recombinação; a recombinação ocorre entre dois segmentos apenas se um dos segmentos for flanqueado por um espaçador de 12 nucleotídeos e o outro for flanqueado por um espaçador de 23 nucleotídeos; isso é chamado de regra 12/23 (MARKET; PAPAVALIIOU, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).





**Figura 2: Representação esquemática do rearranjo gênico que resulta na formação de genes de cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas.** Cada domínio variável pesado, o mais amino terminal é constituído pela junção inicial de um segmento D a um JH e em seguida ocorre a junção do segmento VH ao DJH já rearranjado. Para a formação do domínio variável leve, há um evento de recombinação unindo um segmento gênico VL a um dos cerca de seis JL disponíveis (Descrito em: Maranhão *et al.*, 2014).

A recombinação V(D)J começa quando a enzima RAG1 (*Recombination activating gene 1*) se liga a uma RSS flanqueando um segmento de gene codificante (V, D ou J) e cria um corte de cadeia simples no DNA, entre a primeira base do RSS (justo antes do heptâmero) e o segmento codificador. Esses processos criam um *loop* no DNA que faz com que os diferentes segmentos fiquem perto um do outro e depois as regiões adjacentes são retiradas do DNA. O segundo passo da reação liga as extremidades do cromossomo contendo os segmentos de rearranjo, que em última instância, codificarão para o receptor e são chamados de junções codificantes (CJs). As extremidades de sinal e codificação são então processadas e ligadas através da via de reparo do DNA de junção final não homóloga clássica (NHEJ), envolvendo pelo menos cinco proteínas diferentes. Nesse processo o alelo rearranjado perde DNA e nas junções ocorrem ainda inserções e retiradas de nucleotídeos. O processo de recombinação é o grande responsável pela variabilidade dos receptores de célula B (Figura 2) (GELLERT, 2002; BORGHESI; MILCAREK, 2006; JUNG et al., 2006; SCHATZ; SWANSON, 2011; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).



**Figura 3: Estrutura das regiões variáveis VH e VL.** Os *loops* formando as CDRs aparecem em diferentes cores e nomeados como L1, L2, L3 para o VL; e H1, H2 e H3 para o VH. As partes em cinza correspondem as regiões mais conservadas ou frameworks. (Descrito em: [http://www.blopig.com/blog/wp-content/uploads/2013/10/CDRs\\_rainbow\\_labelled.png](http://www.blopig.com/blog/wp-content/uploads/2013/10/CDRs_rainbow_labelled.png))

A alta variabilidade e especificidade alcançadas durante o processo de recombinação encontram-se representadas em três regiões hipervariáveis que se encontram nas extremidades das VHs e das VLs, essas regiões são chamadas de regiões determinantes de complementariedade, ou CDRs. Alternando-se com as regiões hipervariáveis existem sequências estruturais mais conservadas, ainda que diversas, que fazem o arcabouço dos domínios variáveis. Tais regiões são conhecidas em inglês como *frameworks*. As CDRs são nomeadas CDR1, CDR2 e CDR3, respectivamente, sendo que dessas a CDR3 é a que possui a maior variabilidade e é classificada como a mais importante na determinação da especificidade pelo antígeno; do mesmo modo, os *frameworks* (FR) são nomeados FR1, FR2, FR3 e FR4. Em uma molécula de anticorpo, os três *loops* das regiões hipervariáveis de um domínio VL e os três *loops* das regiões hipervariáveis de um domínio VH se reúnem para formar o sítio de ligação ao antígeno. A região específica que reconhece o antígeno é chamada de paratopo e a parte do antígeno que é reconhecida se chama epitopo ou determinante antigênico (Figura 3) (JANEWAY et al., 2001; SCHROEDER; CAVACINI, 2010; ACTOR, 2012; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Estudos iniciais da estrutura da imunoglobulina foram facilitados pelo uso de enzimas para fragmentar as moléculas de IgG. Se uma molécula de IgG for tratada com a enzima papaína sob condições de proteólise limitada, a enzima atua na região da dobradiça e cliva a IgG em três partes separadas, duas das partes são idênticas uma à outra e consistem na cadeia leve completa ( $V_L$  e  $C_L$ ) ligada a um fragmento  $V_H-C_{H1}$  da cadeia pesada ( $V_H$ ). Esses fragmentos mantêm a capacidade de se ligar ao antígeno porque cada um contém os domínios  $V_L$  e  $V_H$  pareados, e são chamados de Fab (fragmento de ligação ao antígeno). A terceira parte corresponde a dois peptídeos idênticos ligados por pontes dissulfeto, cada um contendo os domínios  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$  da cadeia pesada, o que corresponde à região Fc (Fragmento cristalizável). Já quando a molécula é submetida à proteólise com a enzima pepsina, a clivagem ocorre longe da dobradiça, gerando uma molécula que conserva a dobradiça e ambos os sítios de ligação ao antígeno e se denomina  $F(ab')_2$ , a parte correspondente a região Fc é degradada durante o processo (JANEWAY et al., 2001; WOOFF; BURTON, 2004; SCHROEDER; CAVACINI, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

## ***1.2 Anticorpos monoclonais***

A capacidade da resposta imune humoral dos mamíferos para gerar um repertório de anticorpos muito diversificado em resposta a um antígeno tem sido explorada para uma variedade de aplicações biotecnológicas em diagnósticos, terapia e pesquisa básica (REDDY et al., 2010). A ideia de usar anticorpos para o tratamento de doenças remonta-se ao ano de 1890, quando Behring e Kitasato descobriram a capacidade de pequenas doses de toxina da difteria ou do tétano para produzir imunidade transferível entre os animais, através do soro (mais tarde atribuído à presença de anticorpos) (FOLTZ; KAROW; WASSERMAN, 2013), em 1901 Behring recebeu o Nobel de Fisiologia ou Medicina pela sua pesquisa, mas o Kitasato não recebeu o mesmo prêmio. Quase um século depois, em 1975, Georges Köhler e Cesar Milstein publicaram seu primeiro manuscrito sobre a tecnologia de hibridoma, possibilitando a produção de anticorpos monoclonais (mAbs) em camundongos, com especificidades definidas e capacidade de neutralização (HANSEL et al., 2010), dado seu grande aporte à ciência, ambos ganharam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1984.

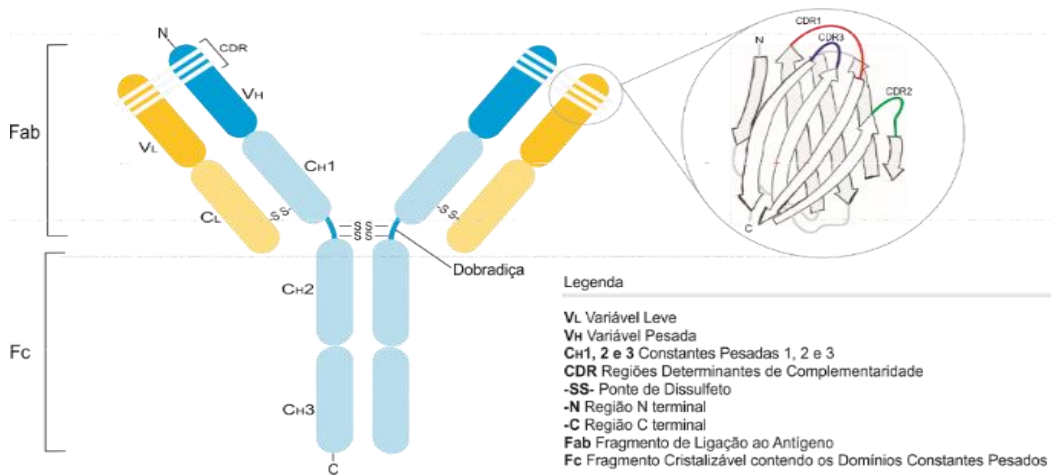
Embora esses anticorpos monoclonais de camundongo revolucionaram as ciências biomédicas, essas moléculas, àquela época, apresentavam um problema para o seu uso

terapêutico em humanos, pois tinham uma meia-vida sérica curta, e muitas vezes eram imunogênicos e com baixa função efetora (WILSON; ANDREWS, 2012). Com o desenvolvimento de novas tecnologias para a engenharia de anticorpos, as quais permitiram produzir anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados e, recentemente totalmente humanos, muitos desses problemas foram superados, levando à geração de uma série de anticorpos monoclonais que estão atualmente aprovados para uso clínico (HANSEL et al., 2010; WEINER; SURANA; WANG, 2010; WILSON; ANDREWS, 2012). Os anticorpos monoclonais (mAbs) e as proteínas relacionadas demonstraram atingir com sucesso uma ampla gama de alvos extracelulares com alta especificidade, isso levou à sua utilização numa ampla variedade de terapias de doenças, incluindo várias formas de câncer, alergias, rejeição a transplantes, esclerose múltipla e distúrbios imunológicos, como artrite reumatoide e psoríase, entre outras (RITA COSTA et al., 2010; SHUKLA; THÖMMES, 2010; MARANHÃO et al., 2014). A alta especificidade ao alvo desses mAbs pode oferecer vantagens consideráveis em relação às drogas de pequenas moléculas, aumentando a eficácia do tratamento, possivelmente por ter menos efeitos adversos do que a terapia convencional (KEIZER et al., 2010).

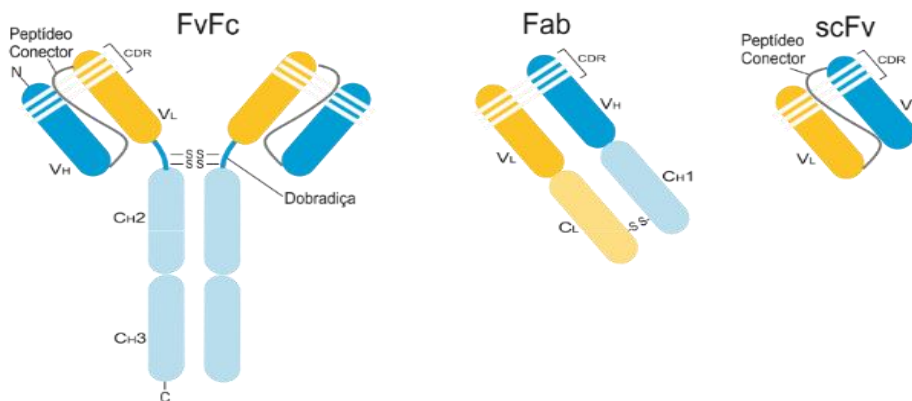
O primeiro mAb murino, Muromonabe-CD3 (Orthoclone®-OKT3), foi aprovado em 1985, para o tratamento da rejeição aguda em pacientes com transplantes de órgãos (KUNG et al., 1979; CHATENOU, 2003), muito anos depois, em 1997, foi aprovado o tratamento com o anticorpo quimérico, Rituximabe, o qual mostrou uma alta atividade no tratamento de linfomas não-Hodgkin como monoterapia e como adjuvante de quimioterapia (MCLAUGHLIN et al., 1998), além disso, demonstrou eficácia no tratamento da artrite reumatoide (EDWARDS et al., 2004). Em 1998, o Trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado, foi aprovado para tratamento do câncer de mama que é positivo para o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER)-2/neu (SLAMON et al., 2001), e em 2002, o primeiro mAb totalmente humano, Adalimumabe foi aprovado para o tratamento da artrite reumatoide (BECK et al., 2010).

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos como moléculas inteiras (150 kDa) quando se faz necessária a função efetora e, como fragmentos de anticorpos (FvFc, scFv, Fab, VH, and VL) quando não é precisa a função efetora. O tamanho menor dos fragmentos de anticorpo permite a penetração em alguns órgãos e tecidos inacessíveis aos mAbs de tamanho completo, por outro lado, os fragmentos demonstram meia-vida circulante curta em seres humanos, provavelmente devido à depuração renal (MARCOTTE; HAMMARSTRÖM, 2015).

### Anticorpo Inteiro



### Fragmentos de Anticorpo



**Figura 4: Representação esquemática de diferentes fragmentos de anticorpos.** A estrutura básica de uma IgG consiste em duas metades idênticas de cadeias proteicas, usualmente representadas na forma de um Y, ligadas por pontes dissulfeto. Cada metade é composta de uma cadeia pesada de aproximadamente 50 kDa e uma cadeia leve de aproximadamente 25 kDa também unidas por ligações dissulfetos. O caráter modular da molécula de anticorpo pode ser notado na representação esquemática da molécula inteira, onde estão ressaltados os fragmentos Fab (de ligação ao antígeno) e Fc, sendo este último glicosilado (no domínio CH2 da cadeia pesada) e responsável pela atividade efetora da molécula. Por engenharia genética é possível ainda obter os fragmentos FvFc e scFv. (Descrito em Maranhão et al., 2014).

Um fragmento variável de cadeia simples (scFv; *single chain fragment variable*) possui cerca de 28 kDa e consiste na união das regiões variáveis da cadeia pesada (VH) e da cadeia leve (VL), as quais são unidas entre si por um *linker* de peptídeos flexível, o qual consta geralmente de 15 resíduos de aminoácidos com a sequência (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. No scFv, a ordem dos domínios pode ser VH-*linker*-VL ou VL-*linker*-VH (FINLAY et al., 2017). O Fab é uma molécula maior consistindo nos domínios variável e o primeiro domínio constante da cadeia pesada (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>) e da cadeia leve (V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>) ligados por pontes

dissulfeto, formando um heterodímero. Estes fragmentos apresentam especificidades de ligação semelhantes aos dos anticorpos originais e um baixo grau de imunogenicidade e são mais facilmente manipulados do que o anticorpo parental bivalente (Figura 4) (HOLLIGER; HUDSON, 2005; MARANHÃO et al., 2014; MARCOTTE; HAMMARSTRÖM, 2015).

Os fragmentos Fab ou FvFc podem ser gerados com sucesso a partir de células de hibridoma, no entanto, para selecionar fragmentos de anticorpos com diferentes especificidades e uma alta afinidade de ligação, geralmente é preferível selecionar os fragmentos diretamente de uma biblioteca de fagos mediante a técnica de *Phage Display* (BÁBÍČKOVÁ et al., 2013). Além disso, podem ser construídas por engenharia genética anticorpos bi-específicos, tri-específicos e até tetra-específicos, onde cada um dos seus paratopos reconhece um epítipo diferente (MARCOTTE; HAMMARSTRÖM, 2015).

Desde a aprovação do OKT3 (KUNG et al., 1979), a produção de anticorpos monoclonais terapêuticos e produtos relacionados com anticorpos, tais como proteínas de fusão Fc, fragmentos de anticorpos e conjugados anticorpo-fármaco, cresceram para se tornar a classe de produto dominante dentro do mercado biofarmacêutico. Após a aprovação do primeiro anticorpo monoclonal em 1985, o crescimento das vendas e a aprovação de outros produtos foram lentos até o final da década de 1990, quando os primeiros anticorpos monoclonais quiméricos foram aprovados. Com a aprovação destes produtos, seguido pela aprovação de anticorpos monoclonais humanizados e, em seguida, totalmente humanos, a taxa de aprovações de produtos e as vendas de produtos de anticorpos monoclonais aumentaram dramaticamente, de modo que, em 2013, a receita global de vendas para todos os produtos de anticorpos monoclonais foi de quase US \$75 bilhões, representando aproximadamente metade das vendas totais de todos os produtos biofarmacêuticos (ECKER; JONES; LEVINE, 2015).

Nos últimos 5 anos o mercado dobrou o tamanho, sendo dominado principalmente por moléculas totalmente humanas, o lançamento de anticorpos bi-específicos e outros biossimilares (GRILO; MANTALARIS, 2019). Segundo relatórios fornecidos pela FDA e a Agência de Medicamentos Europeus (EMA), desde 2013, 31 novos mAbs e 10 biossimilares foram introduzidos, criando um mercado global de um total de 57 mAbs e 11 biossimilares em uso clínico até o final de 2017, gerando um mercado com valor de US\$ 98 bilhões. A previsão é que o mercado de anticorpos tenha um crescimento entre 6%-15% até 2022, gerando um mercado entre US\$ 137-200 bilhões (GRILO; MANTALARIS, 2019).

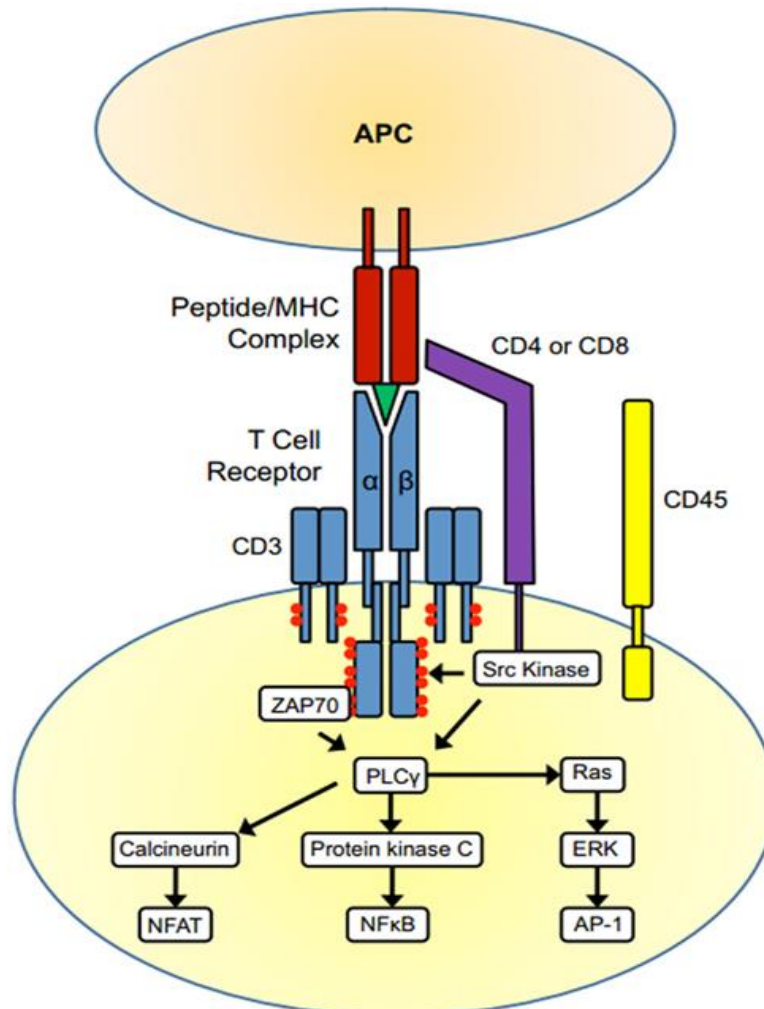
O crescimento contínuo das vendas dos produtos de anticorpos monoclonais atualmente aprovados, juntamente com os mais de 300 candidatos de produtos de anticorpos monoclonais atualmente em desenvolvimento, muitos para indicações múltiplas, resultarão em crescimento contínuo nas vendas de produtos de anticorpos monoclonais nos próximos anos e continuarão a impulsionar as vendas globais de todos os produtos biofarmacêuticos (ECKER; JONES; LEVINE, 2015; REICHERT, 2017; GRILO; MANTALARIS, 2019).

### **1.3 Receptor TCR-CD3**

Os linfócitos T estão envolvidos na regulação da resposta imune e na imunidade mediada por células. Em geral, eles regulam as principais propriedades da resposta imune adquirida, levando à especificidade do reconhecimento antigênico e discriminação entre o que é próprio e o que não. As células T maduras expressam na sua membrana o receptor de células T (TCR) associado a receptores CD3, formando o complexo TCR-CD3, também possuem coreceptores CD4 ou CD8, os quais estão associados com tirosina quinases da família Src (WHITACRE; LIN; HARDING, 2012). O complexo TCR-CD3 desempenha um papel importante na diferenciação, sobrevivência e função das células T, e a ativação do complexo inicia uma série de respostas biológicas que servem para proteger o organismo de agentes patogênicos. Além disso, o TCR é o principal iniciador para a expansão clonal de células específicas de antígenos do repertório de células T (CALL et al., 2002; KUHNS; DAVIS; GARCIA, 2006; ACTOR, 2012; BIRNBAUM et al., 2014).

O receptor de células T (TCR) é um heterodímero variável TCR $\alpha\beta$  que se liga aos antígenos. O TCR forma um complexo receptor de múltiplas subunidades junto com o complexo CD3 de transdução de sinal não variável, que contém as subunidades CD3 $\epsilon$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\zeta$  e TCR (Figura 5) (GUY; VIGNALI, 2009). Todas as subunidades do complexo CD3 contêm domínios ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) em seus domínios citoplasmáticos (VAN DER MERWE; DUSHEK, 2011). A maioria das células T expressa TCRs  $\alpha\beta$ , compostas por cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  unidas por pontes dissulfeto, que tipicamente se ligam a superfícies de peptídeos antigênicos, apresentadas por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), um pequeno subconjunto de células T expressa TCRs  $\gamma\delta$  compostos por cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  ligadas por pontes dissulfeto, estes se ligam diretamente a glicoproteínas derivadas de patógenos ou moléculas de MHC não-clássicas (KUHNS; DAVIS; GARCIA, 2006).

O TCR é responsável pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados pelo MHC, presentes na superfície de todas as células humanas. Após o reconhecimento do antígeno pelo TCR, ocorre a fosforilação dos domínios ITAMs presentes no CD3 e nas cadeias  $\zeta$  pelas quinases Lck ou Fyn. A proteína ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) liga-se aos domínios ITAM fosforilados, é fosforilado e estimula a sinalização a jusante através da fosforilação de proteínas adaptadoras, tais como o *linker* de células T ativadas (LAT), a proteína de leucócitos contendo o domínio 2 (SH2)



**Figura 5: Sinalização intracelular mediada pelo complexo TCR-CD3.** Quando o TCR se liga a um MHC que apresenta seu antígeno, os co-receptores CD4/CD8 também se ligam à molécula de MHC na superfície da APC. A de-fosforilação das Src quinases pela fosfatase CD45 leva à sua ativação, e as Src quinases fosforilam ITAMs no complexo receptor (círculos vermelhos). A fosforilação do ITAM leva então ao recrutamento e ativação da quinase Zap70 e ao subsequente recrutamento de várias outras moléculas de sinalização. A ativação da enzima fosfolipase  $\text{C}\gamma\text{-1}$ , leva à ativação das três principais vias de sinalização que acionam a ativação das células T, a via Ras-MAP quinase, a via da proteína quinase C e a via da Calcineurina. Essas vias culminam na ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, NFAT e AP-1, iniciando a transcrição de genes e resultando na diferenciação, proliferação e atividade efetiva das células T (Descrito em: Whitachre *et al.*, 2012).



de Src (SLP-76) e a fosfolipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ). A ativação da PLC $\gamma$  é muito importante para a cascata de sinalização, e ativa três possíveis vias que levam a ativação das células T. A via do Calcineurina que ativa o Fator nuclear de células T ativadas (NFAT) e leva a uma diferenciação celular; a via da Proteína quinase C, a qual ativa o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e resulta na proliferação celular, e por último, a via de Ras/ERK que ativa AP-1; o qual está envolvido no crescimento celular, diferenciação e apoptose (Figura 5) (WHITACRE; LIN; HARDING, 2012). A ativação de NFAT e AP-1 é necessária para respostas imunes produtivas. A cooperação de NFAT com AP-1 é necessária para que muitos genes diferentes sejam transcritos, incluindo IL-2, GM-CSF, IL-3 e IFN- $\gamma$  (MACIÁN; LÓPEZ-RODRÍGUEZ; RAO, 2001). Esses processos são o ponto de partida para o início de uma cascata de transdução de sinal que pode desencadear a ativação e proliferação dessas células, e, assim, desempenhar as funções efetoras, como a produção de citocinas; tais como IL-2, e citotoxicidade celular (VAN DER MERWE; DUSHEK, 2011; CHAKRABORTY; WEISS, 2014; SIGGS et al., 2016).

Ao se ligarem ao complexo CD3, os anticorpos específicos para CD3 intermedeiam uma cascata de transdução de sinal diferenciada daquela observada quando há o correto engajamento do complexo TCR. Estudos realizados com anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR mostram que a sua ligação ao TCR provoca uma fosforilação parcial das cadeias  $\zeta$ , do CD3 e de seus alvos subsequentes resultando no bloqueio da expressão de IL-2 e de sua proliferação (SMITH; TANG; BLUESTONE, 1998). Diferentemente da ativação de células T por complexos MHC-antígeno, anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR não promovem o aumento de cálcio intracelular e não possibilitam a ativação de *ras*. Foi observado que a ligação do anti-CD3 permite a ativação preferencial da proteína quinase *fyn*, também pertencente à família *Src*, mas não da quinase *lck*, levando à sinalização parcial que permite a inativação das células T (SMITH; TANG; BLUESTONE, 1998; VAN DER MERWE; DUSHEK, 2011).

A indução de tolerância é um dos principais objetivos da imunoterapia. Pesquisas nos últimos 20 anos mostraram que os anticorpos monoclonais anti-CD3 (mAbs) tratam efetivamente doenças autoimunes em modelos animais e também se mostraram promissores em ensaios clínicos. Nessas pesquisas foi demonstrado que a indução de tolerância por mAbs anti-CD3 está relacionada à indução de T-regs que controlam respostas autoimunes patogênicas (KUHN; WEINER, 2016). Recentemente foi demonstrado que o anticorpo anti-CD3 Teplizumabe, pode ser usado no tratamento

precoce da Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), alterando os linfócitos T CD8+, os quais são os responsáveis pela destruição das células  $\beta$ , o tratamento com Teplizumabe pode reduzir a perda da função das células  $\beta$  em pacientes com DMT1 por até 7 anos (HEROLD et al., 2019).

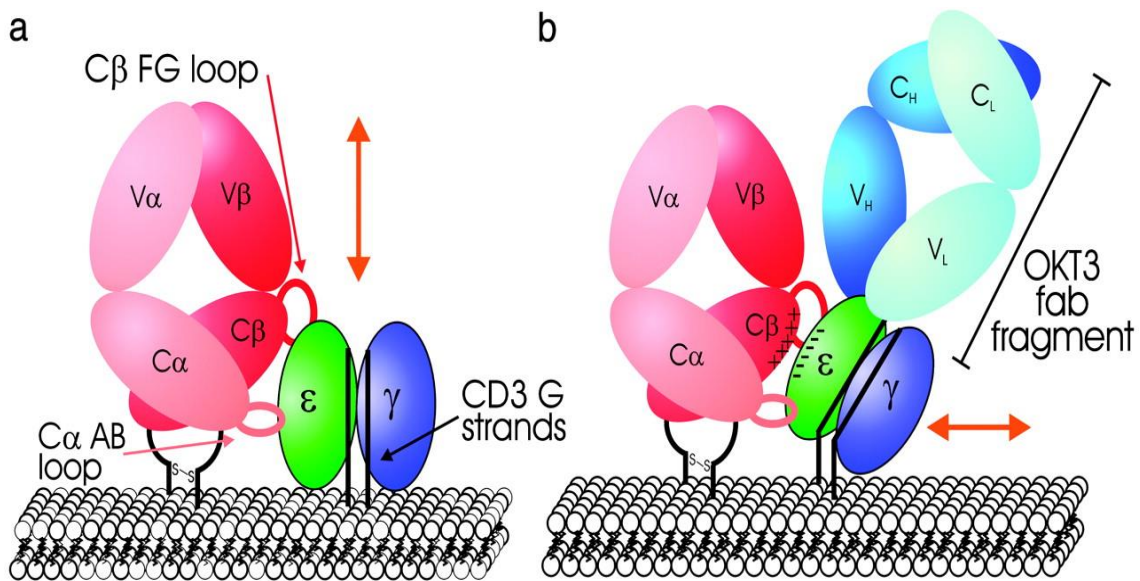
#### ***1.4 Cristalização do mAB murino OKT3 ligado ao fragmento scFv CD3 $\epsilon$ $\gamma$***

Para estudar a ligação do anticorpo murino OKT3 ao seu epitopo, a cadeia CD3 $\epsilon$ , foi feita a cristalização do complexo formado por OKT3-CD3 $\epsilon$  $\gamma$  (KJER-NIELSEN et al., 2004). Inicialmente foi produzido o fragmento scFv correspondente ao heterodímero CD3 $\epsilon$  $\gamma$  (KIM et al., 2000), e o fragmento Fab do OKT3. Para induzir a formação do complexo Fab OKT3-scFv CD3 $\epsilon$  $\gamma$ , um excesso molar de 2,6 vezes de CD3 $\epsilon$  $\gamma$  purificado, foi incubado com Fab OKT3, o complexo resultante foi purificado por gel de filtração (KJER-NIELSEN et al., 2004).

A estrutura final do cristal OKT3/CD3 $\epsilon$  $\gamma$  foi de 2,1-Å, exibiu excelente densidade de elétrons. O OKT3 interage exclusivamente com um epitopo conformacional da subunidade CD3 $\epsilon$ , a interface de ligação OKT3/CD3 $\epsilon$  exibe alta complementaridade de forma e é rica em resíduos aromáticos, ambas características típicas das interações antígeno-anticorpo, no entanto a superfície de interação OKT3/CD3 $\epsilon$  $\gamma$  é atipicamente pequena (KJER-NIELSEN et al., 2004).

Em experimentos de ressonância plasmônica de superfície, realizados com a finalidade de estudar a afinidade da ligação OKT3/CD3 $\epsilon$  $\gamma$ , foi demonstrado que o OKT3 tinha uma afinidade relativamente baixa ao CD3 $\epsilon$  $\gamma$ , na ordem de 640 nanomolar (KJER-NIELSEN et al., 2004), quando comparado com outros anticorpos anti-CD3 (SALMERÓN et al., 1991).

A análise estrutural da ligação do OKT3 ao CD3 $\epsilon$ , revelou que a ligação acontecia de uma forma oblíqua, aproximadamente a 45° graus, no topo da molécula de CD3 $\epsilon$ , juntamente com uma potencial interação lateral entre CD3 $\epsilon$  e o TCR $\beta$ . Esse arranjo aumenta a possibilidade de que uma alteração conformacional no complexo TCR/CD3 $\epsilon$  possa ser o modo de início da sinalização precoce das células T (Figura 6) (KJER-NIELSEN et al., 2004).



**Figura 6: Modelos propostos de sinalização precoce de células T após a ligação do CD3 ao TCR $\alpha\beta$ .** (a) O modelo rígido de deslocamento do tipo pistão da sinalização precoce das células T sugere que um deslocamento vertical do dímero CD3 $\epsilon\gamma$ , emparelhado rigidamente, induz uma alteração conformacional nos domínios transmembrânicos e citoplasmáticos do CD3, permitindo a ligação de Nck a uma sequência rica em prolina na cauda do CD3 $\epsilon$ . (b) Mecanismo de sinalização dinâmica. A natureza lateral da ligação do OKT3 ao CD3 $\epsilon$ , juntamente com as propriedades eletrostáticas do CD3 $\epsilon$ , também são consistentes com um modelo de sinalização precoce de células T que requer uma alteração conformacional no ectodomínio CD3 $\epsilon$ . Produzindo um movimento de rotação ou tesoura (ou uma combinação) nos domínios transmembrânicos e citoplasmáticos do CD3 para facilitar a translocação de Nck (Descrito em: (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

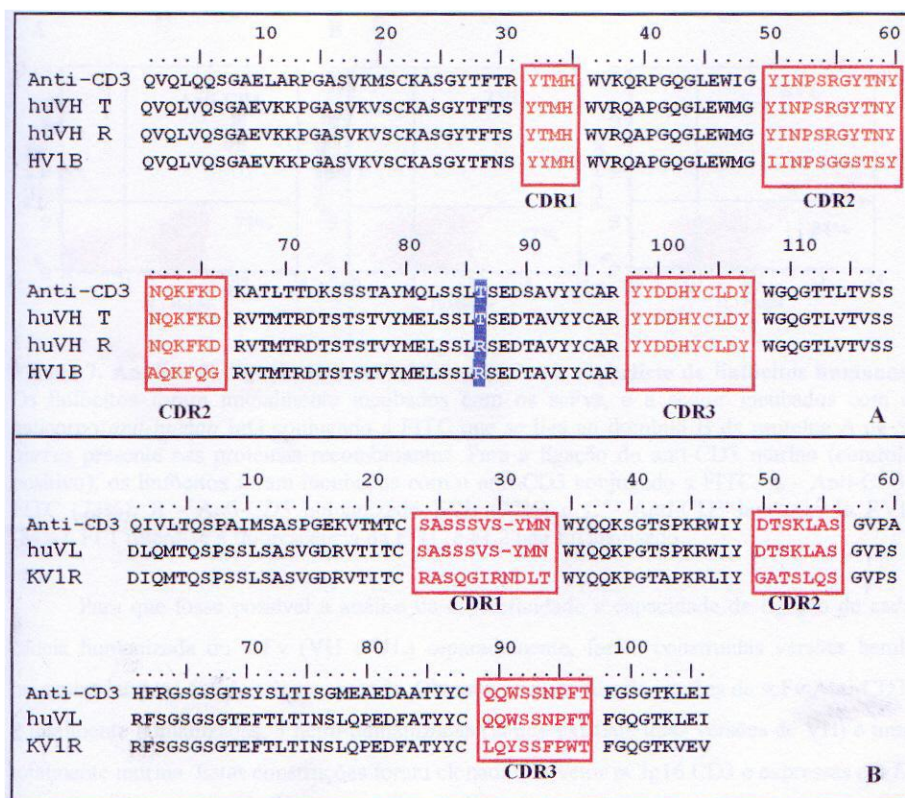
Durante a realização dos nossos experimentos foi usada a molécula scFv CD3 $\gamma\epsilon$  (KJER-NIELSEN *et al.*, 2004), como antígeno para a seleção dos anticorpos humanos, usando a técnica de *Phage display*. Essa molécula foi obtida comercialmente.

### 1.5 Humanização do anticorpo anti-CD3

O grupo de Imunologia Molecular, da Universidade de Brasília, iniciou em 1997, os primeiros experimentos para a humanização do mAb OKT3, usando a técnica de *CDR grafting* (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001), a qual consiste em manter as CDRs do anticorpo murino original (OKT3), e trocar as regiões do arcabouço (FR) por sequências humanas similares, visando dessa forma, manter a especificidade da ligação do anticorpo OKT3.

Para humanizar a cadeia de V<sub>H</sub>, foi utilizada uma sequência germinal humana (H1VB) que tinha uma similaridade de 71,4% com a V<sub>H</sub> do OKT3. Foi feita uma análise

estrutural da proteína humanizada em comparação com o OKT3, usando a estrutura cristalográfica do anticorpo murino 1MRC, depositada no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*, PDB). Essa análise apontou um possível constrangimento causado pela alteração da Treonina 86 (murina) pela Arginina, encontrada no FW3 da sequência de VH humana mais similar. Diante disso, foram criadas duas versões da cadeia de VH, uma com o resíduo murino (huVHT) e outra com o resíduo humano (huVHR) (Figura 7A) (FONSECA, 2000).



**Figura 7: Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.** Sequência codificadora do OKT3 (anti-CD3), versões humanizadas do anti-CD3 para as cadeias pesada (huVH T e R) e leve (huVL) e sequências humanas utilizadas como arcabouço para as CDRs do anti-CD3 (HV1B e KV1R). **A-** Cadeia pesada. **B-** Cadeia leve. São destacadas em vermelho as sequências 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 (Descrito em: Fonseca, 2000).

Diferentemente do que foi feito com a VH, onde foi utilizada como base toda a sequência do anticorpo murino; incluindo-se as CDRs, para a humanização da cadeia VL, Fonseca somente utilizou apenas as regiões do arcabouço da sequência do VL murino, como base para a procura de um anticorpo humano. Como resultado foi escolhida a sequência KV1R, a qual possui 64,3% de identidade com o arcabouço murino, sendo

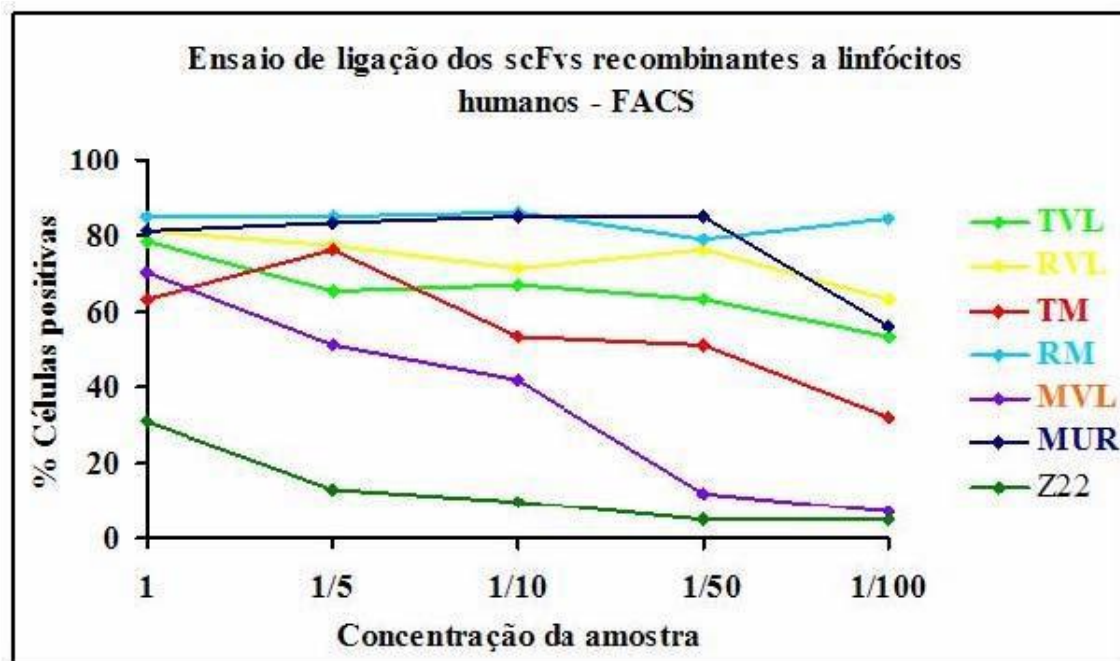
assim a sequência escolhida para a substituição das CDRs (Figura 7B) (FONSECA, 2000).

Costa em 2004, caracterizou a atividade ligante destes anticorpos humanizados expressos em *Pichia pastoris* no formato de scFv. Foram testadas seis versões de scFvs recombinantes: as duas humanizadas (contendo a huVHT e a huVHR), combinadas com a VL humanizada; e três versões hemi-humanizadas consistindo dos três domínios humanizados associados aos domínios originais do OKT3, além do scFv murinho.

Ensaio de ligação direta, utilizando citometria de fluxo (FACS), mostraram que quase todos os fragmentos de anticorpos possuíam capacidade de ligação ao antígeno, exceto a versão hemi-humanizada; com o VH murino e o VL humanizado, sugerindo que a humanização do VL não foi bem sucedida. Também foi possível visualizar que os fragmentos de anticorpos hemi-humanizados; com o huVHR e VL murino e o totalmente murino, tiveram uma capacidade de ligação melhor que os outros scFvs, indicando que a manutenção do resíduo de arginina na posição 86 da VH, favoreceu a manutenção do paratopo do anticorpo no processo de substituição da CDR (Figura 8) (COSTA, 2004).

Foi proposta uma nova humanização da cadeia variável leve (hVL), usando o transplante de CDR, dessa vez utilizando toda a sequência do domínio de VL do OKT3 para a busca do domínio humano mais similar. Foi escolhida a sequência L6 (acesso ao GenBank CAB37836), que tem uma identidade de 61% e 75% de similaridade com a VL do OKT3 (SILVA et al., 2009).

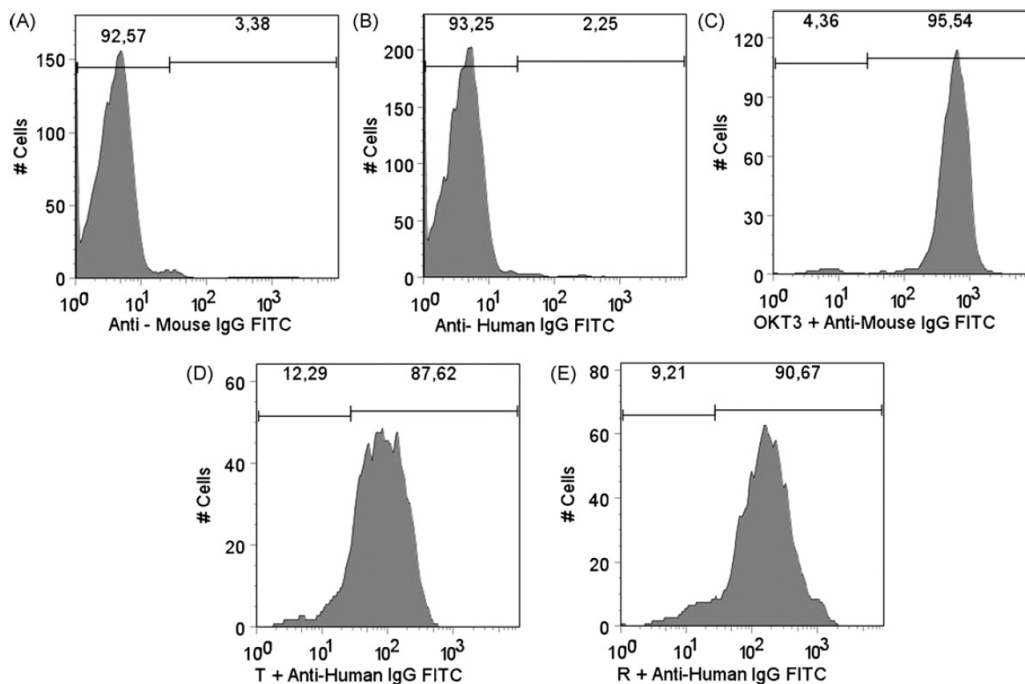
Foram construídas versões humanizadas com as cadeias variáveis pesadas huVHT86 e huVHR86 em conjunto com a nova cadeia leve humanizada (hVL) na forma de FvFc (FvFc T e FvFcR). Os fragmentos de anticorpo foram expressos de forma estável na linhagem celular CHO-K1, e depois purificados por cromatografia de afinidade (SILVA et al., 2009).



**Figura 8: 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 huVHT86 e huVHR86, respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os huVHT86 e huVHR86, 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 (Descrito em: Costa, 2004).

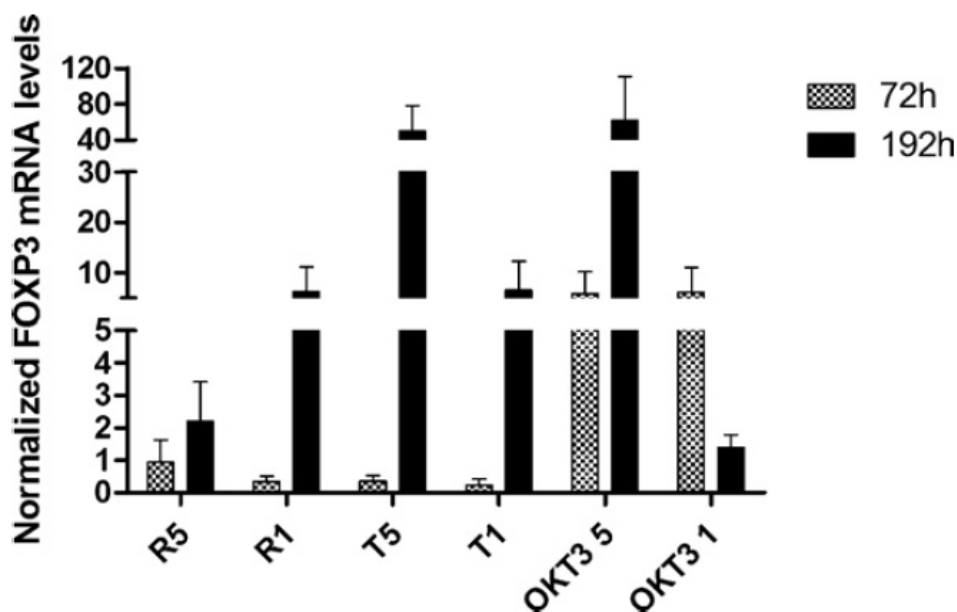
Foram feitos ensaios de ligação direta a células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), por citometria de fluxo. As versões humanizadas R e T, e OKT3 mostraram capacidades semelhantes de ligação celular, com uma ligação de 90%, 87% e 95%, respectivamente (Figura 9). Em ensaios de competição foi demonstrado que as versões humanizadas R e T conseguiam bloquear a ligação do OKT3-FITC, em um 49% e 21%, respectivamente. Esses dados confirmaram que as versões humanizadas eram capazes de se ligar às moléculas de CD3 na superfície dos linfócitos T, mas tinham menor capacidade de competir com o OKT3 (SILVA et al., 2009).

Em outros experimentos *in vitro* com PBMCs, os anticorpos humanizados induziram um perfil de citocinas regulatórias, em contraste ao perfil inflamatório, não desejado, induzido pelo OKT3. Além disso, esses anticorpos anti-CD3 humanizados induziram uma expressão tardia do gene FOXP3, enquanto o OKT3 levou a uma expressão mais transitória do FOXP3. Os resultados, sugerem que esses anticorpos anti-CD3 humanizados podem promover o desenvolvimento de células T com atividade imunorreguladora (Figura 10) (SILVA et al., 2009).



**Figura 9: Análise da ligação direta dos anticorpos anti-CD3 à superfície celular dos linfócitos humanos por citometria de fluxo.** As versões humanizadas anti-CD3 T (D) e R (E) exibiram capacidades de ligação semelhantes ao OKT3 (C), corando 87%, 90% e 95% das células, respectivamente. Para evitar a detecção de imunoglobulinas humanas na superfície das células B, foi realizado um segundo *gate* em células coradas com mAb marcado com ficoeritrina (PE) para CD4 e CD8. Os anticorpos específicos para CD3 foram detectados com IgG anti-humana ou anti-murino marcada com FITC, que foi plotada como um histograma. (A) e (B) representam células incubadas apenas com o anti-murino IgG-FITC e células incubadas apenas com o anti-humano IgG-FITC, respectivamente (Descrito em: Silva *et al.*, 2009).

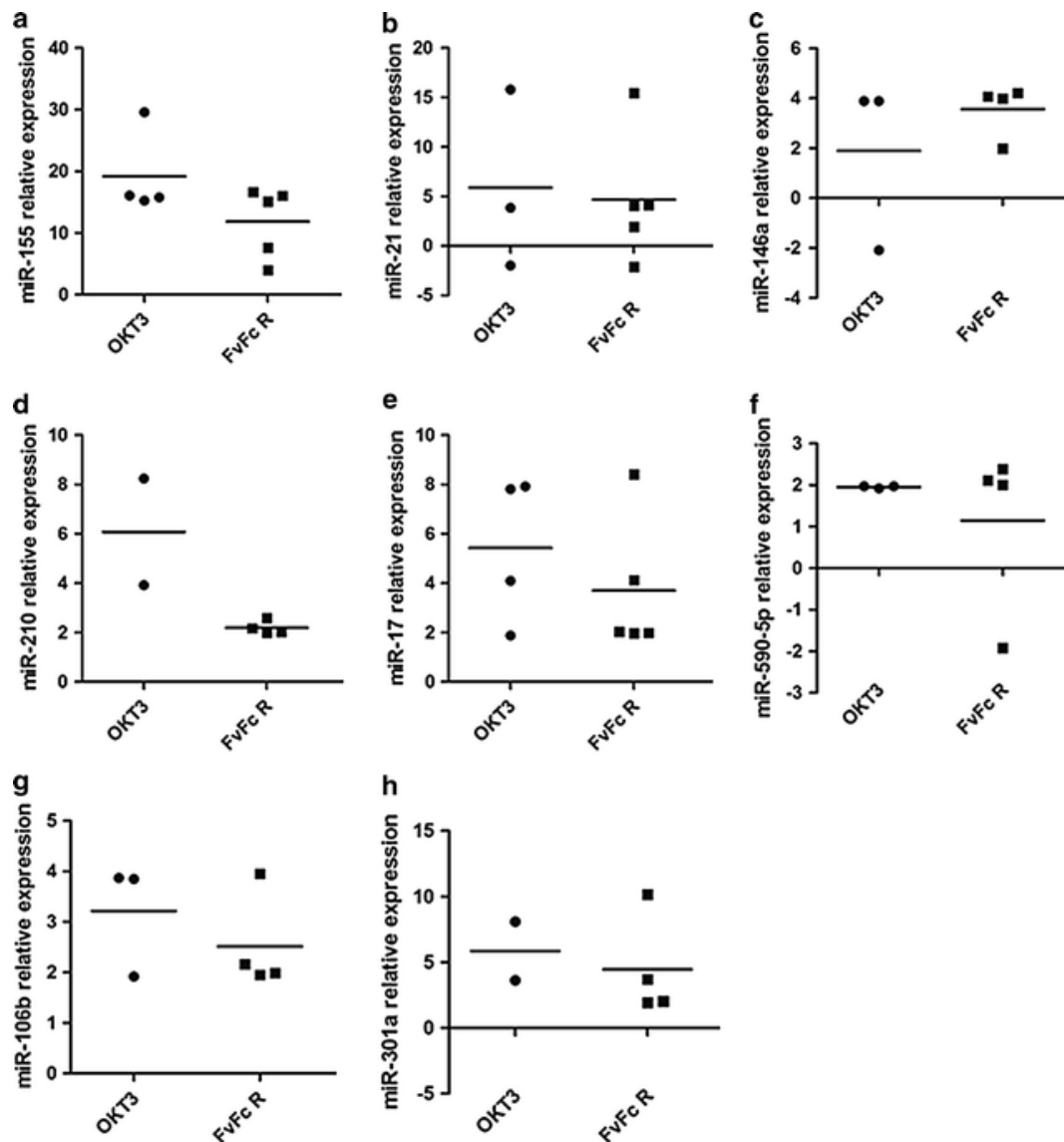




**Figura 10: Expressão de Foxp3 em PBMCs em resposta ao estímulo com OKT3 ou com os FvFcs humanizados versões R e T.** As PBMCs foram incubadas por 72h e 192h na presença de OKT3 e os FvFcs humanizados versões R e T nas concentrações de 5 $\mu$ g/mL (OKT3 5, R5, T5) ou 1 $\mu$ g/mL (OKT3 1, R1, T1, respectivamente). As amostras de cDNA foram preparadas a partir das PBMCs 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 (Descrito em: Silva *et al.*, 2009).

Em estudos posteriores foi usado o anticorpo humanizado FvFc R (SILVA *et al.*, 2009), o qual tinha mostrado ser menos mitogênico que o OKT3, para estudar o perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) em células T. Nesse estudo encontrou-se que após o tratamento com os anticorpos anti-CD3 (FvFc R e OKT3), oito dos miRNAs testados (miR-155, miR-21, miR-146a, miR-210, miR-17, miR-590-5p, miR-106b e miR-301a), foram regulados de forma estatisticamente significativa para cima ou para baixo, quando comparados com as células não tratadas (Figura 11) (SOUSA *et al.*, 2017).

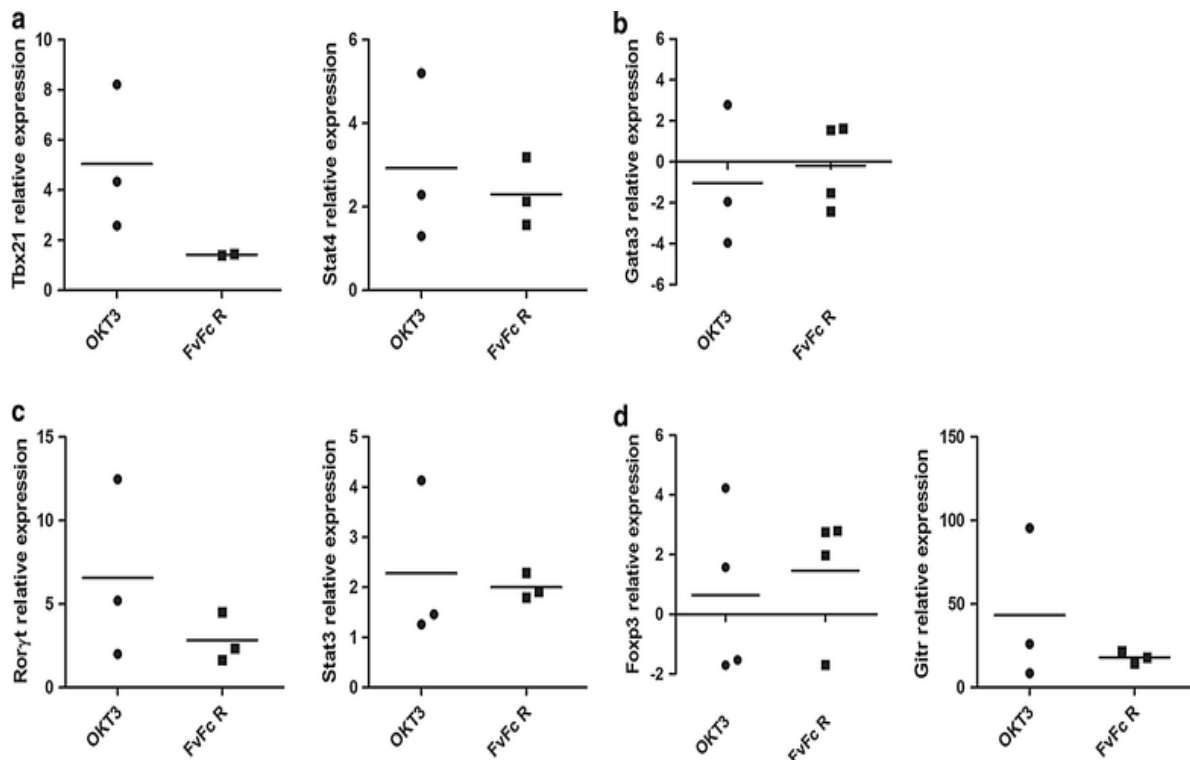




**Figura 11:** Análise quantitativa das alterações na expressão do miRNA nas células T CD3 + após estimulação com anticorpo anti-CD3 humano. qPCR foi realizado em triplicata 72 h pós estimulação; os resultados são expressos como alterações na quantidade, em relação aos níveis normais nas células T (n = 5; p <0,05). Os miRNAs apresentados exibiram alterações estatisticamente significativas nos níveis de expressão em relação às células não tratadas em 80% dos doadores, para o tratamento com FvFc R. O RNR48 snRNA foi utilizado como controle interno para normalização dos dados. a: miR-155, b: miR-21, c: miR-146a, d: miR-210, e: miR-17, f: miR-590-5p, g: miR-106b, h: miR-301a (Descrito em: Sousa *et al.*, 2017).

Nesse mesmo estudo foram analisados os padrões de expressão de alguns genes considerados marcadores típicos da diferenciação de células T *helper*. Os níveis de expressão de TBX21, STAT4, ROR $\gamma$ t e STAT3 foram afetados pela estimulação com os anticorpos anti-CD3 humanos FvFc R e OKT3 (Figura 12a, 12c), a estimulação com os anticorpos não afetou a expressão de GATA3, o que corrobora que as células T sofrem polarização Th1 no tratamento com anti-CD3 (Figura 12b). Além disso, os marcadores

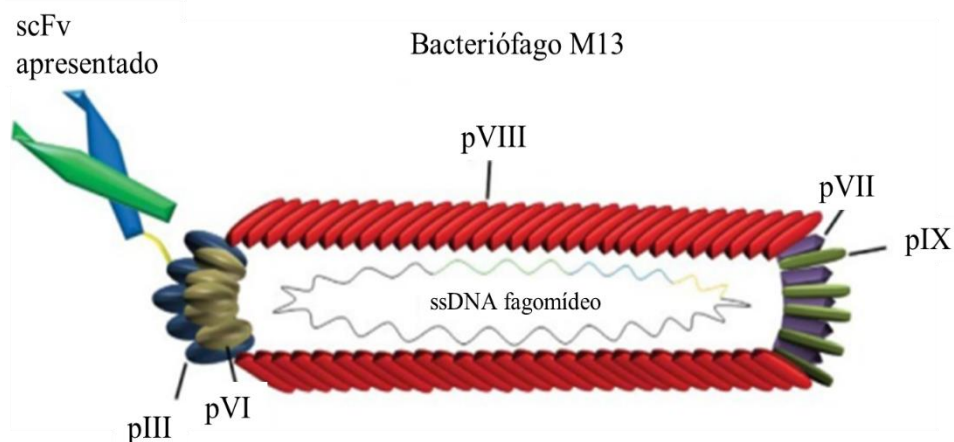
associados a regulação, FOXP3 e GITR, foram induzidos em todos os tratamentos (Figura 12d); o FvFc R foi mais eficaz na indução de FOXP3, enquanto o OKT3 induziu o GITR de forma mais robusta. Esses dados sugerem que a estimulação com FvFc R influencia genes que estão associados ao fenótipo de células T regulatórias (Treg) e Th17 (SOUSA *et al.*, 2017).



**Figura 12: Efeitos da estimulação com anti-CD3 na expressão de genes envolvidos na diferenciação de células T CD4+.** As células T CD3+ foram isoladas 72 h após a estimulação, e o mRNA foi analisado por qPCR para determinar os níveis de expressão de a: TBX21 e STAT4, b: GATA3, c: ROR $\gamma$ t e STAT3 e d: FOXP3 e GITR. Os dados foram normalizados para os níveis de expressão dos mesmos genes em células T CD3+ de culturas não tratadas. São mostrados os resultados representativos de três experimentos independentes (n = 5; p <0,05). O B2M foi utilizado como controle interno para normalização dos dados (Descrito em: Sousa *et al.*, 2017).

### 1.6 Phage Display

Nos últimos anos, a tecnologia de *Phage Display*, como plataforma de seleção de peptídeos/proteínas *in vitro*, ofereceu um grande potencial para a produção de fragmentos de mAb totalmente humanos, específicos para um determinado alvo, dado que permite a engenharia de fragmentos de mAb recombinantes com atributos desejáveis, como afinidade, expressão e estabilidade (BARBAS III et al., 2001; OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015; ZHAO et al., 2016). Em 1985, George Smith fez o primeiro relato da técnica de *Phage display*, a qual baseia-se em métodos de DNA recombinante que permitem a cosseleção de anticorpos recombinantes e seus respectivos genes usando bacteriófagos filamentosos. Smith demonstrou que fragmentos de DNA exógenos podem ser clonados *upstream* ao gene III do bacteriófago, o qual codifica para a proteína III que forma o capsídeo do fago, formando desse jeito uma proteína de fusão que apresenta a proteína exógena na porção N-terminal da proteína III do capsídeo, mantendo as funções fisiológicas e a viabilidade do fago. Além disso, essa fusão permite que o peptídeo interaja com alvos e ligantes externos (SMITH, 1985; BARBAS III et al., 2001; BÁBÍČKOVÁ et al., 2013).



**Figura 13: Bacteriófago M13, usado para *Phage display*.** O bacteriófago apresenta um scFv fusionado à região N-terminal da proteína de revestimento, pIII, através de um peptídeo conector curto. A proteína de revestimento principal, pVIII, encapsula o DNA de fita simples (ssDNA) que codifica as proteínas scFv-pIII. Ainda que cinco proteínas pIII são expressas por cada partícula de fago, geralmente uma ou nenhuma cópia do scFv é apresentada. As outras proteínas (pVI, pVII, pVIII, pIX) são codificadas por genes expressos no genoma do fago *helper* que infecta as células de *E. coli*. (Descrito em: Kierny *et al.*, 2012)

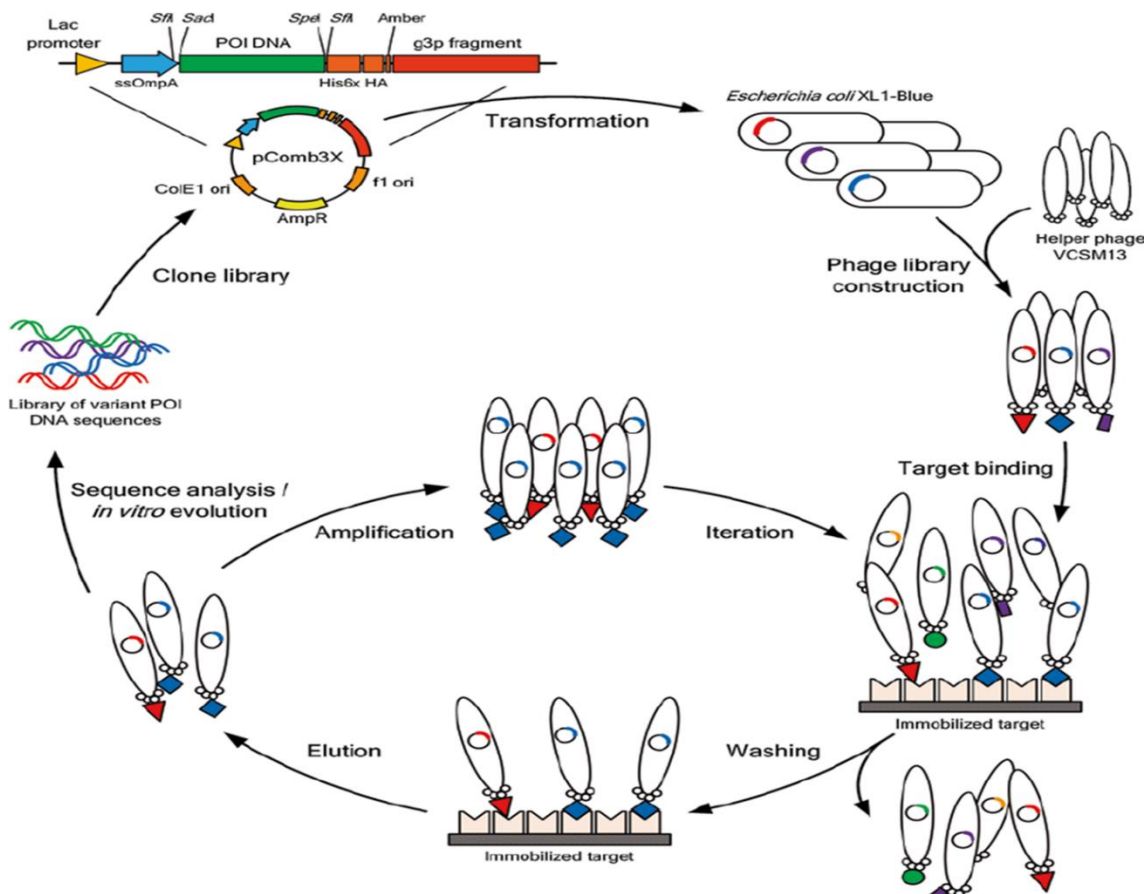
A classe Ff (f1, fd e M13) de fagos filamentosos pertencem à família *Inoviridae* e possuem como material genético, DNA de fita simples (ssDNA) encapsulado numa estrutura cilíndrica formada por várias proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura

13) (KIERNY; CUNNINGHAM; KAY, 2012). A infecção viral ocorre via *pilus* sexual de células bacterianas que contém o plasmídeo F. Os fagos deixam a célula hospedeira sem ocasionar lise celular; desta forma, as células podem produzir novas partículas virais por um longo período de tempo. A formação do fago de fusão se produz após a extrusão do DNA através da membrana, e dessa forma, se produzem títulos de partículas virais entre  $10^9$  até  $10^{12}$  por mL (SMITH; PETRENKO, 1997). Os fagos de fusão originados das bactérias hospedeiras apresentam seu capsídio as proteínas recombinantes. Assim sendo, uma biblioteca de *Phage display* corresponde a um conjunto de milhões ou bilhões de fagos, contendo sequências de DNA exógeno distintas e que expressam uma proteína única na sua superfície (SMITH; PETRENKO, 1997; BARBAS III et al., 2001; KIERNY; CUNNINGHAM; KAY, 2012).

O DNA exógeno pode ser inserido diretamente no DNA do fago ou clonado em vetor plasmidial, do tipo fagomídeo. Os componentes básicos de um fagomídeo incluem principalmente a origem de replicação de um plasmídeo (geralmente *E. coli*), um marcador de seleção (AmpR), a região intergênica (região IG), um sítio para inserção do gene de fusão da proteína de interesse, um gene de uma proteína de revestimento de fago (pIII ou pVIII), sítios de restrição de reconhecimento de enzimas, um promotor e um segmento de DNA que codifica um peptídeo sinal (QI et al., 2012). Dado que o fagomídeo não possui todos os genes necessários para a montagem de uma nova partícula viral, faz-se necessário usar fagos auxiliares (*helper phage*), que possuem todos os genes necessários para a correta montagem das partículas virais infectivas. Cabe destacar que os fagos auxiliares carregam mutações na origem de replicação que dificultam o empacotamento do seu próprio material, o que favorece a formação de partículas virais que carregam o DNA do fagomídeo (BARBAS III et al., 2001; QI et al., 2012; BÁBÍČKOVÁ et al., 2013).

Vale ressaltar que o *Phage Display* permite a conexão entre o genótipo e o fenótipo, possibilitando a obtenção das sequências de DNA que codificam as proteínas (expressas na superfície dos fagos) que reconhecem alvos específicos (ZHAO et al., 2016; FINLAY et al., 2017). Uma seleção *in vitro* típica consta de vários passos: 1- os genes de interesse são clonados no fagomídeo fusionado a uma proteína do capsídio viral; 2- a produção dos fagos de fusão em cultura de células infectadas; 3- incubação dos fagos com o ligante (placa de microtitulação, resina de afinidade, suspensão); 4- lavagens com alta adstringência para eliminar os ligantes não específicos; 5- eluição e amplificação dos ligantes específicos. Cada conjunto de passos se considera um ciclo de seleção, e com

cada ciclo selecionam-se os melhores fagos pelo processo de maturação de afinidade. Em geral, após 3 ou 4 ciclos de infecção e reinfeção obtêm-se populações de fagos que expressam as melhores proteínas ligantes ao alvo (Figura 14) (BARBAS III et al., 2001; BÁBÍČKOVÁ et al., 2013; LEVISSON et al., 2014; ZHAO et al., 2016).



**Figura 14: Representação esquemática de um ciclo típico de Phage Display.** Primeiro o gene de interesse é clonado no vetor, as células são transformadas para criar a biblioteca inicial de fagos. Depois, conjuntos iniciais de moléculas funcionais na superfície de fagos são expostas a um antígeno imobilizado em uma superfície sólida. Em seguida, os fagos não ligados são removidos por lavagem e os fagos ligados são eluídos e utilizados para infectar *E. coli*, produzindo fagos para o próximo ciclo ou para análises dos clones selecionados (Descrito em: Levisson *et al.*, 2014).

A tecnologia de *Phage Display* oferece ferramentas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos: vacinas, reagentes de diagnóstico, bem como sistemas de administração de genes e fármacos. Dentre esses destacam-se a seleção de anticorpos de uso farmacêutico para várias doenças, como câncer, doenças autoimunes e inflamatórias, distúrbios metabólicos e alérgicos. Esta técnica supera as barreiras e limitações dos processos de imunização realizados no processo de produção de anticorpos monoclonais com a técnica de hibridoma, além de reduzir a utilização de animais. Os anticorpos

selecionados são totalmente humanos, sem precisar de etapas de humanização e construção de anticorpos quiméricos (BARBAS III et al., 2001; OMIDFAR; DANESHPOUR, 2015; ZHAO et al., 2016; FINLAY et al., 2017).

No presente trabalho, utilizamos uma biblioteca de Fab humano apresentada na superfície de fagos filamentosos, que foi construída por nosso grupo a partir do repertório imune de 11 pacientes com osteosarcoma (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005). Os Fab foram usados como molde para a amplificação das dos domínios variáveis leves humanos (VL) para construção de genes codificadores de scFvs contendo o domínio hVHR. A biblioteca de scFvs apresentada em fago foi utilizada para selecionar novos anticorpos pelo reconhecimento ao antígeno CD3 humano.

### ***1.7 Uso do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) junto ao Phage Display***

As plataformas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) permitem a quantificação e análise de ligantes a partir da seleção por *Phage Display*. O uso do sequenciamento Sanger para determinar os ligantes mais fortes, proporciona uma representação muito superficial da população total de ligantes. O sequenciamento Sanger, é limitado à identificação de  $<10^2$  e, em casos raros,  $\sim 10^3$  ligantes. Por outro lado, as plataformas NGS permitem a caracterização entre  $10^6$  a  $10^8$  sequências, em uma única corrida (MATOCHKO; DERDA, 2015).

A tecnologia de NGS permitiu um aumento maciço na capacidade de sequenciar genomas, a um custo relativamente baixo e em um curto espaço de tempo. Revolucionou vários aspectos da pesquisa biológica, e também está sendo usado ativamente junto à tecnologia de *Phage Display* (YANG et al., 2017). Atualmente, várias plataformas de NGS estão disponíveis, com comprimentos médios de leitura de 75 a 8500 bp, e diferentes taxas de erro (HODKINSON; GRICE, 2015). Os domínios CDR3 nos scFvs, os quais apresentam a maior diversidade, e formam o centro do local de ligação de antígenos, têm sido o alvo de preferido de sequenciamento para a identificação *in silico* de sequências enriquecidas (MARANHÃO et al., 2013; SPILIOTOPOULOS et al., 2015). O grande volume de dados produzido no sequenciamento NGS é apropriado para uma amostragem mais ampla das bibliotecas, no entanto, tal volume de dados também impõe desafios para a análise de diversidade, e para a definição de critérios de seleção das sequências candidatas (SILVA, 2014).

No Laboratório de Bioinformática do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, foi desenvolvido o *pipeline* ATTLA (*AutomaTed Tool For*

*Immunoglobulin Analysis*), para buscar as sequências que codificam os domínios leves e pesados de anticorpos selecionados em experimentos de *Phage Display*. O programa analisa e identifica cada domínio de VH e VL, reportando o enriquecimento de estes (sequências candidatas), comparando as frequências em que estes domínios são encontrados nos ciclos inicial e final do processo de seleção por *Phage display*, sugerindo aquelas que foram selecionadas, que, em teoria devem ter uma maior afinidade pelo antígeno (SILVA, 2014).

### **1.8 Expressão de peptídeos em células bacterianas**

Uma das grandes limitações na produção de anticorpos monoclonais é o complexo processo de produção, e também o alto custo para produzir proteínas em quantidades suficientes, o que acaba elevando os custos para o paciente (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Atualmente, um dos organismos mais utilizados para a produção de anticorpos monoclonais e outros tipos de moléculas para pesquisa e em grande escala, é a espécie de bactéria *Escherichia coli*, e suas diferentes linhagens derivadas. Há vantagens objetivas para essa escolha, como a simplicidade, a disponibilidade de uma grande quantidade de reagentes bem testados (vetores, linhagens) e a enorme experiência (protocolos) que os pesquisadores acumularam nos últimos 30 anos, usando esta bactéria (DE MARCO, 2015).

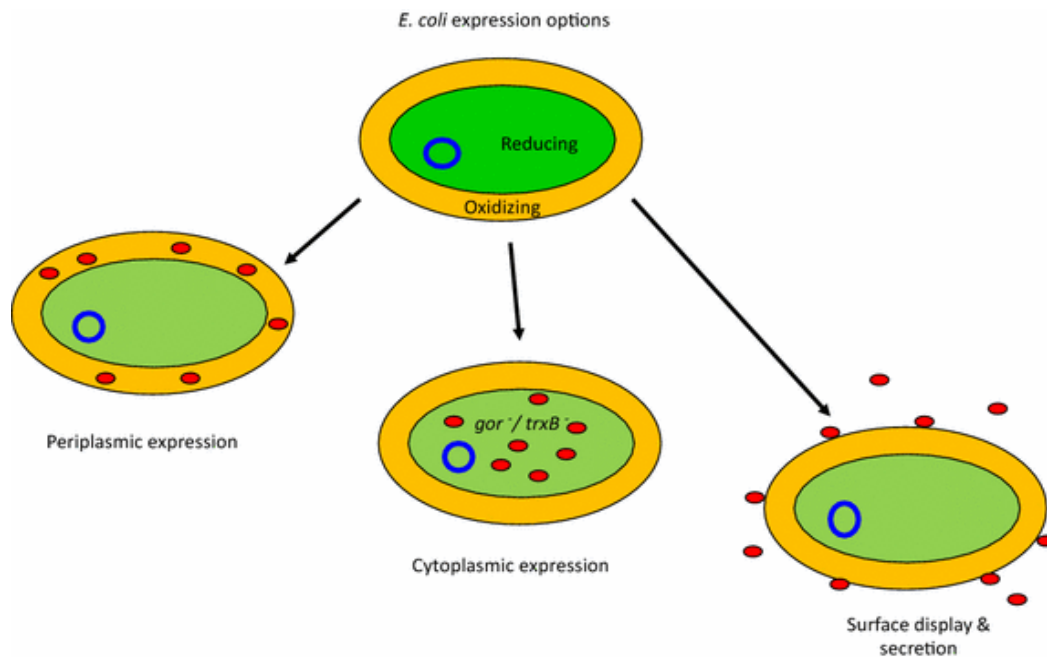
A principal vantagem de escolher o sistema de expressão bacteriano é a relação custo-benefício. O uso de *E. coli* para a produção de proteínas recombinantes vem da experiência de décadas de pesquisa sobre sua genética, fácil manipulação e ferramentas de engenharia genética, facilmente disponíveis para modificar o organismo. Além destes, a rápida taxa de crescimento de *E. coli*, a capacidade de fermentação contínua, baixo custo dos meios de cultura e altos níveis de expressão, fazem deste organismo um excelente hospedeiro para expressar as proteínas recombinantes (LOBSTEIN et al., 2012; JOSEPH et al., 2015).

No entanto, apesar do extenso conhecimento sobre a genética e biologia molecular da *E. coli*, nem todo gene pode ser expresso eficientemente e a produção de alto nível de proteínas eucarióticas funcionais pode não ser uma questão de rotina, resultando as vezes, em algo desafiador. Muitos fatores contribuem com esses problemas, incluindo: (i) as características estruturais únicas da sequência genética a ser expressa, (ii) a estabilidade e eficiência na transcrição do mRNA, (iii) a facilidade de dobramento da proteína, (iv) a degradação da proteína por proteases da célula hospedeira, e (v) a utilização de códons

preferenciais (SIVASHANMUGAM et al., 2009). Um grande obstáculo que enfrenta o uso de *E. coli* como plataforma de expressão de anticorpos é a produção de mAbs com as ligações dissulfeto corretas (ROBINSON et al., 2015). A formação de ligações dissulfeto em *E. coli* pode ser catalisada no compartimento periplasmático, naturalmente oxidativo, ou no citoplasma de linhagens geneticamente modificadas (BERKMEN, 2012; LOBSTEIN et al., 2012). De fato, muitos fragmentos derivados de mAbs tais como Fab, Fv de cadeia simples (scFv), Fc e uma fusão scFv-Fv foram expressos no periplasma ou no citoplasma de *E. coli* especialmente modificada (BERKMEN, 2012; LOBSTEIN et al., 2012; ROBINSON et al., 2015).

No caso de fragmentos de anticorpos (Fab, scFv), a abordagem convencional consiste em expressá-los como proteínas secretadas, as quais acumulam-se no periplasma de *E. coli*, dado que este é o único compartimento bacteriano que fornece as condições oxidantes, e a combinação de atividades específicas de chaperonas e isomerases, necessárias para a formação das ligações dissulfeto corretas e estabilizadoras da molécula. Isto permite a produção de grandes quantidades de fragmentos de anticorpos funcionais, e também, suas fusões a outros polipeptídios, como a fosfatase alcalina (SCHLEGEL et al., 2013; DE MARCO, 2015). Condições oxidantes podem ser reproduzidas no citoplasma de linhagens mutantes, nas quais as vias de redução de tioredoxina e glutathione são bloqueadas (como Origami e derivadas), enquanto a superexpressão citoplasmática da isomerase periplasmática DsbC (como na linhagem de BL21 *SHuffle* -T7 Express) pode rearranjar ligações dissulfeto envolvendo resíduos de cisteína incorretos (Figura 15) (MARKIV et al., 2011; DE MARCO, 2012; LOBSTEIN et al., 2012).





**Figura 15: Expressão convencional de anticorpos em *E. coli*.** A maioria dos anticorpos recombinantes baseia-se na formação de ligações dissulfeto para atingir a sua estrutura nativa. O periplasma é o único compartimento oxidante de *E. coli* compatível com a formação de ligações dissulfeto e, conseqüentemente, tem sido considerado o ambiente lógico para o acúmulo de anticorpos, apesar de seu pequeno volume. As linhagens mutantes (*gor* / *trxB*-) com citoplasma parcialmente oxidante representam uma alternativa (acumulação citoplasmática) bem como sistemas de expressão que permitem a secreção de anticorpos no meio ou na superfície celular (*antibody display*) (Descrito em: De Marco, 2015).

Outra variável importante a se levar em consideração quando se quer expressar proteínas em bactérias, é a escolha do vetor usado para codificar o gene da proteína de interesse. Um dos vetores mais usados para a expressão bacteriana de proteínas recombinantes é o pET28 (WURM et al., 2016), o qual apresenta um sistema baseado no promotor do gene 10 do fago T7. Neste sistema o gene de interesse é clonado após um promotor reconhecido pela enzima RNA polimerase T7 (T7 RNAP) do fago, o qual é considerado um promotor forte. A expressão da proteína é induzida na presença de grandes quantidades da Polimerase T7. A T7 RNAP pode ser fornecida por outro plasmídeo, ou como atualmente, as linhagens modificadas geneticamente que possuem um gene para a expressão da T7 RNAP, sob o controle transcricional do promotor *lacUV5*. Dessa forma, a produção da T7 RNAP pode ser induzida com lactose ou pelo seu análogo IPTG. Esse controle se faz necessário já que a RNA polimerase da célula bacteriana não se liga no promotor do fago. Uma vez fornecida a fonte indutora da produção de T7 RNAP, a polimerase é expressa e reconhece o promotor do fago e, por

consequência, grande parte do metabolismo celular é deslocado para a produção da proteína de interesse. Em culturas bem otimizadas a quantidade de proteína heteróloga produzida, pode representar até o 50% da proteína total da célula (TERPE, 2006; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A expressão basal da proteína antes da indução também deve ser controlada, especialmente quando a proteína recombinante pode chegar a ser tóxica para a célula. Por isso algumas linhagens possuem também um vetor compatível (pLysS, pLysE ou pLysY) que produz uma proteína que se liga no T7 RNAP, inibindo dessa forma a iniciação da transcrição do promotor T7, evitando a expressão basal da proteína (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Finalmente, após a produção da proteína de interesse faz-se necessário a extração e purificação da mesma, sendo muito importante ter uma forma de detectá-la durante esse processo, razão pela qual se usam os chamados marcadores de afinidade. Os mais usados atualmente são os marcadores de pequeno massa molecular que, pelo tamanho, não parecem influir no dobramento da proteína, nem na sua atividade, ainda que em alguns estudos tenha sido mostrado o contrário (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Alguns exemplos de marcadores moleculares pequenos são poly-Arg, FLAG, poly-His, c-Myc, S-, epitopo de hemaglutinina de influenza (HÁ) e Strep II-tag. Para algumas aplicações esses marcadores pequenos não precisam serem removidos, e dado seu tamanho menor não são tão imunogênicos quanto os marcadores maiores, e também podem ser usados como antígenos na produção de anticorpos (TERPE, 2003).

Um dos métodos de purificação mais utilizados baseia-se no marcador poly-His ou His-tag, e na tecnologia de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, *em inglês*), na qual a proteína é purificada pela ligação a íons metálicos de transição ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) imobilizados numa matriz (HOCHULI; DÖBELI; SCHACHER, 1987). A histidina é o aminoácido que apresenta a interação mais forte com as matrizes de íons metálicos imobilizados, pois os grupos de doadores de elétrons no anel de imidazol da histidina formam rapidamente ligações de coordenação com o metal de transição imobilizado, pelo qual peptídeos contendo sequências de resíduos de histidina consecutivos são eficientemente retidos no IMAC. Após a lavagem da matriz, os peptídeos contendo sequências de poli-histidina podem ser facilmente eluídos, ajustando-se o pH do tampão na coluna ou adicionando imidazol livre (TERPE, 2003). Uma vez que existem anticorpos comerciais disponíveis para todos os marcadores, a proteína recombinante marcada pode ser detectada por *Western blot* ao longo de ensaios

de expressão, o que é extremamente útil, quando os níveis das proteínas desejadas não são suficientemente altos para serem detectadas por SDS-PAGE (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

## 2. OBJETIVOS

### *2.1. Objetivo geral:*

Desenvolver novos anticorpos monoclonais (mAbs) contendo domínios variáveis humanos capazes de reconhecer o antígeno linfocitário humano CD3 e realizar a caracterização desses anticorpos quanto à afinidade pelo antígeno.

### *Etapas metodológicas.*

- ✓ Clonar a biblioteca de genes codificadores de domínios variáveis leves humanos no vetor pCIg316;
- ✓ Selecionar por *Phage Display* domínios variáveis leves humanos (hVLs) ligantes ao antígeno CD3, imobilizado na forma de um fragmento de cadeia única  $\gamma\epsilon$ ;
- ✓ Identificar os domínios hVL selecionados e sintetizar genes codificadores dos scFv contendo o domínio VHR humanizado associado aos hVLs;
- ✓ Produzir os scFvs em bactérias;
- ✓ Purificar os scFvs por cromatografia de afinidade (IMAC);
- ✓ Caracterizar a capacidade de ligação ao antígeno CD3 $\gamma\epsilon$ .

### 3. MÉTODOS

#### ***3.1 Extração de DNA plasmidial em pequena e média escala.***

Todas as extrações de DNA plasmidial foram feitas usando os kits da QIAGEN e segundo os protocolos definidos pelo fabricante. Para as extrações em pequena escala foi usado o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (250) - (QIAGEN, catálogo: 27106) e para as de média escala o kit QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) - (QIAGEN, catálogo: 12145).

O DNA foi quantificado usando o kit Qubit (Invitrogen), Nanodrop, ou com marcadores de massa molecular em gel de agarose.

#### ***3.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição.***

As digestões de DNA com enzimas de restrição foram 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. Em geral, foram utilizadas 2-3 unidades de enzima para cada 1 µg de DNA, incubados por 4 horas ou durante a noite.

#### ***3.3 Análise de DNA em gel de agarose (segundo DE-SOUZA, 2016).***

A agarose foi preparada numa concentração de 0,8 a 1,2%; dependendo do tamanho da banda que queria ser visualizada, em tampão TBE (Trizma base 0,89 M, Ácido Bórico 0,89 M, EDTA 0,02 M, pH 8,0) 1X, adicionado de 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese em tampão TBE 1X a 5 V/cm, até conseguir uma boa separação das bandas de interesse. Para visualização do DNA utilizou-se um transluminador (Pharmacia-LKB) e mais recentemente o *E-Gel Imaging System* (Life Technologies).

#### ***3.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose***

No preparo dos géis foi utilizada agarose em concentrações que variaram entre 0,8 e 1,2%, dissolvida em tampão TAE 1X (Estoque 50X: Tris base 242 g, Ácido acético glacial 57,1 mL, EDTA 0,5 M (pH 8,0) 100 mL, em 1 litro de água destilada), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida em tampão de corrida TAE 1X, a temperatura ambiente. Os fragmentos de DNA a serem eluídos; originários de PCR ou de digestão com enzimas de restrição, foram cortados do gel de agarose após eletroforese. A extração do DNA do gel foi feita de acordo com as instruções do

fabricante do kit (QIAquick Gel extraction Kit - (QIAGEN, catálogo: 28706)). Finalmente, as amostras foram ressuspensas em água milli Q e quantificadas por gel de agarose, utilizando-se o marcador *High Mass* (Invitrogen®) e pelo aparelho Nanodrop.

### **3.5 Ligação de fragmentos de DNA**

As concentrações de DNA (vetor:inseto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento a ser realizado, sendo geralmente, numa razão molar de 1:0, 1:3, 1:5, tanto para as ligações simples durante a construção do vetor, quanto para a ligação da biblioteca de VLs humanas. A reação de ligação foi realizada de acordo com instrução do fabricante da enzima T4 DNA Ligase (Promega, Catalogo: M1801). E após incubação durante a noite a 4°C, foram usados para transformar células de *E. coli* XL1-Blue.

A fórmula usada para saber a quantidade de DNA necessária para ligação foi:

$$\frac{\text{Vetor (ng)} \times \text{Inseto (Kb)}}{\text{Vetor (kb)}} = \text{ng do inseto}$$

### **3.6 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.**

#### **3.6.1 Por choque térmico-CaCl<sub>2</sub> (adaptado de MARANHÃO, 2016).**

Foi feito um pré-inóculo em meio LB (Peptona de caseína 1,0% (p/v), Extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1,0% (p/v), pH 7,0), a partir de uma colônia isolada da linhagem celular apropriada, e crescido durante a noite. No dia seguinte, 50 mL de meio LB foram inoculados com 500 µL do pré-inóculo, e incubados a 37 °C a 250 rpm, até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD600nm) de 0,1 a 0,3.

Centrifugou-se o inóculo a 3.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado. (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda na eficiência da transformação).

O sedimento foi ressuspensado em 10 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 50 mM, estéril e gelada, com movimentos suaves, para evitar danificar as células. A solução foi centrifugada novamente a 3.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e

o sedimento foi então ressuspensionado em 1 mL de solução de  $\text{CaCl}_2$  50 mM, estéril e gelada, com movimentos suaves.

As células foram mantidas em incubação em banho de água/gelo por pelo menos 1 hora, (as células podem ser alíquotadas e utilizadas por um período máximo de 24 horas, depois disso, a sua competência vai decaindo). Após a hora de incubação no gelo, foram incubados de 100 a 200  $\mu\text{L}$  de célula competente, com 100 a 500 ng do DNA de interesse em banho de água/gelo por pelo menos 30 min, e imediatamente foi realizado o choque térmico, por meio de incubação do sistema de transformação em banho Maria a 42 °C durante 3 min. Adicionou-se prontamente 1 mL de meio LB, e o sistema foi incubado por 1 h a 37 °C no *shaker* a 250 rpm.

Foram semeadas quantidades variáveis do sistema de transformação em placas de meio LB-ágar (Peptona de caseína 1,0% (p/v), Extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1,0% (p/v), pH 7,0, ágar bacteriológico 1,4% (p/v)) contendo o antibiótico pertinente. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C, por 16 horas.

### **3.6.2 Por eletroporação (adaptado de MARANHÃO, 2016).**

Uma colônia isolada da linhagem celular apropriada, foi inoculada em 10 mL de meio SB (Peptona de caseína 3,0% (p/v), Extrato de levedura 2,0% (p/v), MOPS 1,0% (p/v), pH 7,0), contendo o antibiótico pertinente. O pré-inóculo foi crescido sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, inoculou-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2 M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2 M ( $\text{MgCl}_2$  1 M,  $\text{MgSO}_4$  1 M). O inóculo foi incubado a 37 °C a 250 rpm até a cultura atingir uma OD<sub>600nm</sub> de 0,7 a 0,9. Depois de atingir a OD desejada, o frasco foi resfriado em banho de água/gelo por 15 minutos, antes de centrifugar (A partir desse momento as células devem ser mantidas em gelo sempre).

As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensionado cuidadosamente em 25 mL de glicerol 10%, estéril e gelado, e a seguir adicionou-se mais 75 mL de glicerol 10% gelado. Em seguida foi feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, repetindo a etapa anterior 2 vezes mais.

O sedimento foi então ressuspensionado em 25 mL de Glicerol 10%, estéril e gelado, e submetido a uma última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C. O sedimento final foi ressuspensionado em 1 a 2 mL de glicerol 10% gelado, para ficar numa OD<sub>600nm</sub> de 200

a 250. As células foram alíquotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80 °C.

Para a transformação, a alíquota de células foi descongelada lentamente em gelo e o DNA foi adicionado às células competentes e misturado lentamente, evitando fazer múltiplas pipetagens. A mistura de DNA e células foi imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioAgency®), também já resfriada, e deixou-se uns minutos para o DNA se misturar bem na solução. A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25  $\mu$ F e 200  $\Omega$ , no aparelho *Gene Pulser* com *Pulser Controller* da BioRad. O  $\tau$  esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 milissegundos.

Imediatamente após o choque a cubeta lavou-se com 3 mL de meio SOC (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) 98mL, Solução estoque de  $Mg^{2+}$  2 M 1 mL, Solução estoque de glicose 2 M 1 mL) e transferiu-se o meio recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL. Após uma incubação de 1 h a 37 °C e 250 rpm, diluições da transformação foram semeadas em placas de LB-ágar (Peptona de caseína 1,0% (p/v), Extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1,0% (p/v), pH 7,0, ágar bacteriológico 1,4% (p/v)), contendo o antibiótico apropriado, e as placas foram mantidas na estufa a 37 °C, durante a noite.

### ***3.7 Amplificação das sequências variáveis leves humanas (VLs) por reação em cadeia da polimerase (PCR)***

Para a amplificação das sequências variáveis leves humanas, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso. Para a clonagem das sequências no vetor de expressão pET28a, foram adicionados sítios de corte para as enzimas de restrição *Bgl* II e *Nco* I, nos iniciadores. No iniciador senso foi inserida o sitio para a enzima *Bgl* II (sequência sublinhada) (5'-AGATCTGGCGGCGGCGGA-3'), e no anti-senso inseriu-se o sitio para *Nco* I (sequência sublinhada) (5'-CATGGAAAGACAGATCGTGCAGCC AAGG-3').

As amplificações das sequências de VLs foram realizadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), usando como molde o DNA da biblioteca de Fab de imunoglobulinas humanas (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005). Em cada reação adicionaram-se 50 ng de DNA genômico; 1 mM de dNTP; 2 mM de  $MgCl_2$ ; 1U de *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (ThermoFisher) e o tampão da polimerase 1X. As PCRs foram realizadas em termociclador, da seguinte forma: Desnaturação inicial do DNA a 95 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a



95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 65 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e uma etapa de extensão final a 72 °C por 5 min.

### ***3.8 Seleção da biblioteca***

#### ***3.8.1 Preparação do Fago Auxiliar VCSM13. (Adaptado de BARBAS III et al., 2001)***

Foram inoculados 2 µL de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes (preparadas como descrito no item 3.6.2) em 5 mL de meio SB contendo tetraciclina a uma concentração final de 10 µg/mL e incubados a 37 °C, por 1 hora em agitador a 250 rpm. Durante este tempo, foram preparadas diluições do fago auxiliar VCSM13 da ordem de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup>. Em seguida, 2 µL de cada uma destas diluições do fago foi utilizado para infectar alíquotas de 100 µL da cultura de XL1-Blue. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL das células infectadas a 3 mL de meio LB top ágar liquefeito (45-50°C), misturando o tubo por inversão e, logo após espalhando em placas de meio LB-ágar. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite. Após esse período foram observadas placas de lise (colônias de bactérias com retardo no crescimento devido à infecção pelo fago VCSM13).

#### ***3.8.2 Amplificação de Placas de Lise***

Em um tubo de centrifuga de 50 mL contendo 10 mL de meio SB pré-aquecido a 37 °C, adicionado de 10 µg/mL de tetraciclina, foram inoculados 10 µL de XL1-Blue eletrocompetentes (protocolo 3.6.2). A cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação a 250 rpm, até atingir uma OD<sub>600nm</sub> de 0.8 – 1.0. Uma vez alcançada a OD desejada, com auxílio de uma ponteira estéril, transferiu-se uma placa de lise, obtida no procedimento anterior, para a cultura de XL1-Blue, e deixou-se em incubação nas mesmas condições por 2 horas. Posteriormente, a cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 2 L, contendo 500 mL de meio SB pré-aquecido a 37 °C, acrescido de 70 µg/mL de canamicina. A cultura foi incubada a 37 °C durante a noite, sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos de 50 mL e centrifugada a 2.500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e incubados a 70 °C, por 20 minutos, com o objetivo de eliminar células ainda vivas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente a 2.500 x g por 15 minutos e os sobrenadantes transferidos para novos tubos e estocados a 4°C.

### 3.8.3 Determinação do Título da Preparação de Fagos Auxiliares

O título do preparado de fago foi obtido a partir do mesmo procedimento de infecção para obtenção das placas de lise (como descrito no item 3.8.2). Após a incubação durante a noite, o título foi determinado pela contagem do número de placas de lise presentes multiplicados pela diluição do fago.

### 3.8.4 Ligação da Biblioteca de sequências codificadoras de cadeias variáveis (VLs).

**Tabela 1: Ligação da Biblioteca de sequências codificadoras de cadeias variáveis (VLs) no vetor pGEM®-T Easy.**

Reagente	Reação Standard	Controle positivo	Controle negativo
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL	5 µL	5 µL
pGEM®-T Easy Vector	1 µL	1 µL	1 µL
Produto da PCR	X µL (variável)	---	---
DNA controle	---	2 µL	---
T4 DNA Ligase	1 µL	1 µL	1 µL
Água Mili-Q	10 µL	10 µL	10 µL

Foram feitas várias ligações numa razão de 1:5, vetor:inserto, com a finalidade de obter uma maior variabilidade após a transformação das células eletrocompetentes.

As ligações foram incubadas durante a noite a 16 °C, na manhã seguinte foram precipitadas com a adição de 0,375 µL de glicogênio, 5 µL de acetato de sódio 3 M e 110 µL de etanol, seguido de incubação a -80 °C, durante a noite. Em seguida, a biblioteca precipitada foi centrifugada a 14.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol 70% (v/v), logo após foi secado e ressuspenso em 15 µL de água, incubando-se a 37°C rapidamente.

O volume foi dividido em cinco partes de 3 µL, e cada uma incubada em gelo com uma alíquota de XL1-Blue eletrocompetente, durante 2 min. Seguidamente, cada alíquota foi transferida para uma cubeta de eletroporação. As células foram então submetidas à eletroporação nas seguintes condições: voltagem de 2,5 kV, 25 µF de capacitância e 200 Ω de resistência, gerando pulsos de cerca de 4 a 5 milissegundos de duração.

Logo após o choque, adicionou-se 1 mL de meio SOC à cubeta, repetindo-se este processo por mais duas vezes. O mesmo foi feito com as 5 cubetas, o total de 15 mL de meio com as células transformadas foi colocado em um tubo de centrifuga de 50 mL e

incubado a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, por 1 hora. O mesmo procedimento foi feito com as ligações controles.

Foram semeadas 100, 10 e 1 µL do meio com as células, em placas de LB-ágar contendo ampicilina/IPTG/X-Gal, para no dia seguinte ser determinada a eficiência da transformação. O restante das células foi deixado para crescer nas mesmas condições durante a noite com a finalidade de amplificar os plasmídeos. E paralelamente foram também incubados em placa de petri os controles da ligação.

No dia seguinte foram contadas as colônias brancas (indicando que contém o vetor dentro) de cada placa, e foi feito o cálculo da eficiência de transformação da biblioteca de cadeias variáveis leves humanas (VLs).

Para medir a eficiência da transformação foi usada a seguinte equação:

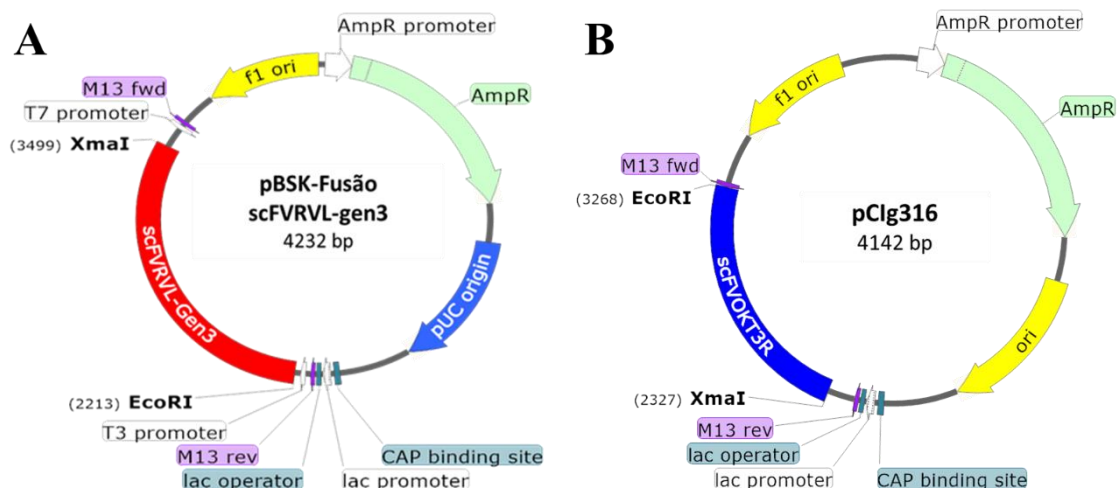
$$\frac{\text{Numero de colônias}}{\text{Quantidade de DNA}} \times \frac{10^3 \text{ ng}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{\text{Vol. total transformação}}{\text{Vol. células plaqueadas}} = \text{Ufc}/\mu\text{g}$$

### **3.8.5 Sequenciamento de colônias transformadas com o vetor pGEM®-T Easy.**

Para verificar a variabilidade das sequências amplificadas por PCR e depois clonadas no vetor pGEM®-T Easy, foram feitas culturas de 20 clones aleatórios, escolhidos das placas que foram crescidas durante a noite, após a transformação. Posteriormente, foi feita uma extração de DNA plasmidial em pequena escala, usando o kit QIAprep Spin Miniprep Kit - (QIAGEN, catálogo: 27106). Após a quantificação, as amostras foram enviadas para sequenciamento por Sanger.

### **3.8.6 Digestão e ligação do inserto sintético contendo a sequência scFvRVL-gen 3 no fagomídeo pCIg316.**

Foram feitas digestões com as enzimas *Xma* I e *EcoR* I, para cortar o vetor e o inserto necessários para formar o vetor de expressão pCIg316-scFvRVL-gen 3, o qual foi usado para os experimentos de *Phage display*. O plasmídeo contendo o gene sintético pBSK-Fusão scFVRVL-gen3 (4232 pb) (Figura 16A) foi digerido com as enzimas de restrição *Xma* I e *EcoR* I, para cortar o inserto. Para obter o vetor, o fagomídeo pCIg316 (4142 pb) (Figura 16B) foi digerido com *Xma* I e *EcoR* I.



**Figura 16: Representação esquemática dos plasmídeos utilizados para obter o vetor e o inserto, para criar o vetor de expressão pCIg316-scFvRVL-gen 3. A:** Vetor pBSK-Fusão scFVRVL-gen3 mostrando os sítios de corte de *Xma* I e *Eco* R I, para retirar o fragmento scFVRVL-gen3; **B:** Vetor pCIg316 (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001) com os sítios de corte de *Xma* I e *Eco* R I, para retirar o inserto scFvOKT3R, e obter o vetor.

O vetor e o inserto foram ligados numa razão molar de 1:5, vetor:inserto, com o objetivo de obter o vetor recombinante pCIg316-scFvRVL-gen 3. Para a clonagem usaram-se 200 ng do inserto, 100 ng do vetor, 2U da enzima *T4 DNA Ligase* (Promega), e tampão da enzima 1X. O sistema de ligação foi incubado a 16 °C durante a noite. A seguir, o plasmídeo recombinante foi transformado em células competentes de *E. coli* XL1-Blue. As células transformadas foram semeadas em placas de LB-ágar contendo ampicilina/IPTG/X-Gal, e incubadas a 37 °C, durante a noite.

Foram selecionadas colônias aleatórias para serem crescidas em tubos com 5 mL de meio LB adicionado de ampicilina, a 37 °C, durante a noite. No dia seguinte, foi feita a extração de DNA plasmidial, com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit - (QIAGEN, catálogo: 27106) para a análise de restrição enzimática e confirmação da clonagem. Os clones foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Pvu* I, já que a enzima *Xba* I corta dentro do inserto. Uma vez feitas as digestões, o DNA foi analisado por eletroforese em gel de poli-acrilamida 1%.

### 3.8.7 Ligação da Biblioteca de VLs no vetor pCIg316-scFvRVL-gen 3 e transformação por eletroporação.

Uma vez foi confirmada a clonagem do vetor pCIg316-scFvRVL-gen 3, foi feita uma digestão com as enzimas *Bgl* II e *Nco* I, com a finalidade de extrair as sequências de

VLs humanizadas, e ligar as sequências de VLs humanas amplificadas anteriormente, no vetor pGEM®-T Easy (Promega). A ligação foi feita com uma razão vetor:inserir de 1:5. 500 ng das VLs digeridas, 1 µg do vetor, 2U de enzima *T4 DNA Ligase* (Promega), e tampão da enzima 1X. A ligação foi incubada a 16 °C, durante a noite, e na manhã seguinte foram precipitadas com a adição de 0,375 µL de glicogênio, 5 µL de acetato de sódio 3M e 110 µL de etanol seguido de incubação a -80 °C durante a noite. Em seguida, a biblioteca precipitada foi centrifugada a 14.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70% (v/v), secado e ressuspendido em 30 µL de água incubando-se a 37 °C rapidamente. O volume foi dividido em dez partes de 3 µL e cada uma incubada em gelo com uma alíquota de XL1-Blue eletrocompetente (150 µL) durante 2 min. Seguidamente, cada alíquota foi transferida para uma cubeta de eletroporação. As células foram então submetidas a eletroporação nas seguintes condições: voltagem de 2,5 kV, 25 µF de capacitância e 200 Ω de resistência, gerando pulsos de cerca de 4 a 5 milissegundos de duração.

### ***3.8.8 Amplificação da biblioteca inicial de fagos recombinantes***

Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio SOC a cada cubeta, repetindo-se este processo por mais duas vezes, o mesmo foi feito com as 10 cubetas, o total de 30 mL de meio com as células transformadas foi colocado em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 37°C, sob a agitação de 250 rpm, por 1 hora.

Foram semeadas 100, 10 e 1 µL de células em meio LB-ágar, adicionado de carbenicilina na concentração final de 25 µg/mL, para no dia seguinte ser determinada a eficiência da transformação usando a fórmula do item 3.8.4. E paralelamente, foram também incubados em placa de petri com meio LB-ágar, contendo os antibióticos nas mesmas concentrações, os controles da ligação.

Ao restante da cultura foram adicionados 10 mL de meio SB pré-aquecido e suplementado com 20 µg/mL de carbenicilina e 20 µg/mL de tetraciclina. A cultura ficou sob agitação de 250 rpm a 37 °C, por 1 hora, em seguida, foi adicionada carbenicilina para uma concentração final de 50µg/mL; a cultura foi mantida por mais uma hora nas mesmas condições. Os 40 mL de cultura foram transferidos para um erlenmeyer de 1 L contendo meio SB pré-aquecido para um volume final de 200 mL, contendo 50 mg/mL de carbenicilina, 10 µg/mL de tetraciclina e 1% de glicose. Foram adicionados também 2 mL de fago auxiliar VCSM13 ( $1 \times 10^{13}$  ufp/mL) e a cultura foi incubada sob agitação a 300 rpm, 37 °C, por 2 horas. Logo após, foi adicionado antibiótico canamicina numa

concentração final de 70 µg/mL, a cultura foi deixada para crescer durante a noite, sob as mesmas condições.

No dia seguinte a cultura foi centrifugada a 6.000 x g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e o sedimento foi estocado para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foi adicionado 4% (p/v) de PEG 8000 e 3% (p/v) de NaCl, a fase sólida foi dissolvida por agitação a 250 rpm, por 5 min a 37 °C, e depois o sobrenadante foi incubado no gelo por 30 min. A solução foi centrifugada a 6.200 x g a 4 °C, durante 40 minutos, o sobrenadante foi descartado, e os tubos foram deixados invertidos por 10 minutos sobre papel toalha para garantir a secagem do sedimento com as partículas virais. Finalmente, o sedimento foi ressuscitado com 2 mL de TBS-BSA 1% (p/v). Este volume foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 13.000 x g a 4 °C, por 5 minutos. Este procedimento foi repetido até não se observar restos de células no tubo. Os fagos foram transferidos para tubos de microcentrífuga novos, e armazenados a 4 °C, após adição de azida sódica 0,02%.

Esses são os fagos correspondentes ao ciclo 0 (fagos de entrada, *input*) do experimento de *Phage display*, e foram usados nos experimentos seguintes para a seleção dos melhores ligantes a CD3 humano.

### ***3.8.9 Seleção da biblioteca de VLS ligantes ao antígeno CD3 sintético por Phage display.***

Sensibilizaram-se dois poços de uma placa de microtitulação de 96 poços, com 200 ng de proteína (CD3) em TBS/BSA 1% (p/v), num volume final de 100 µL por poço e incubou-se por 1 hora a 37 °C. A solução foi descartada e incubou-se com 200 µL de solução de bloqueio (TBS/BSA 3%) por 1 hora a 37 °C.

Descartou-se a solução de bloqueio e incubou-se 100 µL dos fagos obtidos no protocolo anterior (fagos de entrada, *input*), por 2 horas a 37 °C. Paralelamente, foram inoculados 5 µL de XL1-Blue eletrocompetente em 5 mL de meio SB adicionado de 5 µL de tetraciclina (20 mg/mL) e incubou-se até atingir uma OD<sub>600nm</sub> de 0.7.

Descartou-se os fagos e adicionou-se 150 µL de Tween 20 0,5% (v/v) em TBS em cada poço e pipetou-se 5 vezes vigorosamente. Após 5 min, descartou-se esta solução e o ciclo de lavagem foi repetido por 5 vezes no primeiro *round*, 10 vezes no segundo e 15 vezes nos ciclos subsequentes. Após o último ciclo de lavagem, adicionou-se 50 µL do tampão de eluição ácida (100 mM glicina-HCl, pH 2,2). Incubou-se por 10 min a temperatura ambiente, pipetou-se 10 vezes vigorosamente e transferiu-se os fagos eluídos

para tubos de microcentrífuga contendo 3  $\mu\text{L}$  da solução neutralizante (2 M Tris). Em seguida, adicionou-se os 50  $\mu\text{L}$  de fagos eluídos à cultura de *E. coli* crescida no passo 3 e incubou-se a temperatura ambiente, por 15 min. Nesta etapa, foram reservados 100 $\mu\text{L}$  da infecção para usar na titulação do fago de saída (*output*).

Aos 2 mL que foram infectados com fagos adicionou-se 6 mL de meio SB pré-aquecido (37 °C), suplementado com 20  $\mu\text{g/mL}$  de carbenicilina e 10  $\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina. Incubou-se os 8 mL de cultura por 1 hora, a 37 °C /250 rpm. Adicionou-se carbenicilina para uma concentração final de 30  $\text{mg/mL}$ , e incubou-se por mais uma hora, nas mesmas condições anteriores. Nesta etapa foram inoculadas, em meio LB ágar adicionado de carbenicilina (30  $\mu\text{g/mL}$ ) e tetraciclina (30  $\mu\text{g/mL}$ ), diluições desta cultura para serem determinados os títulos dos fagos de saída (*output*). Paralelamente, foram também inoculadas, em LB-ágar adicionado de carbenicilina (30  $\mu\text{g/mL}$ ) e tetraciclina (30  $\mu\text{g/mL}$ ), diluições de uma cultura infectada por 15 min pelos fagos de entrada (*input*), para serem determinados seus títulos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de fago auxiliar VCSM13 ( $10^{12}$  a  $10^{13}$  ufp/mL) à cultura, e este volume foi transferido para um erlenmeyer de 1 L. Foram adicionados 91mL de meio SB pré-aquecido, 50  $\mu\text{g/mL}$  de carbenicilina, 10  $\mu\text{g/mL}$  de tetraciclina e glicose 1% (v/v). Esta cultura foi incubada por 2 horas, a 37 °C sob agitação de 300 rpm e, finalmente, acrescida de 70  $\mu\text{g/mL}$  de canamicina. A cultura foi crescida durante a noite, sob as mesmas condições.

No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 5000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para novos tubos e o sedimento bacteriano foi armazenado a -20 °C, para futuras extrações de DNA. Este procedimento de centrifugação foi repetido com o fim de eliminar o máximo possível de bactérias do meio. O sedimento das outras centrifugações não foi armazenado. O sobrenadante foi transferido para uma garrafa de centrífuga (500 mL) e adicionou-se PEG-8000 4% (p/v) e cloreto de sódio 3% (p/v). Para dissolver a fase sólida incubou-se a garrafa por 5 min a 37 °C /300 rpm. Finalmente, incubou-se no gelo por 30 min. A mistura foi transferida para tubos de centrifuga de 50 mL e centrifugado a 6200 x g por 40 min a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e os tubos foram colocados invertidos sobre uma toalha de papel por no mínimo 10 min e com o auxílio da toalha de papel retirou-se o excesso remanescente de líquido da boca dos tubos.

Finalmente, o sedimento foi ressuscitado com 2 mL de TBS-BSA 1% (p/v). Este volume foi transferido para tubos de microcentrífuga, e centrifugado a 13.000 x g a 4 °C, por 5 minutos. Este procedimento foi repetido até não observar restos de células no tubo.

Os fagos foram transferidos para tubos de microcentrífuga novos e armazenados a 4 °C, após adição de azida sódica 0,02%.

Os fagos obtidos nesse processo correspondem aos fagos do ciclo 1 amplificados, e serão usados como fagos de entrada no ciclo seguinte, para enriquecer os anticorpos com alta afinidade pelo antígeno. Estes passos foram executados por mais 4 vezes consecutivas originando os dados dos 5 ciclos de seleção.

#### ***3.8.10 Titulação dos fagos de entrada (input) e de saída (output)***

É recomendável que a titulação seja realizada no mesmo dia da respectiva seleção (*panning*). Estes procedimentos foram realizados durante os intervalos de incubação do item anterior.

##### ***Fagos de entrada***

A titulação dos fagos de entrada foi realizada com a suspensão de partículas virais que foram adicionadas na placa de seleção, portanto trata-se do “título de entrada”.

Foram preparadas três diluições da ordem  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$  da mesma suspensão de fagos recombinantes (não selecionados) que foi adicionada na placa de 96 poços do passo 3 do item anterior. Alíquotas de 200  $\mu$ L de células XL1-Blue (OD<sub>600nm</sub> 0.8 – 1.0), foram infectadas com 2  $\mu$ L de cada uma das diluições, e deixadas em incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, foram semeados 1, 10 e 100 $\mu$ L de cada uma destas diluições em placas de LB ágar suplementado com 50  $\mu$ g/mL de carbenicilina e 1% de glicose (v/v), e colocadas para crescer em estufa a 37 °C, durante a noite.

##### ***Fagos de saída***

Foi realizado com os 100 $\mu$ L de infecção reservados no item anterior, sendo portanto as partículas virais selecionadas recuperadas após a seleção na placa. Trata-se do “título de saída”.

Foram preparadas diluições da ordem  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  da suspensão de células infectadas e reservadas. Então, foram semeados 1, 10 e 100 $\mu$ L de cada uma destas diluições em placas de LB ágar suplementado com 50 $\mu$ g/mL de carbenicilina e 1% de glicose (v/v), e colocadas para crescer em estufa a 37°C durante a noite.

O valor dos títulos é calculado multiplicando-se o número médio de colônias obtidas pela diluição e pelo volume da infecção.



### **3.9 Sequenciamento de alto desempenho (NGS – Next generation sequencing)**

Após a seleção por *Phage display*, foram feitas extrações de DNA plasmidial dos sedimentos celulares, que foram estocados após cada ciclo de seleção. Foram feitas reações de PCR, para amplificar as sequências codificadoras dos VLs humanos, selecionados. Os amplicons foram juntados e eluídos em gel de poliacrilamida 0,8% em tampão TAE 1X. Uma vez purificados com o kit QIAquick Gel extraction Kit - (QIAGEN, catálogo: 28706), foram submetidos à sequenciamento de nova geração (NGS), na plataforma *Illumina Miseq*. Foi realizado o sequenciamento a partir das duas extremidades (*paired end*) do tipo 2 x 250 pb, que permitia a obtenção de toda a sequência dos domínios de VLs humanos.

### **3.10 Análise do sequenciamento e seleção das melhores VLs**

Os dados gerados pelo NGS foram analisados na plataforma ATTLA (*Automated Tool For Immunoglobulin Analysis*), desenvolvida no Laboratório de Bioinformática da Universidade de Brasília (<http://attila.computationalbio.org/>) (SILVA, 2014). Inicialmente, foi avaliada a qualidade das sequências, usando o programa FastQC, o qual permite identificar problemas gerados pelo sequenciador ou durante a preparação da biblioteca. Depois foram filtradas com o software PRINSEQ, para remover as sequências de baixa qualidade e que não possuíam um tamanho adequado, em nosso caso aproximadamente 350 pb, correspondente ao tamanho do gene das VLs. O PRINSEQ foi usado também para converter do formato fastq para fasta, o qual foi usado nas seguintes etapas.

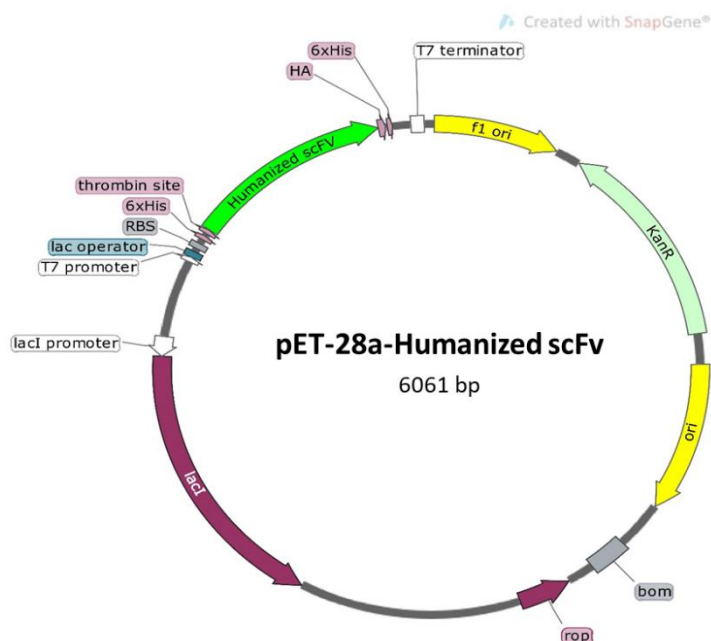
O número de *reads* de cada sequência de VLs foi contado no ciclo zero (biblioteca sem selecionar, *naïve*), e depois comparado com o número de *reads* da mesma sequência no quinto ciclo de seleção (fagos selecionados), desse jeito foi possível observar a quantidade de vezes que uma sequência selecionada tinha sido enriquecida durante o processo de seleção por *Phage Display*. Finalmente, o programa mostra o *fold-change* de cada sequência, o que permite saber que tanto a sequência foi enriquecida, entre o ciclo zero e o último ciclo de seleção.

### **3.11 Expressão das proteínas recombinantes**

Inicialmente foram feitos experimentos de produção das proteínas com duas linhagens diferentes, BL21 DE3 e *SHuffle*. Finalmente, foi escolhida a linhagem *SHuffle*

para a produção das proteínas recombinantes, vale lembrar que essa linhagem é modificada geneticamente para permitir a correta ligação das pontes dissulfeto no citoplasma, o que permite que o acúmulo de proteína na fração solúvel seja maior que em outras linhagens. A indução da produção se faz usando IPTG (LOBSTEIN et al., 2012).

Após o término da análise das sequências, foram escolhidas duas sequências do fragmento scFv, as quais foram enviadas para ser sintetizadas no vetor de expressão pET-28a (Figura 17). As sequências foram clonadas entre os sítios de restrição *Nde* I e *Xho* I. Este vetor possui dois marcadores de afinidade, o His-tag ( $\text{His}_6$ ) que fusiona-se nas regiões terminais de qualquer proteína clonada no pET-28a, sendo muito importante para o processo de purificação por IMAC usando resina de níquel, assim como a detecção no *Western Blot* e outros experimentos imunológicos, e a marca HA, a qual pode facilitar a detecção, isolamento e purificação por anticorpos específicos para a marca HA. É importante dizer que estes dois marcadores não parecem interferir com a bioatividade ou a biodistribuição da proteína recombinante.



**Figura 17: Vetor otimizado para produção de proteína em bactérias.** O vetor possui marcadores de seleção (His-Tag, HA) para a subsequente purificação da proteína.

Os plasmídeos foram transformados em células *SHuffle*, por choque térmico segundo o procedimento descrito no item 3.6.1. Foram semeadas alíquotas das células transformadas e cultivadas em placas de LB-ágar com Canamicina (50 µg/mL) e

Estreptomicina (30 µg/mL), e incubadas a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, foram feitos pré-inóculos de algumas colônias dessas placas, em 5mL de meio LB contendo Canamicina (50 µg/mL) e Estreptomicina (30 µg/mL), e cultivados a 37 °C, 250 rpm durante a noite. No dia seguinte, coletou-se uma alíquota de 500 µL que foi adicionada a 25 mL de meio LB com Canamicina (50 µg/mL) e Estreptomicina (30 µg/mL). O inóculo foi crescido a 37 °C, 250 rpm, até atingir uma OD<sub>600nm</sub> perto de 1. Uma vez atingida a OD desejada, foi adicionado IPTG nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM, para a indução da expressão das proteínas recombinantes. Porém, antes da adição de IPTG, uma alíquota de 1mL de cada cultura foi retirada para controle. Após a indução, as células foram deixadas para crescer durante a noite. Neste passo foram testadas duas temperaturas diferentes: 20 °C e 30 °C. Passado esse tempo foi retirada outra alíquota de 1 mL do meio de cada cultura. As duas alíquotas foram centrifugadas e o meio e o sedimento foram estocados separadamente a -20 °C.

Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL do tampão usado para preparar as soluções de Imidazol (20 mM fosfato de sódio, 0,5 M NaCl, pH 7,4) e sonicadas para lisar as células. As amostras foram sonicadas em água, com uma amplitude de 50, aplicando pulsos de 30 segundos, e dois minutos no gelo, para evitar o aquecimento das amostras. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm em microcentrífuga, por 15 minutos a 4 °C e mantidas no gelo durante todo o processo, separando dessa forma os *debris* celulares (fração insolúvel) e o sobrenadante (fração solúvel).

Inicialmente, a padronização da produção foi feita com quatro proteínas clonadas no vetor pET28a. As quatro proteínas são as seguintes: Proteína Mur (corresponde à VH-VL do anticorpo murino OKT3); proteína RVL (corresponde ao VH humanizado com a mudança no aminoácido 86, e a VL humanizada); proteína RH1 (corresponde ao VH humanizado com a mudança no aminoácido 86, e a primeira sequência de VL humana, obtida pela seleção de *Phage Display*); proteína RH2 (corresponde ao VH humanizado com a mudança no aminoácido 86, e a segunda sequência de VL humana, obtida pela seleção de *Phage Display*).

Nos últimos meses, para a produção das proteínas foi utilizado um protocolo diferente, já que a quantidade de proteína obtida inicialmente foi pouca, e não foi suficiente para continuar com os testes de ligação. Foram escolhidas as 4 proteínas para serem expressas (Mur, RVL, RH1, RH2). Para isso foi utilizado o meio TB (Triptona 12 g, Extrato de levedura 24 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,2 g, em 1 L de água destilada), o

qual é mais rico em nutrientes para o crescimento das células, e também, é um meio tamponado, que ajuda a manter um pH ótimo durante o crescimento celular.

Foi feito um pré-inóculo a 37 °C, crescido durante a noite a 250 rpm, em meio TB contendo canamicina 30 µg/mL. No dia seguinte foi feito o inóculo de 5mL em 1 L de meio TB + canamicina 30 µg/mL. A cultura foi crescida a 37 °C, 250rpm, até atingir uma OD600nm ~2.0. Finalmente, foi adicionado 0,5 mM IPTG e a cultura foi colocada para crescer a 20 °C, 200 rpm, durante a noite. No dia seguinte, as células foram centrifugadas a 5.000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as células armazenadas a -20 °C, até serem sonicadas.

### ***3.12 Purificação das proteínas recombinantes***

As proteínas que possuem o marcador de afinidade His-tag (His)<sub>6</sub> nos seus extremos terminais, foram purificadas por IMAC em colunas de níquel HisTrap<sup>TM</sup> HP (GE Healthcare) de 1 mL.

Culturas em grande escala (500mL) induzidas com 0,5mM de IPTG, foram aliquotadas para fazer as primeiras padronizações da purificação. Sedimentos celulares correspondentes a 100 mL de cultura, foram sonicados e centrifugados para separar a fração solúvel da fração insolúvel. As células foram ressuspensas em tampão de lise (20mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, pH 7,4) para serem sonicadas, foram aplicados 20 pulsos com uma amplitude de 50, pulsos de 10 segundos, seguidos de 50 segundos em gelo para resfriar a amostra. As amostras eram centrifugadas a 8.000 x g, por 30 minutos a 4 °C, para separar a fração solúvel, dos *debris* celulares.

Após a sonicação, o extrato solúvel contendo a proteína recombinante foi diluído em 50 mL de tampão de ligação (20mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4) e aplicado na coluna de níquel (previamente preparada de acordo as especificações do fabricante) (*HisTrap*<sup>TM</sup> HP (GE Healthcare)). Brevemente, a coluna foi tratada com 10 volumes de tampão de ligação (20mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4). Posteriormente o extrato solúvel foi purificado com um fluxo de 0,5 mL por minuto. A coluna foi lavada com 30 volumes de tampão de lavagem (20mM fosfato de sódio, 0,5M NaCl, 100 mM Imidazol, pH 7,4). Foi feita uma curva de eluição começando com 2 mL de 100 mM de Imidazol, até chegar a 1 M de Imidazol, para encontrar a concentração de Imidazol onde a proteína de interesse foi eluída de forma pura. Em cada etapa foram coletadas alíquotas de 1 mL, para análise em SDS-PAGE e *Western Blot*.

Uma vez purificadas todas as proteínas, alíquotas dos maiores picos de absorvância eram agrupadas e concentradas usando filtros de centrifuga *Amicon Ultra-2* (Amicon). Finalmente, as proteínas foram mantidas e estocadas em tampão PBS 1X (Solução stock 10X: NaCl 1,37 M, KCl 2,7 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 M, pH 7,4), a 4 °C.

### **3.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE**

As proteínas foram analisadas em gel de poliacrilamida (N'N'-bis-metileno-acrilamida e bis-acrilamida, 1:29) sob condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoetanol. As amostras analisadas, tanto os *debris* celulares quanto o sobrenadante da sonicação, foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE 2X e colocados para desnaturar a 100 °C, em banho seco, por 5 minutos. Do mesmo jeito foram preparadas as amostras dos sobrenadantes das culturas, para testar se as proteínas estavam sendo secretadas para o meio de cultura.

As amostras foram analisadas em géis de poliacrilamida 12%, usando tampão de corrida 1X, sob voltagem inicial de 30 V e depois aumentando até 80 V, dependendo do número de géis na cuba de eletroforese. Após a eletroforese os géis foram corados com Azul de *Coomassie*, bem como transferidos para membranas de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) para as análises de *Western Blot*. Como padrão foi usado o marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen) no caso da coloração com Azul de *Coomassie*, quando os géis eram para fazer o *Western Blot* foi utilizado como marcador o *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen).

### **3.14 Imunodeteção das proteínas (Western Blot)**

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) utilizando-se o sistema de transferência semi-seca com eletrodos de grafite (Pharmacia-LKB®), usando corrente elétrica de 150 mA, por 35 min.

Para conferir se a transferência das proteínas foi exitosa utilizou-se o marcador *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen), o qual pode ser visto diretamente na membrana de nitrocelulose.

Após este procedimento, a membrana, contendo as proteínas transferidas, foi incubada em solução de bloqueio (leite Molico em pó desnatado (5%) em PBST 1X), por

1h a temperatura ambiente, sob agitação leve ou a 4 °C durante a noite. A solução de bloqueio foi descartada e a membrana lavada 3 vezes com PBST 1X, a temperatura ambiente. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-His (Anti-His Tag produzido em camundongo, conjugado a fosfatase alcalina (AP), Catalogo: R932-25, Invitrogen) na diluição de 1:2000 por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação leve. Após essa etapa a membrana foi lavada 3 vezes com PBST 1X e uma vez com APB (Tris-HCl (pH 9,5) 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O 50 mM). Finalmente, foi adicionada a solução reveladora (NBT/BCIP).

O aparecimento das bandas coloridas foi controlado visualmente. Após a reação, a membrana foi lavada com água destilada em abundancia, até retirar o excesso de solução reveladora e interromper a reação da enzima. A membrana foi secada e preservada para análise.

### **3.15 ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)**

Para confirmar a ligação dos fragmentos de anticorpos no formato scFv ao antígeno CD3, foi realizado o ensaio de ELISA de ligação direta, em placas de microtitulação de 96 poços, *Nunc Maxisorp* da marca Thermo Scientific.

Após revelação as amostras foram medidas no comprimento de onda de 405 nm. Todas as incubações foram feitas a temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada por 16 h a temperatura ambiente.

1- Os poços de interesse na placa foram sensibilizados com o antígeno CD3, 200ng totais por poço, durante 1 hora.

2- Lavou-se 3 vezes com PBST 1X, 150 µL por poço.

3- Bloqueou-se com BSA 5%, 200 µL por poço, durante 1 hora.

4- Lavou-se 3 vezes com 150 µL PBST 1X e incubou-se com os anticorpos de interesse (Mur, RVL, RH1, RH2) e uma proteína Não Relacionada (NR, anticorpo anti-zika), nas seguintes concentrações: 1,25/2,5/5/10 µg/mL. Nesta etapa os poços controle foram incubados com PBS 1X. Tudo foi feito em diluições seriadas e em triplicatas. Incubou-se por 1 hora.

5- Lavou-se 3 vezes com 150 µL PBST 1X e incubou-se com o anticorpo Anti-HA (Anti-HA produzido em coelho, não conjugado. Sigma-Aldrich, Catalogo: SAB4300603-100UG), numa diluição 1:2.000, por 1 hora.

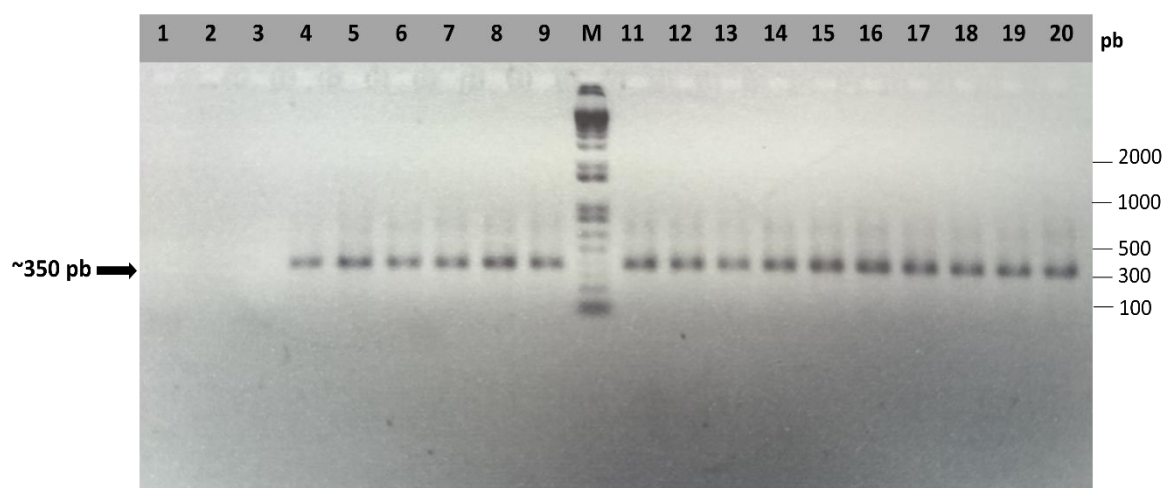
6- Lavou-se 3 vezes novamente com 150  $\mu$ L PBST 1X e foi feita uma nova incubação com o anticorpo anti-Coelho (Anti-Coelho produzido em cabra, conjugado a fosfatase alcalina (AP). Sigma-Aldrich, Catalogo: A8025-.5mL), numa diluição 1:5.000

7- Lavou-se 3 vezes com 150  $\mu$ L PBST 1X e 1 vez com 100  $\mu$ L de tampão para fosfatase alcalina (APB), e por último foi feita a revelação. Após 16 h a placa foi lida a 405 nm.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amplificação dos Segmentos Gênicos Codificadores de Domínios Variáveis Leves Humanas (hVLs)

Foram desenhados iniciadores com o objetivo de amplificar os fragmentos de domínios variáveis da cadeia leve (VL), a partir da biblioteca de Fab humana, previamente construída (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005) e cloná-los no vetor pGEM®-T Easy. Durante o processo foram inseridos sítios de clonagem (*Bgl* II e *Nco* I) flanqueando os produtos da reação de PCR, a fim de permitir a clonagem no vetor pCIg 316 (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001). A Figura 18 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 1%, onde é possível observar o fragmento de aproximadamente 350 pb, correspondente ao tamanho esperado de sequências codificadoras de VLs.



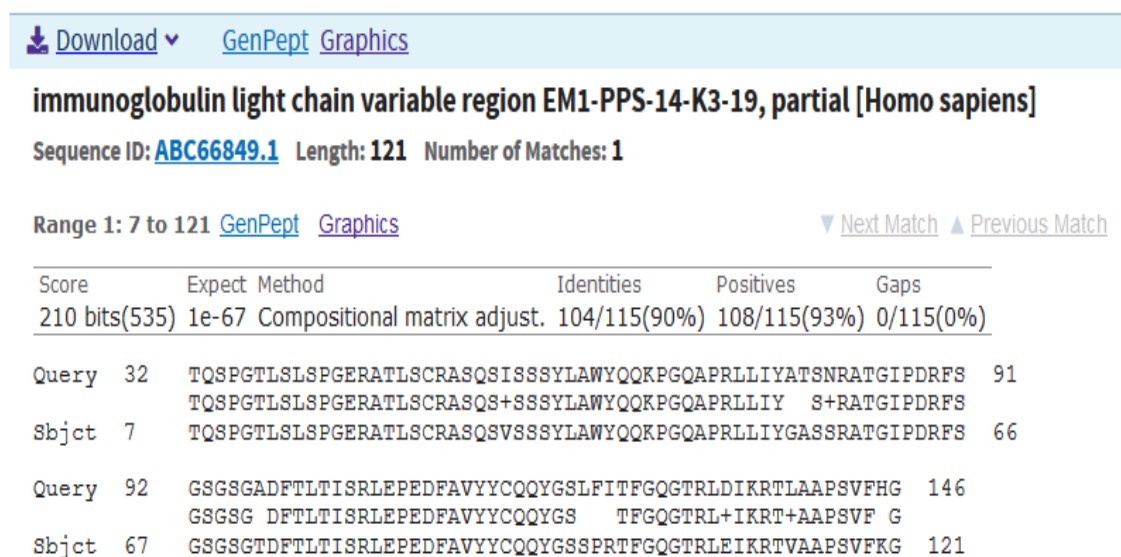
**Figura 18: Amplificação de fragmentos VL por PCR.** Biblioteca de fragmentos VLs amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1%. A seta indica o fragmento de DNA esperado de tamanho aproximado de 350 pb. 1: PCR controle, sem DNA; 2: controle sem iniciador 3'; 3: controle sem iniciador 5'; poços 4-20: reações de PCR; M: marcador de peso molecular 1kB plus (Invitrogen).

O produto final das PCRs foi adenilado nas extremidades 3' para posteriormente serem clonadas no vetor pGEM®-T Easy. Finalmente, foi feito as amostras foram reunidas e a banda correspondente de aproximadamente 350 pb foi extraída do gel, purificada e quantificada.



Após a clonagem das sequências de VLs no vetor pGEM®-T Easy, foi feita a transformação das células XL1-Blue eletrocompetentes por eletroporação, e determinada a eficiência da transformação e o tamanho da biblioteca de VLs. A contagem de colônias transformadas indicou o tamanho de  $1 \times 10^7$ .

Foram feitas extrações de DNA plasmidial de 20 clones escolhidos aleatoriamente, para posterior sequenciamento pelo método Sanger. As sequências geradas foram analisadas utilizando o serviço *Translate*, disponível na plataforma Expaty (<https://web.expasy.org/translate/>), para converter as sequências de nucleotídeos em proteínas, e BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para fazer alinhamento de sequências no GenBank. A análise confirmou que se tratavam de sequências de codificadoras de VL humanas, da superfamília de imunoglobulinas (Ig), com uma identidade de 90% (como exemplificada na Figura 19).



**Figura 19: Alinhamento da sequência de proteína de um clone.** A imagem mostra a análise feita no banco de dados do NCBI usando a ferramenta BLASTP, onde foi demonstrado que a sequência analisada possui a estrutura básica de uma VL humana, com um 90% de identidade.

Realizou-se a análise de similaridade das 20 sequências de VL obtidas, a partir de uma matriz de identidade (Clustal), onde foi possível confirmar a variabilidade das mesmas (LARKIN et al., 2007). Foi construída uma matriz de identidade, onde cada sequência foi comparada com ela mesma e com as outras. Essa análise mostrou que a variabilidade entre os 20 clones foi de 85%, sugerindo que a biblioteca era suficientemente variável para continuar os experimentos (Figura 20).

```
#
#
# Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1
#
#
```

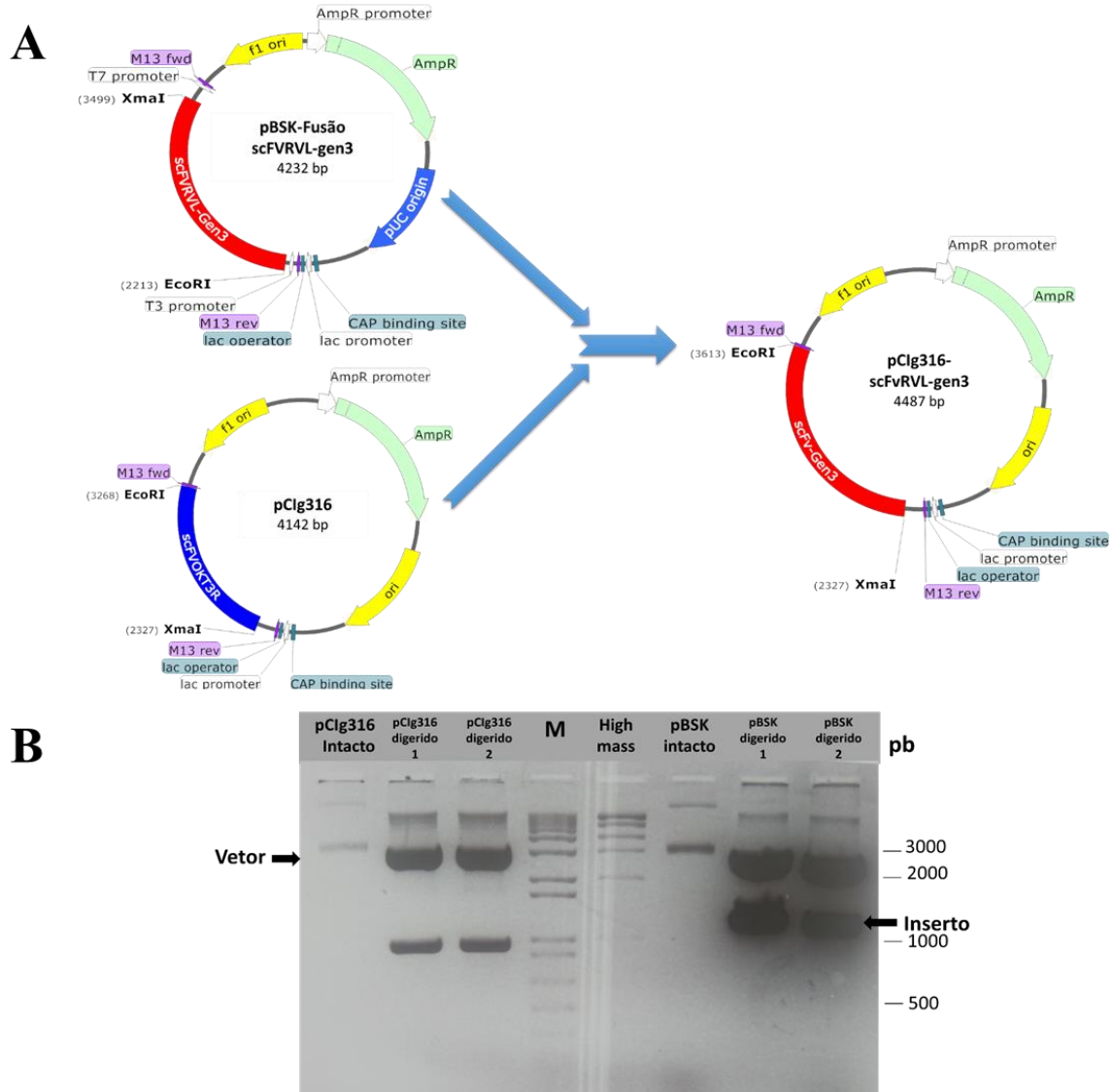
1: clone10	100.00	70.83	64.92	65.01	65.01	65.01	69.97	65.72	70.00	68.64	68.84	68.56	68.84	68.84	68.84	68.84	34.19	35.44	33.43	34.85
2: clone3	70.83	100.00	81.22	68.60	68.60	68.87	75.21	74.07	76.82	75.00	75.50	75.21	75.50	75.50	75.21	75.50	36.47	36.94	38.17	39.70
3: clone7	64.92	81.22	100.00	65.21	64.93	65.21	72.88	66.01	68.33	67.23	67.71	67.99	67.71	67.71	67.71	67.42	35.98	39.40	38.24	40.06
4: clone18	65.01	68.60	65.21	100.00	99.22	98.96	75.59	69.64	72.13	71.67	71.87	71.59	71.87	71.87	71.87	71.59	39.56	38.15	40.74	41.11
5: clone11	65.01	68.60	64.93	99.22	100.00	99.22	75.59	69.64	72.13	71.67	71.87	71.59	71.87	71.87	71.87	71.59	39.84	38.15	40.74	41.11
6: clone12	65.01	68.87	65.21	98.96	99.22	100.00	75.59	69.64	72.13	71.67	71.87	71.59	71.87	71.87	71.87	71.59	39.29	37.57	40.17	40.52
7: clone13	69.97	75.21	72.88	75.59	75.59	75.59	100.00	76.32	77.32	76.39	77.16	77.16	77.44	77.44	77.44	77.16	37.09	37.86	38.46	40.23
8: clone17	65.72	74.07	66.01	69.64	69.64	69.64	76.32	100.00	94.15	94.07	94.90	95.18	95.47	95.47	95.47	95.18	39.36	38.77	39.39	41.61
9: clone2	70.00	76.82	68.33	72.13	72.13	72.13	77.32	94.15	100.00	95.56	96.38	96.66	96.94	96.94	96.94	96.66	40.69	39.88	40.48	42.38
10: clone16	68.64	75.00	67.23	71.67	71.67	71.67	76.39	94.07	95.56	100.00	98.33	98.61	98.89	98.89	98.89	98.61	38.95	38.65	39.27	41.18
11: clone9	68.84	75.50	67.71	71.87	71.87	71.87	77.16	94.90	96.38	98.33	100.00	99.17	99.44	99.44	99.44	99.17	38.48	38.15	39.39	40.68
12: clone20	68.56	75.21	67.99	71.59	71.59	71.59	77.16	95.18	96.66	98.61	99.17	100.00	99.72	99.72	99.72	99.44	39.36	39.08	39.70	41.61
13: clone4	68.84	75.50	67.71	71.87	71.87	71.87	77.44	95.47	96.94	98.89	99.44	99.72	100.00	100.00	100.00	99.72	39.07	38.77	39.39	41.30
14: clone5	68.84	75.50	67.71	71.87	71.87	71.87	77.44	95.47	96.94	98.89	99.44	99.72	100.00	100.00	100.00	99.72	39.07	38.77	39.39	41.30
15: clone14	68.84	75.50	67.71	71.87	71.87	71.87	77.44	95.47	96.94	98.89	99.44	99.72	100.00	100.00	100.00	99.72	39.07	38.77	39.39	41.30
16: clone15	68.84	75.21	67.42	71.59	71.59	71.59	77.16	95.18	96.66	98.61	99.17	99.44	99.72	99.72	99.72	100.00	38.78	38.77	39.39	41.30
17: clone19	34.19	36.47	35.98	39.56	39.84	39.29	37.09	39.36	40.69	38.95	38.48	39.36	39.07	39.07	39.07	38.78	100.00	70.80	67.66	70.00
18: clone8	35.44	36.94	39.40	38.15	38.15	37.57	37.86	38.77	39.88	38.65	38.15	39.08	38.77	38.77	38.77	38.77	70.80	100.00	74.31	76.62
19: clone1	33.43	38.17	38.24	40.74	40.74	40.17	38.46	39.39	40.48	39.27	39.39	39.70	39.39	39.39	39.39	39.39	67.66	74.31	100.00	87.78
20: clone6	34.85	39.70	40.06	41.11	41.11	40.52	40.23	41.61	42.38	41.18	40.68	41.61	41.30	41.30	41.30	41.30	70.00	76.62	87.78	100.00

**Figura 20: Análise de matriz de identidade de 20 clones aleatórios.** Matriz Clustal, comparando cada clone com ele mesmo e com as outras seqüências. É possível observar 3 seqüências com valores de identidade iguais, os outros clones apresentavam diferença. A variabilidade calculada entre os 20 clones foi de 85%.

#### **4.2 Construção do Fagomídeo pCIg316-scFvRVL-gen3**

Para obter o plasmídeo pCIg316-scFvRVL-gen3, foi desenhado e sintetizado um gene codificando o scFv do anticorpo humanizado (VHRVL) fusionado ao gene III codificando a forma truncada da proteína III do fago M13 (aminoácidos 230-406) (SCOTT; BARBAS III, 2001) substituindo o gene selvagem (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001). O gene sintético foi fornecido comercialmente no vetor pBSK-scFVRVL-gen3 de 4232 pb. Este foi digerido com as enzimas de restrição *Xma* I e *Eco*R I, liberando o fragmento de 1286 pb (scFVRVL-gen3), correspondente ao gene que codifica para huVHR<sup>86</sup> e a VL humanizada, na forma de scFv, fusionado ao gene 3 truncado do bacteriófago.

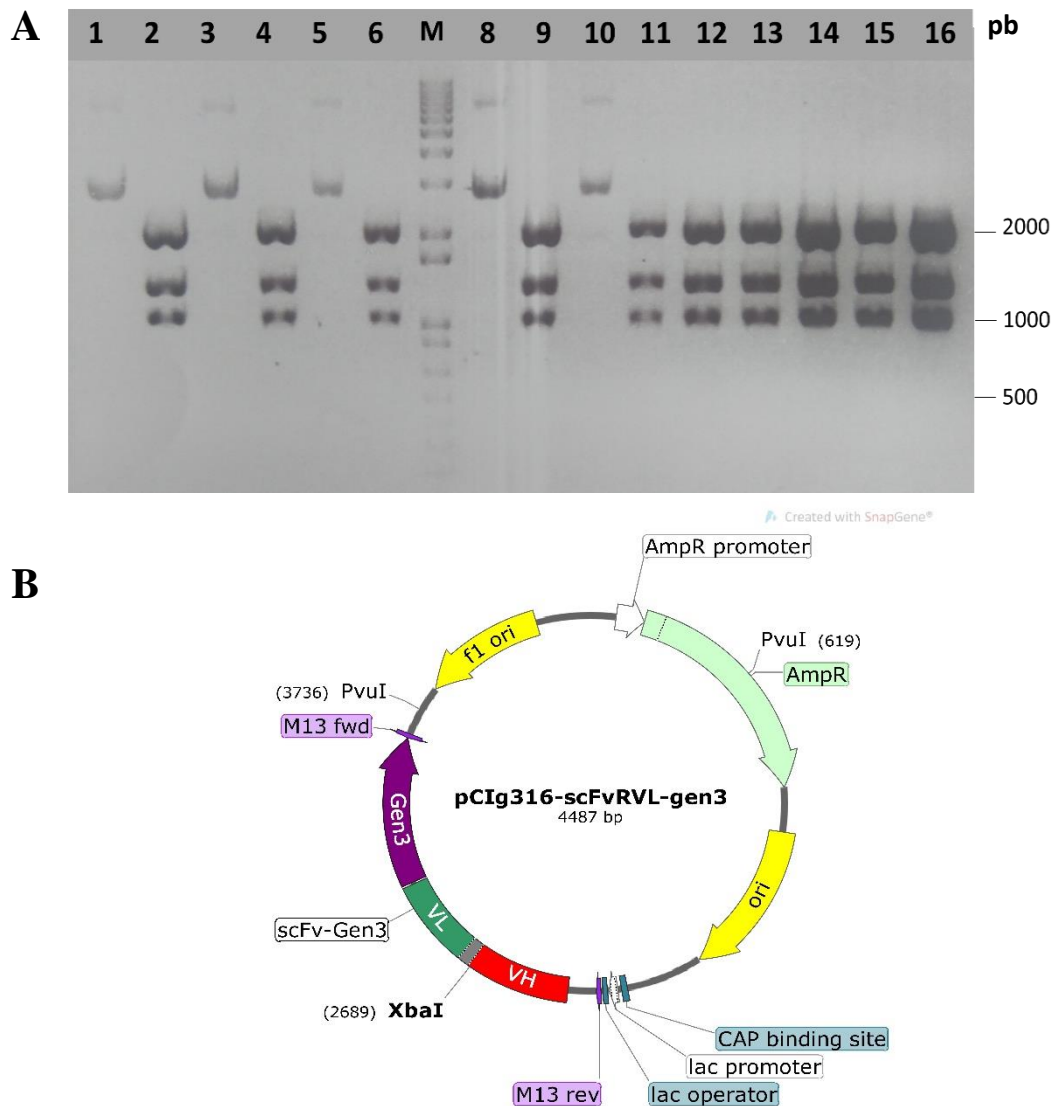
O fragmento foi eluído, a partir de uma eletroforese em gel de agarose 0,8%. A mesma digestão (*Xma* I e *Eco*R I) foi feita com o fagomídeo pCIg316 (4142 pb), obtendo-se o fragmento correspondente ao vetor de 3200 pb, eluído por eletroforese em gel de agarose 0,7% (Figura 21). Finalmente o inserto e o vetor foram ligados para formar o fagomídeo pCIg316-scFvRVL-gen3 (Figura 21) (4487 pb).



**Figura 21: Estratégia de obtenção do vetor pCIg316-scFvRVL-gen3.** **A.** Figura esquemática da clonagem da sequência codificadora do scFv anti-CD3 do plasmídeo pBSK-Fusão scFVRVL-gen3 no vetor pCIg 316. A digestão do inserto e o vetor foi feita com as enzimas *Xma* I e *EcoR* I. O inserto scFVRVL-gen3 (vermelho), foi subclonado no fagomídeo pCIg316, originando o fagomídeo pCIg316-scFvRVL-gen3. **B.** Análise eletroforética da digestão dos plasmídeos (pBSK-Fusão scFVRVL-gen3 e pCIg316) com as enzimas *Xma* I e *EcoR* I. As setas indicam os fragmentos correspondentes ao vetor e ao inserto. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen); *High mass* (Invitrogen): marcador de massa em ng. Amp R: gene de resistência a ampicilina.

O vetor pCIg316-scFvRVL-gen3, foi utilizado para transformar células de *E.coli* da linhagem XL1-Blue. Os clones transformantes foram aleatoriamente selecionados para validar a clonagem em análises subsequentes. Foi feita uma preparação de DNA em pequena escala para analisar cada clone e a inserção do gene foi confirmada por meio de digestão com as enzimas *Xba* I e *Pvu* I, já que a enzima *Xba* I corta dentro do inserto de

interesse (Figura 22B). As bandas obtidas são de tamanhos aproximados de 2070, 1370 e 1047 pb (Figura 22A). Finalmente foi escolhido um dos clones para continuar com os seguintes experimentos.



**Figura 22: Confirmação da obtenção do fagomídeo pCIg316-scFvRVL-gen3.** Os clones foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Pvu* I para confirmar que o inserto tinha sido clonado dentro do vetor. **A)** 1, 3, 5, 8, 10: Plasmídeo intacto; 2, 4, 6, 9, 11-16: Plasmídeo digerido, M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen); **B)** Representação esquemática do vetor, se mostram os sítios de corte das enzimas usadas (*Xba* I e *Pvu* I).

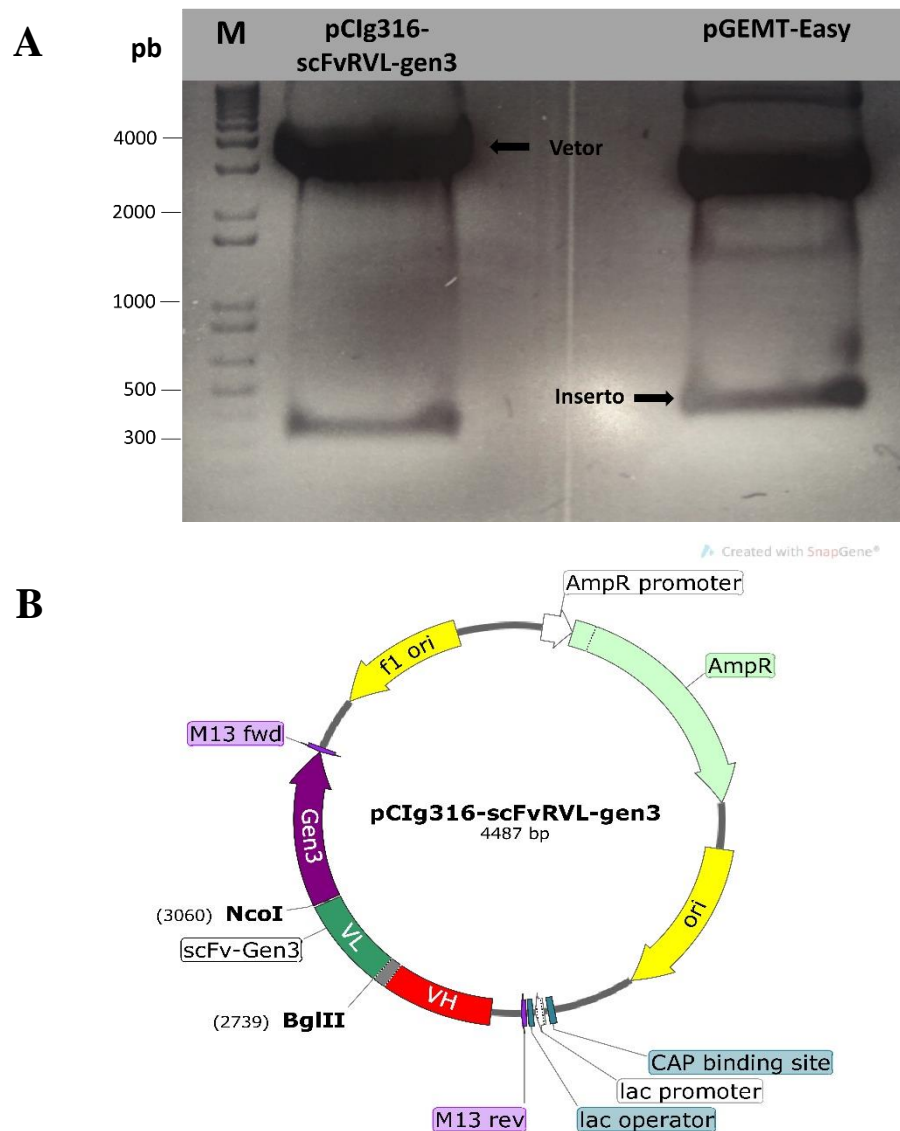
Com o objetivo de selecionar novas VLs humanas foi usada a técnica de *shuffling* de cadeia, onde uma das cadeias foi conservada e a outra foi trocada pelas diversas versões presentes na biblioteca. Nesse caso em particular foi feito o *shuffling* da cadeia VL e a

VH foi conservada. A VH sintética apresenta o genótipo humanizado VHR86, o qual já tinha sido demonstrado em trabalhos anteriores que mantinha a ligação ao antígeno (Costa, 2004; Silva *et al.*, 2009). Com esta estratégia espera-se que os fragmentos de anticorpos scFv produzidos apresentem a VHR combinada a milhões de variantes correspondentes aos segmentos gênicos das VLs humanas.

Com esse intuito foi feita uma preparação de DNA em mediana escala para obter maior quantidade do vetor pCIg316-scFvRVL-gen3. Foram feitas digestões duplas com as enzimas *Bgl* II e *Nco* I (Figura 23B); tanto com o vetor pCIg316-scFvRVL-gen3 (4487 pb), obtendo-se uma banda de um tamanho aproximado de 4137 pb, quanto na preparação de pGEM®-T Easy contendo a biblioteca de genes codificadores de VLs humanas, com um tamanho aproximado de 350 pb; previamente obtida, com a finalidade de retirar as sequências de VLs. Uma vez feitas as digestões e confirmações das mesmas, o vetor e o inserto foram eluídos a partir de um gel de agarose 1% (Figura 23A).

Após a eluição, os segmentos de VLs foram clonados no vetor pCIg316-scFvRVL-gen3. A ligação foi usada para transformar células pelo método de eletroporação (Métodos, sessão 3.2.6.2). Foi feita a contagem das colônias transformantes e obteve-se uma titulação para a biblioteca de  $1 \times 10^7$ , condizente com o que tinha sido encontrado anteriormente na biblioteca de pGEM®-T Easy.





**Figura 23: Análise eletroforética da eluição do vetor pCIg316-scFvRVL-gen3 e do pGEM®-T Easy. A)** Digestão dos plasmídeos com as enzimas *Bgl* II e *Nco* I. Poço 1: M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen) poço 2: Digestão do plasmídeo pCIg316-scFvRVL-gen3; poço 3: Digestão do plasmídeo pGEMT-Easy. As setas indicam o vetor e o inserto, respectivamente. **B)** Representação esquemática do vetor, se mostram os sítios de corte das enzimas usadas (*Bgl* II e *Nco* I).

#### 4.3 Seleção da biblioteca de sequências hVL por Phage Display

A seleção dos melhores ligantes ao CD3 se fez usando a técnica de *Phage Display*. O *Phage Display* foi feito como descrito nos Métodos, sessão 3.8.9. Na Tabela 2 são apresentados a titulação dos fagos obtidos em cada ciclo de seleção.

**Tabela 2: Título dos fagos obtidos durante a seleção por *Phage display*.**

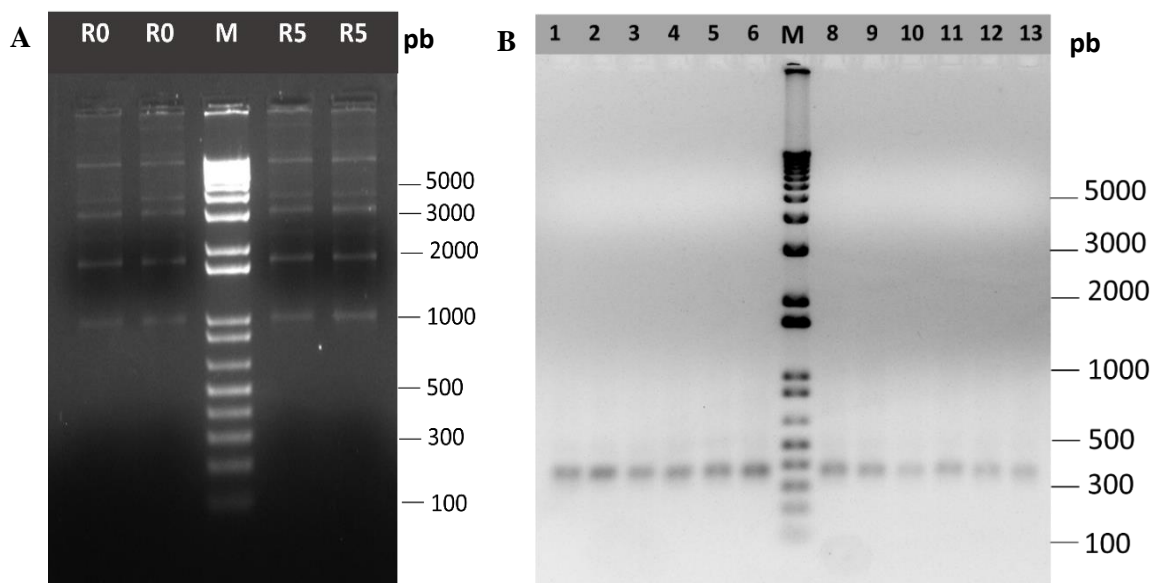
<b>Ciclo</b>	<b>N° de lavagens</b>	<b>Título de entrada (cfu/mL)</b>	<b>Título de saída (cfu/mL)</b>	<b>Entrada/Saída</b>
<i>1</i>	5	$5,05 \cdot 10^{10}$	$2,36 \cdot 10^4$	$2,14 \cdot 10^6$
<i>2</i>	10	$1,93 \cdot 10^{10}$	$6,12 \cdot 10^4$	$3,15 \cdot 10^5$
<i>3</i>	15	$3,50 \cdot 10^{10}$	$7,01 \cdot 10^4$	$4,99 \cdot 10^5$
<i>4</i>	15	$2,15 \cdot 10^{10}$	$5,06 \cdot 10^4$	$4,24 \cdot 10^5$
<i>5</i>	15	$2,2 \cdot 10^9$	$3,24 \cdot 10^5$	$6,79 \cdot 10^3$

Após a titulação, foi calculada a razão do título de fagos de entrada dividido pelo título de fagos de saída. Esta razão indica aproximadamente, o número de fagos removidos (de menor afinidade) para cada fago não removido (ligante ao alvo de maior afinidade) em cada ciclo. Com esses dados verificou-se que a titulação dos fagos retidos na placa aumentou em cada ciclo de seleção e principalmente no 5° ciclo, indicando que foram selecionados fagos ligantes ao antígeno CD3εγ, adsorvido na placa. O enriquecimento calculado de acordo a razão de Entrada/Saída, do ciclo 1/ciclo 5 foi de 315 vezes.

#### **4.4 Preparação de DNA para sequenciamento de alto desempenho (NGS)**

Os DNAs plasmidiais das células infectadas com fagos antes da seleção (ciclo 0, “biblioteca *naïve*”) e após 5 ciclos de seleção foram extraídos (Figura 24A). Os dois conjuntos de fagomídios foram utilizados para amplificar por PCR, os segmentos de DNA correspondentes aos domínios VLs, usando os iniciadores descritos nos Métodos, sessão 3.7. O tamanho dos fragmentos amplificados é de aproximadamente 350 pb (Figura 24B). A reação de PCR foi feita como descrito nos Métodos, sessão 3.7. A banda de interesse de cerca de 350 pb foi eluída e purificada para ser enviada a sequenciamento por NGS (*Next-Generation Sequencing*).



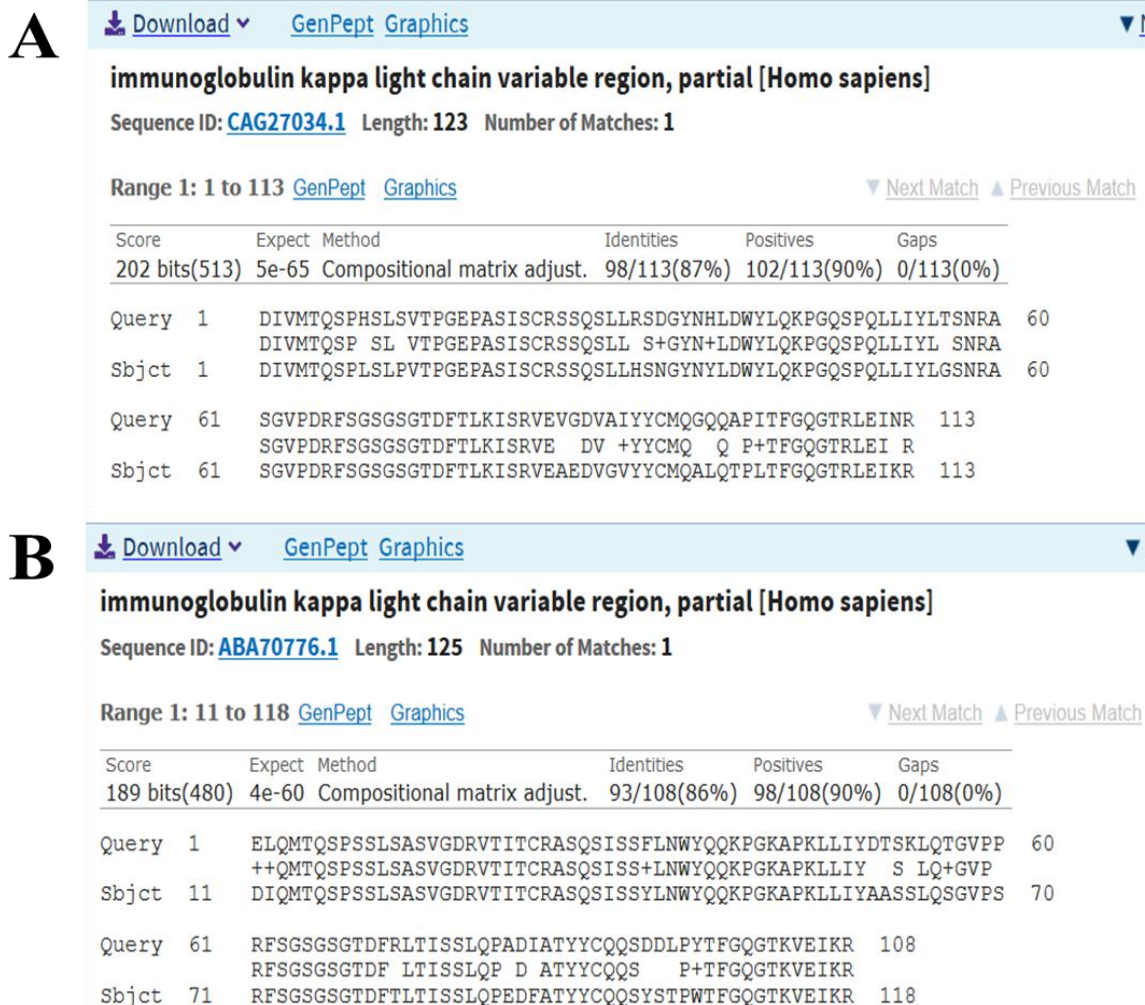


**Figura 24: Análise da extração do DNA dos fagomídios e amplificação das VLs em gel de poliacrilamida 0,8%.** A) Análise dos fagomídios obtidos a partir de células infectadas por fagos antes e após cinco ciclos de seleção. Poço 1, 2: R0: DNA extraído das células do ciclo 0; Poço 3, 4: R5: DNA extraído das células do ciclo 5; B) Obtenção de “amplicons” correspondentes as sequencias de VLs antes e após a seleção. 1-6: Amplificação das VLs do ciclo 0; 8-13: Amplificação das VLs do ciclo 5; M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen).

#### 4.5 Resultados do sequenciamento por NGS

Após realizar as análises usando a plataforma ATTILA, foram encontradas duas sequencias candidatas de VLs para serem produzidas e testadas, como ligantes a CD3 humano.

A primeira sequência apresentou um *fold-change* de 92,7, o que representa o enriquecimento dessa sequência específica durante o processo de seleção. A segunda sequência escolhida apresentou um *fold-change* de 67. Ambas sequencias foram traduzidas a proteínas e foi feito um alinhamento usando a plataforma BlastP, para confirmar que as sequencias correspondiam a VLs humanas (Figura 25). Uma vez feita a confirmação, as sequencias foram utilizadas para desenhar genes codificando os scFvs, contendo as hVLs selecionadas e o VHR, utilizando códons preferenciais para *E. coli*. Os genes sintéticos foram fornecidos já clonados no vetor de expressão bacteriana, pET28a.

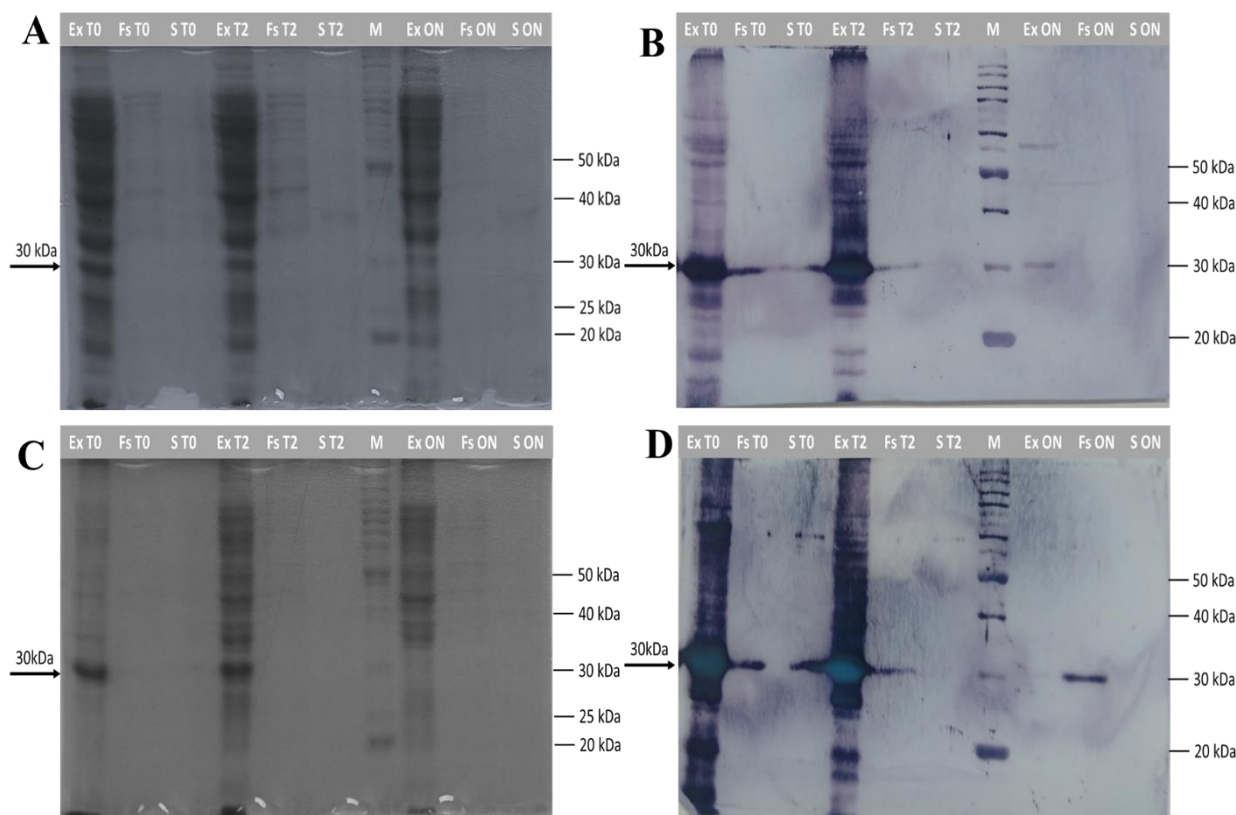


**Figura 25: Alinhamento das seqüências de proteínas das cadeias leves (VLs) humanas selecionadas por *Phage Display*.** A imagem mostra a análise feita no banco de dados do NCBI usando a ferramenta BLASTP. Ambas as sequências apresentam a estrutura básica de uma VL humana, da linha germinal kappa ( $\kappa$ ). A: alinhamento da primeira seqüência, 87% de identidade; B: Alinhamento da segunda seqüência, 86% de identidade.

#### 4.6 Produção e purificação dos fragmentos scFv

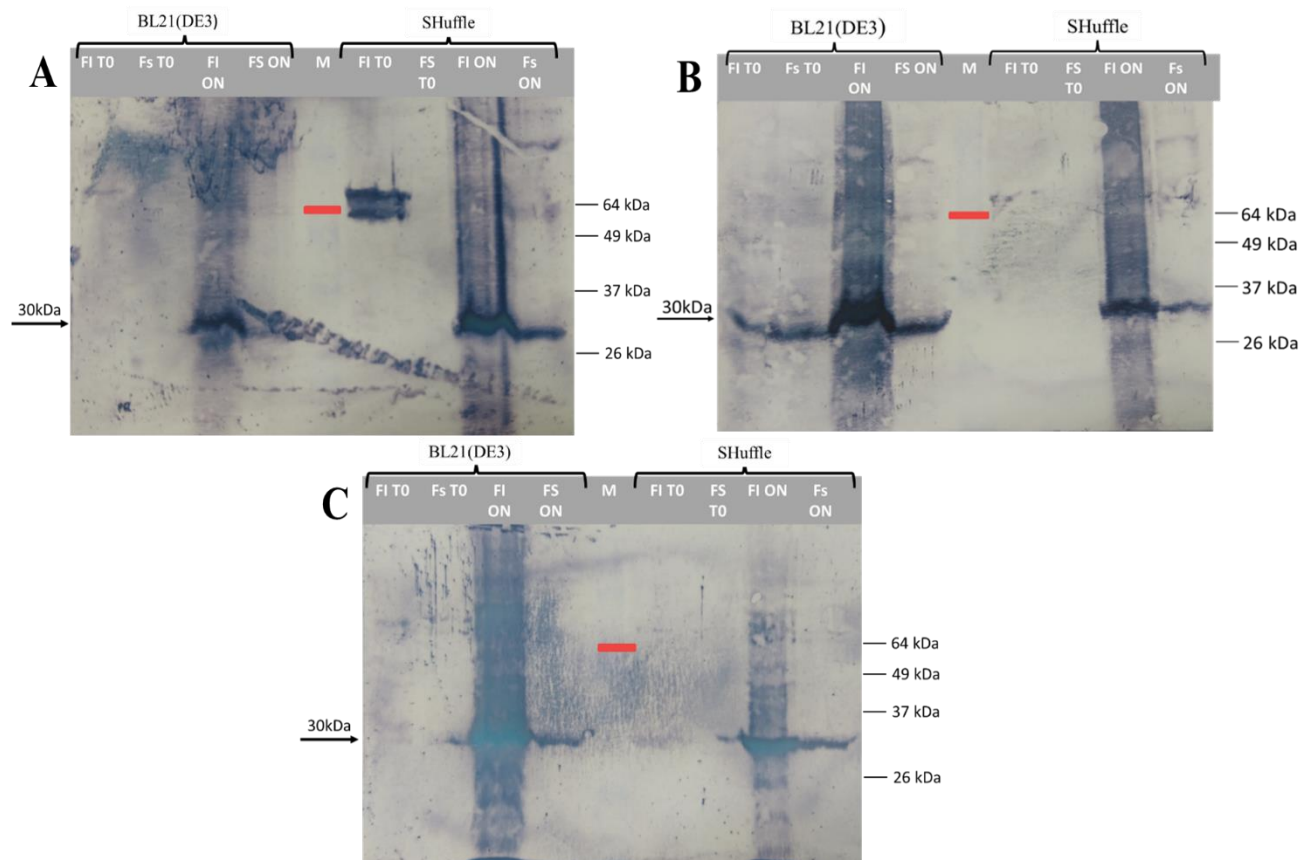
Inicialmente foram realizados testes com duas linhagens bacterianas de *E. coli*, BL21(DE3) e *SHuffle*, para escolher qual expressava melhor as proteínas recombinantes. A produção de proteínas foi realizada como descrito nos Métodos, sessão 3.11. Foi realizada uma cinética da indução, onde células foram coletadas em diferentes tempos, antes da indução com IPTG 1 mM (T0), duas horas depois da indução (T2), e *overnight* (ON). As células foram sonicadas e as proteínas obtidas do extrato celular total (fração insolúvel, Ex), da fração solúvel (Fs), e do sobrenadante da cultura (S) foram analisadas

por SDS-PAGE, como descrito nos Métodos, sessão 3.13, e por *Western Blot*, Métodos, sessão 3.14 (Figura 26).

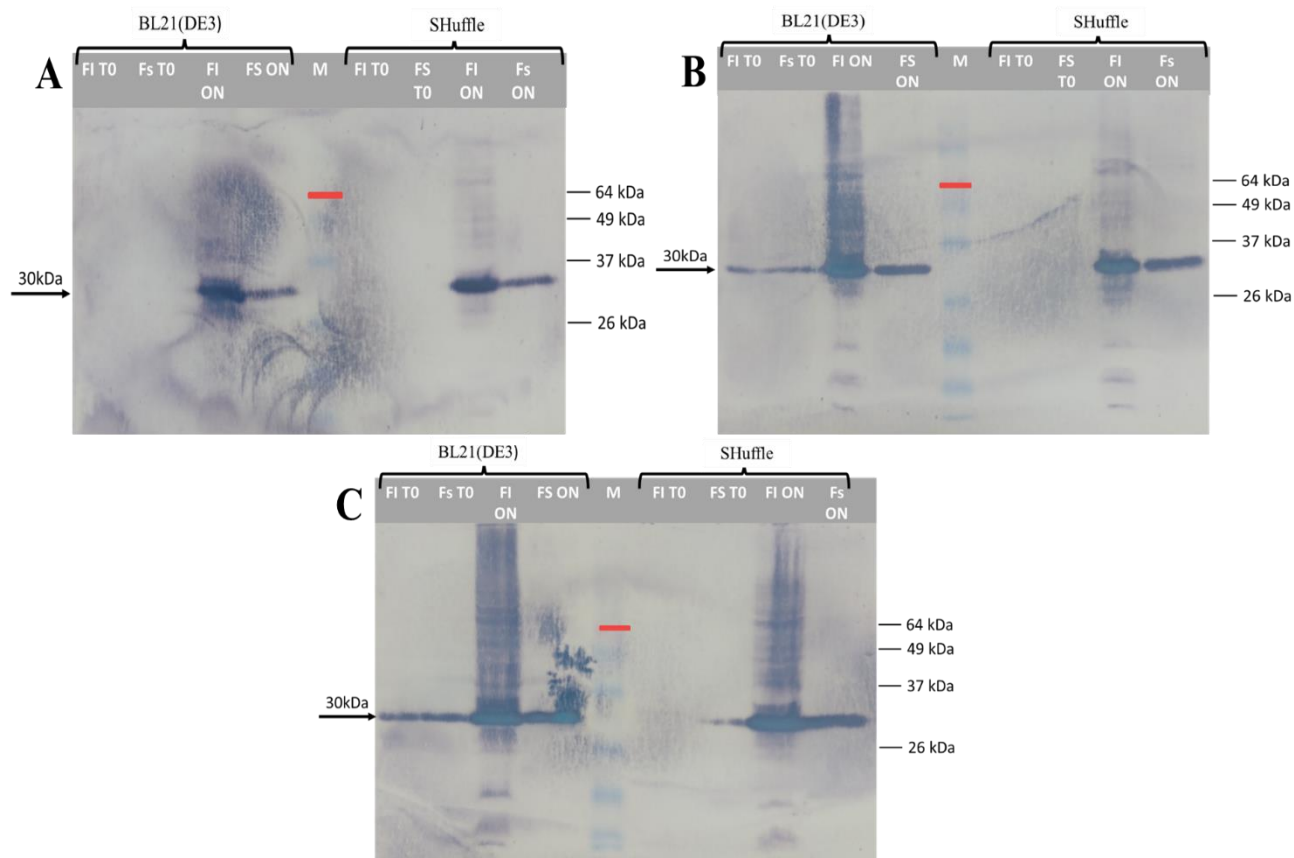


**Figura 26: Análise da produção da proteína recombinante RH1, nas linhagens BL21(DE3) e SHuffle, por SDS-PAGE e Western Blot.** Amostras correspondentes a indução das linhagens BL21(DE3) e SHuffle, com 1mM de IPTG, a 30°C. As setas indicam as bandas de 30 kDa, correspondentes aos scFvs. **A)** SDS-PAGE da proteína RH1 produzida na linhagem BL21(DE3); **B)** Western Blot da proteína RH1 produzida na linhagem BL21(DE3). **C)** SDS-PAGE da proteína RH1 produzida na linhagem SHuffle; **D)** Western Blot da proteína RH1 produzida na linhagem SHuffle. Ex: Fração insolúvel; Fs: Fração solúvel; S: sobrenadante da cultura; T0: Tempo zero; T2: duas horas depois da indução; ON: Overnight; M: Marcador BenchMark Protein Ladder (Invitrogen).

Paralelamente foram feitos experimentos de indução de produção das proteínas recombinantes a diferentes concentrações de IPTG (0,1, 0,5 e 1mM), e com duas temperaturas diferentes, 30 °C (Figura 27) e 20 °C (Figura 28), visando encontrar a temperatura ótima de indução, e a melhor concentração de IPTG, para se obter uma boa produção da proteína de interesse na fração solúvel. Foram testadas as duas linhagens de *E. coli* (BL21(DE3) e SHuffle). Foram analisadas amostras da fração insolúvel (FI) e da fração solúvel (Fs), antes da indução (T0) e Overnight (ON), das duas linhagens.



**Figura 27: Imunodeteção das proteínas recombinantes produzidas em BL21(DE3) e SHuffle, crescidas a 30 °C e induzidas com diferentes concentrações de IPTG.** Os fragmentos scFv foram reconhecidos por um anticorpo anti-His (Invitrogen), conjugado a fosfatase alcalina. As setas indicam as bandas de 30 kDa, correspondentes aos scFvs. As proteínas foram produzidas a partir de indução com IPTG a 0,1 mM (A), 0,5 mM (B) e 1 mM (C). FI: Fração Insolúvel; Fs: Fração solúvel; T0: Tempo zero; ON: Overnight; M: Marcador *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen).



**Figura 28: Imunodeteção das proteínas recombinantes produzidas em BL21(DE3) e SHuffle, crescidas a 20 °C e induzidas com diferentes concentrações de IPTG.** Os fragmentos scFv foram reconhecidos por um anticorpo anti-His (Invitrogen), conjugado a fosfatase alcalina. As setas indicam as bandas de 30 kDa, correspondentes aos scFvs. As proteínas foram produzidas a partir de indução com IPTG a 0,1 mM (A), 0,5 mM (B) e 1 mM (C). FI: Fração Insolúvel; Fs: Fração solúvel; T0: Tempo zero; ON: Overnight; M: Marcador *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen).

Após analisar os resultados dos experimentos de indução a diferentes temperaturas, concentrações de IPTG, e nas duas linhagens, decidiu-se trabalhar com a linhagem *SHuffle*, a qual apresentou uma maior quantidade de proteína na fração solúvel, e também menos produção de proteína antes da indução com IPTG.

A concentração de IPTG escolhida para as induções nos experimentos seguintes foi de 0,5mM (Figura 31B), uma vez que foi observado que com 1mM de IPTG, a concentração de proteína na fração insolúvel aumentou consideravelmente, e o nosso intuito era conseguir a proteína com um dobramento correto.

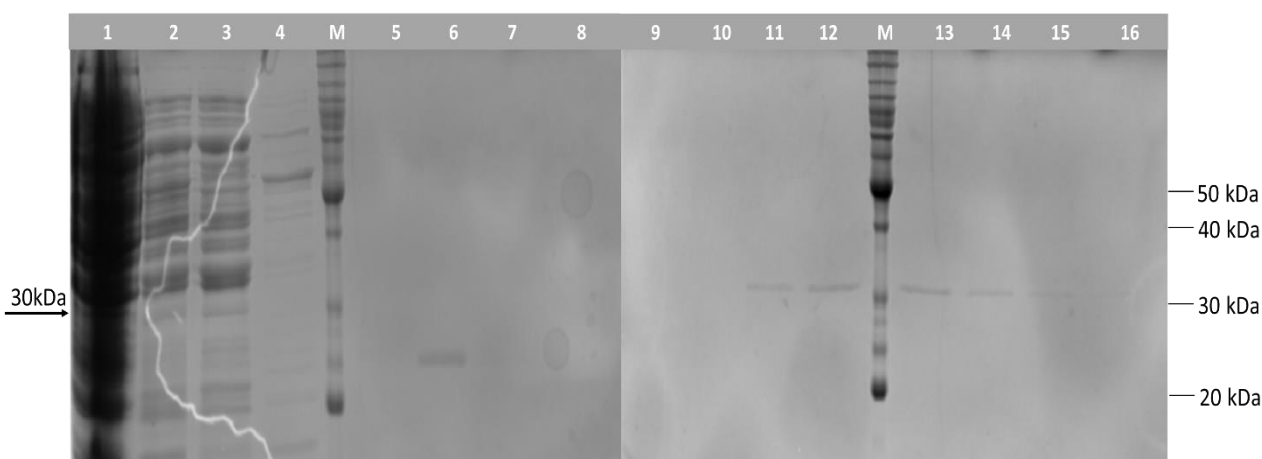
Também foi observado que na temperatura de 20 °C, o acúmulo de proteína na fração solúvel foi maior que a 30°C, já que a baixas temperaturas o crescimento das células acontece mais devagar. Por tanto, para os experimentos seguintes de produção e



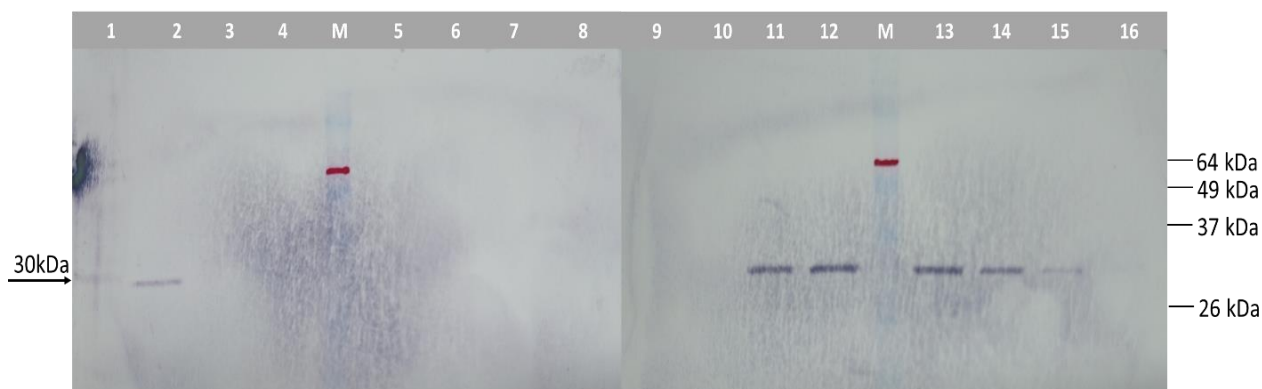
purificação das proteínas recombinantes foram usadas as seguintes condições: culturas de células *SHuffle*, crescidas até a OD<sub>600nm</sub> de 1, induzidas com 0,5mM de IPTG, crescidas *overnight* a 20 °C, sob agitação de 250 rpm.

A purificação da proteína, que apresenta o marcador de seleção *His-tag*, foi realizada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). Utilizou-se uma coluna de níquel HisTrap (GE) de 1 mL. Foram coletadas alíquotas de 1 mL em cada um dos passos da purificação, para serem analisados por SDS-PAGE (Figura 29) e *Western Blot* (Figura 30).

Os resultados obtidos após as purificações mostraram que a proteína RH1 foi eluída com 300mM de Imidazol (Figuras 29 e 30).

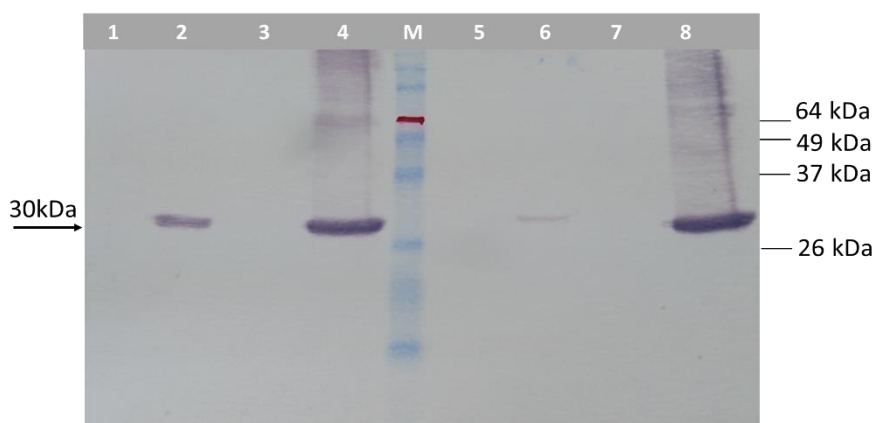


**Figura 29: Análise da purificação da proteína RH1 por SDS-PAGE.** Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. Culturas de linhagem *SHuffle*, induzidas com 0,5mM de IPTG, crescidas *overnight* a 20°C. Seta indicando as bandas correspondentes ao scFv de aproximadamente 30kDa. 1: Fração insolúvel; 2: Fração solúvel; 3: *Flow through* da fração solúvel; 4: *Flow through* do buffer 100mM Imidazol; 5, 6: Eluição com 100mM de Imidazol; 7-10: Eluição com 200mM de Imidazol; 11-14: Eluição com 300mM de Imidazol; 15,16: 500mM Imidazol; M: Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).



**Figura 30: Imunodeteção da proteína RH1 produzida em células *SHuffle* e purificada.** Os fragmentos scFv foram reconhecidos por um anticorpo anti-His (Invitrogen) conjugado a fosfatase alcalina. Seta indicando as bandas correspondentes ao scFv de aproximadamente 30kDa. 1: Fração insolúvel; 2: Fração solúvel; 3: Flow through da fração solúvel; 4: Flow through do buffer 100mM Imidazol; 5, 6: Eluição com 100mM de Imidazol; 7-10: Eluição com 200mM de Imidazol; 11-14: Eluição com 300mM de Imidazol; 15,16: Eluição com 500mM Imidazol; M: Marcador *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen).

Após várias purificações feitas para padronizar o processo, foi definido o seguinte protocolo: Lavagem da coluna com 10 volumes de Imidazol 10mM, purificação da fração solúvel a uma velocidade de 0,5 mL por minuto, lavagem com 30 volumes de Imidazol 100mM, eluição da proteína com 7 mL de Imidazol 300mM, foram coletadas alíquotas de 1 mL, e finalmente, a coluna foi lavada com 5 mL de Imidazol 500mM, para tirar toda a sujeira que tenha ficado ligada na coluna de níquel. Seguindo o protocolo anterior, foi feita a produção e purificação das 4 proteínas (Mur, RVL, RH1, RH2). Por último, as proteínas foram concentradas, com uma coluna de Amicon de tamanho 10 kDa (Figura 31).



**Figura 31: Imunodeteção da purificação das 4 proteínas recombinantes.** Proteína Mur: Poços 1,2; RVL: Poços 3,4; RH1: Poços 5,6; RH2: Poços 7,8. A seta indica o tamanho de aproximadamente 30 kDa. Poços 1, 3, 5, 7: *Flow through* da proteína purificada, Poços 2, 4, 6, 8: Proteínas purificadas e concentradas. M: *BenchMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen).

Após serem purificadas e concentradas, as proteínas foram quantificadas usando espectrometria. Para isto o coeficiente de extinção molar de cada proteína foi calculado, usando a ferramenta *ProtParam*, disponível no site da *ExpASy* (<https://web.expasy.org/protparam/>). Aplicando a fórmula de quantificação foi feito o cálculo da concentração de cada proteína (Tabela 3).

**Tabela 3: Concentração das proteínas calculada com o coeficiente de extinção molar.**

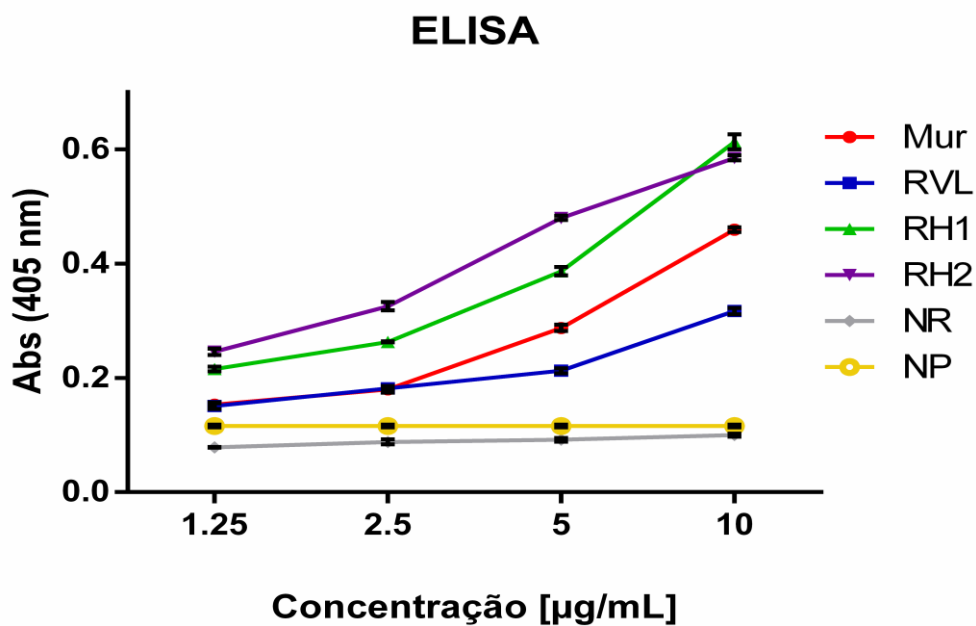
<i>Nome</i>	<i>[mg/L]</i>
<i>Mur</i>	<b>35,07</b>
<i>RVL</i>	<b>58,48</b>
<i>RH1</i>	<b>20,49</b>
<i>RH2</i>	<b>137,56</b>

Como mostra a Tabela 3, a concentração das diferentes proteínas foi variável, começando pela proteína Mur com uma concentração de 35,07 mg/L, a proteína RVL 58,48 mg/L. É importante ressaltar que a proteína RH1, obtida pelo *Phage Display*, teve a concentração mais baixa, 20,49 mg/L, enquanto a outra proteína obtida pelo *Phage Display*, RH2, teve a concentração mais alta, 137,56 mg/L.

#### **4.7 ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)**

Uma vez quantificados por espectrometria, os anticorpos foram testados quanto a sua ligação ao antígeno, o CD3 $\gamma$ ε humano. Foi feito um imunoenensaio (ELISA) de ligação direta, com o antígeno fixado na placa, como descrito nos Métodos, sessão 3.15. 4 dos fragmentos scFv foram testados, a proteína Mur, com a porção ligante do OKT3; a proteína RVL, as duas proteínas selecionadas pelo *Phage display*, RH1 e RH2, e como controle foi utilizado um scFv não relacionado, NR. Foi feito também um controle sem o anticorpo primário, NP. As proteínas foram testadas a diferentes concentrações, e tudo foi feito em triplicata. Os resultados mostraram que os dois fragmentos de anticorpos selecionados durante os experimentos; RH1 e RH2, ligavam-se ao antígeno CD3 e aparentemente, ligaram melhor que o scFv Mur, em todas as concentrações testadas. O fragmento RVL, também teve ligação ao antígeno, mas um pouco mais fraca que o scFv Mur (Figura 32).





**Figura 32: Análise da ligação direta dos anticorpos scFv ao antígeno CD3εγ.** O gráfico mostra a absorbância (Abs) vs. a concentração de proteína. Mur: versão murina, RVL: versão humanizada com o huVHR<sup>86</sup>, RH1, RH2: proteínas selecionadas pelo *Phage display*, NR: proteína não relacionada (anti-Zika) A ligação dos anti-CD3 foi evidenciada após a adição de anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina e do substrato PNPP. Como controle negativo, os anticorpos anti-CD3 foram omitidos (NP). A placa foi deixada para revelar por 16 h a temperatura ambiente. Cada ponto foi feito em triplicata e mostra a média ± SD.

## 5 DISCUSSÃO

Um dos fatores determinantes quando se realizam experimentos de *Phage Display* é o tamanho da biblioteca inicial. As bibliotecas de fragmentos de anticorpos humanos podem ser sintéticas ou obtidas a partir de repertórios de pacientes, e a seleção de ligantes é realizada visando um antígeno previamente definido, resultando em um fragmento de anticorpo completamente humano, teoricamente menos imunogênico que os murinos ou humanizados (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2012). A biblioteca de clones obtida após a clonagem no vetor pGEM®-T Easy, com um tamanho de  $1 \times 10^7$  clones, demonstrou que o número de transformantes é compatível com a cobertura do repertório humano de VLs circulantes, o qual é estimado em torno de  $3.4 \times 10^6$  (MARKET; PAPAVALIIOU, 2003). Soma-se a isso o fato de que o alinhamento de sequências realizado mostrou que a biblioteca possuía uma variabilidade de 85%. Essa análise foi importante para ter uma noção do estado da biblioteca, e saber se a amplificação dos segmentos de VLs tinha sido exitosa.

Foi feita a clonagem do inserto sintético scFvRVL (hVHR86, VH humanizado, versão R) com o objetivo de incorporar o VH humanizado anti-CD3 ao fagomídeo pCIg316. Essa clonagem foi necessária para possibilitar a clonagem dos genes de hVL amplificados por PCR a partir da biblioteca original, visando a posterior seleção de novas hVLs ligantes ao CD3. É importante ressaltar que em trabalhos anteriores do nosso grupo (COSTA, 2004; SILVA et al., 2009), foi demonstrado a eficácia da ligação deste VH, em conjunto com a VL murina original, no reconhecimento ao antígeno na superfície de células humanas, em níveis comparáveis ao anticorpo monoclonal murino (OKT3), tal fato pode explicar os níveis de *fold change* obtidos, relativamente baixos, uma vez que o VH humanizado já contribuiu bastante para o reconhecimento do antígeno.

Um desafio associado à tecnologia de *Phage Display* é a identificação de prováveis candidatos após o processo de seleção. Antes do desenvolvimento da tecnologia de NGS, este objetivo era comumente realizado escolhendo aleatoriamente clones de fagos para testar a ligação ao alvo, e por análise de sequenciamento de Sanger (DANTAS-BARBOSA et al., 2009; HU et al., 2015), mas é um processo que pode ser caro e requerer muito trabalho (RAVN et al., 2013). Atualmente, o poder analítico das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) de alto desempenho, tem sido preconizadas para analisar fagos que foram selecionados a partir de grandes bibliotecas

combinatórias que apresentam ligantes peptídicos ou anticorpos (YANG et al., 2017). Esse processo, geralmente chamado de *Phage Display* de nova geração (*Next generation Phage Display*, NGPD), permite ao pesquisador identificar fagos específicos que estão sendo enriquecidos contra um antígeno alvo, pela análise da sequência de DNA que codifica o ligante apresentado (SPILIOTOPOULOS et al., 2015). Nesse trabalho foi possível identificar algumas sequências que tinham sido enriquecidas durante o processo de seleção por *Phage display*, usando o programa ATTILA. Finalmente, foram escolhidas duas sequências para serem clonadas em vetor de expressão bacteriano. A análise de ambas as sequências, mostrou que eram cadeias leves (VLs) humanas do tipo kappa ( $\kappa$ ).

As sequências de duas hVLs com maior *fold change* foram utilizadas para o desenho de genes de scFvs e clonadas no vetor pET28a, para serem produzidas em bactérias, esse vetor possui algumas características importantes que ajudam na expressão das proteínas recombinantes. Entre elas um promotor T7, o qual é um promotor forte, regulado pela RNAP T7, também apresenta o promotor *lac*, que ativa a expressão de RNAP T7, dessa forma a indução da proteína pode ser iniciada pela adição de lactose ou do análogo IPTG (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, a síntese do gene e a clonagem no vetor pET28a foi feita de forma a incorporar nas proteínas dois marcadores: o His-Tag (6X), utilizado para purificação e imunodeteção, e o epítipo correspondente ao decapeptídeo da proteína hemaglutinina do vírus influenza (HA), para imunodeteção das proteínas recombinantes (TERPE, 2003).

Durante os experimentos de produção das proteínas, foi possível observar que uma grande quantidade de proteína ficava na fração insolúvel, formando corpos de inclusão, pelo qual seria importante fazer algumas mudanças, nos protocolos, ou incluso no vetor de expressão, visando melhorar e aumentar a produção das proteínas solúveis.

O IPTG é um indutor muito forte que não é metabolizado por *E. coli*, razão pela qual a adição uma única vez é suficiente para induzir a produção das proteínas recombinantes. No entanto, tem sido demonstrado que a indução da produção com IPTG coloca uma alta carga metabólica nas células, resultando na formação de agregados inativos da proteína recombinante, conhecidos como corpos de inclusão (WURM et al., 2016). Por essa razão, em alguns estudos foi usada lactose como indutor alternativo da produção das proteínas heterólogas. Verificou-se que a lactose era tão eficaz quanto o IPTG, para aumentar a capacidade celular, reduzir a formação de corpos de inclusão, e melhorar a formação de produto recombinante solúvel (PEI et al., 2011; BASHIR et al.,

2016). Sabendo disso, pode-se pensar que a baixa expressão das proteínas alvo desse estudo, possa ser melhorada usando a lactose como indutor ao invés do IPTG.

Outras possibilidades para melhorar a qualidade da proteína, e a solubilidade da mesma, são: alterar as condições do meio de cultura, a coexpressão com algumas chaperonas, ou usar diferentes proteínas de fusão que aumentem a solubilidade da proteína recombinante, e também podem ser usados como marcadores de seleção para a purificação das proteínas, tais como, MBP (*maltose-binding protein*), GST (*glutathione-S-transferase*), TRX (*thioredoxin*) ou NusA (*N-utilization substance*) (STEVENSON, 2000). Por outro lado, o uso de marcadores de seleção muito grandes pode interferir na ligação da proteína na coluna de purificação, ou mesmo, no correto dobramento das moléculas, gerando também a formação de corpos de inclusão, ou proteínas inativas (SMYTH et al., 2003).

A produção de proteínas heterólogas em células de bactéria é uma prática comum nos laboratórios de biologia molecular, mas é importante sempre selecionar a melhor linhagem para a produção de cada proteína, dado que pequenas diferenças estruturais podem influir na ótima produção de uma proteína funcional (BERKMEN, 2012). Os sistemas de expressão bacteriana, para produção de proteínas heterólogas, são atraentes devido à sua capacidade de crescer rapidamente e a alta densidade em substratos baratos, sua genética, frequentemente bem caracterizada, e a disponibilidade de um número cada vez maior de vetores de clonagem e linhagens de hospedeiros mutantes (TERPE, 2006).

Para a produção das proteínas recombinantes nesse trabalho foram testadas duas linhagens bacterianas com características diferentes. A linhagem BL21(DE3) apresenta deficiência em dois genes de protease o *ompT* e *lon*. Essa linhagem foi usada na expressão de um scFv anti-HER2 (AKBARI et al., 2015), um scFV anti-TNF- $\alpha$  (ALIZADEH; HAMZEH-MIVEHROUD; DASTMALCHI, 2015), e também uma forma ativa de um scFv do anticorpo monoclonal murino ABL-1, que é específico para o fator de ativação de células B da família TNF (CAO et al., 2005).

A linhagem *SHuffle* apresenta modificações nos genes *gor* e *trxB*, que codificam glutatona redutase e tioredoxina redutase, os quais são interrompidos. Como as duas enzimas estão envolvidas na manutenção do ambiente redutor de *E. coli*, o citoplasma da linhagem *SHuffle* é menos reduzido (LOBSTEIN et al., 2012). Além disso, a dissulfeto isomerase de *E. coli*, DsbC, é expressa no citoplasma da linhagem *SHuffle*, essas características de engenharia promovem a correta formação das ligações dissulfeto nos scFv no citoplasma de *E. coli* (LIU et al., 2019). A linhagem *SHuffle* foi usada para

expressar com sucesso um anticorpo funcional scFv contra o ácido ganodérico A (GAA), um metabólito farmacologicamente ativo de *Ganoderma lingzhi* (YUSAKUL et al., 2017), na fração solúvel do citoplasma, e também na produção de fragmentos Fab *Quenchbody*, os quais podem ser usados como marcadores *in vitro* (ABE et al., 2014), e outras proteínas como GLuc (*Gaussia luciferase*), PhoA (Fosfatase Alcalina), Quitinase, CelZ (Endoglucanase) (LOBSTEIN et al., 2012). Alguns autores reportam que a linhagem BL21(DE3) produz altas quantidades de proteínas formando corpos de inclusão, os quais devem ser renaturados, o que leva a um alto custo na produção (TSUMOTO et al., 1998). Além disso, é importante ressaltar que o uso da linhagem *SHuffle* já que possui a capacidade de estocar a proteína recombinante no citoplasma, o que permite o acúmulo de maiores quantidades de proteína recombinante (LOBSTEIN et al., 2012; ROBINSON et al., 2015).

Nos nossos resultados a análise comparativa da expressão entre as linhagens BL21(DE3) e *SHuffle* mostrou que a linhagem BL21(DE3) tinha uma grande quantidade de proteína formando corpos de inclusão, e a quantidade de proteína na fração solúvel era menor que a proteína solúvel produzida na linhagem *SHuffle*, além que a linhagem BL21(DE3) apresentava uma produção basal da proteína, mesmo antes de ser induzida com IPTG. As concentrações das proteínas recombinantes estão de acordo com valores reportados por vários autores, que já usaram a linhagem *SHuffle* para produção de proteínas (LOBSTEIN et al., 2012; REN; KE; BERKMEN, 2016; YUSAKUL et al., 2017; VERMEULEN et al., 2018).

A temperatura também tem um papel importante durante a produção das proteínas. A cultura de bactérias a baixas temperaturas é frequentemente usada para reduzir a agregação de proteínas, dado que diminui a taxa de síntese de proteínas e a cinética de dobramento, diminuindo assim as interações hidrofóbicas envolvidas na auto agregação das proteínas (SCHUMANN; FERREIRA, 2004). As baixas temperaturas de cultura também podem reduzir ou anular a degradação das proteínas, devido a uma baixa atividade das proteases de choque térmico, que geralmente são induzidas durante a superprodução de proteínas em *E. coli* (COSTA et al., 2014). Essa estratégia, apresenta algumas desvantagens, pois a redução da temperatura também pode afetar as taxas de replicação, transcrição e tradução, além de diminuir o rendimento bacteriano do crescimento e da produção de proteínas, no entanto, isso pode ser ajustado permitindo o crescimento das culturas até OD<sub>600nm</sub> mais altas, e usando meios com pH 8,2, os quais atuam como tampão, e conseguem manter um ótimo crescimento celular por mais tempo

(SIVASHANMUGAM et al., 2009). As proteínas recombinantes que produzimos apresentaram melhor produtividade e solubilidade quando a cultura transformada era crescida a 20 °C, durante a noite, dados condizentes com a literatura (LOBSTEIN et al., 2012; ROBINSON et al., 2015).

Um dos passos importantes na produção de proteínas é a purificação das mesmas. Como já foi mencionado, o vetor usado no nosso estudo, pET28a, possibilita expressar a proteína recombinante fusionada a uma cauda de seis histidinas (His-Tag). Tal característica permite a purificação em coluna de afinidade a metal (IMAC). Durante o processo de purificação existem algumas variáveis que devem ser levadas em consideração, como o pH, a temperatura, a velocidade com que a proteína passa através da coluna. As mudanças de pH durante o processo, podem levar à formação de agregados e corpos de inclusão, incluso dentro da mesma coluna, o que pode resultar numa proteína pura, mas sem atividade biológica (COSTA et al., 2014).

O tempo de interação da proteína com a resina da coluna também influi em melhorar a purificação, já que uma velocidade de fluxo menor ajuda a que interação da proteína com o metal imobilizado seja melhor, e que mais quantidade de proteína consiga se ligar na resina (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Para a purificação das proteínas recombinantes, foram usadas soluções com um pH de 7,4, recomendado pelo fabricante da coluna, e o fluxo da proteína foi ajustado para 0,5 mL por minuto, para permitir que a interação da proteína com a resina acontecesse de uma melhor forma e desse jeito obter uma maior quantidade de proteína ligada à resina. Os resultados das purificações mostraram que o método foi bem sucedido, uma vez que não era possível observar proteína nas alíquotas do *flow through* após ter passado pela coluna.

O resultado do ensaio de ELISA, mostrou que as proteínas conseguiam reconhecer o antígeno, mas só foi possível observar isso depois de 16 horas de revelação. Nesse tocante temos que levar em consideração a baixa afinidade ao antígeno constituído pelo heterodímero  $\gamma\epsilon$ . No trabalho de KJER-NIELSEN et al., 2004, eles mostraram por ressonância plasmonica de superfície (SPR), que um fragmento Fab do anticorpo OKT3 tinha uma constante de afinidade de 2,73  $\mu\text{M}$  pela molécula de CD3 $\gamma\epsilon$ , por outro lado, a constante de afinidade do anticorpo completo, foi de 0,64  $\mu\text{M}$ , umas três vezes maior que a afinidade do fragmento monovalente. Em outro trabalho, LAW et al., 2002, também mostraram que a afinidade do OKT3 pelo CD3 $\gamma\epsilon$  era baixa, pelo contrário, o OKT3 ligava com maior afinidade à molécula de CD3 $\epsilon\delta$ , com uma afinidade de  $10,6 \times 10^{-9}$ . Essa afinidade é considerada baixa, quando comparada a outros mAbs, como por exemplo os

anti-CD20 Rituximabe, que apresenta uma afinidade de 5,45 nM, ou o Ofatumumabe, que tem uma afinidade de 4,76 nM (UCHIYAMA et al., 2010). A nossa hipótese é que tem poucas moléculas com o dobramento compatível ao reconhecimento do antígeno CD3 $\gamma\epsilon$ . Somando-se a isso, está a baixa afinidade ao antígeno recombinante, e a avidéz reduzida do fragmento scFv. Tudo isso leva a uma baixa ligação das proteínas produzidas nesse estudo, pelo qual a reação enzimática do anticorpo secundário é imperceptível e só observável após 16 horas de incubação.

Dentre as possíveis causas para a pouca atividade ligante das proteínas encontram-se, problemas no dobramento correto da proteína dentro da célula (AHMAD et al., 2012), problemas que possam ter acontecido durante a purificação, manipulação e armazenamento da proteína, e mudanças de pH podem ser responsáveis pela precipitação da proteína, inclusive dentro da própria coluna de purificação (SIVASHANMUGAM et al., 2009). Pode ter acontecido também a precipitação por formação de agregados, o que acontece em ocasiões quando se tem grandes quantidades de proteína num volume pequeno, ou incluso a perda da sua estrutura (TEMEL; LANDSMAN; BRADER, 2016). Também pode ser devido a que por ser uma proteína pequena, esteja sujeita a degradar-se rapidamente, fazendo com que a quantidade de proteína funcional seja muito baixa e praticamente indetectável durante os experimentos de citometria e calorimetria (TEMEL; LANDSMAN; BRADER, 2016).

Considerando que os experimentos para medir a afinidade dos anticorpos não foram conclusivos, seria importante tentar algumas outras formas de produção da proteína, e talvez mudar o formato do fragmento para a forma FvFc, ou inclusive, na forma de IgG completa, o que aumentaria a avidéz dos anticorpos (SERPIERI et al., 2010). Para a expressão desses anticorpos é necessário usar células de mamífero, que possuem os mecanismos necessários para o dobramento correto dos anticorpos, tais como a linhagem CHO ou HEK.

Outra possibilidade, visando melhorar a qualidade das proteínas recombinantes, é fazer a clonagem dos fragmentos scFv em vetores, como o pET SUMO, o qual é um vetor melhorado para a produção de proteínas heterólogas. O vetor usa um modificador pequeno similar a ubiquitina (SUMO, do inglês *small ubiquitin-like modifier*), que permite a expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli* (BUTT et al., 2005). O SUMO pode aumentar a quantidade de produção de uma proteína e também aumentar a solubilidade das proteínas insolúveis. Além disso, pode aumentar a

estabilidade dos anticorpos, fazendo que possam ser estocados por mais tempo, mantendo sua atividade ligante (LIU et al., 2015).

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao longo desse trabalho obtivemos os seguintes resultados:

- Conseguimos clonar no vetor pCIg316 um cassete de expressão contendo gene que codifica o scFv anti-CD3 humanizado fusionado ao gene que codifica a proteína III do fago M13 (aa 230-406). Tal vetor é passível de utilização para apresentação do scFv na superfície de bacteriófagos filamentosos.
- Realizamos a amplificação dos genes de domínios variáveis leves (VLs) contidos na biblioteca de Fabs (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005).
- Construimos uma sub-biblioteca de VLs no vetor pCIg316-gen 3.
- O enriquecimento calculado das sequencias após a seleção por *Phage Display* foi na ordem de 315 vezes.
- Duas VLs com *fold change* de 92,7 e 67, foram escolhidas para serem clonadas no vetor de expressão na forma scFv.
- Padronizou-se a expressão das proteínas recombinantes. As proteínas recombinantes foram expressas em células de *E. coli* da linhagem *SHuffle*, modificada geneticamente para fazer as ligações dissulfeto nas proteínas heterólogas, usando o vetor pET28a. A melhor condição para a produção das proteínas foi a 20 °C, a 250 rpm durante a noite, com uma concentração de IPTG de 0,5 mM.
- Foi possível a padronização do sistema de purificação das proteínas recombinantes na fração solúvel.
- Conseguimos obter entre 20,49 mg/L e 137,56 mg/L das proteínas recombinantes purificadas.
- Em imunoenensaio as 4 proteínas testadas; Mur, RVL, RH1 e RH2, tiveram ligação ao antígeno, as proteínas RH1 e RH2, obtidas durante o experimento de *Phage display* aparentemente ligaram melhor que a versão scFv Mur. A proteína RVL a qual já tinha sido testada em trabalhos anteriores na forma scFv (COSTA,



2004), onde demonstrou ligar melhor que a Mur, aparentemente perdeu um pouco da sua afinidade.

Dentre as perspectivas do trabalho estão:

- Produzir as proteínas como fragmentos FvFc, ou como uma IgG completa, em células de mamíferos.
- Clonar os fragmentos scFv no vetor pET-SUMO, visando dar maior solubilidade e estabilidade às proteínas.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8th Edit. ed. [s.l.] Elsevier Saunders, 2015.
- ABE, R.; JEONG, H.-J.; ARAKAWA, D.; DONG, J.; OHASHI, H.; KAIGOME, R.; SAIKI, F.; YAMANE, K.; TAKAGI, H.; UEDA, H. Ultra Q-bodies: quench-based antibody probes that utilize dye-dye interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4640, 11 abr. 2014.
- ACTOR, J. K. **Elsevier's integrated review immunology and microbiology**. 2nd Edit. ed. [s.l.] ELSEVIER SAUNDERS, 2012.
- AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B. M.; HAMID, M. scFv antibody: principles and clinical application. **Clinical and developmental immunology**, v. 2012, 2012.
- AKBARI, V.; SADEGHI, H. M. M.; JAFARIAN-DEHKORDI, A.; CHOU, C. P.; ABEDI, D. Optimization of a single-chain antibody fragment overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 1, p. 75–83, 2015.
- ALIZADEH, A. A.; HAMZEH-MIVEHROUD, M.; DASTMALCHI, S. Production and Purification of a Novel Anti-TNF- $\alpha$  Single Chain Fragment Variable Antibody. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. Suppl 1, p. 667–672, dez. 2015.
- BÁBÍČKOVÁ, J.; TÓTHOVÁ, L.; BOOR, P.; CELEC, P. In vivo phage display - A discovery tool in molecular biomedicine. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1247–1259, 2013.
- BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage Display: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- BASHIR, H.; AHMED, N.; KHAN, M. A.; ZAFAR, A. U.; TAHIR, S.; KHAN, M. I.; KHAN, F.; HUSNAIN, T. Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhCIFN. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 5, p. 708–714, 1 set. 2016.
- BECK, A.; WURCH, T.; BAILLY, C.; CORVAIA, N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 345–352, 2010.
- BERKMEN, M. Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. **Protein**

- Expression and Purification**, v. 82, n. 1, p. 240–251, 1 mar. 2012.
- BIRNBAUM, M. E.; BERRY, R.; HSIAO, Y.-S.; CHEN, Z.; SHINGU-VAZQUEZ, M. A.; YU, X.; WAGHRAY, D.; FISCHER, S.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; WALZ, T.; GARCIA, K. C. Molecular architecture of the  $\alpha\beta$  T cell receptor–CD3 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 49, p. 17576–17581, 9 dez. 2014.
- BORGHESI, L.; MILCAREK, C. From B cell to plasma cell. **Immunologic Research**, v. 36, n. 1, p. 27–32, 2006.
- BUTT, T. R.; EDAVETTAL, S. C.; HALL, J. P.; MATTERN, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 1 set. 2005.
- CALL, M. E.; PYRDOL, J.; WIEDMANN, M.; WUCHERPFENNIG, K. W. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 967–979, 2002.
- CAO, P.; TANG, X. M.; GUAN, Z. B.; DIAO, Z. Y.; ZHANG, S. Q. Production and characterization of a bacterial single-chain antibody fragment specific to B-cell-activating factor of the TNF family. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n. 2, p. 157–164, 2005.
- CHAKRABORTY, A. K.; WEISS, A. Insights into the initiation of TCR signaling. **Nat Immunol**, v. 15, n. 9, p. 798–807, set. 2014.
- CHATENOUD, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 123–132, 2003.
- COSTA, P. L. N. Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. n. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 63, 19 fev. 2014.
- DANTAS-BARBOSA, C.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 2, p. 126–140, 2005.
- DANTAS-BARBOSA, C.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Antibody Phage Display Libraries: Contributions to Oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 5420–5440, 4 maio 2012.

- DANTAS-BARBOSA, C.; FARIA, F. P.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Isolation of Osteosarcoma-Associated Human Antibodies from a Combinatorial Fab Phage Display Library. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1–8, 2009.
- DE-SOUZA, M. T. Capítulo IX Análise de DNA por electroforese em gel de agarose. In: **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 2da. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 2016. p. 372.
- DE MARCO, A. Recombinant antibody production evolves into multiple options aimed at yielding reagents suitable for application-specific needs. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 125, 2015.
- DE MARCO, A. Recent contributions in the field of the recombinant expression of disulfide bonded proteins in bacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 129, 14 set. 2012.
- ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2 jan. 2015.
- EDWARDS, J. C. W.; SZCZEPAŃSKI, L.; SZECHÍŃSKI, J.; FILIPOWICZ-SOSNOWSKA, A.; EMERY, P.; CLOSE, D. R.; STEVENS, R. M.; SHAW, T. Efficacy of B-Cell–Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 25, p. 2572–2581, 17 jun. 2004.
- FINLAY, W. J. J.; BLOOM, L.; GRANT, J.; FRANKLIN, E.; SHÚILLEABHÁIN, D. N.; CUNNINGHAM, O. Phage Display: A Powerful Technology for the Generation of High-Specificity Affinity Reagents from Alternative Immune Sources. In: WALLS, D.; LOUGHRAN, S. T. (Eds.). **Protein Chromatography: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 85–99.
- FOLTZ, I. N.; KAROW, M.; WASSERMAN, S. M. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies what cardiologists need to know. **Circulation**, v. 127, n. 22, p. 2222–2230, 2013.
- FONSECA, A. S. D. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3. n. Departamento de Biologia Celular. Universidade de Brasília, Brasília, 2000.
- GELLERT, M. V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 101–132, jun. 2002.
- GRILO, A. L.; MANTALARIS, A. The Increasingly Human and Profitable Monoclonal

- Antibody Market. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 9–16, 1 jan. 2019.
- GUY, C. S.; VIGNALI, D. A. A. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. **Immunological Reviews**, v. 232, n. 1, p. 7–21, 1 nov. 2009.
- HANSEL, T. T.; KROPSHOFER, H.; SINGER, T.; MITCHELL, J. A.; GEORGE, A. J. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 325–338, abr. 2010.
- HEROLD, K. C.; BUNDY, B. N.; LONG, S. A.; BLUESTONE, J. A.; DIMEGLIO, L. A.; DUFORT, M. J.; GITELMAN, S. E.; GOTTLIEB, P. A.; KRISCHER, J. P.; LINSLEY, P. S.; MARKS, J. B.; MOORE, W.; MORAN, A.; RODRIGUEZ, H.; RUSSELL, W. E.; et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 7, p. 603–613, 9 jun. 2019.
- HOCHULI, E.; DÖBELI, H.; SCHACHER, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. **Journal of Chromatography A**, v. 411, p. 177–184, 1987.
- HODKINSON, B. P.; GRICE, E. A. Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. **Advances in wound care**, v. 4, n. 1, p. 50–58, 1 jan. 2015.
- HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.
- HU, D.; HU, S.; WAN, W.; XU, M.; DU, R.; ZHAO, W.; GAO, X.; LIU, J.; LIU, H.; HONG, J. Effective Optimization of Antibody Affinity by Phage Display Integrated with High-Throughput DNA Synthesis and Sequencing Technologies. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129125, 5 jun. 2015.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th Edit. ed. New York: Garland Science, 2001.
- JOSEPH, B. C.; PICHAIMUTHU, S.; SRIMEENAKSHI, S.; MURTHY, M.; SELVAKUMAR, K.; M, G.; SADAN; MANJUNATH, A R. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. 06, n. 05, 29 ago. 2015.
- JUNG, D.; GIALLOURAKIS, C.; MOSTOSLAVSKY, R.; ALT, F. W. MECHANISM AND CONTROL OF V(D)J RECOMBINATION AT THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN LOCUS. **Annual Review of**

- Immunology**, v. 24, n. 1, p. 541–570, abr. 2006.
- KEIZER, R. J.; HUITEMA, A. D. R.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J. H. Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 8, p. 493–507, 2010.
- KIERNY, M.; CUNNINGHAM, T.; KAY, B. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. **Nano reviews**, v. 3, 23 jul. 2012.
- KIM, K. S.; SUN, Z.-Y. J.; WAGNER, G.; REINHERZ, E. L. Heterodimeric CD3 $\epsilon$  extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis<sup>11</sup>Edited by I. Wilson. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 4, p. 899–916, 2000.
- KJER-NIELSEN, L.; DUNSTONE, M. A; KOSTENKO, L.; ELY, L. K.; BEDDOE, T.; MIFSUD, N. A; PURCELL, A. W.; BROOKS, A. G.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 20, p. 7675–80, 2004.
- KUHN, C.; WEINER, H. L. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 889–906, 10 maio 2016.
- KUHNS, M. S.; DAVIS, M. M.; GARCIA, K. C. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 133–139, 2006.
- KUNG, P.; GOLDSTEIN, G.; REINHERZ, E. L.; SCHLOSSMAN, S. F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. **Science**, v. 206, n. 4416, p. 347 LP – 349, 19 out. 1979.
- KUOKKANEN, E.; ŠUŠTAR, V.; MATTILA, P. K. Molecular Control of B Cell Activation and Immunological Synapse Formation. **Traffic**, v. 16, n. 4, p. 311–326, 1 abr. 2015.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 10 set. 2007.
- LAW, C.; HAYDEN-LEDBETTER, M.; BUCKWALTER, S.; MCNEILL, L.; NGUYEN, H.; HABECKER, P.; THORNE, B. A.; DUA, R.; LEDBETTER, J. A. Expression and characterization of recombinant soluble human CD3 molecules:

- presentation of antigenic epitopes defined on the native TCR–CD3 complex. **International Immunology**, v. 14, n. 4, p. 389–400, 1 abr. 2002.
- LEVISSON, M.; SPRUIJT, R.; WINKEL, I.; KENGEN, S.; OOST, J. Phage Display of Engineered Binding Proteins. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1129, p. 211–229, 20 mar. 2014.
- LIU, C.; KOBASHIGAWA, Y.; YAMAUCHI, S.; TOYOTA, Y.; TERAMOTO, M.; IKEGUCHI, Y.; FUKUDA, N.; SATO, T.; SATO, Y.; KIMURA, H.; MORIOKA, H. Preparation of single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* by simplified and systematic chaperone optimization. **The Journal of Biochemistry**, 6 set. 2019.
- LIU, Z.; ZHANG, J.; FAN, H.; YIN, R.; ZHENG, Z.; XU, Q.; LIU, Q.; HE, H.; PENG, X.; WANG, X.; LI, X.; XIAO, Y. Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in *Escherichia coli*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 302–306, 1 jul. 2015.
- LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; FAULKNER, M.; RIGGS, P.; BERKMEN, M. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, 2012.
- MACIÁN, F.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, C.; RAO, A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2476–2489, 2001.
- MARANHÃO, A. Q. Capítulo X Transformação bacteriana. In: **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. 2da. ed. Brasília: Universidade de Brasília, 2016. p. 372.
- MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. ANTICORPOS HUMANIZADOS Pesquisa Humanização de anticorpos de interesse clínico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 23, p. 38–43, 2001.
- MARANHÃO, A. Q.; COSTA, M. B. W.; GUEDES, L.; MORAES-VIEIRA, P. M.; RAIOL, T.; BRIGIDO, M. M. A Mouse Variable Gene Fragment Binds to DNA Independently of the BCR Context: A Possible Role for Immature B-Cell Repertoire Establishment. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72625, 2 set. 2013.
- MARANHÃO, A. Q.; SIMI, K. C.; BURTET, R. T.; BRÍGIDO, M. M. **Clonagem e expressão de genes de anticorpos: métodos e aplicações**. São Paulo: Editora Blücher S/A., , 2014. (Nota técnica).
- MARCOTTE, H.; HAMMARSTRÖM, L. **Passive Immunization : Toward Magic**

- Bullets.** Fourth Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2015.
- MARKET, E.; PAPAVALIOU, F. N. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. **PLoS Biology**, v. 1, n. 1, p. e16, 13 out. 2003.
- MARKIV, A.; BEATSON, R.; BURCHELL, J.; DURVASULA, R. V; KANG, A. S. Expression of recombinant multi-coloured fluorescent antibodies in gor (-)/trxB(-) *E. coli* cytoplasm. **BMC Biotechnology**, v. 11, p. 117, 30 nov. 2011.
- MATOCHKO, W. L.; DERDA, R. Next-Generation Sequencing of Phage-Displayed Peptide Libraries BT - Peptide Libraries: Methods and Protocols. In: DERDA, R. (Ed.). New York, NY: Springer New York, 2015. p. 249–266.
- MCLAUGHLIN, P.; GRILLO-LÓPEZ, A. J.; LINK, B. K.; LEVY, R.; CZUCZMAN, M. S.; WILLIAMS, M. E.; HEYMAN, M. R.; BENCE-BRUCKLER, I.; WHITE, C. A.; CABANILLAS, F.; JAIN, V.; HO, A. D.; LISTER, J.; WEY, K.; SHEN, D.; et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 8, p. 2825–2833, 1 ago. 1998.
- MORGAN, G.; BOYLE, E. M.; WARDELL, C.; WALKER, B. A.; DAVIES, F. E.; LELEU, X. B-cell malignancies: capture-sequencing strategies for identification of gene rearrangements and translocations into immunoglobulin gene loci. **Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy**, v. 4, p. 107, 30 out. 2014.
- OMIDFAR, K.; DANESHPOUR, M. Advances in phage display technology for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 6, p. 651–669, 3 jun. 2015.
- PEI, X.-L.; WANG, Q.-Y.; LI, C.-L.; QIU, X.-F.; XIE, K.-L.; HUANG, L.-F.; WANG, A.-M.; ZENG, Z.-W.; XIE, T. Efficient Production of a Thermophilic 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Glucose-Limited Fed-Batch Cultivations of *Escherichia coli* by Continuous Lactose Induction Strategy. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 416–425, 2011.
- QI, H.; LU, H.; QIU, H.-J.; PETRENKO, V.; LIU, A. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. **Journal of Molecular Biology**, v. 417, n. 3, p. 129–143, mar. 2012.
- RAVN, U.; DIDELOT, G.; VENET, S.; NG, K.-T.; GUENEAU, F.; ROUSSEAU, F.; CALLOUD, S.; KOSCO-VILBOIS, M.; FISCHER, N. Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery. **Methods**, v. 60, n. 1, p. 99–110, 15 mar. 2013.



- REDDY, S. T.; GE, X.; MIKLOS, A. E.; HUGHES, R. A.; KANG, S. H.; HOI, K. H.; CHRYSOSTOMOU, C.; HUNICKE-SMITH, S. P.; IVERSON, B. L.; TUCKER, P. W.; ELLINGTON, A. D.; GEORGIU, G. Monoclonal antibodies isolated without screening by analyzing the variable-gene repertoire of plasma cells. **Nat Biotech**, v. 28, n. 9, p. 965–969, set. 2010.
- REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2017. **mAbs**, v. 9, n. 2, p. 167–181, 17 fev. 2017.
- REN, G.; KE, N.; BERKMEN, M. Use of the SHuffle Strains in Production of Proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 85, n. 1, p. 5.26.1-5.26.21, 2016.
- RETH, M.; NITSCHKE, L.; HIKIDA, M.; KUROSAKI, T. Chapter 10 - Structure and Signaling Function of the B-Cell Antigen Receptor and Its Coreceptors BT - Molecular Biology of B Cells (Second Edition). In: London: Academic Press, 2015. p. 151–170.
- RITA COSTA, A.; ELISA RODRIGUES, M.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 2, p. 127–138, fev. 2010.
- ROBINSON, M.-P.; KE, N.; LOBSTEIN, J.; PETERSON, C.; SZKODNY, A.; MANSELL, T. J.; TUCKEY, C.; RIGGS, P. D.; COLUSSI, P. A.; NOREN, C. J.; TARON, C. H.; DELISA, M. P.; BERKMEN, M. Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. **Nature Communications**, v. 6, p. 8072, 27 ago. 2015.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.
- ROSENTHAL, K. S.; TAN, M. J. Rapid Review Microbiology and Immunology. **Rapid Review**, n. Third Edition., 2011.
- SALMERÓN, A.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; URSA, M. A.; FRESNO, M.; ALARCÓN, B. A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 147, n. 9, p. 3047 LP – 3052, 1 nov. 1991.
- SCHATZ, D. G.; SWANSON, P. C. V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 167–202, 15 dez. 2011.
- SCHLEGEL, S.; RUJAS, E.; YTTERBERG, A. J.; ZUBAREV, R. A.; LUIRINK, J.; DE

- GIER, J.-W. Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 24, 12 mar. 2013.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S41–S52, 2010.
- SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* **Genetics and Molecular Biology** sciELO , , 2004.
- SCOTT, J. K.; BARBAS III, C. F. Capítulo 2 Phage-display Vectors. In: **Phage Display: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.
- SERPIERI, F.; INOCENCIO, A.; DE OLIVEIRA, J. M.; PIMENTA, A. A.; GARBUIO, A.; KALIL, J.; BRIGIDO, M. M.; MORO, A. M. Comparison of humanized IgG and FvFc anti-CD3 monoclonal antibodies expressed in CHO cells. **Molecular Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 218–225, 25 jul. 2010.
- SHUKLA, A. A.; THÖMMES, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 253–261, maio 2010.
- SIGGS, O.; KALINA, S.; MURRAY, A.; BEUTLER, B. **Mutagenetix Phenotypic Mutation “allia”MUTAGENETIX (TM)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <mutagenetix.utsouthwestern.edu>.
- SILVA, H. M. Método in silico para análise de sequências de imunoglobulinas produzidas por tecnologia de phage display. n. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília., 2014.
- SILVA, H. M.; VIEIRA, P. M. M. M.; COSTA, P. L. N.; PIMENTEL, B. M. S.; MORO, A. M.; KALIL, J.; MARANHÃO, A. Q.; COELHO, V.; 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.
- SIVASHANMUGAM, A.; MURRAY, V.; CUI, C.; ZHANG, Y.; WANG, J.; LI, Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 18, n. 5, p. 936–948, 16 maio 2009.
- SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, T.; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM,

- M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783–792, 15 mar. 2001.
- SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 14 jun. 1985.
- SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p. 391–410, abr. 1997.
- SMITH, J. A.; TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. Partial TCR Signals Delivered by FcR-Nonbinding Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Differentially Regulate Individual Th Subsets. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 10, p. 4841 LP – 4849, 15 maio 1998.
- SMYTH, D. R.; MROZKIEWICZ, M. K.; MCGRATH, W. J.; LISTWAN, P.; KOBE, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. **Protein Science**, v. 12, n. 7, p. 1313–1322, 1 jul. 2003.
- SOUSA, I. G.; DO ALMO, M. M.; SIMI, K. C. R.; BEZERRA, M. A. G.; ANDRADE, R. V.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M. MicroRNA expression profiles in human CD3+ T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 124, 2017.
- SPILIOTOPOULOS, A.; OWEN, J. P.; MADDISON, B. C.; DREVENY, I.; REES, H. C.; GOUGH, K. C. Sensitive recovery of recombinant antibody clones after their in silico identification within NGS datasets. **Journal of Immunological Methods**, v. 420, p. 50–55, 2015.
- STEVENS, R. C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. **Structure**, v. 8, n. 9, p. R177–R185, 1 set. 2000.
- TEMEL, D. B.; LANDSMAN, P.; BRADER, M. L. Chapter Fourteen - Orthogonal Methods for Characterizing the Unfolding of Therapeutic Monoclonal Antibodies: Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Chemical Denaturation, and Intrinsic Fluorescence with Concomitant Static Light Scattering. In: FEIG, A. L. B. T.-M. IN E. (Ed.). . **Calorimetry**. [s.l.] Academic Press, 2016. v. 567p. 359–389.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523–533, jan. 2003.

- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–222, 22 set. 2006.
- TSUMOTO, K.; SHINOKI, K.; KONDO, H.; UCHIKAWA, M.; JUJI, T.; KUMAGAI, I. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent—application to a human single-chain Fv fragment. **Journal of Immunological Methods**, v. 219, n. 1, p. 119–129, 1998.
- UCHIYAMA, S.; SUZUKI, Y.; OTAKE, K.; YOKOYAMA, M.; OHTA, M.; AIKAWA, S.; KOMATSU, M.; SAWADA, T.; KAGAMI, Y.; MORISHIMA, Y.; FUKUI, K. Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 201–209, 1 jan. 2010.
- VAN DER MERWE, P. A.; DUSHEK, O. Mechanisms for T cell receptor triggering. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 1, p. 47–55, jan. 2011.
- VERMEULEN, J.-G.; BURT, F.; VAN HEERDEN, E.; CASON, E.; MEIRING, M. Evaluation of in vitro refolding vs cold shock expression: Production of a low yielding single chain variable fragment. **Protein Expression and Purification**, v. 151, p. 62–71, 2018.
- WEINER, L. M.; SURANA, R.; WANG, S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 5, p. 317–327, maio 2010.
- WHITACRE, J.; LIN, J.; HARDING, A. T Cell Adaptive Immunity Proceeds through Environment-Induced Adaptation from the Exposure of Cryptic Genetic Variation. **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 5, 9 fev. 2012.
- WILSON, P. C.; ANDREWS, S. F. Tools to therapeutically harness the human antibody response. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 10, p. 709–719, out. 2012.
- WOOFF, J. M.; BURTON, D. R. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 2, p. 89–99, fev. 2004.
- WURM, D. J.; VEITER, L.; ULONSKA, S.; EGGENREICH, B.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. The *E. coli* pET expression system revisited-mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8721–8729, out. 2016.
- YANG, W.; YOON, A.; LEE, S.; KIM, S.; HAN, J.; CHUNG, J. Next-generation sequencing enables the discovery of more diverse positive clones from a phage-displayed antibody library. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 3, p.

e308–e308, 2017.

- YUSAKUL, G.; NUNTAWONG, P.; SAKAMOTO, S.; RATNATILAKA NA BHUKET, P.; KOHNO, T.; KIKKAWA, N.; ROJSITTHISAK, P.; SHIMIZU, K.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S. Bacterial Expression of a Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody against Ganoderic Acid A: A Cost-Effective Approach for Quantitative Analysis Using the scFv-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 10, p. 1767–1774, 2017.
- ZHAO, A.; TOHIDKIA, M. R.; SIEGEL, D. L.; COUKOS, G.; OMIDI, Y. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 276–289, 3 mar. 2016.