



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamífero

Maryani Andressa Gomes Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

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

Brasília – DF

2009



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

Estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamífero

Maryani Andressa Gomes Bezerra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

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

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

Brasília – DF

2009

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho (UFAM – Membro Externo)

Prof^ª. Dra. Ildinete Silva Pereira (UnB – Membro Interno)

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca (UnB – Suplente)

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

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais,
Antônio e Osita, por sempre me darem
força para lutar e seguir os meus
sonhos...
Amo vocês!

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

Albert Einstein

Agradecimentos

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

A minha família, meus pais Antônio e Osita, minhas irmãs Dayanna e Claudenice, pelo carinho, paciência e apoio nos momentos de dificuldade e constante estresse. E mãe, obrigado pelos lanchinhos da tarde enquanto eu escrevia essa dissertação, eles davam uma grande renovada nas forças, até na hora de fazer a lista de abreviaturas! Aff..

Agradeço profundamente aos meus orientadores e amigos Andréa Maranhão e Marcelo Brígido por terem me acolhido no grupo e terem feito desses 5 anos que passei no laboratório momentos maravilhosos e cheios de aprendizado. E podem se preparar porque vem mais 4 anos no doutorado, com muito *tudão*!

Aos meus amigos do coração, Juliana, Priscilla, Renan e Geraldo. Por participarem da minha vida cada um de um jeito e me lembrarem que amizade verdadeira ajuda no crescimento pessoal. Juliana, em todos os momentos da minha vida, desde os choros até as gargalhadas. Amo você demais amiga!; Priscilla, nas farras, viagens, dias de tédio, mas também uma amiga com quem eu posso contar pra tudo. Nós temos nossas diferenças, mas no fundo a gente se ama, né amiga!; Geraldinho, um amigo de longa data que só briga comigo, mas que eu amo demais da conta! E Renan, uma pessoa que a cada dia se torna mais especial na minha vida e com quem eu posso contar pra tudo. Amo, amo e amo para sempre!

A minha grande amiga Gláucia, que mesmo estando longe de mim, sempre acreditou no meu potencial, enchendo a minha bola “seu futuro é brilhante, amiga”. Amo muito você bacaninha! Obrigada mesmo! Agradeço também aos amigos, não menos importantes, Vanessa e Vinícius, por sempre estarem perto de mim, me dando força pra seguir em frente e agüentando minhas reclamações! Amo demais da conta!

Aos grandes amigos do Lab1:

Barbarela, minha grande amiga que alegra o meu dia no lab! Sempre pronta pra escutar: “Não desiste de mim não!”, você não desistiu e hoje sou uma pessoa melhor! Kkkk Você é muito especial na minha vida e terá lugar cativo para sempre no meu coração! “Me esfregar em você e descer até o chão não tem preço”!

Fê, minha companheira da Biomedicina e é claro do Ceubão, eu nem preciso dizer o quanto eu te adoro né! O *tudão* vai ser nossa música para sempre! Manga, não desista de me ligar de madrugada, quem sabe um dia eu atenda... kkkkk

Kelly Simi, com sua paciência infinita é a única pessoa que não perde a paciência comigo! Simi, adoro você muito! Quem sabe se não viro uma pessoa melhor convivendo com você!

Mari, apesar de não estar mais no lab 1, ainda faz parte da minha vida. Obrigada pela paciência, ajuda nos experimentos e é claro pela amizade. Te adoro até mesmo com sua curiosidade infinita e quando você não escuta nada.

Isa, com um jeitinho todo peculiar conquistou meu coração e vai ficar pra sempre! Adoro você amiga! E que para sempre tenha picanhas nos restaurantes para a gente se esbaldar!

Lu, a minha amiga mais saudável e corredora de maratonas, obrigada por estar sempre pronta a me ajudar e por seus conselhos de vida! Você sabe o quanto é especial pra mim né!

Ao Yuri, “meu melhor amigo”, por que mesmo brigando com você a cada segundo você sabe que eu te adoro né! E tinha que agradecer senão você iria jogar isso na minha cara daqui a uns 10 anos!

Ao Rafa por sua alegria e prontidão com suas idéias mirabulosas, dando um jeito pra tudo. É muito bom conviver com você! Victor, que apesar de me estressar bastante torna o meu dia mais agradável com suas besteiras! A Flavinha, por estar sempre pronta a ajudar e ser essa pessoa toda especial, sempre com uma resposta na língua. Obrigada por tudo! A Janaína, tu é uma figura, nunca irei esquecer de seus comentários na hora certa. Gosto muito de você! Ao Leo, Thaíssa, Paulo, Izabel, Vanessa e Guto por fazerem parte da minha vida diariamente e me agüentar nos dias em que estou mais atacada!

E logicamente que não poderia me esquecer do Hernandez, mesmo com o Yuri tendo tomado o seu lugar no quesito briga diária, saiba que você é muito especial pra mim e me ensinou muita coisa nessa vida! Que você tenha muito sucesso na sua vida acadêmica porque você merece e muito! Agradeço também a Carol, porque mesmo estando lá na Austrália tem um lugar no meu coração pra sempre. Outra que tem o futuro brilhante! Te adoro Carolzinha!

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

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

Agradeço também a Dona Fátima e Dona Ivonildes por cuidarem do laboratório, dos nossos reagentes e materiais. Dona Fátima, você briga comigo todo dia, mas se eu ficar sem ir para o laboratório uma semana duvido se não sente minha falta!

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

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

Sumário

Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
Lista de abreviaturas.....	xvi
Resumo.....	xix
Abstract.....	xx
Introdução.....	1
1.1 Anticorpos.....	2
1.2 Anticorpos na clínica.....	4
1.3 Anticorpo anti-CD3.....	6
1.4 Produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos.....	13
1.4.1 Promotor CMV e o Íntron.....	14
1.4.2 IRES.....	16
1.4.3 Furina.....	18
Objetivos.....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Etapas metodológicas.....	21
Materiais e Métodos.....	23
3.1 Materiais.....	24
3.1.1 Células.....	24
3.1.2 Plasmídios utilizados.....	24
3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento, clonagem e reações de PCR.....	26
3.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases.....	28
3.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias.....	28
3.1.6 Antibióticos.....	29
3.1.7 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos.....	30
3.1.8 Soluções e tampões de uso geral.....	32
3.1.9 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana.....	33
3.1.10 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	34
3.1.11 Tampões de Endonucleases de Restrição.....	35

3.1.12 Tampões de outras reações.....	37
3.1.13 Endonucleases de restrição.....	38
3.1.14 Outras enzimas.....	39
3.1.15 Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	40
3.1.16 Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Western e Dot blot</i>).....	42
3.1.17 Coluna de cromatografia de afinidade.....	43
3.1.18 Soluções para cromatografia de afinidade.....	43
3.1.19 Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas.....	43
3.1.20 Marcadores moleculares para DNA e proteína.....	44
3.1.21 Kits comerciais.....	44
3.1.22 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, <i>Western Blot e Dot Blot</i>	45
3.2 Métodos.....	46
3.2.1 Preparação de DNA plasmidial.....	46
3.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	48
3.2.3 Análise de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose.....	48
3.2.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	48
3.2.5 Reação de Desfosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP). 49	
3.2.6 Reação de polimerização de extremidades de DNA utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I.....	49
3.2.7 Reação de anelamento de oligonucleotídeos.....	49
3.2.8 Amplificação dos fragmentos Fc e Cκ para inserção da seqüência codificadora de um sítio clivável por furina – PCR.....	50
3.2.9 Ligação de fragmentos de DNA.....	51
3.2.10 Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	52
3.2.11 Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.....	53
3.2.12 Cultura de células de mamíferos.....	54
3.2.13 ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	59
3.2.14 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	60
3.2.15 Análise de proteínas por <i>Dot Blot</i>	60

3.2.16	Análise de proteínas por eletroforese em gel de SDS.....	61
3.2.17	Coloração do gel de SDS-PAGE.....	62
3.2.18	Análise de proteínas por <i>Western Blot</i>	62
Resultados e Discussão.....		63
4.1	Etapas metodológicas.....	64
4.2	Construção do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3.....	65
4.2.1	Clonagem da cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor de expressão pMACIA IRES EV.....	66
4.2.2	Clonagem da cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor de expressão pMACIA L anti-CD3.....	69
4.3	Transfecção transiente da linhagem celular HEK293 utilizando o vetor bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3.....	72
4.4	Purificação do anticorpo anti-CD3 a partir de transfectomas de pMACIA HIL anti-CD3.....	74
4.5	Construção de vetores para expressão de duas versões monocistrônicas do anticorpo anti-CD3.....	76
4.5.1	Construção do vetor de expressão monocistrônico pMACIA HL anti-CD3.....	77
4.5.2	Construção do vetor de expressão monocistrônico pMACIA LH anti-CD3.....	80
4.6	Transfecção transiente da linhagem celular HEK293 utilizando as construções monocistrônicas e bicistrônica.....	84
4.7	Transfecção transiente da linhagem celular BHK-21 utilizando as construções monocistrônicas e bicistrônica.....	86
4.8	Purificação e quantificação do anticorpo anti-CD3 obtido a partir de células de BHK-21 transfectadas com os vetores pMACIA HIL, pMACIA HL e pMACIA LH.....	88
4.9	Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3.....	90
4.10	Transfecção estável da linhagem celular BHK-21 utilizando o vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3.....	92
4.10.1	Seleção das células transfectadas utilizando Geneticina [®] (G418).....	92
4.11	Construção do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3.....	95

4.12 Transfecção estável da linhagem celular BHK-21 utilizando o vetor bicistrônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3 na.....	97
Conclusões e Perspectivas.....	98
Referências Bibliográficas.....	101

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.....	3
Figura 2. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....	4
Figura 3. Diagrama esquemático do complexo receptor de células T (TCR).....	7
Figura 4. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.9	
Figura 5. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos.....	11
Figura 6. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC.....	12
Figura 7. Esquema do promotor completo de CMV.....	14
Figura 8. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, <i>Internal Ribosome Entry Site</i>) em um processo de tradução.....	17
Figura 9. Sobreposição dos domínios catalíticos de Kex2 e furina.....	19
Figura 10. Esquema do vetor de expressão pMACIA IRES EV.....	25
Figura 11. Representação esquemática das etapas metodológicas do trabalho.....	64
Figura 12. Representação esquemática do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3.....	65
Figura 13. Estratégia para construção do vetor pMACPS VLC κ anti-CD3.....	67
Figura 14. Estratégia para construção do vetor pMACIA L anti-CD3.....	68
Figura 15. Estratégia para construção do vetor pMACPS VHCH123 anti-CD3.....	70
Figura 16. Estratégia para construção do vetor pMACIA HIL.....	71
Figura 17. Produção do anticorpo anti-CD3 humano em HEK293.....	73
Figura 18. Análise do processo de purificação por <i>Western Blot</i>	75
Figura 19. Representação esquemática das construções monocistrônicas.....	76
Figura 20. Estratégia para clonagem da porção Fc Fur no vetor pMAC HIL anti-CD3.....	78
Figura 21. Estratégia para construção do vetor pMACIA HL anti-CD3.....	79
Figura 22. Esquema dos sítios de clonagem criados após anelamento do Linker LH furina..	80
Figura 23. Estratégia para clonagem da porção VL no vetor pMACIA H LHfur.....	81
Figura 24. Estratégia para construção do vetor pMACIA LH anti-CD3.....	83
Figura 25. Comparação da produção do anticorpo anti-CD3 humano no sobrenadante de transfectomas de HEK293 a partir dos três vetores.....	85

Figura 26. Comparação da produção do anticorpo anti-CD3 humano no sobrenadante de transfectomas de BHK-21 a partir dos três vetores.....	87
Figura 27. Análise do anticorpo anti-CD3 purificado a partir de transfectomas de BHK-21..	89
Figura 28. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3.....	91
Figura 29. Níveis de produção do anticorpo anti-CD3 em transfectomas estáveis de BHK-21.....	94
Figura 30. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3.....	96

Índice de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados nos EUA para uso terapêutico.....	5
Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.....	26

Lista de abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos
AICD	Morte celular induzida por ativação
Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
APS	Persulfato de amônio
BCIP	5-Bromo-4Cloro-indolil fosfato
BHK	Células renais de <i>hamster</i> recém-nascidos
°C	Grau Celsius
CD	Marcador de superfície celular (<i>Cluster of differentiation</i>)
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CHO	Células de ovário de <i>hamster</i> chinês
C κ	Porção constante <i>kappa</i> da cadeia leve
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
CMV	Citomegalovírus
dH ₂ O	Água destilada
dNTPs	Mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados adenosina, citidina, guanosina e timidina.
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dsDNA	DNA de fita dupla
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimático
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL	Fluorescência
FR	Arcabouço (<i>Framework</i>)
Fur	Seqüência codificadora de um sítio clivável por furina

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

PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerização
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável de anticorpo de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS
SFB	Soro fetal bovino
TE	Tampão Tris/EDTA
TCR	Receptor de célula T
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodimetilamina
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
UTR	Região não traduzida do gene
v	Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

Resumo

O desenvolvimento de novos anticorpos recombinantes teve impacto significativo no tratamento de diversas doenças. Contudo, devido a complexidade estrutural da molécula de imunoglobulina, a produção desta em células de mamífero ainda é um desafio. Uma das dificuldades é obter uma produção equimolar das cadeias pesada e leve para a prevenção do acúmulo de cadeias não-montadas, seguido de apoptose por estresse. Em nosso grupo, vimos trabalhando com um anticorpo com potencial imunoregulatório específico para o antígeno CD3 humano. Anticorpos anti-CD3 têm sido utilizados como imunoterápicos na prevenção da rejeição aguda de órgãos transplantados e é considerado um fármaco promissor para o tratamento de doenças auto-imunes. A produção desse anticorpo em cultura de células animais tem se mostrado limitante devido ao baixo rendimento de anticorpo recombinante. Na tentativa de desenvolver estratégias alternativas para a produção de anticorpo recombinante, foram construídos vetores de expressão, onde o anticorpo inteiro é produzido a partir de construções monocistrônicas, bicistrônicas e tricistrônica em células de mamíferos. As versões monocistrônicas possuem uma seqüência codificadora de um sítio clivável por furina entre as duas cadeias do anticorpo. A versão bicistrônica possui um elemento IRES sintético entre as duas cadeias. Além disso, foi introduzida uma marca seletiva para o antibiótico Geneticina associada ao mesmo cassete de expressão como um cístron extra guiado por outro elemento IRES. Para produção do anticorpo anti-CD3 foram utilizadas as linhagens celulares HEK293 e BHK-21, de forma transiente e estável. Os anticorpos produzidos foram purificados por cromatografia de afinidade e analisados para a produção de imunoglobulina intacta. Os resultados indicam que a construção bicistrônica pMACIA HIL e monocistrônica pMACIA HL são capazes de garantir a expressão de ambas as cadeias de anticorpo. Já as construções monocistrônica pMACIA LH e bicistrônica pMACIA HL IRES neo não foram capazes de produzir o anticorpo recombinante. A construção tricistrônica pMACIA HIL IRES neo foi a construção que se mostrou mais promissora, apresentando estabilidade de produção do anticorpo em transfectomas estáveis.

Palavras-chave: anticorpo, anti-CD3, monocistrônicas e bicistrônica

Abstract

The development of new pharmaceuticals derived from recombinant antibodies had a significant impact in the treatment of various illnesses. However, due to the structural complexity of the immunoglobulin molecule, the production of these molecules in mammal cells is still challenging. One of the difficulties is the equimolar production of heavy and light chains and the prevention of the stress induced by the accumulation of unassembled protein. We are working with a potentially immunoregulatory recombinant humanized antibody specific for the human CD3 antigen. Anti-CD3 antibodies have been used in the prevention of the acute graft rejection and are considered as a promising pharmaceutical for the treatment of autoimmune diseases. The production of this antibody in culture of animal cells has shown to be problematic due to the low yield of recombinant antibody recovery. In the attempt to create alternative strategies for recombinant production of antibody, monocistronic, bicistronic and tricistronic expression vectors were constructed to coordinate the expression of a complete antibody in mammal cells. The monocistronic versions possess a furin cleavage coding sequence between the both antibody chains. The bicistronic version possesses a synthetic IRES element between the two chains. A selective mark for the Geneticin antibiotic was introduced in the expression cassette as an extra cistron driven by another IRES element. The cell lines HEK293 and BHK-21 were used for transient or stable production of the anti-CD3 antibody. Recombinant antibodies were purified by affinity chromatography and analyzed for the production of intact immunoglobulin. The results indicate that the bicistronic construction pMACIA HIL and the monocistronic construction pMACIA HL are capable to express both antibody chains. On the other hand, the monocistronic construction pMACIA LH or the bicistronic construction pMACIA HL IRES neo were not able to produce the recombinant antibody. The tricistronic vector pMACIA HIL IRES neo was shown to be the most promising construction to obtain the whole antibody production in stable transfectomes.

Key words: antibody, anti-CD3, monocistronics and bicistronic.

Introdução

1.1 Anticorpos

O sistema imune garante a integridade do organismo em resposta às injúrias sofridas no seu convívio com o ambiente, como infecções, acúmulo de produtos metabólicos e a outras intoxicações, mantendo a homeostase (revisto por Cohen, 2007). Essa homeostase é mantida por dois tipos de resposta, a imunidade inata, sendo esta a primeira linha de defesa contra infecções; e a imunidade adaptativa, que tem por característica responder com um alto grau de especificidade à infecção por determinado antígeno. Essa última pode ser subdividida em dois tipos: imunidade mediada por células, a qual envolve os linfócitos T e é responsável pela resposta a microorganismos intracelulares; e a imunidade humoral, mediada por moléculas presentes no sangue e mucosas, chamadas de anticorpos. Os anticorpos são produzidos por células denominadas linfócitos B. Essas moléculas possuem a capacidade de reconhecer antígenos, neutralizar microorganismos e marcá-los para eliminação por vários mecanismos efetores (revisto por Abbas *et al.*, 2003).

Os anticorpos (Ab) ou imunoglobulinas são glicoproteínas que possuem massa molecular em torno de 150 kDa, compostos por dois tipos de cadeias polipeptídicas: pesada (H) e leve (L) (revisto por Janeway *et al.*, 2001). Cada cadeia pesada é unida covalentemente a uma cadeia leve por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, já ligadas às cadeias leves, são mantidas unidas covalentemente, também por pontes dissulfeto, formando o anticorpo (Abbas *et al.*, 2003) (Figura 1).

As cadeias das imunoglobulinas podem ser diferenciadas pelos seus isotipos. A cadeia leve é subdividida nos isotipos *kappa* (κ) e *lambda* (λ), enquanto que a cadeia pesada se subdivide em cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ e μ . Esses cinco isotipos de cadeia pesada são utilizados para diferenciar as cinco classes de imunoglobulinas, sendo elas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. A classe mais comum e abundante de anticorpo no soro, dependendo do organismo, é a IgG, sendo também a mais utilizada para fins terapêuticos.

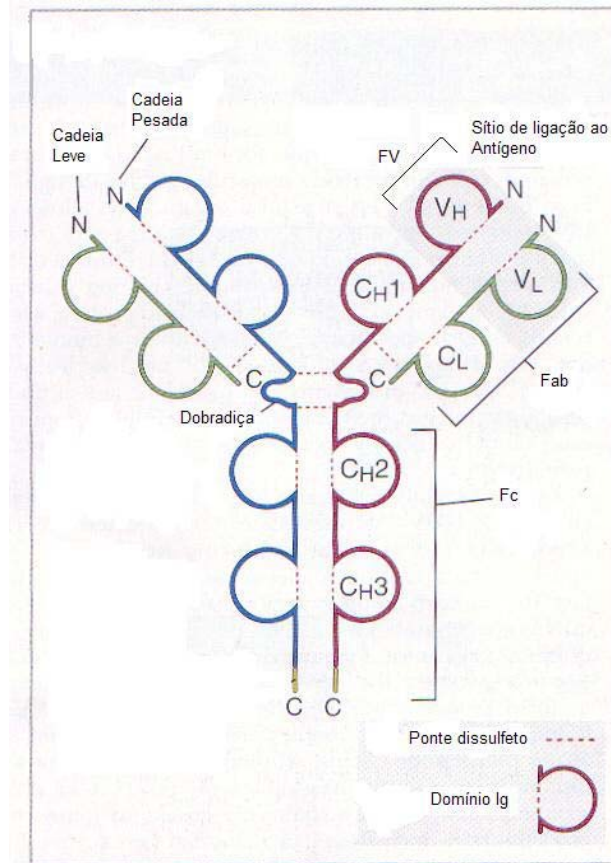


Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. (Abbas *et al.*, 2003).

As imunoglobulinas podem ser fragmentadas por proteólise. Uma molécula de IgG quando submetida a clivagem por papaína na região da dobradiça gera duas moléculas. Uma delas é chamada de fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *Antigen Binding Fragment*), constituído da cadeia leve ligada ao fragmento VH-CH1 da cadeia pesada (revisado por Holliger e Hudson, 2005). Já a outra é chamada de fragmento cristalizável (Fc), composto pelas cadeias constantes CH2 e CH3. O fragmento Fc é responsável por interagir com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, mediando a maioria das funções biológicas de um anticorpo. Os domínios VH e VL juntos, das cadeias pesada e leve respectivamente, formam o fragmento variável (Fv) responsável pela ligação ao antígeno (revisado por Janeway *et al.* 2001).

Além desses fragmentos gerados por proteólise, é possível por técnicas de DNA recombinante, gerar novos fragmentos de anticorpos como alternativa para a utilização clínica. Um dos fragmentos mais utilizados é o scFv, composto pelos domínios VH e VL unidos por um conector polipeptídico flexível ((Gly₄Ser)₃, por exemplo), mimetizando a região Fv do anticorpo com a mesma especificidade original. Uma outra opção é a união do

fragmento scFv à região Fc formando o fragmento FvFc que reúne as vantagens do scFv, como maior penetrabilidade tecidual e a facilidade de manipulação gênica, às funções efetoras do fragmento Fc (Figura 2).

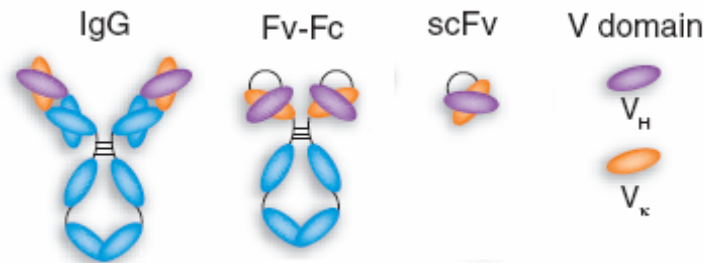


Figura 2. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. (Holliger e Hudson, 2005).

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

1.2 Anticorpos na clínica

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

A utilização clínica de anticorpos monoclonais data de vinte anos. O primeiro, um anticorpo murino anti-CD3 humano, Orthoclone OKT3, aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration – EUA) em 1986, vem sendo utilizado até hoje no tratamento da rejeição aguda de transplantes renais, cardíacos e hepáticos (Li *et al.*, 2005). Desde então o mercado de anticorpos monoclonais vem crescendo cada dia mais. Em 2004, existiam 18 anticorpos aprovados pelo FDA no mercado (Tabela 1), variando entre anticorpos murinos, quiméricos, humanizados e totalmente humanos. Nessa época, eram previstos que 16 novos anticorpos entrariam no mercado até 2008 (Reichert e Pavolu, 2004), dos quais 5 se confirmaram, o Certolizumab pegol (2008), o Eculizumab (2007), o Natalizumab (2004), o Panitumumab (2006) e o Renibizumab (2006), sendo quatro humanizados e um totalmente humano (http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_antibody_therapy). Entre os anos de 2001 e 2002, o mercado de anticorpos monoclonais cresceu 37, 5%, chegando a um patamar de US\$ 5,4 bilhões. Essa taxa de crescimento vem sendo mantida e estima-se que esse mercado atinja US\$ 30 bilhões em 2010 (Maggon, 2007).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados nos EUA para uso terapêutico*

Nome (Genérico)	Molécula Alvo	Tipo	Doença indicada	Categoria Terapêutica	Empresa	Data de Aprovação
OKT3 (Muromonab-CD3)	CD3	Murino	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Johnson & Johnson	19.06.1986
ReoPro (Abciximab)	CA17-1A	Quimérico	PTCA	Homeostase	Centocor	22.12.1994
Panorex (edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer colorretal	Anti-Neoplástica	Centocor	1995
Rituxan (Rituximab)	CD20	Quimérico	Linfoma Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Biogen IDEC	26.11.1997
Zenapax (Daclizumab)	IL2R	Humanizado	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Protein Design Labs	10.12.1997
Simulect (Basiliximab)	IL2R	Quimérico	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Novartis	12.05.1998
Synagis (Palivizumab)	RSV F	Humanizado	Profilaxia de RSV	Anti-infectivo	MedImmune	19.06.1998
Remicade (Infliximab)	TNF- α	Quimérico	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Centocor	24.08.1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her2/neu	Humanizado	Metástase de câncer de mama	Anti-Neoplástica	Genentech	25.09.1998
Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	CD33	Humanizado	Leucemia mielóide	Anti-Neoplástica	Wyeth	17.05.2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica	Anti-Neoplástica	Millennium/ILEX	07.05.2001

Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	CD20	Murino	Linfoma Non- Hodgkins	Anti- Neoplástica	Biogen IDEC	19.02.2002
Humira (Adalimumab)	TNF- α	Humano	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Abbott	31.12.2002
Xolair (Ornalizumab)	IgE	Humanizado	Asma	Imunológica	Genentech	20.06.2003
Bexxar (Tositumomab- I 131)	CD20	Murino	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti- Neoplástica	Corixa	27.06.2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Imunológica	Genentech	27.10.2003
Erbix (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer colorectal	Anti- Neoplástica	Imclone Systems	12.02.2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer colorectal, renal.	Anti- Neoplástica	Genentech	26.02.2004
Tysabri (Natalizumab)	Integrina A4	Humanizado	Doença de Crohn e esclerose múltipla	Imunológica	Biogen IDEC	23.11.2004
Lucentis (Renibizumab)	VEGF-A	Humanizado	Degeneração macular	Anti- Neoplástica	Genentech	30.06.2006
Vectibix (Panitumumab)	EGFR	Humano	Câncer colorectal	Anti- Neoplástica	Amgen	27.09.2006
Soliris (Eculizumab)	C5	Humanizado	Paroxysmal hemoglobinúria (PNH)	Imunológica	Alexion Pharm	16.03.2007
Cimzia (Certolizumab pegol)	TNF- α	Humanizado	Doença de Crohn	Imunológica	UCB	22.04.2008

*Adaptado de (Silva, 2008)

1.3 Anticorpo anti-CD3

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

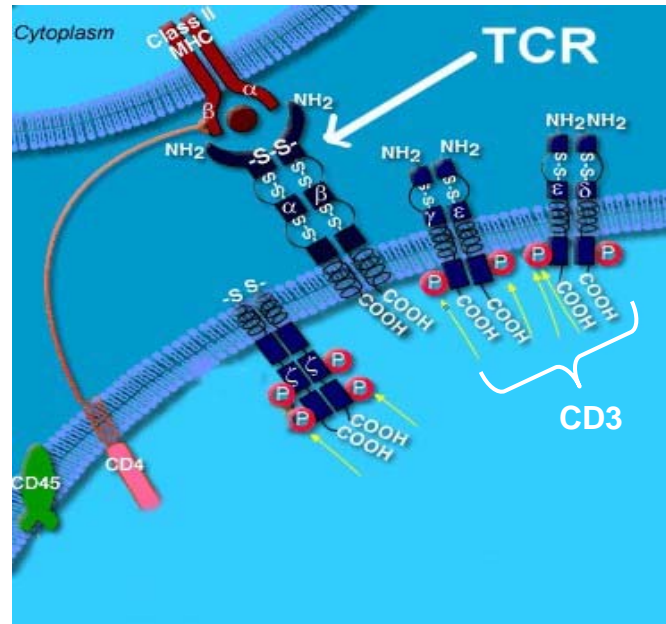


Figura 3. Diagrama esquemático do complexo receptor de células T (TCR). Este é constituído pelo TCR, cadeias ζ e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias ζ e do CD3 apresentam uma seqüência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), indicada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

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

A ligação de anticorpos anti-CD3 gera uma sinalização diferente daquela realizada via complexo TCR e esta é responsável pelos efeitos observados durante o tratamento com esses imunobiológicos. Esses efeitos podem ser: depleção de células T dependente do sistema complemento ou uma citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC); lise da célula alvo, aproximando-a de uma célula T citotóxica (Wong e Colvin, 1991); indução de apoptose por meio de uma transdução de sinal direta, particularmente em células T ativadas (Carpenter *et al.*, 2000); depleção de células T por morte celular induzida por ativação (AICD, do inglês,

Activated Induced Cell Death); ou ainda o desenvolvimento de um estado de irresponsividade ao estímulo chamado de anergia clonal (Smith *et al.*, 1997).

Relatos recentes mostram outros efeitos relacionados aos anticorpos monoclonais anti-CD3, incluindo mecanismos imunorregulatórios (Chatenoud, 2003). Dados de anticorpos anti-CD3 de última geração mostram que o tratamento em curto prazo pode induzir um estado de tolerância a um determinado antígeno que é sustentado sem o uso de imunossuppressores. Como exemplo, pode-se citar o tratamento da diabetes Tipo 1 (Herold *et al.*, 2005), psoríase e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Utset *et al.*, 2002).

O OKT3 é um anticorpo monoclonal murino e, como tal, tem o seu uso limitado devido a sua capacidade de gerar uma resposta caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas (principalmente IgM e IgG) contra anticorpos produzidos em camundongo promovendo uma rápida remoção e neutralização do OKT3. Para resolver este problema, a humanização desse anticorpo tem sido um instrumento valioso no desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos específicos anti-CD3.

Diante dos problemas relacionados à origem murina do OKT3, a utilização da engenharia de anticorpos pode ser a chave para a solução desses entraves na utilização de anticorpos originados de camundongos. Desde a década de 1980, estudos são feitos com o objetivo de reduzir a imunogenicidade de anticorpos monoclonais de origem murina. A humanização de anticorpos propõe que, por meio de técnicas de biologia molecular, possam ser conferidas características de um anticorpo humano, tornando-os similares aos circulantes no soro, diminuindo assim a resposta imune direcionada contra essas moléculas.

Com o desenvolvimento das técnicas de humanização, os anticorpos humanizados tornaram-se uma realidade de sucesso na clínica, sendo que dos 22 anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA para uso terapêuticos 78% são humanizados, ou parcialmente humanizados (quiméricos). Além disso, mais de 56 anticorpos humanizados já estão em fase avançada de testes clínicos e devem chegar ao mercado nos próximos anos (Reichert e Pavolu, 2004).

Nos últimos anos, tem-se procurado obter anticorpos humanizados com o mínimo de aminoácidos murinos em toda seqüência do anticorpo. Com esse objetivo foi proposta a técnica de transplante de CDR (CDR grafting) que consiste em transplantar os três CDRs da seqüência codificadora do anticorpo murino para um arcabouço (*framework*) de um anticorpo humano, por manipulação gênica (Maranhão e Brígido, 2001).

A humanização do anticorpo anti-CD3 desenvolvida pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília foi realizada de acordo com a técnica de *CDR grafting* (citado por Maranhão e Brígido, 2001). Para tal, foram escolhidos arcabouços humanos para cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) que possuíam a maior similaridade com a seqüência do anticorpo murino, visando, assim, reter a especificidade de ligação característica do OKT3 (Figura 4).

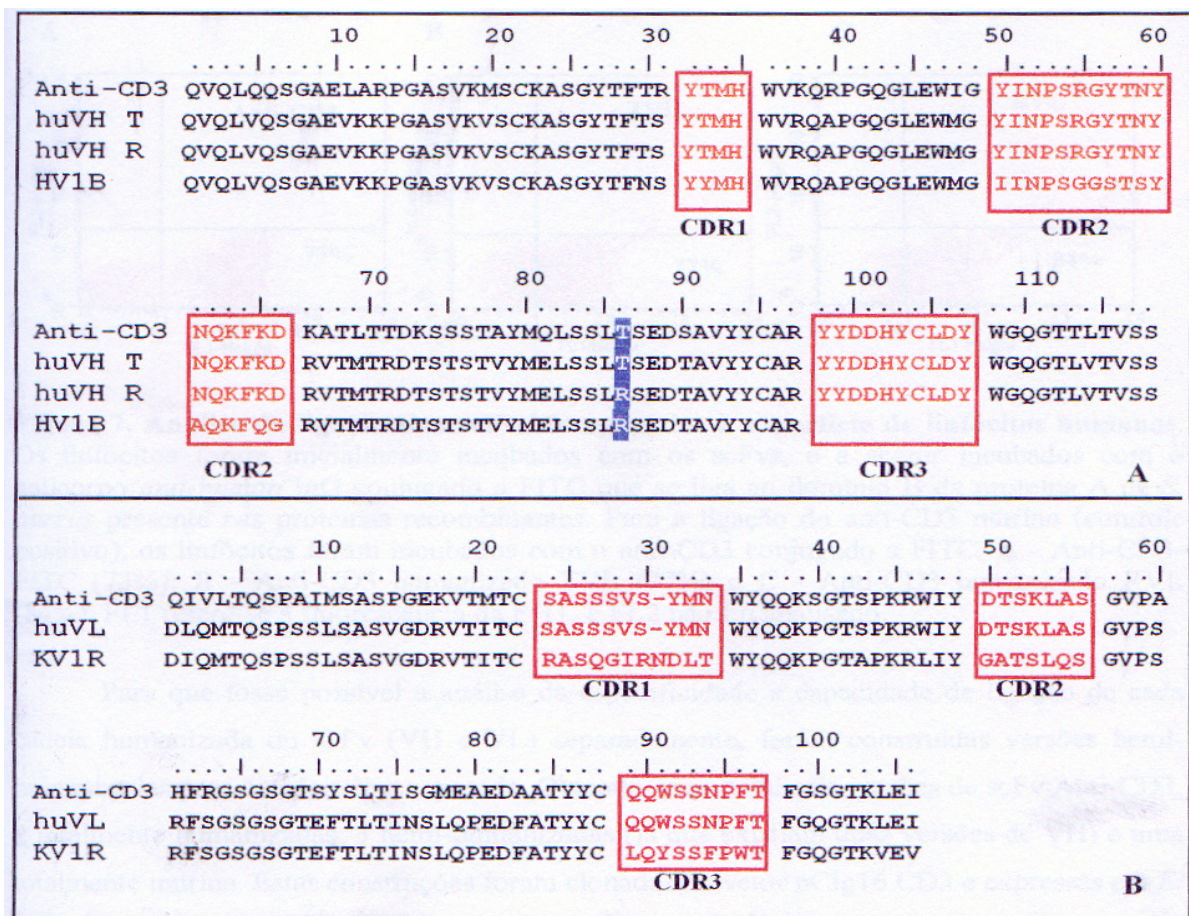


Figura 4. Alinhamento das seqüências de resíduos de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3. Seqüência codificadora do OKT3 (anti-CD3), versões humanizadas do anti-CD3 para as cadeias pesada (huVH T e R) e leve (huVL) e seqüências humanas utilizadas como arcabouço para as CDRs do anti-CD3 (HV1B e KV1R).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

Na humanização da cadeia variável pesada foi utilizada uma seqüência germinal humana que possuía a maior similaridade com a VH do OKT3, a H1VB, tendo uma identidade de 71,4% com a VH do OKT3. Para análise do impacto estrutural do transplante das CDRs do OKT3 nessa seqüência germinal, foram realizadas análises a partir da estrutura

cristalográfica do anticorpo murino 1MRC depositada no banco de dados de proteína (PDB, do inglês, Protein Data Bank). A partir dessa análise, o resíduo 86 (presente no arcabouço 3 [FR3, do inglês, framework 3]) da cadeia variável pesada foi considerado estruturalmente importante, pois se situa na base das CDRs 2 e 3. Essa análise possibilitou a criação de duas versões da cadeia variável pesada (Figura 4), uma com o resíduo murino treonina (hVH^{T86}) e outra com o resíduo humano arginina (hVH^{R86}) (Fonseca, 2000).

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

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

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

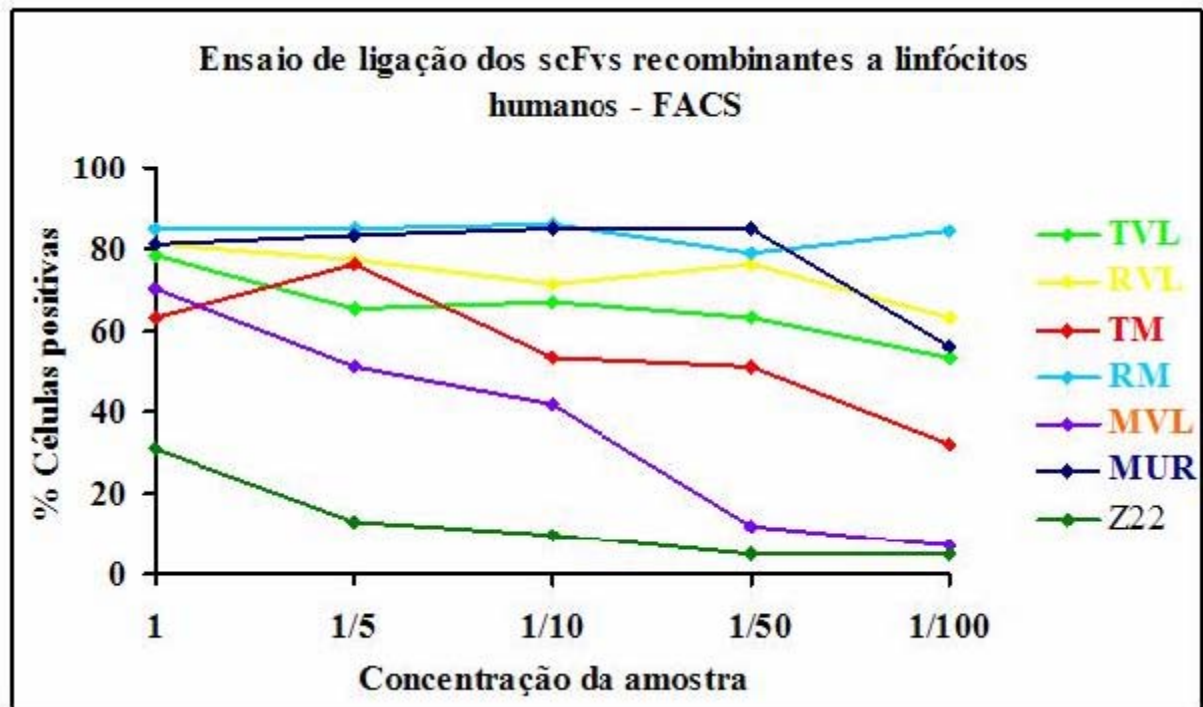


Figura 5. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas pelos scFvs recombinantes. TVL e RVL, versões humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86} , respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86}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

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

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

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

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

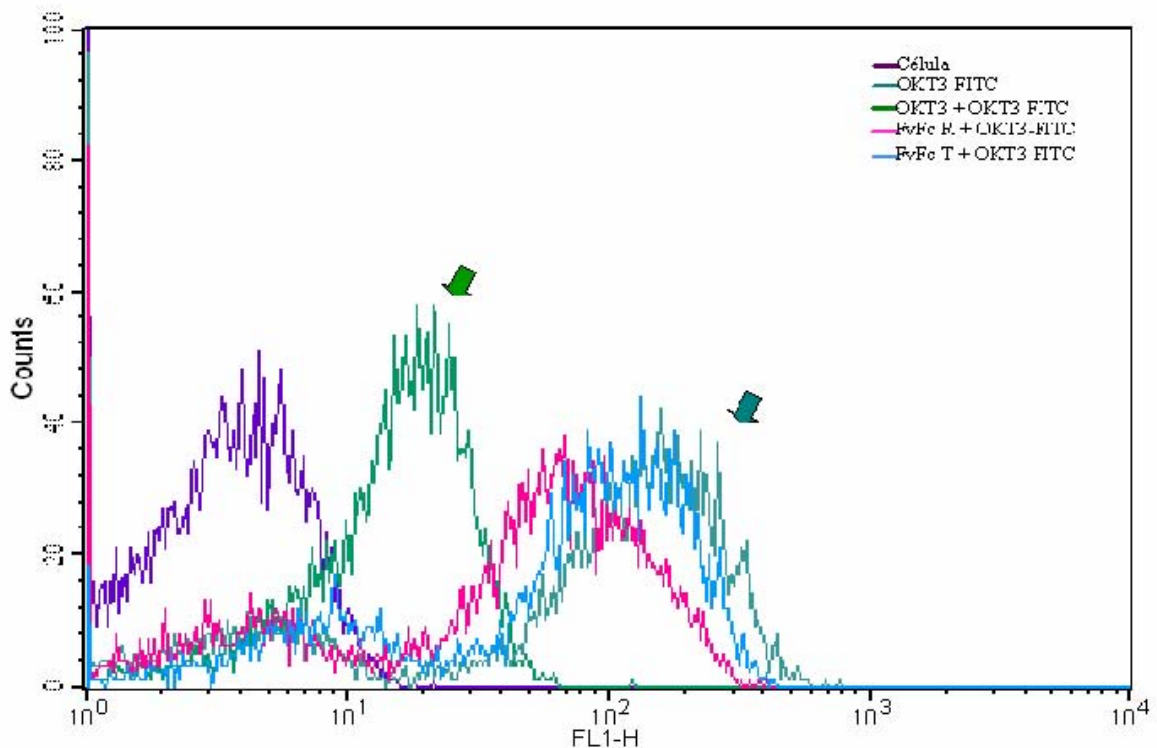


Figura 6. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC. Os linfócitos foram incubados inicialmente com os FvFc's humanizados T e R ou com o OKT3 não conjugado e posteriormente com o OKT3-FITC. Seta azul indicando a fluorescência da reação do OKT3-FITC sem bloqueio. Seta verde indicando o deslocamento da intensidade de fluorescência provocada pelo bloqueio utilizando o OKT3 não marcado. FL1: Intensidade de fluorescência emitida por FITC (530 nm); Counts: número de células. (Silva, 2008)

Por outro lado, esses anticorpos foram capazes de induzir um perfil de citocinas regulatórias em contraste ao perfil inflamatório induzido por OKT3 em experimentos *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*). Este perfil imunorregulatório é evidenciado pela comparação da produção de IL-10 e IFN- γ . A razão IL-10/IFN- γ é bem maior nas células cultivadas na presença das versões humanizadas do que naquelas cultivadas com o OKT3. Além disso, a presença dos anticorpos humanizados foi capaz de induzir uma expressão tardia do gene FOXP3 (marcador

de células T regulatórias), sugerindo que os anticorpos anti-CD3 humanizados provavelmente estimulam o desenvolvimento de células T com atividade regulatória (Silva, *et al.* 2009, manuscrito em preparação).

1.4 Produção de proteínas recombinantes em células de mamíferos

Uma das grandes limitações na utilização de anticorpos terapêuticos é o processo de produção complexo. As limitações se encontram principalmente na quantidade reduzida de proteína produzida e no alto custo, o que de certa forma dificulta o acesso ao medicamento por boa parte dos pacientes. Atualmente, o estado da arte do processo de produção de anticorpos monoclonais emprega células de mamíferos devido a sua capacidade de promover dobramento e processamento pós-traducional corretos (revisto por Wurm, 2004).

Em 1986 foi produzida a primeira proteína recombinante com fins terapêuticos em células de mamífero, a proteína ativadora de plasminogênio tissular humana (*human tissue plasminogen activator*) (revisto por Wurm, 2004). Desde então, inúmeros estudos visando à otimização da expressão de produtos biológicos comerciais vêm sendo realizados. Atualmente, 60 a 70% de biofármacos e proteínas com interesse comercial são produzidos em células de mamífero. Isso porque as células de mamífero têm características fisiológicas mais similares às de humanos do que células de leveduras ou de *Escherichia coli*. Desse modo, a existência de processos como glicosilação de proteínas, fosforilação, formação de pontes de dissulfeto e outras modificações pós-traducionais tornam a produção de proteínas com interesse comercial mais viável em células de mamífero do que em outros tipos celulares (Wurm, 2004).

A linhagem de células mais utilizada é a linhagem de células de ovário de *hamster* chinês (CHO). Essas células são epiteliais, têm a morfologia fibroblastóide e são aderentes ao plástico onde são cultivadas. A sublinhagem CHO-K1 é derivada da linhagem celular parental de CHO que foi estabelecida a partir do material da biópsia do ovário de um *hamster* chinês adulto (Puck *et al.*, 1958).

Atualmente, utilizam-se outros tipos celulares para a produção de proteínas heterólogas com fins terapêuticos. Uma é a linhagem HEK293, derivada de células embrionárias de rim humano transformadas com o DNA de adenovírus tipo 5 (Grahan *et al.*, 1977). Esta linhagem é utilizada principalmente para a expressão transiente de proteínas de interesse, como a glicoproteína de membrana do retrovírus HTLV-1 (Penteado *et al.*, 2006) e

anticorpos (Braren *et al.*, 2007). Outra linhagem que vem sendo utilizada é a BHK-21, derivada de células renais de *hamster* recém-nascidos (Stoker e MacPherson, 1964), empregada na expressão do fator de coagulação VIII humano (Ishaque *et al.*, 2008), anticorpos (Cruz *et al.* 2002), entre outras proteínas recombinantes.

Entretanto, um dos principais obstáculos para a utilização das células de mamífero em cultura é a baixa produção da proteína recombinante comparando-se com outros sistemas de expressão, como leveduras e *E. coli*. Para isso, os cientistas estão estudando métodos para melhorar os níveis de produção de biofármacos, de modo a se atingir um patamar de produção industrial. Alguns métodos já descritos são: a mudança da temperatura de cultivo das células (Shi *et al.*, 2005), adição de compostos químicos no meio de cultura (Sung *et al.*, 2005) e a engenharia de vetores de expressão (Quilici, 2008).

1.4.1 Promotor CMV e o Íntron A

Um dos promotores mais comumente utilizados em construções de vetores de expressão em células de mamífero é o promotor constitutivo do citomegalovírus (CMV). Este promotor pode ser utilizado em diversas linhagens celulares de origens distintas, sendo, portanto o mais utilizado nas construções do nosso grupo. O promotor dirige a expressão dos genes Imediatamente Precoces de CMV, que apresenta diversas regiões regulatórias, como sítios de ligação ao fator nuclear 1 (NF1) (Champman *et al.*, 1991). Este gene é constituído por 4 éxons e 3 íntrons, sendo que o maior dos íntrons, o íntron A, possui o sítio mais forte de ligação a NF1 (Champman *et al.*, 1991). Neste mesmo estudo, observou-se que o íntron A possui ainda um sítio homólogo ao elemento regulador interno do gene da troponina I, um elemento similar a um *enhancer* (Figura 7). Além disso, este sítio pode também funcionar como sítio de ligação de fatores de transcrição (Champman *et al.*, 1991).

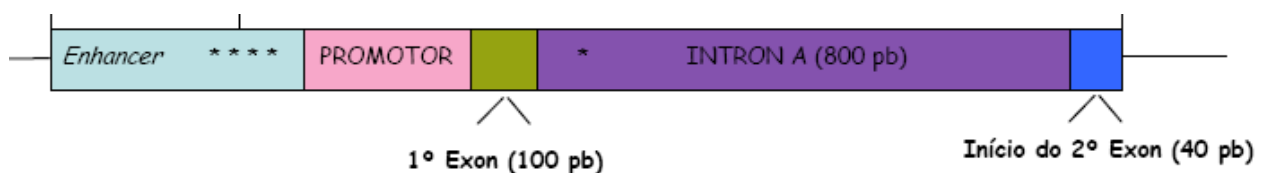


Figura 7. Esquema do promotor completo de CMV. O *enhancer* com os 4 sítios de NF1 (*), o primeiro e o segundo éxon e o íntron A, o maior íntron deste gene, com aproximadamente 800 pb, podem ser observados na figura. O intron A possui ainda o sítio mais forte de ligação a NF1, representado por (*) (Quilici, 2008).

Os íntrons são seqüências genômicas removidas do transcrito de RNA correspondente por meio de um processo conhecido como *splicing*. Um complexo que consiste em diversas ribonucleoproteínas e pequenos RNAs nucleares (sRNA), denominado *spliceossomo*, é responsável por cortar as junções íntron-éxon, remover os íntrons e por fim unir as extremidades dos éxons, formando um mRNA maduro.

Atualmente, os cientistas perceberam que o *splicing* não é um evento estático, correlacionando-se com outros processos do metabolismo do RNA, como a poliadenilação do pré-mRNA e seu transporte do núcleo para o citoplasma, a tradução e o decaimento. Em outras palavras, muitas proteínas que participam da maquinaria de um determinado processo podem também fazer parte de outros, sendo que o efeito final desta interação é o aumento da produção de uma proteína recombinante (Le Hir, Nott e Moore, 2003).

Sabe-se também que os íntrons podem modificar o nível de remodelamento da cromatina, fazendo com que o DNA esteja mais acessível para a ligação da RNA polimerase II e dos fatores de transcrição associados, conseqüentemente aumentando o nível de transcrição do gene estudado. Corroborando tal observação, foi constatado que, tanto *in vitro* quanto em camundongos transgênicos, os íntrons do gene do hormônio de crescimento de camundongo promovem um remodelamento da cromatina, permitindo um aumento de até quinze vezes da produção da proteína comparando-se com a versão sem íntron (Liu *et al*, 1995).

Mediante interação de proteínas do *spliceossomo* com fatores de transcrição, há um melhoramento da processividade e atividade da RNA polimerase II. Estudos demonstraram que um dos componentes do *spliceossomo*, o snRNA U1, interage com o fator de transcrição geral TFIIF no estágio inicial da transcrição, estimulando a taxa de formação da primeira ligação fosfodiéster pela RNA polimerase II (Kwek *et al*, 2002). A determinação da posição do íntron também é importante para que a sua função de potencializador da expressão gênica seja alcançada. Um estudo indicou que a posição do sítio de *splicing* 5' em relação ao promotor é proporcional à transcrição gênica, sendo que quanto maior a distância entre estes, menor é a taxa de transcrição (Furger *et al*, 2002).

Diversos grupos de pesquisa, inclusive o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, utilizaram o íntron A com sucesso em suas construções, comparando níveis de expressão de diversas proteínas, como anticorpos (Xia *et al*, 2006), fator VIII e gp120 do HIV (Campos-da-Paz *et al.*, 2008 e Champman *et al*, 1991 e) e proteínas repórter, como a luciferase (Xu *et al*, 2001 e Quilici, 2008).

1.4.2 IRES

A produção de anticorpos em células de mamíferos pode ser realizada utilizando-se dois vetores de expressão independentes, cada um codificando uma das cadeias do anticorpo, leve ou pesada, ou na forma policistrônica, onde as duas cadeias estão contidas no mesmo vetor, contendo dois promotores, um para cada cadeia. Uma regulação fina da expressão das duas cadeias de anticorpo é essencial para a otimização da produção de IgGs em células de mamífero. A transfecção dessas células com duas construções independentes é o procedimento menos eficiente para a obtenção de uma expressão balanceada das duas cadeias. Isso porque geralmente o sítio de integração desses vetores no DNA da célula hospedeira tem grande efeito na expressão do gene recombinante. Quando se utiliza dois vetores em uma transfecção eles podem integrar em regiões com perfis transcricionais distintos. Assim, a integração em regiões de heterocromatina resulta em pouca ou nenhuma expressão, enquanto integração em eucromatina freqüentemente permite a expressão do gene (Wurm, 2004).

Um exemplo de construção que possibilita a expressão policistrônica é a utilização de sítios de entrada ribossomais internos (IRES, do inglês, *Internal Ribosome Entry Site*). Os IRES são seqüências localizadas na região 5' UTR de alguns vírus de RNA, como por exemplo os picornavírus. Ao ser adicionado entre as duas cadeias de anticorpos, o IRES possibilita a tradução dos dois genes, devido à geração de um sítio interno para entrada de ribossomos sem a necessidade de todo o aparato de iniciação da tradução presente em eucariotos. Outro exemplo da utilização do IRES é entre um gene de interesse e uma marca seletiva (Figura 8). A adição de uma marca seletiva no vetor durante uma transfecção é importante quando se pretende selecionar um clone altamente produtor e estável. Esse é um parâmetro essencial para a produção em larga escala de proteínas recombinantes.

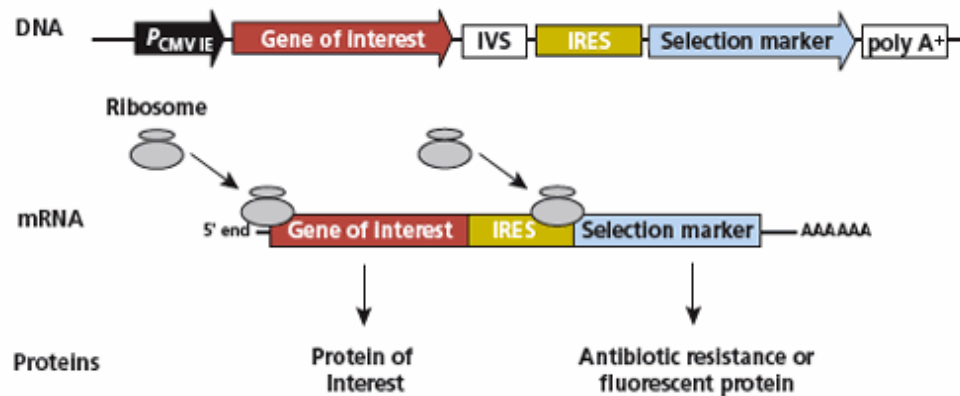


Figura 8. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, *Internal Ribosome Entry Site*) em um processo de tradução. P_{cmvie}: promotor. Gene of interest: gene de interesse. Selection marker: marca seletiva. IVS: íntron sintético. Poly A: sinal de poliadenilação. Adaptado de (http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10479&tabno=2).

A descoberta do elemento IRES gerou uma nova abordagem para a co-expressão de múltiplas cadeias polipeptídicas por possibilitar uma razão definida de cadeias leve e pesada de anticorpos (Houdebine e Attal, 1999). Usualmente, cístrons adicionados a jusante de IRES, são traduzidos com menos eficiência do que nas construções monocistrônicas, onde há a iniciação da tradução cap-dependente. Contudo, Li e colaboradores, em 2007, demonstraram que uma construção bicistrônica contendo IRES entre as duas cadeias de um anticorpo, comparada a construções monocistrônicas de cada cadeia co-transfectadas, produziram um nível de expressão de anticorpo similar e estável a longo prazo na linhagem celular CHO.

Mielke e colaboradores, em 2000, demonstraram que uma construção tricistrônica para expressão de anticorpos, com um elemento IRES entre as cadeias pesada e leve de um anticorpo, e outro entre a cadeia leve e uma marca de resistência, apresentaram um nível de expressão de anticorpo maior e mais estável na linhagem celular BHK-21, ao contrário das construções monocistrônicas desse anticorpo co-transfectadas com um vetor com a marca de resistência. Sistemas como esses permitem uma expressão duradoura de proteínas recombinantes, até mesmo de proteínas complexas como anticorpos, com estabilidade a longo prazo.

1.4.3 Furina

Polipeptídeos biologicamente ativos agem como mensageiros intracelulares de informação (neuropeptídeos, peptídeos hormonais), dirigindo muitas atividades celulares (fatores de crescimento, enzimas e receptores) e são envolvidos na patogenicidade de certos vírus (glicoproteínas virais) e bactérias (toxinas). Para que sua função seja assegurada temporal e espacialmente, muitos desses polipeptídeos são inicialmente sintetizados em precursores, ou pró-proteínas, grandes e inativos. Em virtude disso, um mecanismo celular funciona para a liberação do segmento bioativo da proteína. Esse mecanismo é a clivagem proteolítica do precursor por endoproteases celulares, as quais reconhecem pares específicos de aminoácidos, como por exemplo Arg-Arg ou Lys-Arg. Este processamento é encontrado em bactérias, fungos, invertebrados e mamíferos e ocorre tanto na via exocítica quanto na endocítica (processamento e degradação de proteínas) (Denault e Leduc, 1995).

Um exemplo é a furina, uma endoprotease dibásica responsável pelo processamento proteolítico de uma ampla variedade de precursores de proteína da via secretória. A maioria dos substratos da furina são precursores de proteína em rota para o espaço extracelular ou membrana plasmática (Seidah *et al.*, 1993). Esta é a primeira enzima caracterizada da família das convertases similares a subtilisina. Análises por *northern blot* demonstraram que a maior parte do transcrito de 4,4 kb da enzima furina é ubiquamente distribuído em todos os tecidos (Seidah, Chrétien e Day, 1994). Em humanos, esse RNA mensageiro dá origem a uma proteína transmembrânica.

No final de 1989, foi observado por Fuller, Brake e Thorner, que a enzima kexina, presente em levedura e caracterizada como uma serino protease cálcio-dependente, era capaz de clivar o fator pro- α de levedura e a toxina “pro-killer” e possuía em seu sítio catalítico uma alta similaridade de seqüência com a furina humana. As duas enzimas são marcadamente similares, apresentando poucas diferenças em elementos estruturais na superfície das proteínas. Os domínios catalíticos da kexina 2 (Kex2) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da furina possuem o mesmo dobramento e topologia similar a subtilisina e a proteinase K (Figura 9) (Rockwell e Thorner, 2004). Burtet e colaboradores, em 2007, desenvolveram um sistema de expressão de um fragmento Fab em *P. pastoris*, onde as cadeias leve e pesada eram produzidas em um único polipeptídeo contendo uma seqüência codificadora de um sítio reconhecido por Kex2 entre as duas cadeias. Após a clivagem por Kex2, um fragmento Fab corretamente montado era liberado.

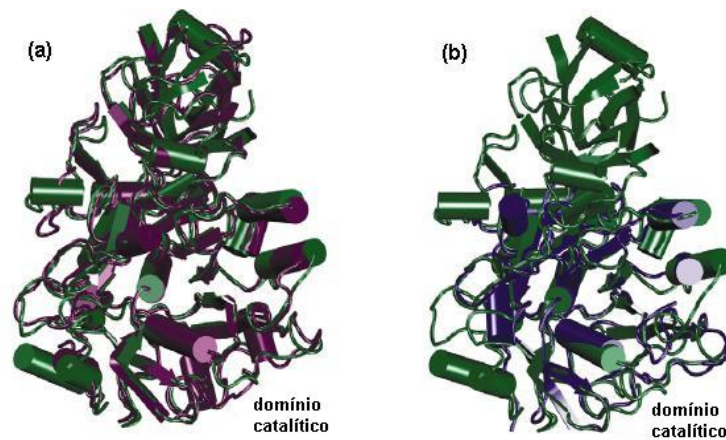


Figura 9. Sobreposição dos domínios catalíticos de Kex2 e furina. (a) Sobreposição de Kex2 (verde) e furina (roxo) mostrando uma similaridade conformacional entre as duas estruturas, apesar de apenas 41% de identidade de seqüência primária entre elas. (b) Sobreposição de Kex2 (verde) e subtilisina (azul) mostrando conservação da estrutura secundária central do domínio catalítico. Adaptada de Rockwell e Thorner, 2004.

Desde a descoberta inicial da existência de furina em células de mamíferos, existe um interesse considerável em determinar sua localização subcelular. Contudo, tentativas de imunolocalização da furina endógena foram dificultadas pela baixa abundância da proteína na maioria das células (van Duijnhoven *et al.*, 1992). Evidentemente, uma pequena quantidade de furina é suficiente para cumprir os muitos processos proteolíticos nos quais a enzima é envolvida.

Shapiro e colaboradores, em 1997, revelaram a localização da furina dentro da célula por imunocitocalização. A proteína está predominantemente concentrada dentro da região trans do Complexo do Golgi (TGN), em torno de 80%, embora uma significativa quantidade da proteína tenha sido encontrada em estruturas vesiculares com características de endossomos e lisossomos (Bosshart *et al.*, 1994). A localização da furina endógena no TGN tem uma implicação importante para a fisiologia da clivagem de precursores de proteína. Sugere-se que a maioria das proteínas celulares e secretadas sofra clivagem no TGN quando estão em trânsito para a membrana plasmática. Portanto, o processamento proteolítico pela furina endógena não requer o desvio dos precursores de proteínas para longe da via secretória, como ocorreria caso a furina estivesse localizada exclusivamente em vesículas endossomais e lisossomais (Shapiro *et al.*, 1997).

Existem alguns relatos da inserção de seqüências codificadoras de sítios cliváveis reconhecidos por furina em construções policistrônicas, com o intuito de separar cada cístron

depois que estes forem traduzidos. Goyal e Batra, em 2000, incluíram um espaçador que continha a seqüência codificadora de um sítio reconhecido por furina entre uma construção de anti-receptor de transferrina humano, na forma de scFv, e a toxina restrictocina, uma toxina ribonucleotídica. Essa construção possibilitaria uma melhor ação da ribotoxina em seu alvo, o ribossomo. A incorporação do espaçador clivável aumentou a atividade citotóxica da construção em 2 a 30 vezes, dependendo da célula alvo.

Fang e colaboradores, em 2007, desenvolveram um sistema de expressão de um anticorpo monoclonal *in vivo*, onde as cadeias pesada e leve do anticorpo eram separadas por uma seqüência codificadora de um sítio reconhecido por furina. O vetor de expressão era injetado via peritônio em camundongos, o sítio entre as cadeias era reconhecido pela furina intracelular, liberando as duas cadeias de anticorpo para serem montadas. O sistema possibilitou uma razão definida das duas cadeias, otimizando a produção do anticorpo que chegou a níveis de 1mg/mL no soro dos camundongos.

Diante de todos esses dados, o uso de engenharia de vetores para expressão e aumento dos níveis de produção de anticorpos em células de mamíferos está sendo largamente utilizado e é de especial interesse para o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília. Assim, propomos nesse trabalho traçar estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamíferos, utilizando construções monocistrônicas, bicistrônicas e tricistrônica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Traçar estratégias para a expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamíferos por meio de construções monocistrônicas, bicistrônicas e tricistrônicas.

2.2 Etapas metodológicas

- 2.2.1 Clonagem das cadeias pesada e leve inteiras do anticorpo anti-CD3 humanizado no vetor para expressão em células de mamífero pMACIA IRES EV, que contém o promotor CMV, o íntron A, um íntron de imunoglobulina dentro do peptídeo sinal da cadeia pesada e um elemento IRES sintético. Construção bicistrônica (HIL).
- 2.2.2 Retirada do IRES sintético entre as cadeias leve e pesada da construção do anti-CD3 humanizado no vetor pMACIA e inserção de uma sequência codificadora de um sítio clivável por furina entre as duas cadeias, construindo duas versões monocistrônicas: cadeia pesada – sítio clivável por furina – cadeia leve (HL), e cadeia leve – sítio clivável por furina – cadeia pesada (LH).
- 2.2.3 Transfecção transiente das três construções do anticorpo, monocistrônicas e bicistrônica, nas linhagens celulares HEK-293 e BHK-21.
- 2.2.4 Comparação do nível de expressão do anticorpo anti-CD3 humano das construções monocistrônicas e bicistrônica.
- 2.2.5 Construção da versão tricistrônica do anticorpo a partir da construção bicistrônica HIL, com a adição de outro elemento IRES e uma marca de resistência a geneticina (NEO^R). Construção HIL IRES neo.
- 2.2.6 Transfecção estável da construção tricistrônica HIL IRES neo na linhagem celular BHK-21.

- 2.2.7 Construção de outra versão bicistrônica do anticorpo a partir da construção monocistrônica HL, com a adição de um elemento IRES e uma marca de resistência a geneticina (NEO^R). Construção HL Ires neo.
- 2.2.8 Transfecção estável da construção bicistrônica HL IRES neo na linhagem celular BHK-21.
- 2.2.9 Comparação do nível de expressão do anticorpo anti-CD3 humano das construções bicistrônica HL IRES neo e tricistrônica HIL IRES neo.

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Células

3.1.1.1 Linhagens Bacterianas

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

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

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

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção das versões do anticorpo.

3.1.1.2 Linhagem de Células de Mamíferos

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

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

3.1.2 Plasmídios Utilizados

- **pIg CD3 scFv R-** 3,9 kb, contém o scFv do anticorpo anti-CD3 versão R

humanizado, hVH^{R86} hVL, múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R. Utilizado para a construção da cadeia pesada inteira do anticorpo, como doador da porção VH.

- **pMACPS VHCH123 anti-CD18 (Ruggiero, 2002):** 5,7 kb, contém a cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD18, Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, sinal de poliadenilação SV40 polyA. Utilizado para junção da porção VH do anti-CD3 à porção constante CH123, formando a cadeia pesada inteira do anti-CD3.

- **pUC57 hVL** – 3,0 kb, contém o VL humanizado do anticorpo anti-CD3, Amp^R, rep (pMB1), múltiplos sítios de clonagem. Utilizado para a construção da cadeia leve inteira, como doador da porção VL.

- **pMACPS VLC κ anti-CD18 (Ruggiero, 2002)** – 6,0 kb, contém a cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD18, Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, sinal de poliadenilação SV40polyA. Utilizado para junção da porção VL do anti-CD3 à porção constante C κ , formando a cadeia leve inteira do anti-CD3.

- **pMACIA IRES EV** – 6,4 kb, derivado do vetor pMAC com substituição do promotor mínimo de CMV pelo promotor/*enhancer* de CMV com intron A, íntron de imunoglobulina no interior da primeira seqüência líder codificadora do peptídeo sinal, um elemento IRES sintético, sinal de poliadenilação SV40 polyA, Amp^R, ori ColE1 (Figura 10). Utilizado para clonagem das cadeias pesada e leve inteiras do anticorpo anti-CD3 humanizado.

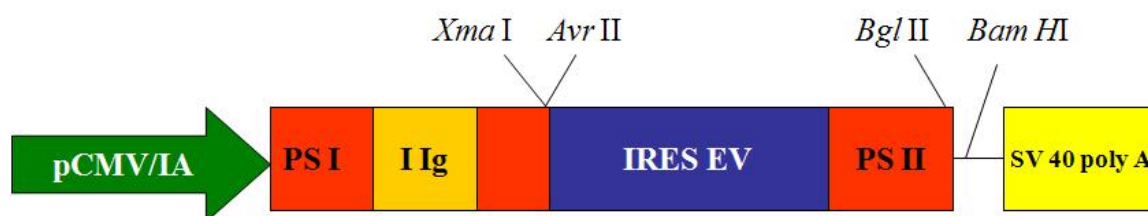


Figura 10. Esquema do vetor de expressão pMACIA IRES EV. Siglas – *pCMV/IA*: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *I Ig*: íntron de imunoglobulina presente dentro da seqüência de *PS I*; *IRES EV*: IRES sintético; *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve e *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação Os sítios de restrição utilizados para a clonagem das cadeias pesada e leve do anticorpo anti-CD3 humanizado foram evidenciados.

- **pGEM-T Easy (Promega)** – vetor comercial de 3,15 kb, constituído pelo promotor T7 e SP6, múltiplos sítios de clonagem, gene *α LacZ*, gene da β -lactamase, origem de replicação de fago (f_1 ori) e origem de replicação plasmidial. Utilizado para a clonagem de produtos de PCR.

- **pLXIN (Clontech)** - vetor comercial de 6,1 kb, possui um elemento IRES, NEO^R, sítio múltiplo de clonagem, os elementos virais 5' MoMuSV LTR e 3' MoMuLV LTR, Amp^R, ori ColE1. Utilizado como doador da porção IRES Neo para construção das versões bicistrônicas e tricistrônicas do anticorpo.

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

3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento, clonagem e reações de PCR

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 μ moles/ μ L. A tabela 2 mostra as seqüências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Seqüência	Utilização
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Seqüenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T-easy.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAAC 3'	Seqüenciamento de fragmentos de PCR clonados no vetor pGEM T-easy.
CH2 ₂₀₂₆ reverso	5' GGGGGAAGAGGAAGACTGAC 3'	Seqüenciamento da cadeia pesada clonada no plasmídeo pMACIA IRES EV. Anela na região Fc da cadeia.
CH2 ₂₁₆₆ reverso	5' CGGCTTTGTCTTGGCATTAT 3'	Seqüenciamento da cadeia pesada clonada no plasmídeo pMACIA IRES EV. Anela na região Fc da cadeia.

Ck reverso	5' GCGTTATCCACCTTCCACTG 3'	Seqüenciamento da porção VL da cadeia leve clonada no plasmídio pMACIA IRES EV. Anela na região Ck da cadeia.
CH1 reverso	5' GGGAAGTAGTCCTTGACCAG 3'	Seqüenciamento da porção VH da cadeia pesada clonada no plasmídio pMACIA IRES EV. Anela na região Fc da cadeia.
CMV 3' reverso	5' ATGGCGGTCATATTGCAGAT 3'	Seqüenciamento da cadeia leve clonada no plasmídio pMACIA IRES EV. Anela ao final do vetor.
CH123 509	5' TAATGCCAGACAAAGCCGCGGGAGGAG 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica HL. Iniciador de PCR para a amplificação da porção Fc e inserção de seqüência codificadora do sítio clivável por furina. Anela na posição 509 da porção Fc da cadeia pesada.
CH123 reverso	5' CAGATCTCGACGGGCTCTAGGGG CTAGCGAGAGGCTCTTCTGCG 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica HL. Iniciador de PCR para a amplificação da porção Fc e inserção de seqüência codificadora do sítio clivável por furina. Anela ao final da porção Fc da cadeia pesada e insere a seqüência do sítio clivável por furina ao final dela. Adiciona um sítio de <i>Bgl</i> II.
Linker LH fur	5' CCGGCTAGATCTGCTTCTCGAGATATC 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica LH Utilizado para a construção da versão monocistônica LH. Anela-se ao Linker LH fur reverso
Linker LH fur reverso	5' CCGGGATATCTCGAGAAGCAGATCTAG 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica LH Quando anelado ao Linker LH fur gera sítios de <i>Bgl</i> II, <i>Xho</i> I e <i>Xma</i> I.
LH VL	5' TTGTCAGCAGTATAGTAAGTTCCCATTTCAG GTTCGGCTCGGG 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica LH. Iniciador de PCR para a amplificação da porção Ck e inserção de seqüência codificadora do sítio clivável por furina. Anela ao final da porção VL da cadeia leve.
LH CK fur	5' CCCGGGAGCTCTCTCCGAGCTCGGGATCC AACTCTCCCCTGTT 3'	Utilizado para construção da versão monocistônica LH. Iniciador de PCR para a amplificação da porção Ck e inserção de seqüência codificadora do sítio clivável por furina. Anela ao final da porção Ck da cadeia leve e insere a seqüência do sítio clivável por furina ao final dela. Adiciona um sítio de <i>Xma</i> I.

3.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

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

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

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

3.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

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

NaCl 1,0% (p/v)

pH 7,0.

Meio LB ágar

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

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

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

MOPS 1,0% (p/v)

pH 7,0.

Meio SOB

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

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

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

pH 7,0.

Meio SOC

Meio SOB	98 mL
Solução estoque de Mg^{2+} 2 M	1 mL
Solução estoque de glicose 2 M	1 mL

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

$MgCl_2$	1 M
$MgSO_4$	1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

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

3.1.6 Antibióticos**Ampicilina**

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

Tetraciclina

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

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

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

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

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

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

Meio de Congelamento de Células

DMEM

Soro Fetal Bovino 20% (v/v)

DMSO 5% (v/v)

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

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	0,048 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Glicose	1 g
Vermelho de fenol	0,01 g
dH ₂ O q.s.p.	1 L
pH 7,4	

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

Tripsina 2,5 g

EDTA 0,38 g

BSS.CMF qsp 1 L

pH 8,0

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

Estocar de -5 a -20 °C.

Adicionado ao meio de cultura Ham-F12 com L-glutamina à concentração de 1,25%, 2,5%, 5% ou 10% (v/v).

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

Estocar de -5 a -20 °C.

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

Antibiótico/Antimicótico 100X (GIBCO)

Penicilina 10.000U

Estreptomicina 10.000µg

Anfotericina B 25µg/mL

Preparada em 0,85% de salina

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

Geneticina – G418 (GIBCO)

A geneticina liofilizada foi ressuspensa em água Mili-Q na concentração de 50 mg/mL. Após a ressuspensão, ela foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22 µm. Após a filtração, ela foi estocada a 4°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção em transfecções estáveis para plasmídios que continham o gene de resistência a geneticina (NEO^R).

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán 400 mg

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

Reagente de transfecção PolyFect® (Qiagen, nº de catálogo 301105)

Esse reagente de transfecção é um dendrímero ativado que possui uma carga positiva, que permite sua ligação a receptores carregados negativamente na superfície de células eucarióticas. Uma vez dentro da célula, o reagente PolyFect® tamponiza o pH do lisossomo e assegura a estabilidade de o transporte do DNA intacto até o núcleo.

Reagente de transfecção Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, nº de catálogo 15338-100)

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

3.1.8 Soluções e tampões de uso geral**Azida Sódica – Solução estoque 100X**

Azida sódica 5% (p/v)

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

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Tampão Tris

Tris-HCl pH 8,0 10mM

Glicogênio

Glicogênio 20mg/mL

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

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

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 MNaN₃ 0,02% (p/v)**Tampão PBST 1X, pH 7,4**

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

3.1.9 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação bacteriana**Solução de CaCl₂**CaCl₂ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

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

Glicerol 15%

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Solução de Glicerol

Glicerol 10% (v/v)

Solução de X-Gal

Solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo (X-Gal) dissolvido em N,N-dimetilformamida em solução estoque de 2,5%. Solução armazenada a -20°C e protegida da luz. Usada no meio de cultura na proporção de 1:100.

Solução de IPTG

Solução de isopropil-tio-β-D-galactosídeo (IPTG) dissolvido em água em solução estoque de 100 mM e esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μm. Usada no meio de cultura na proporção de 1:1000.

Cubetas de eletroporação (BioAgency[®], n^o catálogo: 165-2086N)

3.1.10 Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Glicose	50 mM

Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio	3 M
Ácido Acético	2 M
pH ajustado para 4,8 - 5,0	

RNase A

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

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6	1 v
Clorofórmio	1 v
B-hidroxiquinilona	0,05% (p/v)
Equilibrado com 0,1 v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6	

Clorofil

Clorofórmio	24 v
Álcool isoamílico	1 v
Equilibrado com 0,25 v de tampão TE	

Etanol 100%

Etanol 100% (v/v)

Etanol 70%

Etanol 70% (v/v)

Isopropanol 100%

Isopropanol 100% (v/v)

Acetato de sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

3.1.11 Tampões de Endonucleases de Restrição**3.1.11.1 Fermentas[®] :****TangoTM (10X)**

Tris-Acetato pH 7,9 33 mM

Acetato de Magnésio 10 mM

Acetato de Potássio 66 mM

BSA 0,1 mg/mL

Fast Digest BufferTM (10X)**3.1.11.2 New England Biolabs[®] :****NEBuffer 1 (1X)**

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

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 2 (1X)

Tris-HCl pH 7,9 10 mM

MgCl₂ 10 mM

DTT 1 mM

NEBuffer 3 (1X)

Tris-HCl pH 7,9	150 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
DTT	1 mM

NEBuffer 4 (1X)

Tris-Acetato pH 7,9	20 mM
Acetato de Magnésio	10 mM
Acetato de Potássio	50 mM
DTT	1 mM

NEBuffer EcoRI (1X)

Tris-HCl pH 7,5	100 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM
Triton X-100	0,025% (v/v)

3.1.11.3 Promega[®] :**Buffer A (1X)**

Tris-HCl pH 7,5	6 mM
MgCl ₂	6 mM
NaCl	6 mM
DTT	1 mM

Buffer H (1X)

Tris-HCl pH 7,5	90 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM

3.1.12 Tampões de outras reações

Tampão da polinucleotídeo quinase 10X (New England Biolabs[®])

Tris-HCL pH 7,6 660 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

BSA 2 mg/mL

Tampão SAP (Fosfatase alcalina de camarão) (Promega[®])

Tris-HCl pH 9,0 500 mM

MgCl₂ 100 mM

Tampão de Reação da Taq DNA Polimerase CENBIOT/RS 10X

Tris-HCl 0,1M

KCl 0,5M

BSA 0,1% (p/v)

Na PCR foi adicionado cloreto de magnésio para uma concentração final de 1mM e uma mistura de dNTPs (dGTP, dATP, dCTP e dTTP) na concentração de 10 mM cada.

Tampão de Anelamento de Oligonucleotídeos

Tris-HCl 1M

MgCl₂ 100mM

pH 7,6

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

Tris-HCl 250 mM

MgCl₂ 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25% (p/v)

pH 7,6

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

Tris-HCl pH 7,5	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM

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

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

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

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

3.1.13.2 New England Biolabs[®] :

<i>Ava</i> I	(10U/ μL)
<i>Avr</i> II	(4U/ μL)
<i>Bam</i> H I	(20U/ μL)
<i>Bgl</i> II	(10U/ μL)
<i>Eco</i> R I	(20U/ μL)
<i>Hind</i> III	(20U/ μL)
<i>Kpn</i> I	(10U/ μL)

Nco I (10U/ μ L)
Nde I (20U/ μ L)
Nhe I (10U/ μ L)
Not I (2,5U/ μ L)
Pvu II (5U/ μ L)
Sac I (20U/ μ L)
Sac II (20U/ μ L)
*Sna*B I (2,5U/ μ L)
Sfi I (20U/ μ L)
Spe I (10U/ μ L)
Sma I (20U/ μ L)
Stu I (10U/ μ L)
Xba I (20U/ μ L)
Xho I (20U/ μ L)
Xma I (10U/ μ L)

3.1.13.3 Promega[®] :

Apa I (10U/ μ L)
Pst I (10U/ μ L)

3.1.14 Outras enzimas

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

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

T4 DNA Ligase (1U/ μ L) (Promega[®])

T4 Polinucleotídeo Quinase (1U/ μ L) (New England Biolabs[®])

Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) (1U/ μ L) (Promega[®])

Fragmento Klenow da DNA polimerase (0,5U/ μ L) (Invitrogen[®])

Taq DNA polimerase (2U/ μ L) (Cenbiot/RS[®])

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

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA pH 8,0	0,02 M
dH ₂ O q.s.p.	1 L

Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato	2 M
Trizma-base	242 g
Ácido Acético Glacial	57,10 mL
EDTA pH 8,0	0,05 M
dH ₂ O q.s.p.	1 L

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

Tampão de corrida TEB 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno Cianol	0,1% (p/v)

Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo	10 mg/mL
-------------------	----------

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

Trizma base	125 M
Glicina	125 mM
SDS	0,5% (p/v)

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

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

Acrilamida 30% (29:1)

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

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris	36,34 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

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

Tris	12,11 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

SDS 10%

SDS	10 g
dH ₂ O q.s.p.	100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

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

3.1.16 Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, *Western e Dot blot*)**Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)**

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

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

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

Solução de Bloqueio

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

Solução Reveladora para ELISA

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

Solução Reveladora para *Western* e *Dot blot*

O NBT (Nitro Blue Tetrazole) e o BCIP (5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato) eram preparados numa solução estoque de 50 mg/mL. O NBT solubilizado em N,N-dimetil formamida e o BCIP, em água. Para preparar 10 mL da solução reveladora, 66 µL do estoque de NBT eram adicionados em 10 mL de APB e em seguida 33 µL do estoque de BCIP. Esta ordem deve ser respeitada para se evitar a precipitação dos reagentes.

Membrana de Nitrocelulose

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

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

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

3.1.17 Coluna de cromatografia de afinidade

HiTrap[™] Protein A HP 1mL (GE lifescience, n.º. catálogo. 17-0402-01). Para purificação dos anticorpos recombinantes.

3.1.18 Soluções para cromatografia de afinidade

Tampão de ligação HiTrap Protein A

Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0

Filtrado em membrana com poros de 0,45 µm

Tampão de Eluição HiTrap Protein A

Ácido Cítrico 0,1 M, pH 3,5 para eluição das proteínas recombinantes e pH 2,0 para limpeza.

Filtrados em membrana com poros de 0,45 µm

3.1.19 Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas

Concentradores Amicon[®] Bioseparations:

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

3.1.20 Marcadores moleculares para DNA e proteína

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

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

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

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 2.000; 1.200; 800; 400; 200 e 100. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 20; 10 e 5 ng, respectivamente.

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

Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 2 µL do marcador, corresponde a massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

Page RulerTM Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas[®] n.º catálogo SM1811)

Fragmentos de proteínas em kDa: 250; 130; 100; 70; 55; 35; 27; 15 e 10.

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®] n.º catálogo SM0431)

Fragmentos de proteínas em kDa: 116; 66,2; 45; 35; 25; 18,4; 14,4.

3.1.21 Kits comerciais

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

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

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

Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen[®], n.º. catálogo 28704).

Invisorb Fragment CleanUp - Para extração de DNA de gel de agarose (Invitex[®], n.º. catálogo 10203002).

Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para seqüenciamento (Qiagen[®], n.º. catálogo 28104).

Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®], n.º. catálogo 42600).

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

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

3.1.22 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, *Western Blot* e *Dot Blot*.

Anti – IgG humana (H + L) feito em cabra (Pierce[®] n.º catálogo: 31119)

Concentração: 1,8 mg/mL

Titulação de uso: 1:1000 (ELISA)

Anti – IgG humana (Fc específico) feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina

(Sigma[®] n.º catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL

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

IgG Humana (Sigma[®] n.º catálogo: K9001)

Concentração: 1 mg/mL

Utilizado à 80, 100 ou 160 ng/mL como padrão nos experimentos de ELISA.

Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra (Pierce[®] n^o catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:2500 (*Western Blot* e *Dot Blot*)

Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma[®] n^o catálogo: A-4187)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:2500 (*Western Blot* e *Dot Blot*)

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de DNA plasmidial

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

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

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

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

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

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

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

7- Eram adicionados 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, as amostras eram centrifugadas por 5 min a 5.000 g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

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

9- Eram adicionados 2v de etanol absoluto gelado e as amostras eram incubadas a -20°C por

no mínimo 2 horas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6- O sobrenadante era filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante eram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente, as amostras eram centrifugadas a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.

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

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

9- O passo anterior era repetido mais uma vez.

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

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

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

desprezado.

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

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

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

3.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

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

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

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

3.2.4 Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

Após eletroforese os fragmentos de DNA a serem eluídos eram cortados do gel de agarose. A eluição do DNA do gel era feita de acordo com as instruções do fabricante do kit utilizado (Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen[®] ou Invisorb Fragment CleanUp, Invitex[®]) ou submetido ao Freeze-Squeeze:

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

2 – A bolsa contendo o fragmento era congelada a -40°C.

3 - Após o total congelamento, a porção plana da tampa de um microtubo de 1,5 mL era

utilizada para macerar o fragmento até se liquefazer.

4 – O líquido e o gel eram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]).

5 – O material era centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.

6 - Após a centrifugação o material era precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. As amostras eram incubadas a -20°C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

3.2.5 Reação de Desfosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP)

Essa enzima tem a capacidade de remover o grupo fosfato presente nas extremidades 5' de dsDNA digeridos com enzimas de restrição. Dessa forma, ela impede uma auto-ligação do DNA plasmidial digerido sem a inserção do inserto.

1 – Dois a quatro µg de dsDNA eram incubados com 5 µL da fosfatase alcalina e tampão apropriado da enzima em 1X para um volume final de 50 µL por 1h a 37^o C.

2 – O sistema era inativado por 15 minutos a 65^o C. A partir desse ponto, o sistema era utilizado em sistema de ligação para posterior transformação de células competentes *E. coli*.

3.2.6 Reação de polimerização de extremidades de DNA utilizando o fragmento Klenow da DNA polimerase I (Invitrogen[®])

Para a extensão das extremidades coesivas geradas por meio de digestão com enzima de restrição, uma mistura de dNTP era utilizada na concentração final da reação de 1mM e 0,5U de enzima para cada 100 ng de material utilizado na digestão. O tampão utilizado foi o tampão da própria enzima de restrição utilizada para a digestão do DNA, visto que o fragmento *Klenow* tem atividade ótima em qualquer tampão. A reação ocorreu a 37°C durante 40 minutos e depois a enzima foi inativada a 65° C por 20 minutos.

3.2.7 Reação de anelamento de oligonucleotídeos

Cem pmoles de cada oligonucleotídeo eram colocados em um microtubo de 1,5mL, juntamente com 6,6 µL de tampão de anelamento e água MiliQ para um volume final de 50 µL. Essa mistura era fervida durante 10 minutos, e depois a temperatura do banho caía

lentamente, até que fosse atingida a temperatura ambiente. Esse processo durou cerca de 3 horas. A partir daí, os oligonucleotídeos anelados já estavam prontos para a reação de ligação aos vetores plasmidiais.

3.2.8 Amplificação dos fragmentos Fc e Cκ para inserção da seqüência codificadora de um sítio clivável por furina – PCR

As reações de PCR eram feitas da seguinte forma:

3.2.8.1 Amplificação do fragmento Fc fur

DNA molde (pMACIA HIL anti-CD3)	50ng
Primer 5'	10μM
Primer 3'	10μM
Tampão de reação da enzima 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0,25mM de cada
Taq DNA polimerase	2U/μL

O volume final de reação era de 50μL e a reação era feita no termociclador Eppendorf nas seguintes condições:

- 1) 94°C 3 min
- 2) 30 ciclos: 68 °C 1 min
 72 °C 2 min 30seg
 94 °C 1 min
- 3) 72°C 10 min

3.2.8.2 Amplificação do fragmento Cκ fur

DNA molde (pMACPS VLCκ anti-CD3)	50ng
Primer 5'	10μM
Primer 3'	10μM
Tampão de reação da enzima 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0,25mM de cada
Taq DNA polimerase	2U/μL

O volume final de reação era de 50μL e a reação era feita no termociclador Eppendorf nas seguintes condições:

- 1) 94°C 3 min
- 2) 30 ciclos: 65 °C 1 min
 72 °C 2 min 30seg
 94 °C 1 min
- 3) 72°C 10 min

3.2.9 Ligação de fragmentos de DNA

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

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

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

3.2.10 Preparação de células competentes e transformação bacteriana

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

- 1- Eram inoculados 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. O inóculo era incubado a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2- O inóculo era centrifugado a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante era desprezado. (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subseqüentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3- O sedimento era ressuspendido em 10 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 4- Era feita uma centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4°C, o sobrenadante era desprezado.
- 5- O sedimento era ressuspendido em 1 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo, as células eram aliqüotadas e estas podiam ser utilizadas por um período máximo de 24 horas.
- 7- Eram incubados de 100 a 200 µL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- O choque térmico era realizado por meio de incubação do sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Era adicionado imediatamente 1 mL de meio LB e o sistema era incubado por 1 h a 37°C.
- 10- Eram semeadas quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 150 µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

3.2.10.2 Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Uma colônia isolada da célula de interesse era inoculada em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.
- 2- Era inoculado 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. O inóculo era incubado a

37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} de 0,7 a 0,9.

2- O inóculo era centrifugado a 3.000 x g por 20 min a 4°C, o sobrenadante era desprezado e a célula era mantida sempre gelada a partir desse momento.

3- O sedimento era ressuspensionado em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir eram adicionados mais 75 mL de glicerol 10% gelado.

4- Era feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo a etapa anterior.

5- O sedimento era ressuspensionado em 25 mL de Glicerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.

6- O sedimento final era ressuspensionado em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células eram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.

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

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

9- Imediatamente após o choque a cubeta era lavada com 3 mL de meio SOC e o meio era recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.

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

3.2.11 Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.

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

As seqüências obtidas por meio do seqüenciamento automático eram analisadas utilizando ferramentas de bioinformática: Phred e CAP3 disponíveis na página: www.biomol.unb.br. Depois da análise de qualidade, as seqüências eram submetidas à ferramenta de procura de alinhamentos básicos locais (BLAST, do inglês, Basic Local

Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para análise de identidade com seqüências já depositadas no GenBank. As seqüências também eram manipuladas e analisadas com seqüências, depositas em um banco de dados pessoal, utilizando o programa BioEdit Sequence Aligment Editor (Hall, 2007).

3.2.12 Cultura de células de mamíferos

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

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

1 – As células em cultura aderente eram lavadas 3 vezes com BSS.CMF. Após esse procedimento, eram adicionados 5 mL de tripsina para que as células se soltassem da garrafa de cultura.

2 – A suspensão celular era então transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL, ao qual eram acionados 5 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% de Soro fetal bovino (SFB), para a inativação da tripsina que é nociva as células.

3 – As células eram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.

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

5 – As células eram distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos, onde 500µL de meio de congelamento eram adicionados.

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

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

1 – Os criotubos eram transferidos para um banho de 37°C até o total descongelamento das células.

2 – As células eram plaqueadas em densidade de 2×10^2 células por garrafa de 25cm^2 em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB.

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

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

- 1 – O meio de cultura da garrafa era descartado.
- 2 – Eram adicionados à garrafa 5 mL de tripsina numa concentração de 1:250.
- 3 – Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu.
- 4 – A tripsina era neutralizada com cerca de 5 mL de meio acrescido de 10% de SFB.
- 5 – A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 50 mL, e centrifugados a 130 x g por 8 minutos.
- 6 – O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso em 3 mL de meio acrescido de SFB.
- 7 – Era transferida toda a população células por garrafas de 75 cm² ou 150 cm² contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

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

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

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

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

- 1 – As células eram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15mL, ao qual se adicionou 5 mL de meio com SFB.
- 2 – As células eram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.
- 3 – O sobrenadante era descartado e as células ressuspensas em 3mL de meio de cultura remanescente.
- 4 – Vinte microlitros da suspensão celular eram incubados com 80µL da solução de Azul de Tripán (diluição de 5 vezes da cultura).
- 5 – A câmara de Neubauer era montada, e nela aplicou-se um volume de 10µL da mistura.
- 6 – Eram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não-viáveis (azuis). A célula não-viável tem a membrana celular mais permeável, e por isso, o corante entra na célula, tornando-a azul. Após a contagem, era estabelecida a porcentagem de células viáveis.

3.2.12.6 Transfecção de Células HEK-293 utilizando o reagente PolyFect[®] Transfection Reagent (Qiagen, nº de catálogo 301105)

- 1 – Em uma placa de cultura de 6 poços eram semeadas cerca de 3×10^5 células por poço, e em seguida eram adicionados 3 mL de meio contendo SFB.
- 2 – As células eram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência de 40%.
- 3 – No dia seguinte, o DNA a ser transfectado era diluído em meio de cultura sem soro. Para placas de 6 poços, a quantidade a ser utilizada é: 2 µg de DNA por poço, para um volume final de 100µL, completado com meio sem soro.
- 4 – Era adicionado o reagente PolyFect[®] à solução de DNA. Para placas de 6 poços, a quantidade do reagente a ser utilizada é 20µL.
- 5 – A solução era incubada por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente.
- 6 – Enquanto o complexo era formado, o meio dos poços do dia anterior era trocado por 1,5mL de meio com soro com antibiótico/antimicótico 1X (tópico 3.1.7).
- 7- Eram adicionados 500µL de meio com soro com antibiótico/antimicótico e a solução era imediatamente transferida aos poços em movimentos cruciformes.
- 8 – As células eram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ e 70% de umidade.
- 9 – No tempo de 48 e 72 horas pós-transfecção, o meio de cultura era coletado e verificava-se a presença dos anticorpos recombinantes.

3.2.12.7 Transfecção de células BHK-21 utilizando o reagente Lipofectamine LTX™ (Invitrogen, nº de catálogo 15338-100)

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

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

Como as construções bicistrônica (HL IRES Neo) e tricistrônica (HIL Ires neo) utilizadas para expressão dos anticorpos recombinantes apresentam o gene de resistência a geneticina (NEO^R), após o processo de transfecção os vetores possibilitaram que fosse feita a seleção das células transfectadas e eliminação daquelas que não estavam produzindo as proteínas recombinantes.

- 1 - Após 72h da transfecção o sobrenadante de cultura era coletado para verificação da expressão de proteínas recombinantes e o meio era repostado adicionado de geneticina a uma

concentração final de 600 µg/mL em todos os poços transfectados com o plasmídio e também no poço com as células não transfectadas, utilizadas como controle.

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

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

3.2.12.9 Propagação das células transfectadas selecionadas para aumento da expressão.

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

1 – O meio de cultura do poço era descartado.

2 – Eram adicionados 500 µL de tripsina ao poço.

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

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

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

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

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

9 – Quando as células chegavam novamente a uma confluência máxima as células eram então passadas para garrafas de 150 cm² contendo 30 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina. A partir de então, as células transfectadas eram mantidas nessas condições, trocando-se o meio a cada 48h nas mesmas condições e coletando-se o sobrenadante para acúmulo de quantidade suficiente para purificação dos anticorpos recombinantes e realização dos ensaios biológicos.

3.2.13 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Eram realizados ensaios do tipo ELISA sanduíche para detecção e quantificação das proteínas recombinantes. Após cada lavagem as placas de microtitulação (Nunc[®]) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções. Os anticorpos utilizados estão detalhados no tópico 3.1.22 dos Materiais.

- 1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com 150 μ L por poço com o anticorpo anti-IgG humana H+L feito em cabra, diluído em PBS 1X 1:1.000, e eram incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 2- Os poços eram lavados 3X com PBST 1X, 200 μ L por poço.
- 3- Os poços eram bloqueados com 180 μ L por poço de solução de bloqueio, e eram incubados durante 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
- 4- Estes eram lavados 3X com PBST 1X e o sobrenadante de cultura das células transfectadas eram adicionados. Eram feitas diluições seriadas de fator comum 3 dos anticorpos em PBS, onde o volume final era de 100 μ L por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243. A mesma diluição era realizada para todas as amostras. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada na concentração especificada nos materiais (diluída na mesma solução/meio que as proteínas recombinantes). As reações eram feitas em triplicatas e eram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente.
- 5- Os poços eram lavados novamente 3X com PBST 1X e 150 μ L por poço do anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina feito em cabra na diluição de 1:5.000 eram incubados por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Os poços eram lavados 3X com PBST 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB).
- 7- O ensaio era revelado com 100 μ L por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB. Este era incubado por 20 a 30 min a temperatura ambiente. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “Microplate Reader BioRad[®]” modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

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

3.2.14 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

A purificação dos FvFc_s recombinantes era realizada na coluna HiTrapTM Protein A HP 1mL (GE lifescience[®]).

- 1 – Os microtubos de coleta da eluição eram preparados adicionando 200 µL de Tris-HCl 1M pH9,0 por mL de fração a ser coletado.
- 2 – Era preparada a bomba peristáltica preenchendo-a de tampão de ligação. A tampa da parte superior da coluna era retirada e a mangueira da bomba peristáltica era conectada à coluna cromatográfica gota a gota.
- 3 - A coluna era lavada com 10 volumes de tampão de ligação mantendo uma taxa de passagem do tampão pela coluna em 1 mL/min.
- 4 – O sobrenadante de cultura filtrado e concentrado era aplicado.
- 5 – A coluna era lavada com 10 volumes de tampão de ligação.
- 6 – Os anticorpos recombinantes ligados eram eluídos com 8 volumes de tampão de eluição pH 3,5 sempre coletando as amostras nos microtubos de coleta preparados com Tris-HCl.
- 7 – Eram passados 3 volumes de tampão de eluição a pH 2,0 para retirada das IgGs bovinas ligadas a resina e limpeza da coluna. O material também era coletado.
- 8 – A coluna era lavada com mais 10 volumes de tampão de ligação.
- 9 – Eram aplicados etanol 20% a coluna, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.

Imediatamente após o fim da coleta, 5µL de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blot*, seguindo o protocolo do item 3.2.14 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas na coluna Centricon YM-50 (Amicon[®]), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 50 kDa para diálise e concentração.

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

- 1 - 5 µL das frações obtidas durante o processo de purificação eram adicionadas diretamente a uma membrana de nitrocelulose.
- 2 - Com a membrana seca, contendo os anticorpos recombinantes ligados, era procedido o bloqueio utilizando solução de bloqueio por 1h a temperatura ambiente ou durante a noite a

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.17 Coloração do gel de SDS-PAGE

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

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

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

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

2 – O "sanduíche" era colocado entre os eletrodos de grafite e submetido a uma corrente elétrica de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de membrana por 1h 45 min.

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

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

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

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

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

Resultados e Discussão

4.1 Etapas metodológicas

Seguem abaixo as etapas metodológicas adotadas neste trabalho (Figura 11).

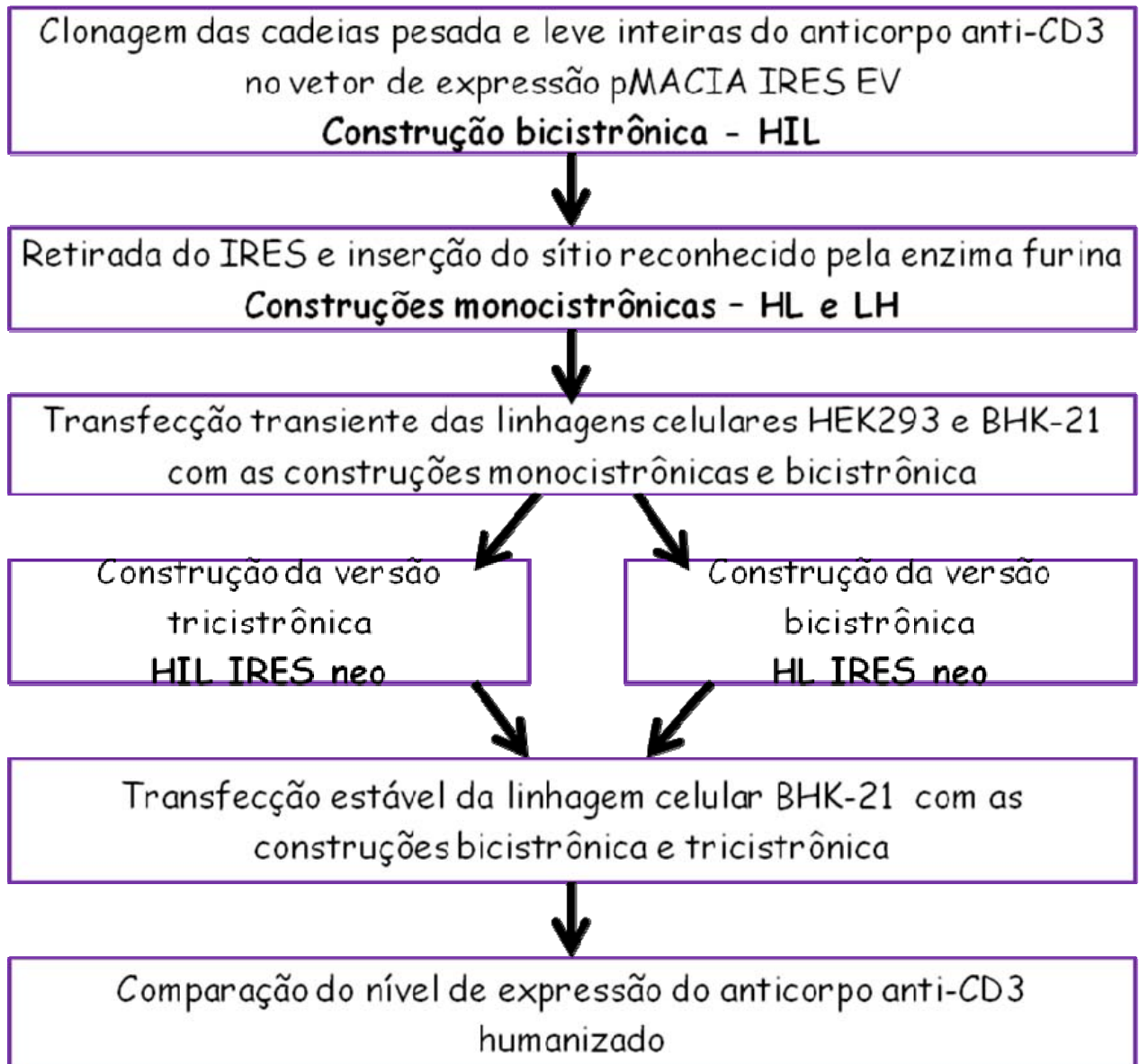


Figura 11. Representação esquemática das etapas metodológicas do trabalho.

4.2 Construção do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3

Tendo em vista os resultados promissores das versões FvFc_s humanizadas do anticorpo anti-CD3 humano (Silva, 2008 e Silva, *et al.* 2009, manuscrito em preparação) foi proposta a construção de versões de anticorpo inteiro para expressão em células de mamífero, a partir da versão FvFc R.

A primeira versão proposta foi uma construção bicistrônica utilizando o vetor pMACIA IRES EV. Este vetor contém um IRES que foi sintetizado a partir da seqüência gênica do isolado 71 de enterovírus (Shih *et al.*, 2000), um íntron de imunoglobulina presente no peptídeo sinal da cadeia pesada advindo da família VH10.2 (Whitcomb *et al.*, 1999) e a região codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve proveniente da região V-J do mieloma MPC11 (Kelley, Coleclough e Perry, 1982). Assim, entre as duas cadeias inteiras do anticorpo, pesada e leve, haveria o elemento IRES sintético, formando o vetor de expressão pMACIA HIL anti-CD3 (Figura 12).

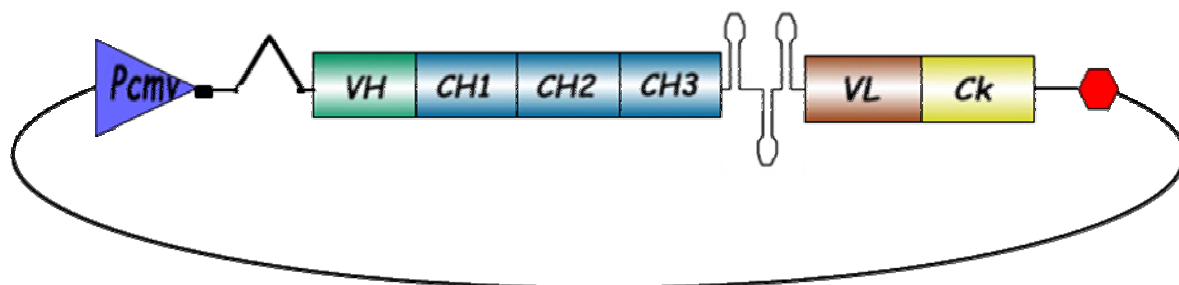


Figura 12. Representação esquemática do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3. Este vetor é composto, respectivamente, por um promotor de citomegalovírus (Pcmv); íntron A; seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada, com seu íntron original; cadeia pesada inteira (VHCH1CH2CH3); IRES sintético; seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; cadeia leve inteira (VLC κ) e sinal de poliadenilação.

4.2.1 Clonagem da cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor de expressão pMACIA IRES EV

Com o vetor de expressão estabelecido, direcionamos as estratégias de clonagem e montagem das seqüências codificadoras do anticorpo recombinante para inseri-las nesse vetor e possibilitar a futura expressão em células de mamíferos.

Para clonagem do fragmento gênico codificador da cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor pMACIA IRES EV, tivemos que montá-la inicialmente num outro vetor, o pMACPS VL κ anti-CD18. Esse vetor foi utilizado como doador da porção κ , e o vetor pUC57 hVL como doador da porção VL humanizada. Dessa forma, esses dois últimos vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xho* I, proporcionando a liberação do VL humanizado anti-CD3 e VL do anti-CD18 (Figura 13). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando a enzima de restrição *Kpn* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida, originando o vetor pMACPS VL κ anti-CD3.

A partir disso, a cadeia leve inteira foi transferida do vetor pMACPS VL κ anti-CD3 para o vetor de expressão pMACIA IRES EV por meio de digestão com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Bam*H I. Essa digestão proporcionou a liberação da cadeia leve inteira e a geração dos sítios para clonagem no vetor pMACIA IRES EV (Figura 14). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando a enzima de restrição *Kpn* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, originando o vetor pMACIA L anti-CD3.

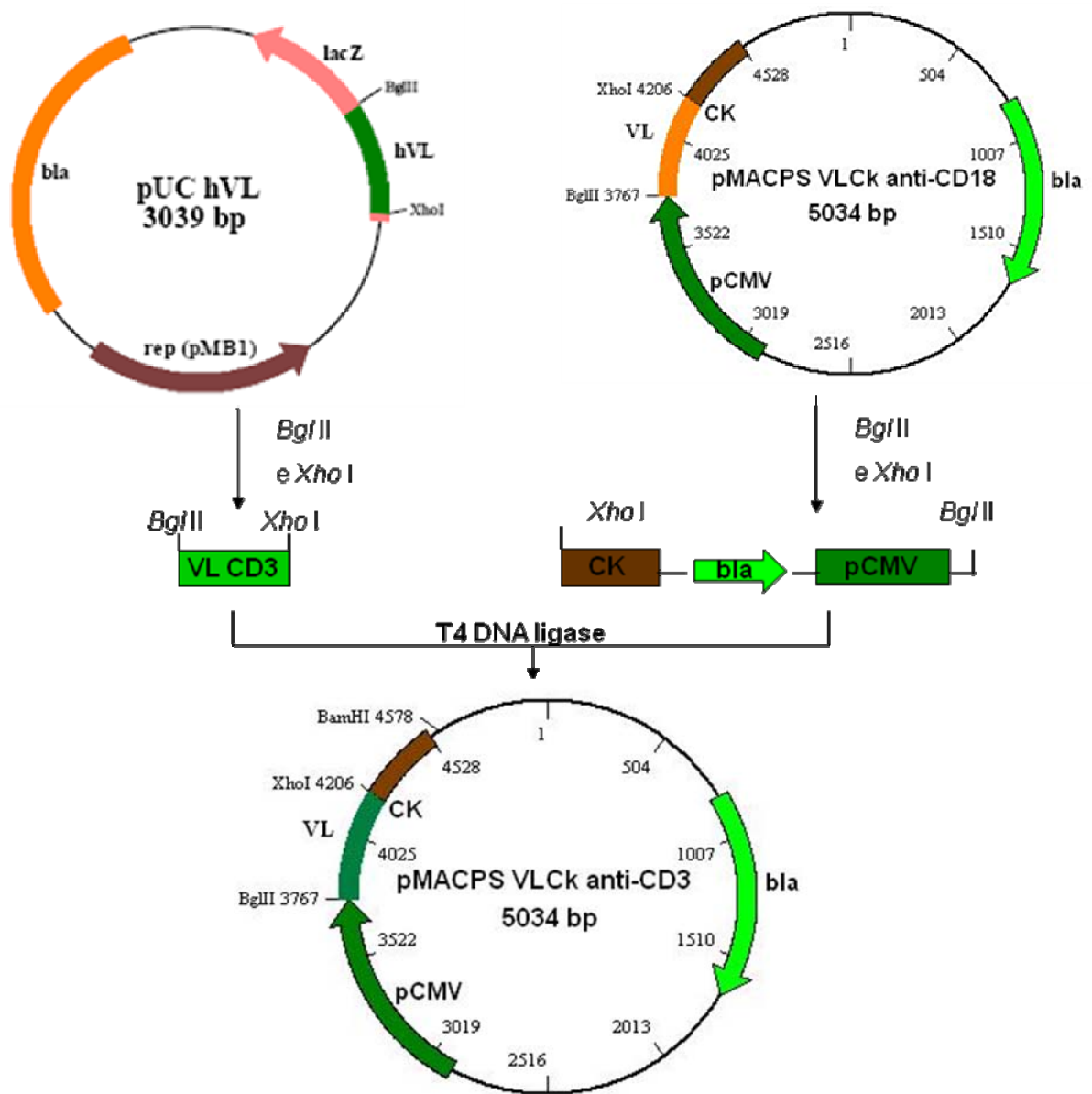


Figura 13. Estratégia para construção do vetor pMACPS VLCK anti-CD3. Para obtenção do vetor contendo a cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD3 humano, os plasmídios pUC hVL e pMACPS VLCK anti-CD18 foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I para liberação do fragmento gênico codificador da cadeia variável leve e do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem ao vetor pMACPS VLCK anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase e *pCMV*: promotor de citomegalovírus.

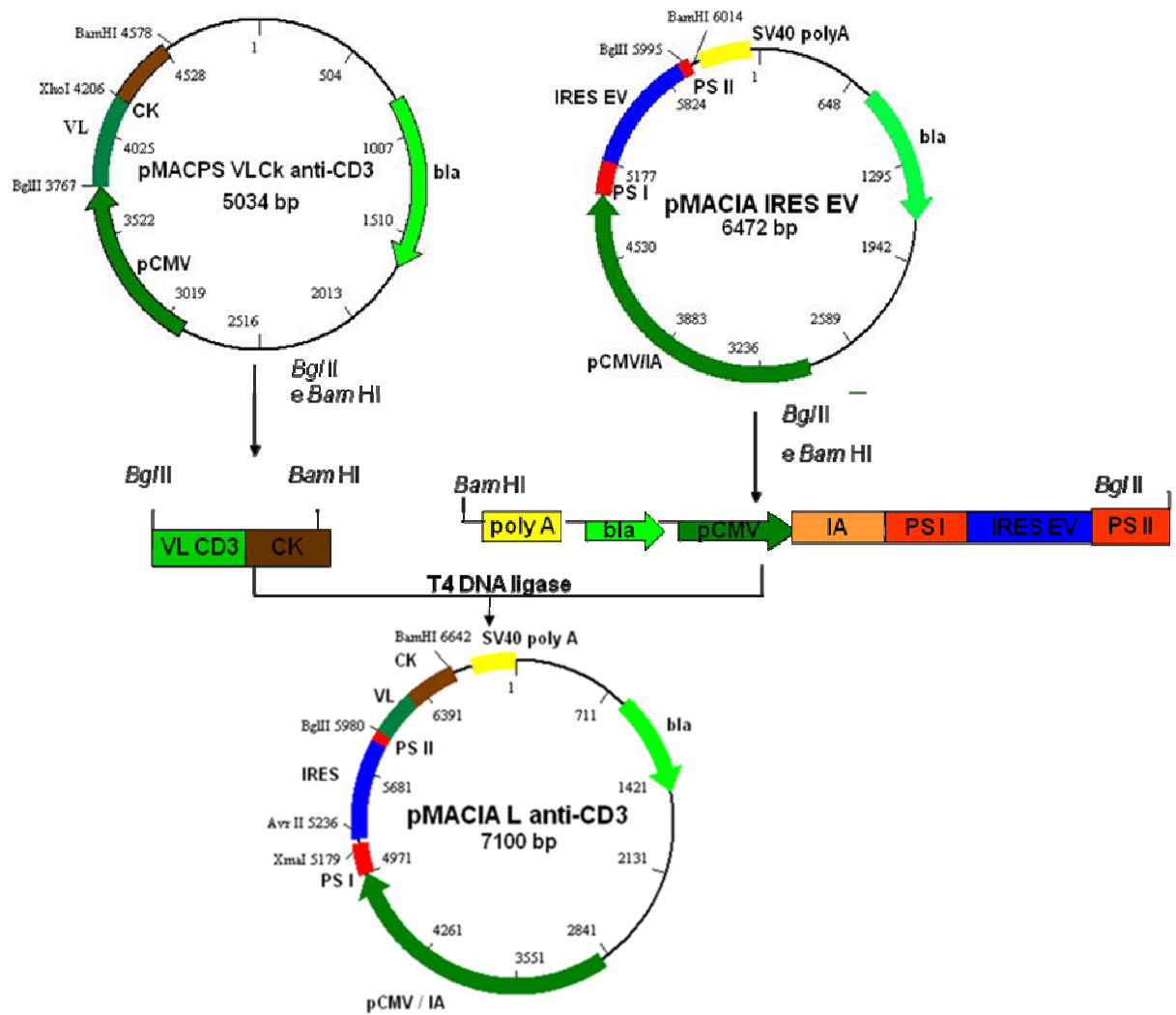


Figura 14. Estratégia para construção do vetor pMACIA L anti-CD3. Para clonagem da cadeia leve inteira do anticorpo anti-CD3 humano no vetor pMACIA IRES EV, este e o plasmídeo pMACPS VLCK anti-CD3 foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Bam* HI para liberação do fragmento gênico codificador da cadeia leve e do vetor. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor pMACIA L anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; *pCMV/IA*: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *IRES EV*: IRES sintético; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada e *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve.

4.2.2 Clonagem da cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor de expressão pMACIA L anti-CD3

Para clonagem do fragmento gênico codificador da cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD3 no vetor pMACIA L anti-CD3, tivemos que montá-la primeiramente num outro vetor, o pMACPS VHCH123 anti-CD18. Esse vetor foi utilizado como doador da porção constante de IgG1 contendo os três domínios constantes (CH123), e o vetor pIg CD3 scFv R como doador da porção VH humanizada, hVH^{R86}. Dessa forma, esses dois últimos vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Xba* I, proporcionando a liberação do VH humanizado anti-CD3 e VH do anti-CD18 e a geração dos sítios para clonagem no vetor pMACPS VHCH123 anti-CD18 (Figura 15). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Pvu* II e o perfil originado estava de acordo com o esperado, sugerindo que a clonagem foi bem sucedida, originando o vetor pMACPS VHCH123 anti-CD3.

A partir disso, a cadeia pesada inteira foi transferida do vetor pMACPS VHCH123 anti-CD3 para o vetor de expressão pMACIA L anti-CD3 por meio de digestão com as enzimas de restrição *Xma* I e *Spe* I para o primeiro vetor, e *Xma* I e *Avr* II para o segundo vetor. Essa digestão proporcionou a liberação da cadeia pesada inteira e a geração dos sítios para clonagem no vetor pMACIA L anti-CD3 (Figura 16). As enzimas de restrição *Spe* I e *Avr* II são compatíveis e com a ligação dos fragmentos há a perda dos sítios de restrição das duas enzimas. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I e *Xba* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida, originando a construção bicistrônica denominada pMACIA HIL anti-CD3.

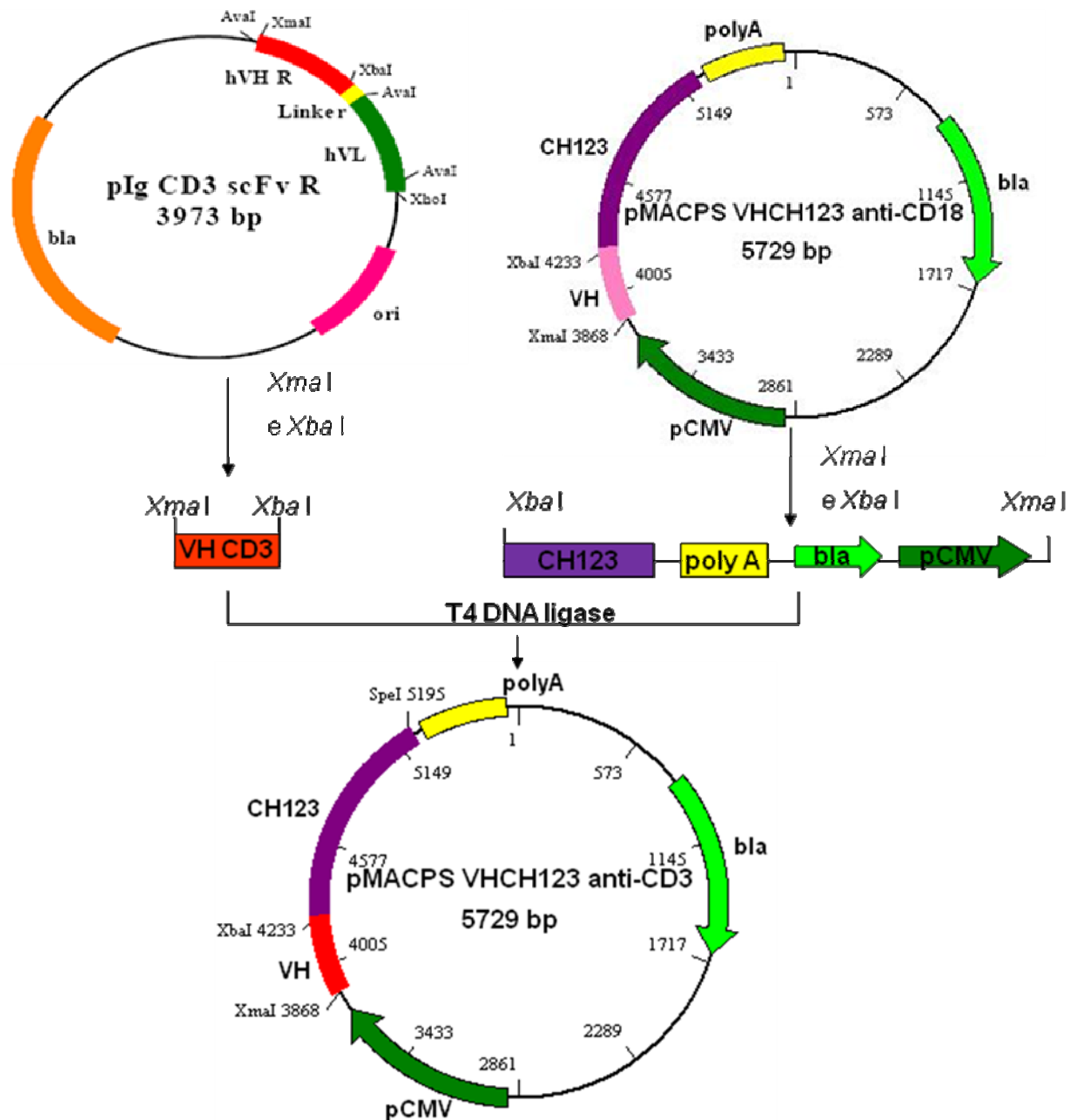


Figura 15. Estratégia para construção do vetor pMACPS VHCH123 anti-CD3. Para obtenção do vetor contendo a cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD3 humano, os plasmídios pIg CD3 scFv R e pMACPS VHCH123 anti-CD18 foram digeridos com as enzimas *Xba* I e *Xma* I para liberação do fragmento gênico codificador da cadeia variável pesada e do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor pMACPS VHCH123 anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; *poly A*: sinal de poliadenilação; *pCMV*: promotor de citomegalovírus.

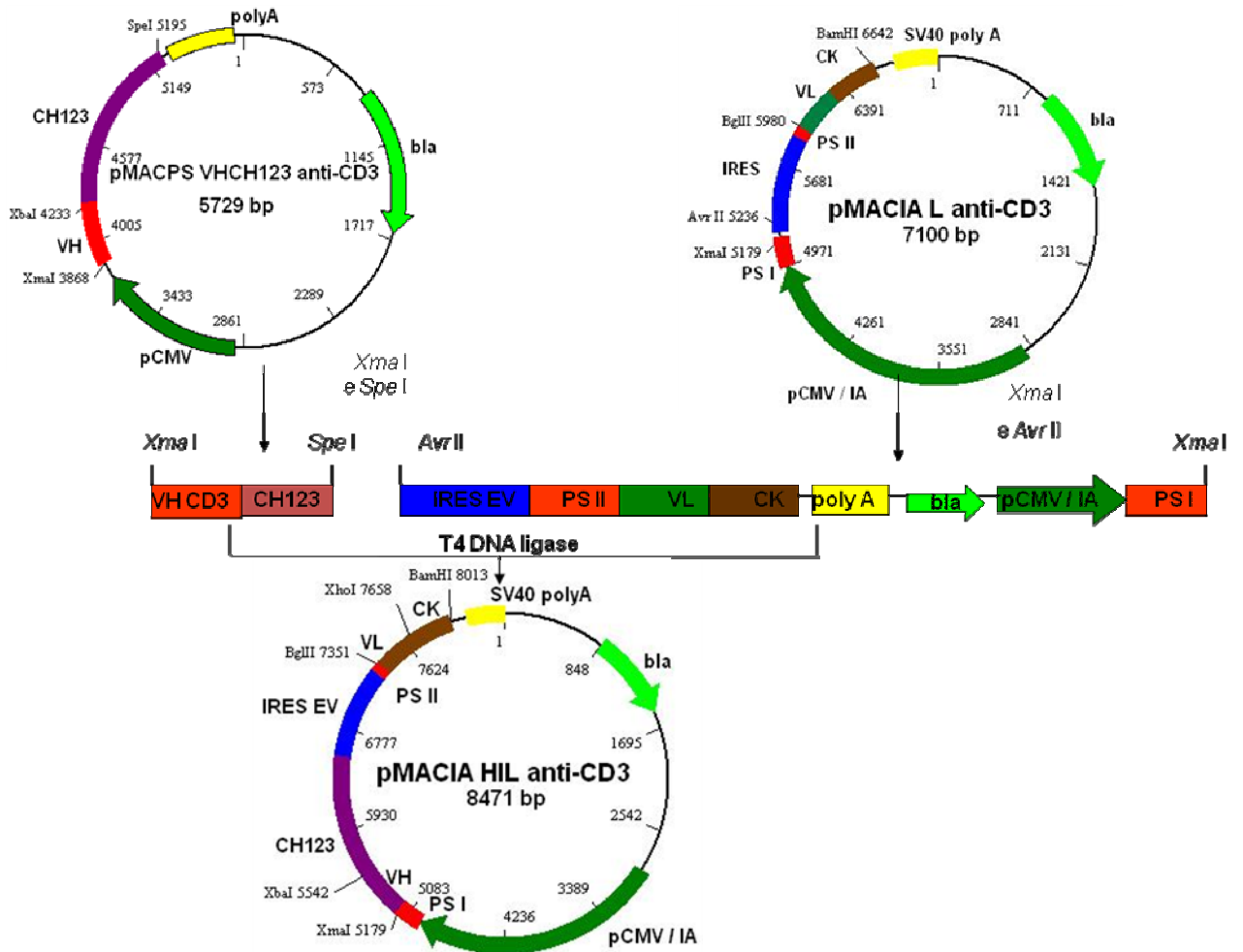


Figura 16. Estratégia para construção do vetor pMACIA HIL anti-CD3. Para clonagem da cadeia pesada inteira do anticorpo anti-CD3 humano no vetor pMACIA L, o plasmídeo pMACPS VHCH123 anti-CD3 foi digerido com as enzimas *Xma* I e *Spe* I para liberação do fragmento gênico codificador da cadeia pesada; já o plasmídeo pMACIA L foi digerido com as enzimas *Xma* I e *Avr* II para liberação do vetor. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor capaz de expressar a construção bicistrônica pMACIA HIL anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; *pCMV/IA*: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada e *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve.

4.3 Transfecção transiente da linhagem celular HEK293 utilizando o vetor bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3 na

Atualmente, no âmbito da produção heteróloga de proteínas recombinantes para fins farmacêuticos as células de mamífero se destacam. Cerca de 60 a 70% dessas proteínas já disponíveis no mercado são produzidas em células de mamíferos (Wurm, 2004). E dentro desse cenário a linhagem celular HEK293 vem se destacando na expressão transiente de anticorpos (Braren *et al.*, 2007). Dessa forma, com a seqüência da construção bicistrônica pMACIA HIL anti-CD3 já analisada e correta, partimos para a produção desse anticorpo na linhagem celular HEK293. Para tal foi realizada transfecção transiente (tópico 3.2.12.6) e esta foi realizada em triplicata. Além desse vetor, também foi transfectado separadamente o vetor pGFP/NEO para controle da eficiência de transfecção, pois ele expressa o gene da proteína fluorescente verde recombinante, e a fluorescência pode ser observada quando a célula é excitada com luz ultravioleta.

Após 48h e 72h da transfecção os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA), sendo que na última coleta, a de 72h pós-transfecção, tínhamos o acúmulo de proteína de 24h apenas. Esse ensaio foi realizado com o intuito de verificar a expressão do anticorpo recombinante (tópico 3.2.13). O experimento de ELISA foi desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc. Os anticorpos eram quantificados a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas (Figura 17). O ensaio foi realizado para cada poço transfectado e os resultados referentes ao anticorpo recombinante agrupados, assim foram agrupadas três medidas.

Os resultados revelaram que a construção bicistrônica conseguiu promover a expressão do anticorpo recombinante (Figura 17). Entretanto, a eficiência de transfecção, revelada pela contagem de células fluorescentes quando transfectadas com o vetor pGFP/NEO, foi bastante baixa diante dos níveis expressos, aproximadamente 5%, mesmo com as células estando numa confluência em torno de 40%, recomendada pelo fabricante do reagente de transfecção. A partir dos dados da curva padrão com IgG humana a 100 ng/mL, pode-se inferir que a quantidade de anticorpo recombinante presente no sobrenadante de cultura era de 20ng/mL em 48h pós-transfecção e 11ng/mL em 72h pós-transfecção.

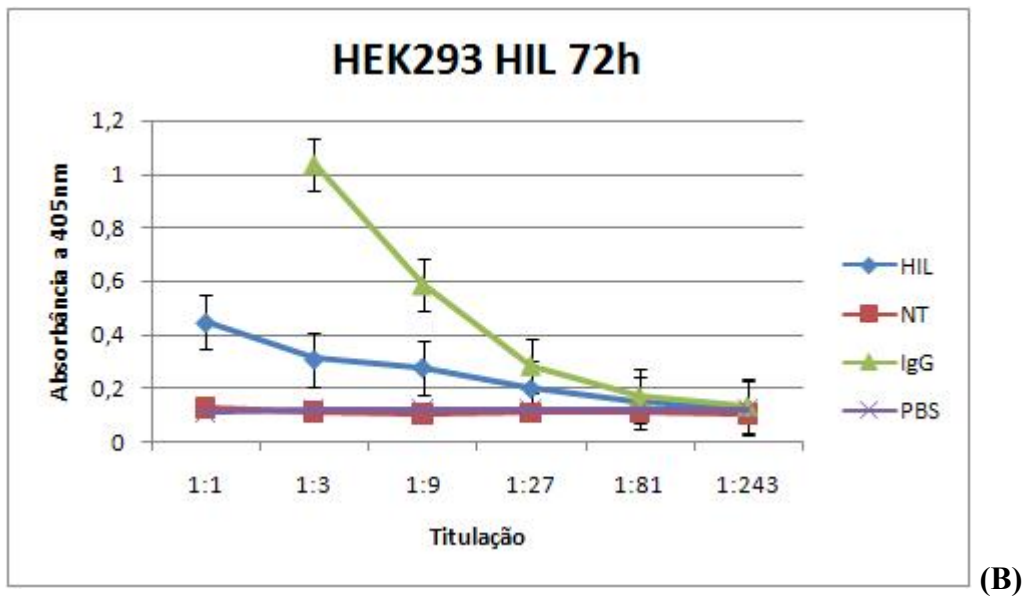
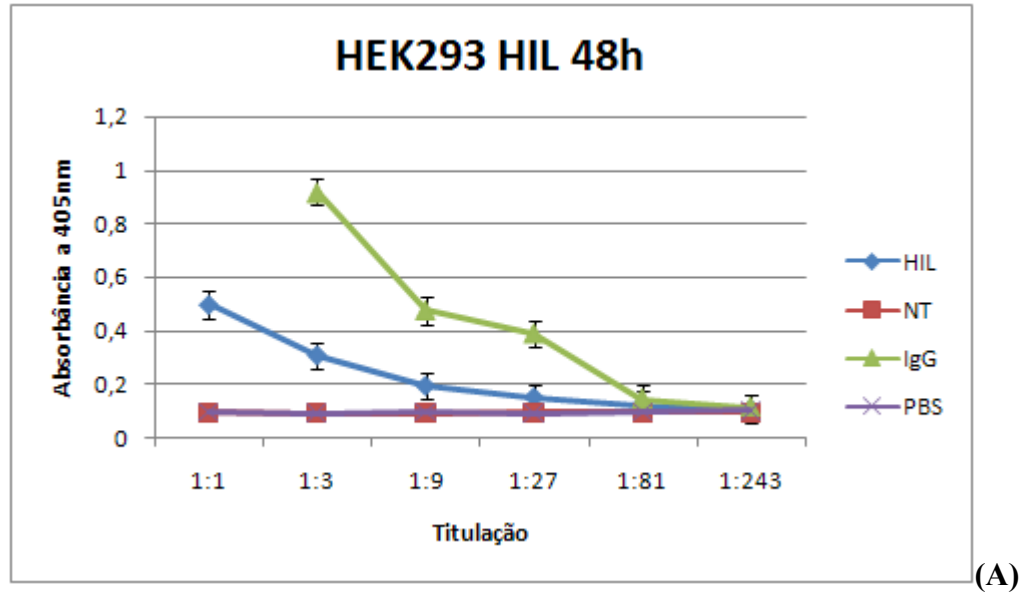


Figura 17. Produção do anticorpo anti-CD3 humano em HEK293. Imunodeteção da expressão de anticorpos nos sobrenadantes de culturas de células transfectadas com o vetor pMACIA HIL anti-CD3 coletados 48h e 72h após a transfecção. Todas as células foram transfectadas utilizando o reagente PolyFect[®] Transfection Reagent (Qiagen). **(A)** 48h pós-transfecção. **(B)** 72h pós-transfecção. HIL: pMACIA HIL anti-CD3; NT: sobrenadante de células não transfectadas; IgG: IgG humana a uma concentração inicial de 100 ng/mL; PBS: Controle negativo.

4.4 Purificação do anticorpo anti-CD3 a partir de transfectomas de pMACIA HIL anti-CD3

Os sobrenadantes foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade (tópico 3.2.14) utilizando a coluna Hitrap protein A HP 1mL (GE Healthcare[®]) e as frações coletadas foram analisadas quanto à presença do anticorpo recombinante por imunoenaios do tipo *Dot Blot* (tópico 3.2.15). Uma estratégia adotada durante a purificação para redução da contaminação com IgGs bovinas, presentes no SFB, foi a adoção de pHs distintos para eluição dos anticorpos recombinantes (Silva, 2008). As IgGs bovinas possuem como característica um pH de eluição ideal da resina de proteína A em torno de 2,0 enquanto que as IgGs humanas são facilmente eluídas dessa resina em pHs variando entre 3,5 e 4,5. Dessa forma, procedia-se uma eluição com o tampão em pH 3,5 para minimizar a contaminação dos anticorpos recombinantes com IgG bovina e depois se realizava a eluição com pH 2,0 para limpeza da coluna.

Para uma melhor caracterização dos anticorpos purificados, frações do processo de purificação foram submetidas a um SDS-PAGE (tópico 3.2.16) seguido de *Western Blot* a fim de verificar a presença do anticorpo recombinante (tópico 3.2.18). As bandas correspondentes às cadeias pesada e leve do anticorpo recombinante podem ser observadas em torno de 55 kDa e 27 kDa, respectivamente (Figura 18).

A banda correspondente à cadeia pesada aparece mais nitidamente na segunda fração da eluição em ambos pHs, enquanto a banda correspondente à cadeia leve aparece muito discretamente nessa fração. É interessante ressaltar a presença da cadeia leve do anticorpo, quando revelado com o anticorpo anti-C κ humano, nas frações de lavagem do processo de purificação, sugerindo que havia no sobrenadante cadeias leves não associadas à cadeias pesadas. Uma razão para este resultado poderia ser devido a um desbalanço na síntese das duas cadeias de anticorpo, havendo um maior acúmulo da cadeia leve em relação à cadeia pesada. Isso pode ser devido a força do elemento IRES utilizado, que estaria dirigindo a expressão da cadeia leve em maior quantidade que a cadeia pesada, cuja expressão é cap-dependente. Cadeias pesadas somente são secretadas quando combinadas a cadeias leves, formando moléculas de anticorpo inteiras (Leitzgen, Knittler e Haas, 1997), já a cadeia leve pode ser secretada como monômeros ou homodímeros livres (Dul *et al.*, 1996). Um outro motivo para tal verificação poderia ser devido ao fato de se utilizar dois anticorpos (primário e secundário) para a detecção da cadeia leve em contrapartida a apenas um para a detecção da

cadeia pesada. Tal fato leva a uma amplificação do sinal e aporta ao método uma maior sensibilidade de detecção da cadeia leve em relação à cadeia pesada.

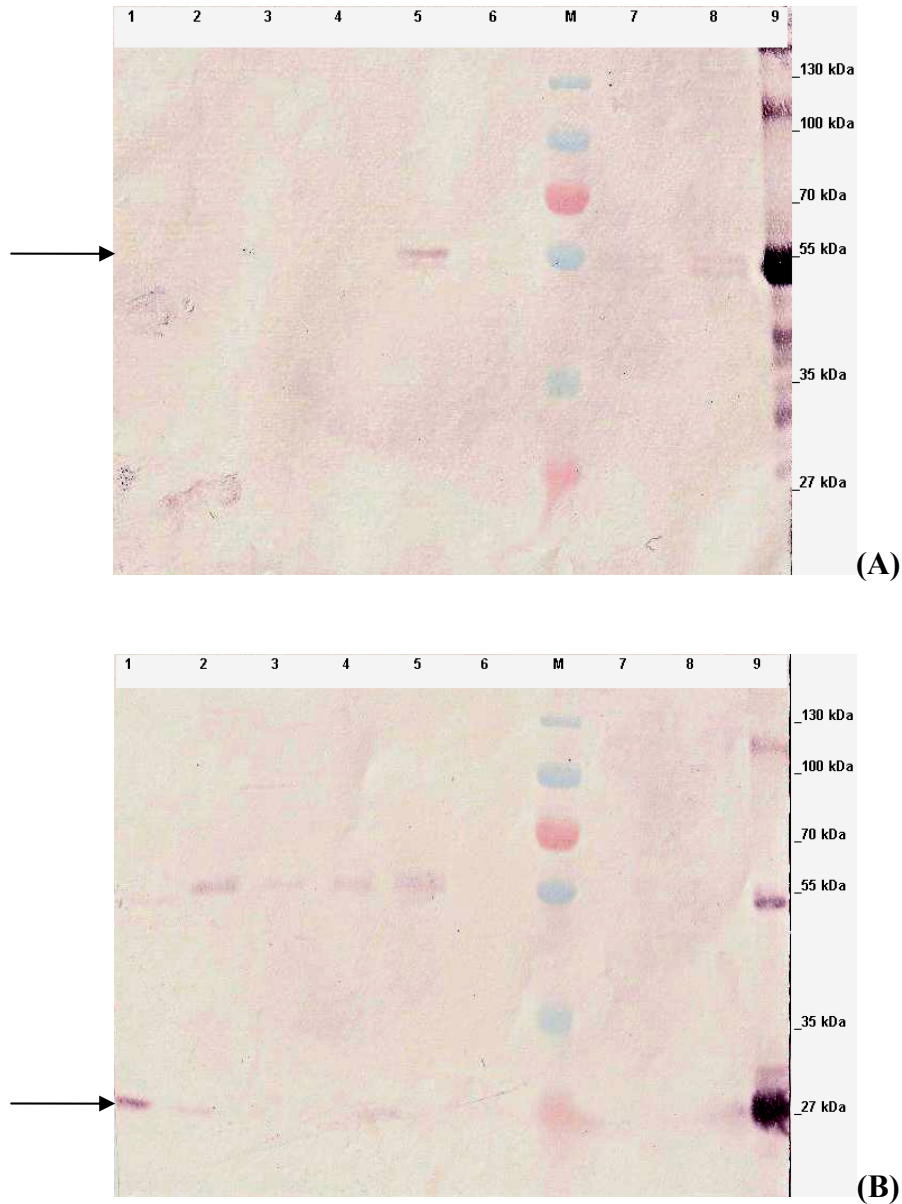


Figura 18. Análise do processo de purificação por *Western Blot*. Foi realizada uma eletroforese em gel SDS 10% para separação das frações purificadas as quais eram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do ensaio. **(A)** Immunodeteção utilizando anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. **(B)** Immunodeteção utilizando anti- C κ humano feito em cabra e anti-IgG de cabra conjugado a fosfatase alcalina. **1 – 3:** primeira, segunda e terceira frações da lavagem do processo de purificação. **4 – 6:** primeira, segunda e terceira frações da eluição com tampão pH 3,5. **7 e 8:** primeira e segunda frações da eluição com tampão pH 2,0. **9:** 500 ng de IgG humana. **M:** Marcador Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas[®]). Setas pretas destacando as bandas correspondentes às cadeias pesada e leve nas segundas frações das eluições, respectivamente.

4.5 Construção de vetores para expressão de duas versões monocistrônicas do anticorpo anti-CD3

Com a confirmação da expressão do anticorpo anti-CD3 a partir da construção bicistrônica, partimos para a construção de duas versões monocistrônicas deste anticorpo. Nessas construções foi retirado o elemento IRES sintético entre as cadeias pesada e leve, e em seu lugar foi inserida uma seqüência codificadora de um sítio clivável pela enzima furina (Fur). A construção monocistrônica HL possui o cassete de expressão na seguinte ordem: cadeia pesada inteira – Fur – cadeia leve inteira, além de todos os elementos advindos da construção bicistrônica pMACIA HIL anti-CD3. Já a construção monocistrônica LH possui o cassete de expressão invertido: cadeia leve inteira – Fur – cadeia pesada inteira (Figura 19). A seqüência codificadora para este sítio clivável por furina foi idêntica àquela previamente utilizada para o processamento do fator VIII humano (Campos-da-Paz *et al.*, 2008).

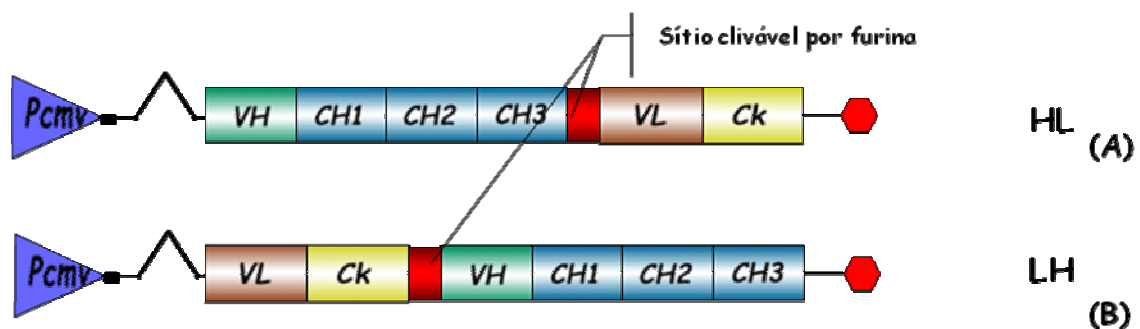


Figura 19. Representação esquemática das construções monocistrônicas. Composição em comum dos dois vetores pMACIA HL anti-CD3 (A) e pMACIA LH anti-CD3 (B): promotor de citomegalovírus (Pcmv); íntron A e sinal de poliadenilação. (A) cassete de expressão da construção monocistrônica HL: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada, com um íntron de imunoglobulina no interior dessa seqüência; cadeia pesada inteira (VHCH1CH2CH3); seqüência codificadora de um sítio de clivável por furina e cadeia leve inteira (VLC κ). (B) cassete de expressão da construção monocistrônica LH: cadeia leve inteira (VLC κ); seqüência codificadora de um sítio clivável por furina e cadeia pesada inteira (VHCH1CH2CH3).

4.5.1 Construção do vetor de expressão monocistrônico pMACIA HL anti-CD3

Para a construção da versão monocistrônica HL foram sintetizados dois oligonucleotídeos, CH123 509 e CH123 reverso, que amplificam a porção Fc da cadeia pesada a partir da posição 509, e inserem uma seqüência codificadora de um sítio clivável por furina (Fur) e um sítio de restrição para a enzima *Bgl* II, ao final desta cadeia (Tabela 2). Essa porção foi amplificada do vetor pMACIA HIL anti-CD3 por PCR (tópico 3.2.8.1) e clonada no vetor pGEM-T easy (Promega) gerando o vetor pGEM-T easy Fc Fur.

Como o vetor pMACIA HIL anti-CD3 possui um sítio de restrição da enzima *Sac* II dentro do promotor CMV, este foi manipulado para perder esse sítio. Portanto, este vetor foi digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Sna*B I, seguido de tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I, e ligado com *T4 DNA ligase*. A perda do sítio de restrição da enzima *Sac* II foi confirmada pela digestão dos clones obtidos com esta mesma enzima e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor pMAC HIL anti-CD3.

Este último vetor e o vetor pGEM-T easy Fc Fur foram então digeridos com as enzimas de restrição *Sac* II e *Bgl* II. No vetor pGEM-T easy Fc Fur essa digestão promoveu a liberação do fragmento Fc Fur. Já no vetor pMAC HIL anti-CD3 proporcionou a perda da cadeia pesada a partir da posição 509, do elemento IRES e da seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve, gerando os sítios para clonagem neste vetor. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Sac* I e *Sac* II e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida, dando origem ao vetor pMAC HL anti-CD3, um vetor intermediário que não possuía o íntron A no promotor e ao invés do elemento IRES possuía Fur (Figura 20).

Logo em seguida, os vetores pMAC HL anti-CD3 e pMACIA HIL anti-CD3 foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba* I e *Bgl* II. No vetor pMAC HL anti-CD3 essa digestão proporcionou a liberação da porção constante da cadeia pesada juntamente com Fur. Já no vetor pMACIA HIL anti-CD3 promoveu a perda da porção constante da cadeia pesada, do elemento IRES e da seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve, gerando os sítios para clonagem neste vetor. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Nhe* I, *Xba* I e *Bgl* II e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida e originando a construção monocistrônica pMACIA HL anti-CD3 (Figura 21).

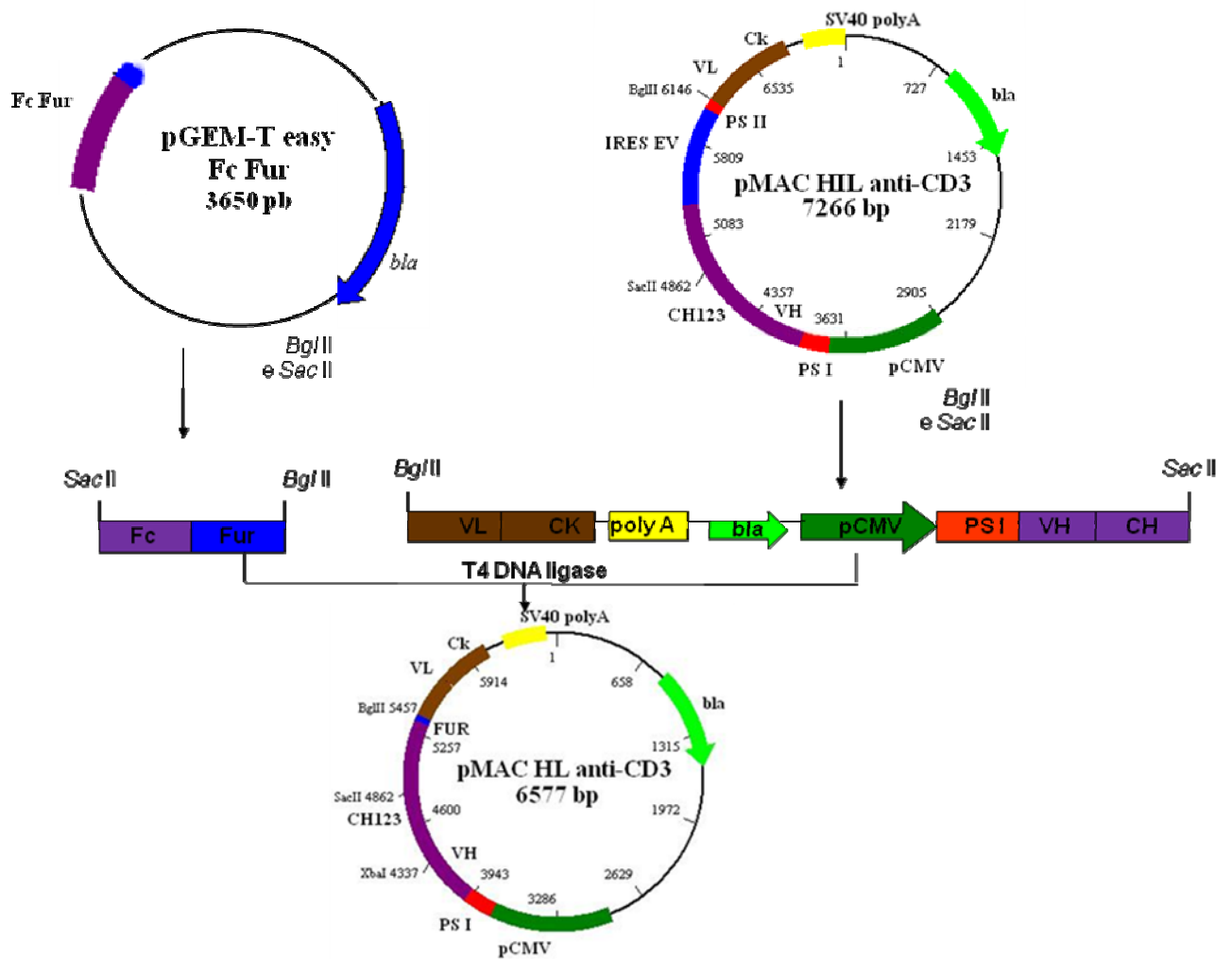


Figura 20. Estratégia para clonagem da porção Fc Fur no vetor pMAC HIL anti-CD3. Para clonagem da porção Fc Fur no vetor pMAC HIL anti-CD3, os plasmídios pGEM-T easy Fc Fur e pMAC HIL anti-CD3 foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Sac* II para liberação do fragmento gênico Fc Fur e para liberação do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor intermediário pMAC HL anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; pCMV: promotor de citomegalovírus; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; Fc: porção constante da cadeia pesada e Fur: seqüência codificadora de um sítio clivável por furina.

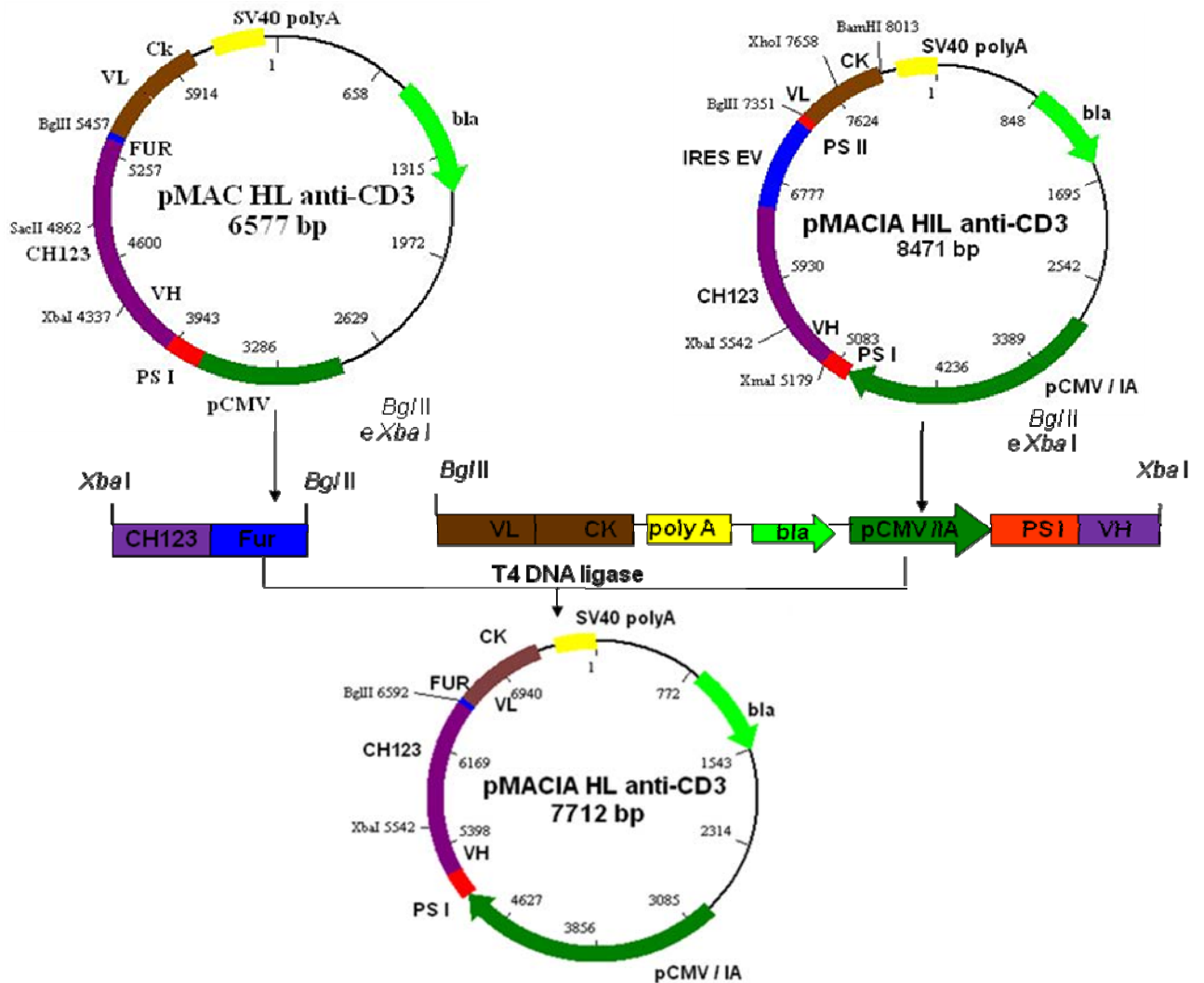


Figura 21. Estratégia para construção do vetor pMACIA HL anti-CD3. Para clonagem da porção Fc Fur no vetor pMACIA HIL anti-CD3, os plasmídios pMAC HL anti-CD3 e pMACIA HIL anti-CD3 foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Xba* I para liberação do fragmento gênico CH123 Fur e para liberação do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem a construção monocistrônica pMACIA HL anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve e Fur: seqüência codificadora de um sítio clivável por furina.

4.5.2 Construção do vetor de expressão monocistrônico pMACIA LH anti-CD3

Como a versão monocistrônica LH contém o cassete de expressão invertido, cadeia pesada inteira- Fur- cadeia leve, o primeiro passo sua construção foi eliminar as porções IRES e cadeia leve inteira. Para isso o vetor pMACIA HIL anti-CD3 foi digerido com as enzimas de restrição *Not* I e *Bam* HI, seguido de tratamento com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I, e ligado com *T4 DNA ligase*. A perda destas porções foi confirmada pela digestão dos clones obtidos com a enzima de restrição *Kpn* I e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor pMACIA H.

Este vetor foi então digerido com a enzima de restrição *Xma* I, que está presente no início da porção VH da cadeia pesada, e nele foi introduzido o linker LH furina, para posicionamento da cadeia leve antes da cadeia pesada com Fur entre elas. O linker LH furina foi gerado pela junção dos oligonucleotídeos Linker LH furina e Linker LH furina reverso (Tabela 2) de acordo com o tópico 3.2.7. Os sítios de clonagem obtidos com a união dos oligonucleotídeos podem ser visualizados na Figura 22. A inserção do Linker LH furina foi confirmada pela digestão dos clones obtidos com as enzimas de restrição *Kpn* I, *Bgl* II e *Xho* I, e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor pMACIA H LHfur.



Figura 22. Esquema dos sítios de clonagem criados após anelamento do Linker LH furina. * Sequência que altera o sítio original de *Xma* I.

Com o Linker LH furina introduzido, partimos para a clonagem da porção VL no vetor pMACIA H LHfur. Este último vetor e o vetor pMACIA HIL anti-CD3, foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xho* I. No vetor pMACIA HIL anti-CD3 essa digestão promoveu a liberação da porção VL, enquanto no vetor pMACIA H LHfur gerou os sítios para clonagem neste vetor, presentes no Linker LH furina. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I, *Bgl* II e *Xho* I, e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem ao vetor pMACIA VL H (Figura 23).

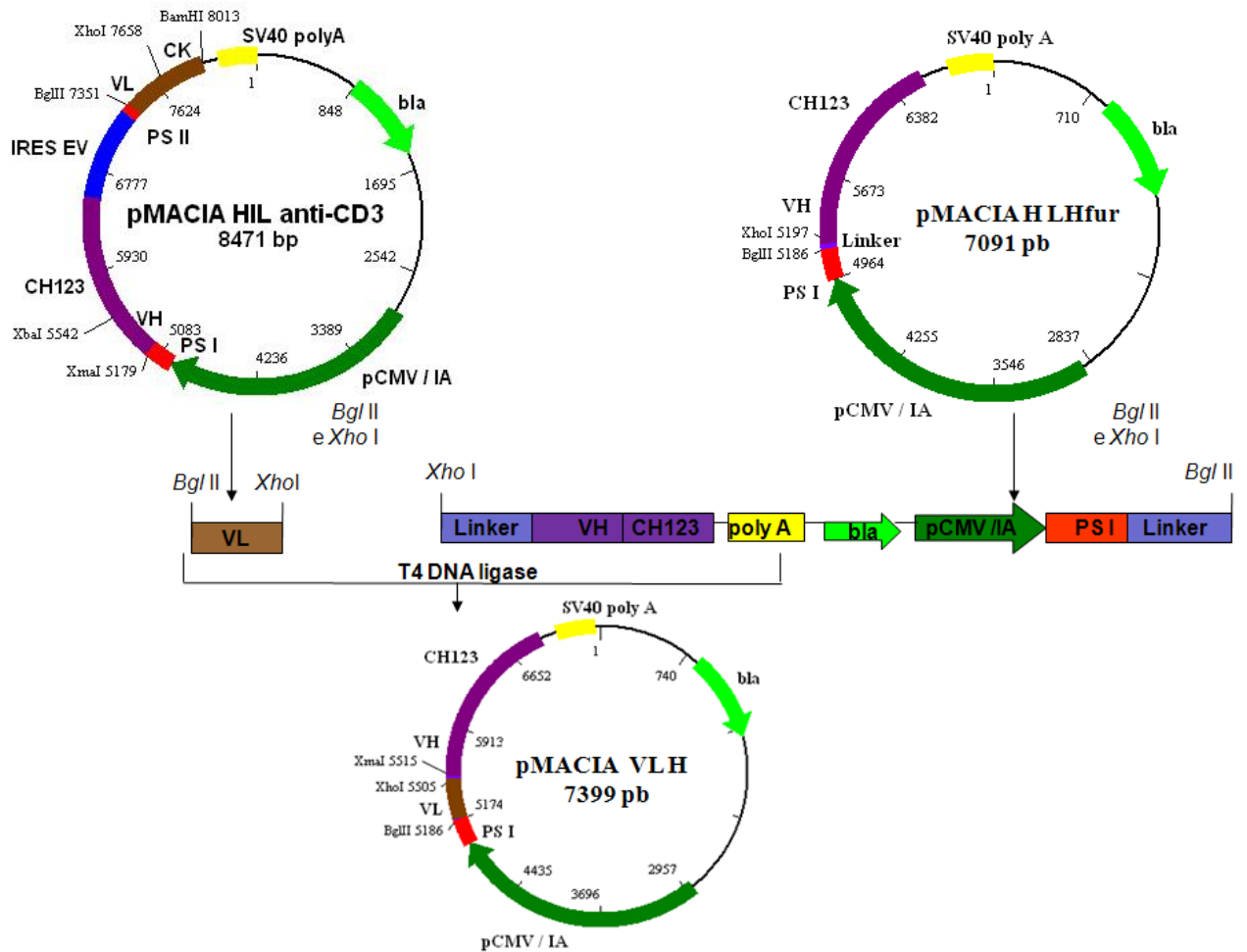


Figura 23. Estratégia para clonagem da porção VL no vetor pMACIA H LHFur. Para clonagem da porção VL no vetor pMACIA H LHFur, os plasmídios pMACIA HIL anti-CD3 e pMACIA H LHFur foram digeridos com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I para liberação do fragmento gênico VL e para liberação do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor pMACIA VL H. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve e Fur: seqüência codificadora de um sítio clivável por furina.

Para a finalização da construção faltava a inserção da porção C κ no vetor juntamente com a seqüência codificadora para o sítio clivável por furina (Fur). Foram então sintetizados dois oligonucleotídeos, LH VL e LH C κ fur, que anelam ao final da porção VL, amplificam a porção C κ inteira, e inserem Fur e um sítio de restrição para a enzima *Xma* I, ao final desta cadeia (Tabela 2). Essa porção foi amplificada do vetor pMACPS VLC κ anti-CD3 por PCR e clonada no vetor pGEM-T easy (Promega) gerando o vetor pGEM-T easy C κ Fur.

Assim os vetores pGEM-T easy C κ Fur e pMACIA VL H foram digeridos com as enzimas de restrição *Xho* I e *Xma* I. No vetor pGEM-T easy C κ Fur essa digestão promoveu a liberação do fragmento C κ Fur, enquanto vetor pMACIA VL H gerou os sítios para clonagem neste vetor. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Nhe* I, *Xba* I e *Bgl* II e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando indício de que a clonagem foi bem sucedida e originando a construção monocistrônica pMACIA LH anti-CD3 (Figura 24).

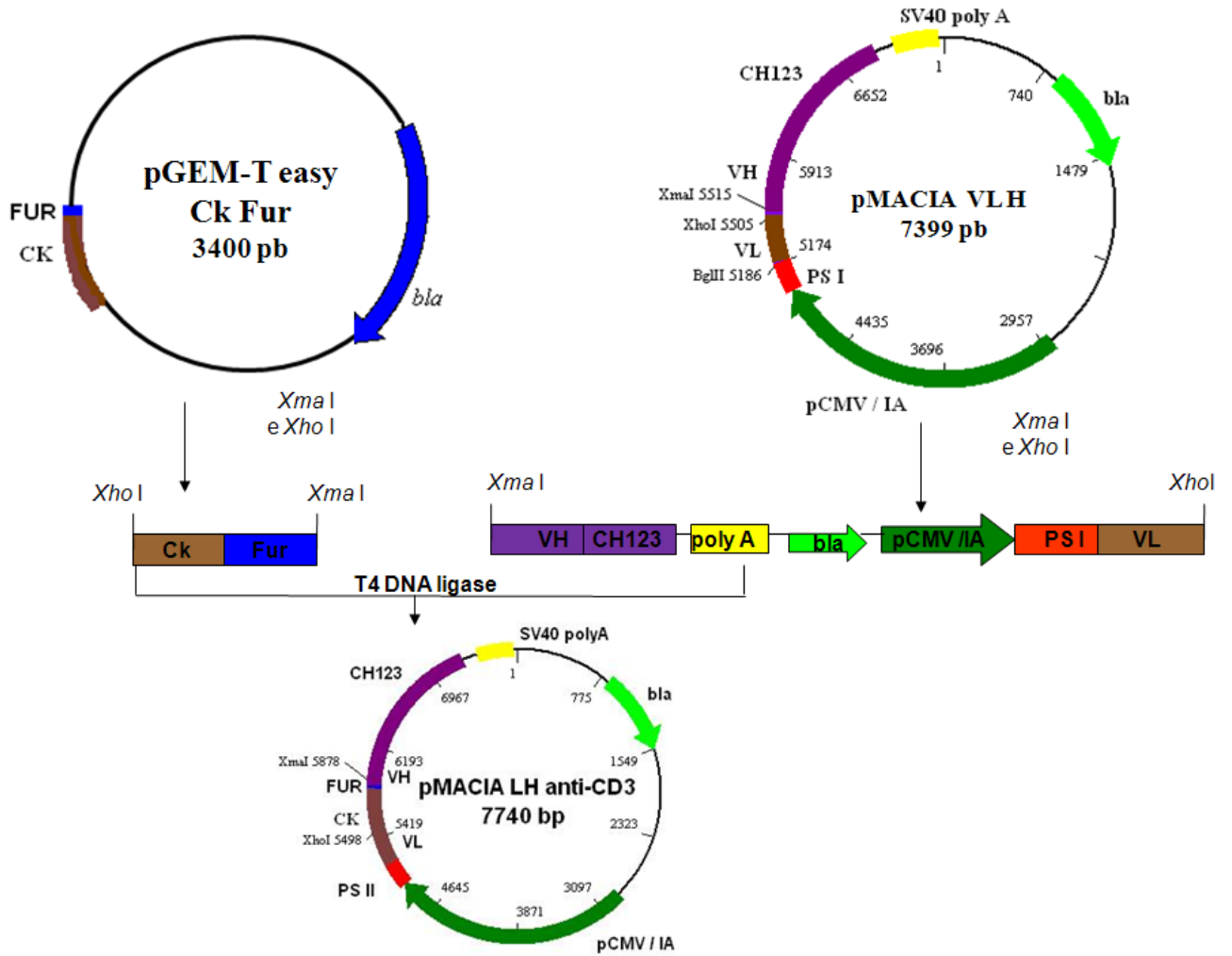


Figura 24. Estratégia para construção do vetor pMACIA LH anti-CD3. Para clonagem da porção Fc Fur no vetor pMACIA VL H, este e o vetor pGEM-T easy Ck fur foram digeridos com as enzimas *Xho* I e *Xma* I para liberação do vetor e do fragmento gênico Ck Fur, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem a construção monocistrônica pMACIA LH anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada e Fur: seqüência codificadora de um sítio clivável por furina.

4.6 Transfecção transiente da linhagem celular HEK293 utilizando as construções monocistrônicas e bicistrônica

Com os dois tipos de construções em mãos, partimos para a produção do anticorpo anti-CD3 humanizado na linhagem celular HEK293, já avaliada com sucesso para a construção bicistrônica pMACIA HIL anti-CD3. Para tal, foi realizada transfecção transiente (tópico 3.2.12.6) com os três vetores em triplicata. Além desses três vetores, também foi transfectado separadamente o vetor pGFP/NEO para controle da eficiência de transfecção.

Após 48h e 72h da transfecção os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com o intuito de verificar a expressão do anticorpo recombinante. O experimento de ELISA também foi desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc. Os anticorpos eram quantificados a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas (Figura 25). O ensaio era realizado para cada poço transfectado e os resultados referentes ao anticorpo recombinante agrupados, assim foram agrupadas três medidas.

Como era esperado, a construção bicistrônica conseguiu promover a expressão do anticorpo recombinante. A partir dos dados da referência de IgG humana em concentração inicial de 100 ng/mL, pode-se inferir que a quantidade de anticorpo recombinante presente no sobrenadante de cultura dessa construção foi de 38ng/mL em 48h pós-transfecção e de 19ng/mL em 72h pós- transfecção (Figura 25).

Já para as construções monocistrônicas, não foi observada a expressão do anticorpo recombinante (Figura 25), mesmo com uma alta eficiência de transfecção revelada pela fluorescência de células transfectadas com o vetor pGFP/NEO, aproximadamente 60%. Delineamos então duas hipóteses: a linhagem celular HEK293 não estava produzindo suficientemente a enzima furina, requerida por essas construções, ou as construções não estavam funcionando. Para solucionar o problema teríamos que proceder a transfecção dessas construções em uma linhagem celular que sabidamente produziria a enzima furina. Shapiro e colaboradores, em 1997, estudaram a localização celular da enzima furina em diversas linhagens celulares de mamíferos e a encontraram, entre outras linhagens, na linhagem celular BHK-21. Essa linhagem é derivada de células renais de *hamster* recém-nascidos e vêm sendo largamente utilizada tanto em transfecções transientes como em estáveis (Cruz *et al.* 2002).

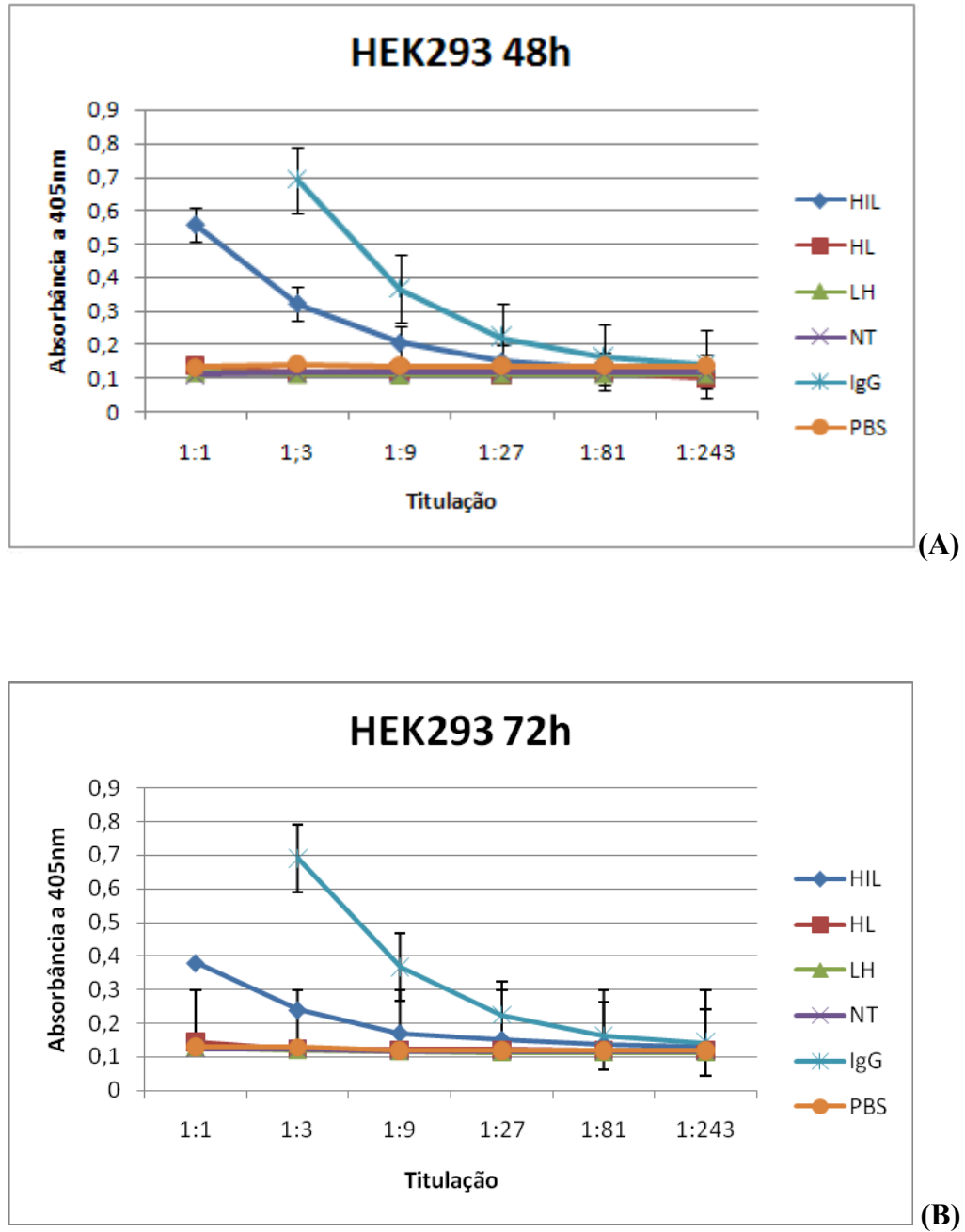


Figura 25. Comparação da produção do anticorpo anti-CD3 humano no sobrenadante de transfectomas de HEK293 a partir dos três vetores. Imunodeteção da expressão de anticorpos no sobrenadante de cultura coletado 48h e 72h após a transfecção. Todas as células foram transfectadas utilizando o reagente PolyFect[®] Transfection Reagent (Qiagen). **(A)** 48h pós-transfecção. **(B)** 72h pós-transfecção. As siglas HIL, HL e LH referem-se ao: sobrenadante de cultura de células transfectadas com o vetor pMACIA HIL anti-CD3, pMACIA HL anti-CD3 e pMACIA LH anti-CD3, respectivamente; NT: sobrenadante de células não transfectadas; IgG: IgG humana a uma concentração inicial de 100 ng/mL para obtenção de uma curva-padrão para estimativa da concentração dos sobrenadantes; PBS: Controle negativo.

4.7 Transfecção transiente da linhagem celular BHK-21 utilizando as construções monocistrônicas e bicistrônica

Partimos então para a produção do anticorpo anti-CD3 humanizado na linhagem celular BHK-21, a partir das três construções. Para tal, foi realizada transfecção transiente (tópico 3.2.12.7) e esta foi realizada em triplicata. Além desses três vetores, também foi transfectado separadamente o vetor pGFP/NEO para controle da eficiência de transfecção.

Após 48h e 72h da transfecção os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com o intuito de verificar a expressão do anticorpo recombinante. O experimento de ELISA também foi desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc. Os anticorpos eram quantificados a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas (Figura 26). O ensaio era realizado para cada poço transfectado e os resultados referentes ao anticorpo recombinante agrupados, assim foram agrupadas três medidas.

A construção bicistrônica HIL conseguiu promover a expressão do anticorpo recombinante, mas em menor quantidade que na linhagem celular HEK293. Foi possível também detectar a presença de anticorpos no sobrenadante de células transfectadas com a construção monocistrônica HL, em uma quantidade bem menor que a construção HIL (Figura 26). Assim descartamos a hipótese de que essa construção não estaria funcionando, e propomos a de que a linhagem celular HEK293 não estaria produzindo a enzima furina em quantidade suficiente para promover a clivagem e liberação do anticorpo recombinante.

Já para o vetor contendo a construção monocistrônica LH foi possível observar a presença da proteína recombinante (Figura 26), mesmo com uma alta eficiência de transfecção revelada pela fluorescência de células transfectadas com o vetor pGFP/NEO, aproximadamente 50%. Como a construção monocistrônica HL, que também possui Fur, conseguiu produzir o anticorpo recombinante, mesmo em uma quantidade ínfima, considera-se a hipótese de o plasmídeo pMACIA LH anti-CD3 deve apresentar algum problema, não detectado pelas análises realizadas, devendo este ser melhor seqüenciado a fim de se verificar a integridade da região codificadora para a proteína recombinante.

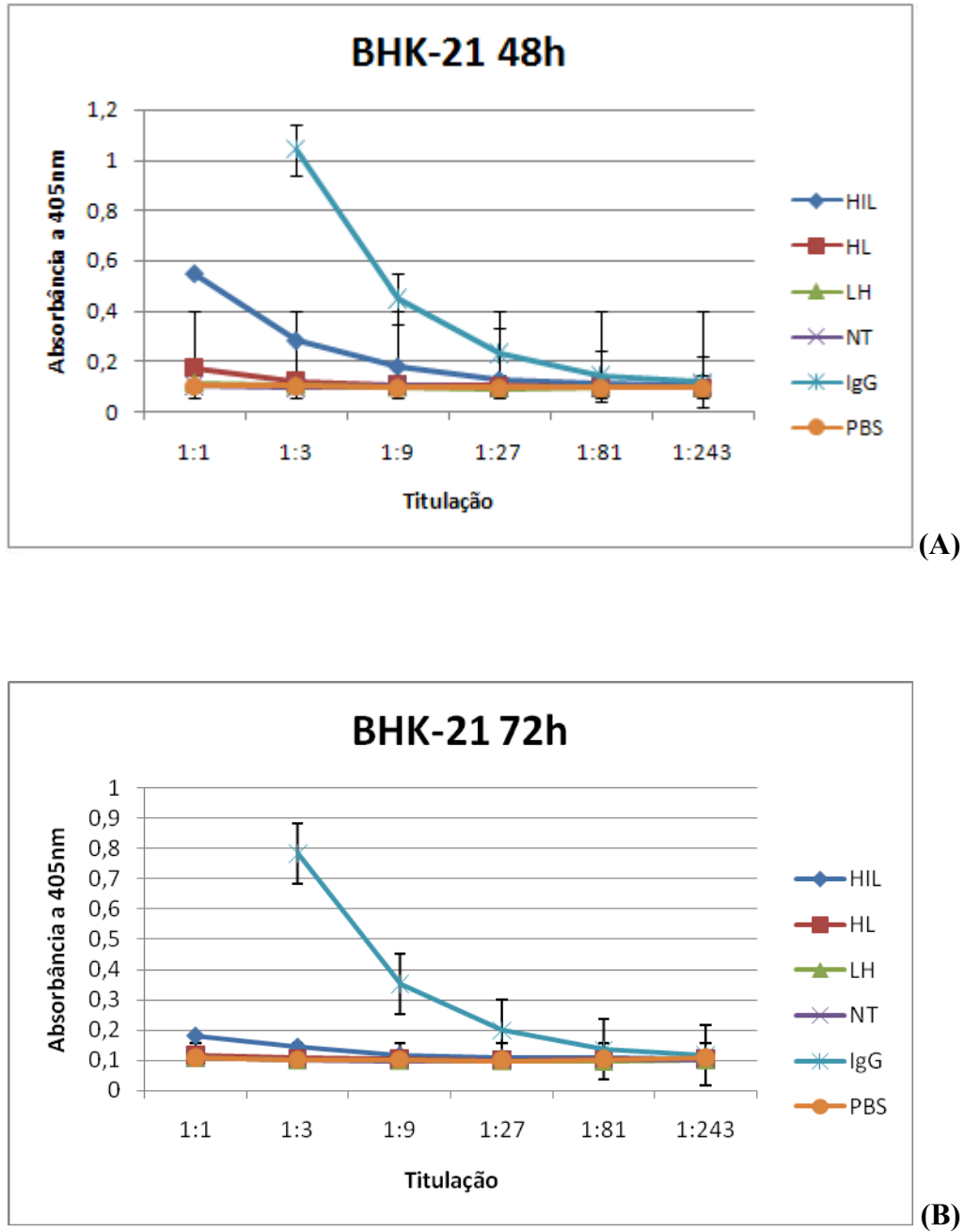


Figura 26. Comparação da produção do anticorpo anti-CD3 humano no sobrenadante de transfectomas de BHK-21 a partir dos três vetores. Imunodeteção da expressão de anticorpos no sobrenadante de cultura coletado 48h e 72h após a transfecção. Todas as células foram transfectadas utilizando o reagente Lipofectamine LTX™ (Invitrogen). **(A)** 48h pós-transfecção. **(B)** 72h pós-transfecção. As siglas HIL, HL e LH referem-se ao: sobrenadante de cultura de células transfectadas com o vetor pMACIA HIL anti-CD3, pMACIA HL anti-CD3 e pMACIA LH anti-CD3, respectivamente; NT: sobrenadante de células não transfectadas; IgG: IgG humana a uma concentração inicial de 160 ng/ml para obtenção de uma curva-padrão para estimativa da concentração dos sobrenadantes; PBS: Controle negativo.

A partir dos dados da curva padrão com IgG humana a uma concentração inicial de 160 ng/mL, pode-se inferir que a quantidade de anticorpo recombinante presente no sobrenadante de cultura era de 12ng/mL em 48h pós-transfecção e 1,2ng/mL em 72h pós transfecção para a construção bicistrônica HIL, e de 4,7ng/mL em 48h pós-transfecção para a construção monocistrônica HL (Figura 26).

4.8 Purificação e quantificação do anticorpo anti-CD3 obtido a partir de células de BHK-21 transfectadas com os vetores pMACIA HIL, pMACIA HL e pMACIA LH

Os sobrenadantes das três construções obtidos na transfecção transiente em BHK-21 foram submetidos à purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna Hitrap protein A HP 1mL (GE Healthcare[®]) e as frações coletadas foram analisadas quanto à presença do anticorpo recombinante por imunoenaios do tipo *Dot Blot*. Resolvemos também purificar o sobrenadante da construção LH mesmo com a falta de produção constatada nos ensaios ELISA. A quantidade produzida por essa construção poderia ser tão pouca que não fosse detectada pelo ensaio. Novamente foi utilizada a estratégia de pHs distintos durante a purificação (tópico 3.2.14).

O pico de liberação do anticorpo recombinante da coluna estava presente na quarta fração da eluição para as construções HIL e HL. Já na construção LH novamente não foi detectada a presença do anticorpo, mesmo assim continuamos o processo de purificação. As frações onde se encontravam as proteínas de interesse determinadas, foram passadas para uma coluna Centricon YM-50 (Amicon[®]), com limite de exclusão de 50 kDa, para concentração e troca do tampão de eluição por PBS que propicia condições melhores de armazenamento para as proteínas.

Para uma melhor caracterização e avaliação das amostras, elas foram submetidas à análise por SDS-PAGE, de forma reduzida e não-reduzida, seguida de coloração com prata (Figura 27), kit PlusOne Silver Staining Protein (GE Lifescience). Na coloração com prata observou-se claramente as bandas correspondentes às cadeias pesada e leve do anticorpo recombinante, expressas pelas construções monocistrônica pMACIA HL anti-CD3 e bicistrônica pMACIA HIL anti-CD3, nas formas reduzida em torno de 55 kDa e 27 kDa, e não-reduzida em torno de 250 kDa (Figura 27).

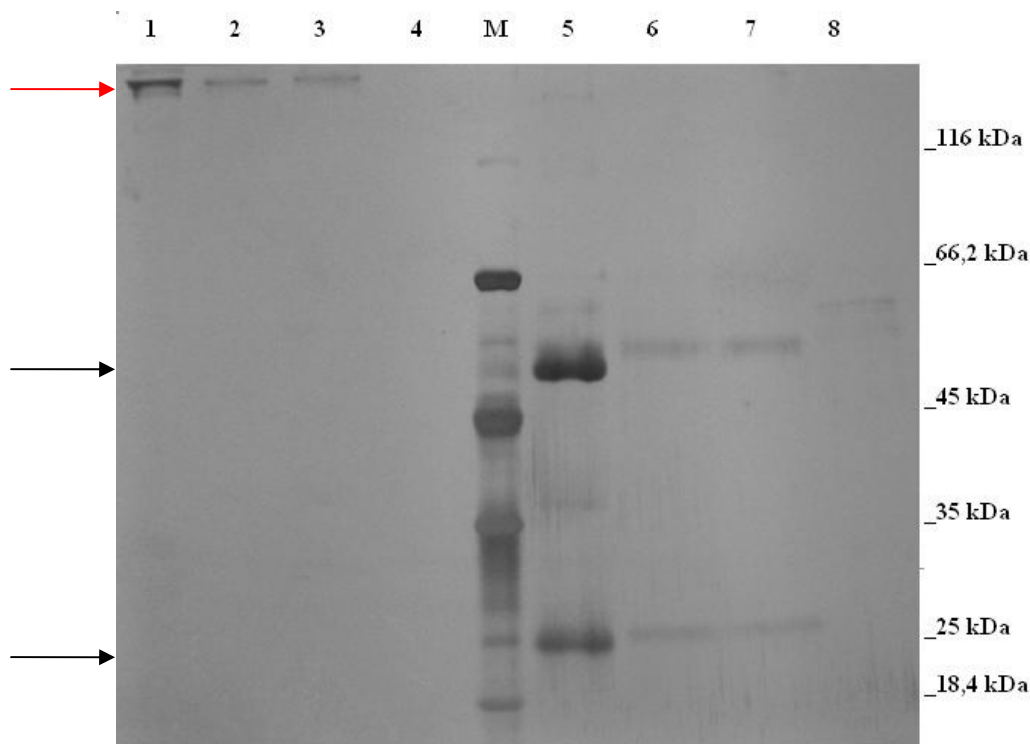


Figura 27. Análise do anticorpo anti-CD3 purificado a partir de transfectomas de BHK-21. Foi realizada uma eletroforese em gel SDS 10%, de forma reduzida e não-reduzida, para separação dos anticorpos purificados e concentrados. Foi feita coloração com prata utilizando o kit Plus One Silver Staining Protein (GE Lifescience). **1:** 400 ng de IgG humana não-reduzida. **2:** Construção HIL não-reduzida. **3:** Construção HL não-reduzida. **4:** Construção LH não-reduzida. **5:** 400 ng de IgG humana reduzida. **6:** Construção HIL reduzida. **7:** Construção HL reduzida. **8:** Construção LH reduzida. **M:** Marcador Page Ruler Unstained Protein Molecular Weight (Fermentas®). Setas vermelhas destacando a forma não-reduzida. Setas pretas destacando as bandas correspondentes às cadeias pesada e leve reduzidas, respectivamente.

A forma dimérica, não reduzida, foi observada em uma banda com tamanho bem acima de 116 kDa. Isso pode ter acontecido por uma possível agregação dos anticorpos ou ainda devido a sua estrutura terciária que, sob condições não-redutoras, pode impactar na migração do gel SDS-PAGE quando comparada com o polipeptídeo desnaturado. Em artigo recente foi mostrado que IgGs submetidas à migração em SDS-PAGE sob condições não redutoras apresentaram uma massa molecular aparente de 300 kDa, entretanto, quando submetidas a uma cromatografia analítica de gel filtração as IgGs se apresentaram em monômeros, não sendo observado agregados (Li *et al.*, 2007).

Já a construção monocistrônica pMACIA LH anti-CD3 realmente não mostrou nenhuma produção. Portanto, essa construção será melhor analisada, com um seqüenciamento completo do cassete de expressão, para avaliar se houve alguma mutação durante a manipulação para a construção deste vetor. Contudo, mesmo sem expressar o anticorpo, ela serviu como um controle da purificação mostrando que as amostras das construções monocistrônica HL e bicistrônica HIL não apresentavam contaminação com IgGs bovinas, presente no meio de cultura onde foram cultivadas as células.

As amostras de anticorpos purificadas e concentradas foram quantificadas por análise de proteína total pelo kit BCA (Pierce[®]). As análises geraram uma estimativa em torno de 4,6µg/mL para a construção bicistrônica HIL e 3,7µg/mL para a construção monocistrônica HL. Como essas concentrações estavam muito abaixo do esperado, partimos para a construção de vetores para transfecção estável dessas duas construções. Com isso haveria a possibilidade de se obter transfectomas estáveis, expandir essa população e ter uma expressão continuada do anticorpo recombinante, possibilitando análises de função efetora deste no futuro.

4.9 Construção do vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3

Com o intuito de aumentar a produção do anticorpo recombinante pela construção bicistrônica HIL, resolvemos adicionar a essa construção uma marca de seleção para expansão de clones estáveis. Assim um novo IRES seria interposto entre o final da região codificadora do anticorpo recombinante e o início da marca de resistência ao antibiótico G418, seqüências estas obtidas a partir do vetor comercial pLXIN (Clontech). O interessante dessa construção é que gera de um transcrito tricistrônico, contendo a marca de resistência a G418 (NEO^R), garantindo que durante o processo de seleção das células transfectadas somente aquelas produtoras do anticorpo recombinante vão ser selecionadas. Isso se dá porque a célula só adquire resistência ao antibiótico G418 se estiver produzindo o transcrito que contém tanto a marca de resistência como o gene da proteína de interesse.

Para a construção do vetor tricistrônico, o vetor pLXIN (Clontech) foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Bam*H I, liberando a porção IRES NEO^R. Já o vetor pMACIA HIL anti-CD3 foi digerido apenas com a enzima de restrição *Bam* HI, promovendo a linearização do vetor. As digestões dos dois vetores foram seguidas de tratamento com o

fragmento *Klenow* da DNA polimerase I, e estes foram ligados com *T4 DNA ligase*. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I, *Nhe* I e *EcoR* I. Essa clonagem pode gerar dois perfis, pois o fragmento pode entrar na orientação correta IRES – neo, ou na forma incorreta neo – IRES. Foram analisados 15 clones, sendo 1 positivo e o perfil originado estava de acordo com o esperado na orientação IRES - neo, dando origem a construção tricistrônica pMACIA HIL IRES neo (Figura 28).

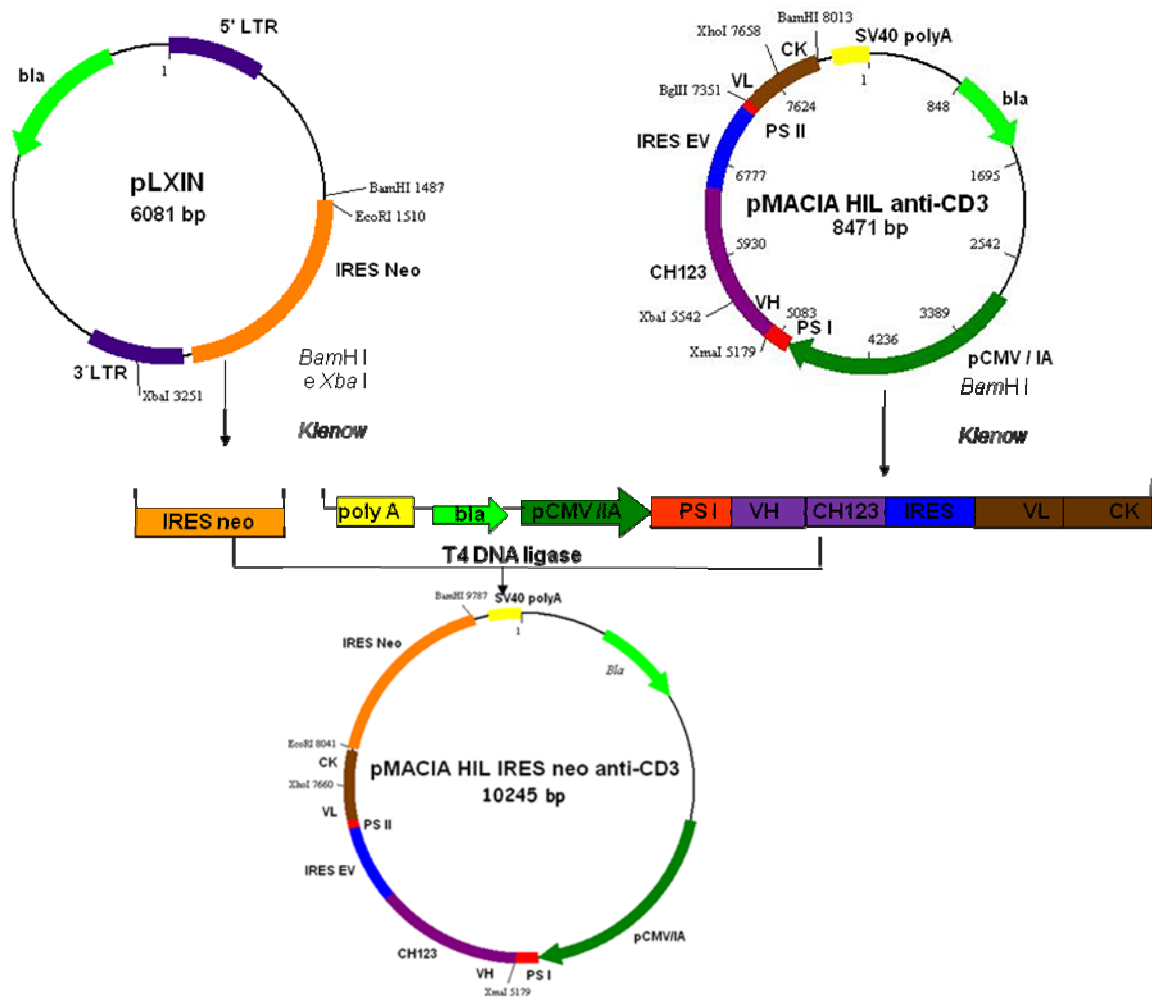


Figura 28. Estratégia para construção do vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3. Para clonagem da porção IRES NEO^R no vetor bicistrônico pMACIA HIL anti-CD3, o vetor pLXIN (Clontech) foi digerido com as enzimas *Xba* I e *Bam*H I para liberação do do fragmento gênico IRES NEO^R. Já o vetor pMACIA HIL anti-CD3 foi digerido apenas com a enzima *Bam*H I. Após as digestões, ambos foram tratados com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I e ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*, dando origem a construção tricistrônica pMACIA HIL IRES neo anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β-lactamase; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada; *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve; 5' *LTR*: porção 5' UTR do fragmento gênico IRES NEO^R e 3' *LTR*: porção 5' UTR do fragmento gênico IRES NEO^R.

4.10 Transfecção estável da linhagem celular BHK-21 utilizando o vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3

Seguimos então para a produção do anticorpo anti-CD3 humanizado a partir do vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3 na linhagem celular BHK-21. Para tal foi realizada primeiramente uma transfecção transiente (tópico 3.2.12.7) e esta foi realizada em duplicata. Além desse vetor, também foi transfectado separadamente o vetor pGFP/NEO para controle da eficiência de transfecção.

Após 48h e 72h da transfecção os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com o intuito de verificar a expressão do anticorpo recombinante. Esse experimento de ELISA também foi desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc. Os anticorpos eram quantificados a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas. O ensaio era realizado duplicata para cada poço transfectado e os resultados referentes ao anticorpo recombinante agrupados, assim foram agrupadas quatro medidas.

Os resultados revelaram que o vetor contendo a construção tricistrônica conseguiu promover a expressão do anticorpo recombinante. A partir dos dados da curva padrão com IgG humana a uma concentração inicial de 160 ng/mL, pode-se inferir que a quantidade de anticorpo recombinante presente no sobrenadante de cultura era de 14,3 ng/mL em 48h pós-transfecção e 1,75 ng/mL em 72h pós-transfecção (Figura 29). É interessante ressaltar que essa construção produziu uma maior quantidade de anticorpo do que a construção bicistrônica pMACIA HIL, mesmo com mesma eficiência de transfecção, revelada por análise em microscópio de fluorescência das células transfectadas com o vetor pGFP/NEO, sendo de aproximadamente 50%. Visto isso, partimos para a seleção de clones estáveis a partir dessa construção.

4.10.1 Seleção das células transfectadas utilizando Geneticina[®] (G418)

Com intuito de obtermos quantidades de proteínas suficientes para a realização dos ensaios biológicos, partiu-se para seleção das células transfectadas utilizando o antibiótico Geneticina[®] (G418) (tópico 3.2.12.8). A adição de agente seletivo promove a morte celular das células não transfectadas e permite a sobrevivência das células produtoras de proteína

recombinante, visto que, os plasmídios utilizados possuíam a marca de resistência ao agente seletivo citado. Além disso, após a morte celular das células não transfectadas, as células resistentes passam a ter a capacidade de se proliferar até atingir a confluência máxima do poço. Assim, após a seleção somente células expressando a proteína recombinante estariam presentes nos poços transfectados.

Após a coleta do sobrenadante de 72h depois da transfecção, o meio de cultura foi repostado por meio adicionado do antibiótico Geneticina a uma concentração de 600 µg/mL. Além disso, o meio com o antibiótico foi adicionado aos poços controles contendo as células não-transfectadas. Essas por sua vez seriam utilizadas como controle da morte celular. A partir da adição do meio com o agente seletivo, o sobrenadante de cultura foi coletado a cada 48h e trocado por meio novo acrescido de Geneticina. As células foram sempre acompanhadas pela visualização no microscópio óptico onde era observada a sua morfologia e a aderência à placa.

As células da linhagem BHK-21 possuem como característica o crescimento em meio de cultura contendo soro fetal bovino de forma aderida e apresentando uma morfologia elíptica. Quando essas células entram no processo de morte celular elas começam a perder a aderência pela placa e mudam sua morfologia para a forma esférica.

Dessa forma as células foram acompanhadas da maneira citada e quando foi constatado que aquelas presentes nos poços não-transfectados tinham morrido, era assumido que a partir daquele ponto as células estavam selecionadas.

Durante a seleção das células transfectadas, os sobrenadantes das culturas foram coletados para acompanhamento por ELISA dos níveis de proteínas recombinantes expressos. Os resultados mostraram entre os tempos de 240h a 408h houve uma total perda da produção do anticorpo (Figura 29). Após 480h o anticorpo volta a ser produzido, mas sua produção fica oscilante além de ser muito baixa. Esse mesmo processo de queda de expressão foi observado por Silva, em 2008, no entanto com a expansão da cultura mista de clones estáveis para garrafas de cultura de 75 e 150 cm², houve um aumento considerável na produção do anticorpo recombinante.

Essa etapa é um momento crucial para o estabelecimento das células resistentes ao antibiótico. Provavelmente, além de provocar a morte celular daquelas não-transfectadas, as células que integraram no seu genoma poucas cópias do vetor tricistrônico durante a transfecção podem ter sido eliminadas. A quantidade do gene resistência expressa provavelmente era consideravelmente inferior àquelas células que internalizaram e integraram diversas cópias dos vetores contendo a marca de resistência.

Nesse sentido, essa queda de expressão provavelmente se deve a morte dessas células transfectadas com poucas cópias dos vetores que de certa forma estavam contribuindo para as quantidades de proteínas expressas. Outra hipótese é que essa pequena variação seja um artefato intrínseco do experimento visto que a composição inconsistente do meio, devido à presença de soro fetal bovino, pode gerar variações dos níveis de produção das proteínas recombinantes. Esse experimento está em continuidade e os dados aqui contidos são até a presente data.

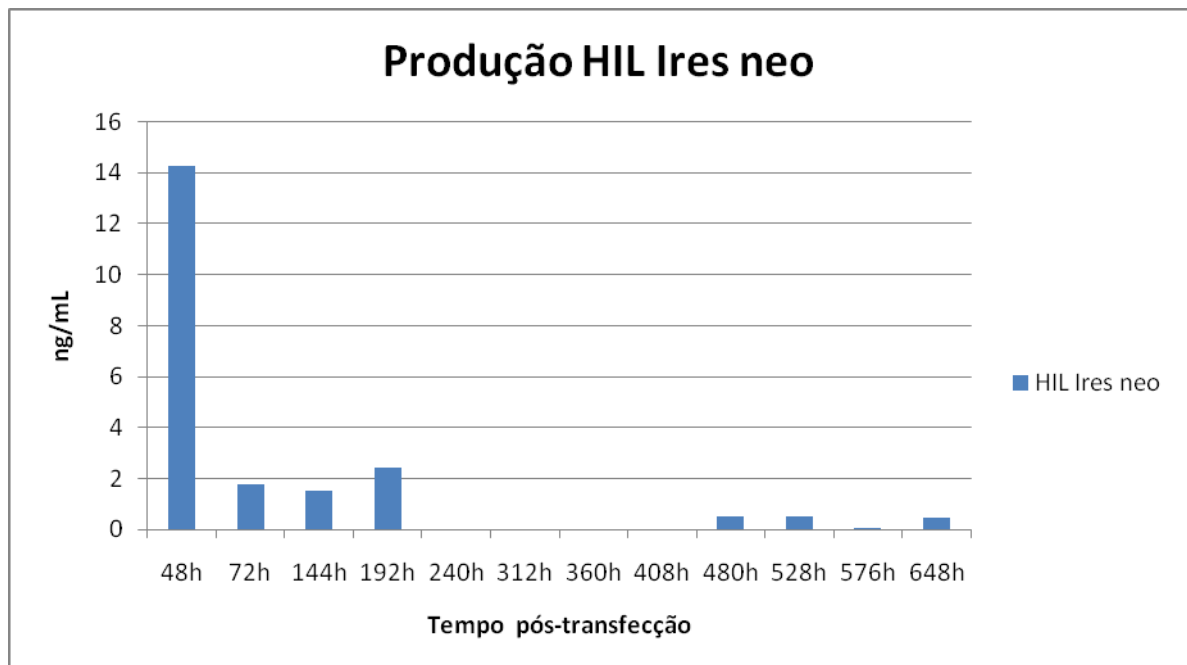


Figura 28. Níveis de produção do anticorpo anti-CD3 em transfectomas estáveis de BHK-21. O sobrenadante de cultura foi coletado após 72h da transfecção e o meio repostado adicionado do referido antibiótico a cada 48h ou 72h. As células foram observadas quanto a sua morfologia para determinação da morte das células não transfectadas e o sobrenadante de cultura coletado para acompanhamento dos níveis de anticorpos produzidos. Os níveis de produção do anticorpo anti-CD3 foram determinados por ELISA, a partir da comparação com uma curva-padrão de IgG humana.

4.11 Construção do vetor de expressão bicistrônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3

Para o aumento a produção do anticorpo recombinante pela construção monocistrônica HL, resolvemos também adicionar a essa construção uma marca de seleção para expansão de clones estáveis. Assim um elemento IRES seria interposto entre o final da região codificadora do anticorpo recombinante e o início da marca de resistência ao antibiótico G418, seqüências também obtidas a partir do vetor comercial pLXIN (Clontech).

Para essa construção, o vetor monocistrônico pMACIA HL anti-CD3 e o vetor tricistrônico pMACIA HIL IRES neo foram digeridos com as enzimas de restrição *Xma* I e *Xho* I, liberando as porções cadeia pesada inteira – Fur – VL e e a geração dos sítios para clonagem, respectivamente. Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando as enzimas de restrição *Kpn* I, *Nhe* I e *EcoR* I, e o perfil originado estava de acordo com o esperado, dando origem a nova construção bicistrônica, pMACIA HL IRES neo (Figura 30).

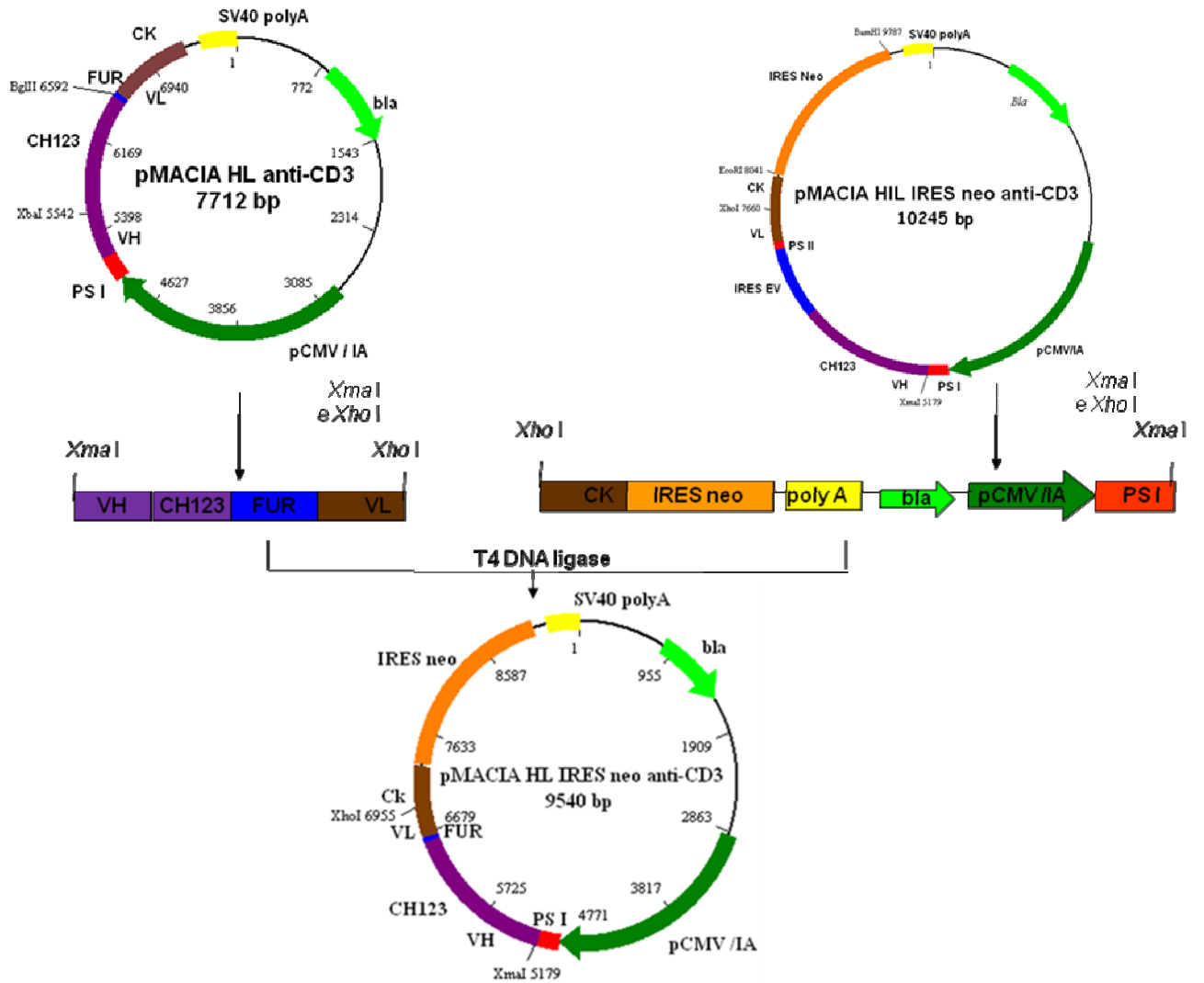


Figura 30. Estratégia para construção do vetor tricistônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3. Para clonagem das porções cadeia pesada inteira – Fur – VL no vetor tricistônico pMACIA HIL IRES neo anti-CD3, o vetor monocistônico pMACIA HL anti-CD3 foi digerido com as enzimas *Xma* I e *Xho* I para liberação das porções cadeia pesada inteira – Fur – VL e liberação do vetor pMACIA HIL anti-CD3 IRES neo. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem a construção bicistônica pMACIA HL IRES neo anti-CD3. Siglas – *bla*: gene da enzima β -lactamase; pCMV/IA: promotor de citomegalovírus contendo o íntron A; *SV40 polyA*: sinal de poliadenilação; *PS I*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia pesada e *PS II*: seqüência líder codificadora do peptídeo sinal da cadeia leve.

4.12 Transfecção estável da linhagem celular BHK-21 utilizando o vetor bicistrônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3

Partimos para a produção do anticorpo anti-CD3 humanizado a partir do vetor bicistrônico pMACIA HL IRES neo anti-CD3 na linhagem celular BHK-21. Para tal foi realizada primeiramente uma transfecção transiente (tópico 3.2.12.7) e esta foi realizada em duplicata. Além desse vetor, também foi transfectado separadamente o vetor pGFP/NEO para controle da eficiência de transfecção.

Após 48h e 72h da transfecção os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com o intuito de verificar a expressão do anticorpo recombinante. Esse experimento de ELISA também foi desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc. Os anticorpos eram quantificados a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas. O ensaio era realizado para cada poço transfectado e os resultados referentes ao anticorpo recombinante agrupados, assim foram agrupadas duas medidas.

Não foi detectada nenhuma produção de anticorpo a partir dessa construção. No entanto, resolvemos partir para a seleção dessa construção com Geneticina, pois poderia haver produção do anticorpo por poucas células, não sendo detectada pelo ensaio de ELISA. Com a seleção essas células produtoras seriam expandidas, podendo assim detectarmos a presença do anticorpo. Contudo, com a seleção houve morte celular tanto das células não-transfectadas, utilizadas como controle como no tópico 4.2.9, como nas células transfectadas com a construção bicistrônica pMACIA HL IRE neo.

A concentração de Geneticina utilizada, 600 µg/mL, foi obtida a partir de uma curva de sobrevivência feita previamente na linhagem celular CHO-K1 (Silva, 2008). Isso pode ter interferido na produção dos anticorpos recombinantes, produzidos na linhagem BHK-21, tanto na construção tricistrônica quanto na bicistrônica. Essa linhagem celular pode ser mais sensível a esse agente seletivo, eliminando conseqüentemente os clones produtores. Uma curva de sobrevivência para a linhagem BHK-21 será feita e serão repetidas as transfeções estáveis a partir das construções tricistrônica pMACIA HL IRES neo anti-CD3 e bicistrônica pMACIA HL IRES neo anti-CD3.

Com essas barreiras ultrapassadas será possível chegar a uma produção do anticorpo anti-CD3 humanizado suficiente para análises de sua função efetora e futuro uso clínico.

*Conclusões e
Perspectivas*

No presente trabalho foram traçadas estratégias inovadoras para a expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamíferos. Para isso foram construídas versões monocistrônicas, bicistrônicas e tricistrônicas desse anticorpo no sentido de otimizar sua produção.

Os resultados aqui apresentados mostram que a expressão de anticorpos recombinantes em células de mamíferos utilizando o vetor de expressão bicistrônico pMACIA HIL, com o elemento IRES entre as duas cadeias do anticorpo, é bastante promissora, se mostrando a construção mais satisfatória em termos de produção em transfecções transiente e estável até o momento. A adição de uma marca seletiva a essa construção, gerando o vetor de expressão tricistrônico pMACIA HIL IRES neo, apresentou um certo nível de estabilidade de produção ao longo do tempo, sendo que a este experimento está sendo dada continuidade.

O vetor de expressão monocistrônico pMACIA HL, com uma seqüência codificadora de um sítio clivável por furina entre as duas cadeias do anticorpo, se mostrou factível, produzindo o anticorpo recombinante de forma efetiva. Esse resultado é interessante, pois essa construção gera um polipeptídeo bastante grande que somente é hipoteticamente clivado no Complexo de Golgi, liberando as duas cadeias do anticorpo para montagem. Contudo, a adição da marca seletiva a essa construção, gerando o vetor de expressão bicistrônico pMACIA HL IRES neo, teve um efeito negativo nessa construção, ocasionando nenhuma produção por parte desta.

Já o vetor de expressão monocistrônico pMACIA LH não conseguiu produzir o anticorpo recombinante. Este vetor foi bastante manipulado durante a sua construção, pelo fato de que além da inserção uma seqüência codificadora de um sítio clivável por furina entre as duas cadeias do anticorpo, houve a inversão da posição das cadeias em relação as outras construções. Essa manipulação pode ter gerado algum problema nessa seqüência, impossibilitando a produção do anticorpo.

Como perspectivas para este trabalho temos em primeiro lugar a análise massiva da seqüência da construção monocistrônica pMACIA LH, para tentar entender o porque da não produção do anticorpo recombinante. Com a resolução do problema, será feita a repetição da transfecção transiente das três construções, monocistrônicas e bicistrônicas em BHK-21, para uma melhor comparação da produção do anticorpo recombinante entre elas. Será feita, paralelamente, uma curva de sobrevivência de BHK-21 com o Geneticina, estabelecendo-se uma concentração ideal desse antibiótico para ser utilizada na seleção de clones estáveis a partir das construções tricistrônica pMACIA HIL IRES neo e bicistrônica pMACIA HL IRES

neo. Com essa concentração estabelecida, a transfecção dessas construções será refeita e suas produções serão comparadas para o estabelecimento da melhor construção.

Será feita também transfecção estável da construção tricistrônica pMACIA HIL IRES neo na linhagem celular CHO-K1, pela sua estabilidade de produção do anticorpo mostrada por Silva, em 2008. Outra perspectiva é suprir linhagens celulares que não possuem quantidades suficientes da enzima furina, como HEK293 e CHO-K1 (Shapiro *et al.*,1997), através de co-transfecção de um vetor contendo uma seqüência codificadora da enzima furina, possibilitando a expressão das construções monocistrônicas nessas linhagens. Com essas questões solucionadas, em conjunto com os dados experimentais, será possível avaliar o potencial dessas moléculas recombinantes como futuros imunoterápicos.

Ao estabelecer-se a melhor construção, esta e as versões do mesmo anticorpo na forma de FvFc, , FvFc T e FvFc R (Silva, 2008), serão utilizadas durante meu projeto de Doutorado. Este tem como objetivos analisar o efeito dos anticorpos anti-CD3 humanizados, versões FvFcs e anticorpo inteiro, na indução de proliferação, produção de citocinas e expressão de fatores de transcrição imunorreguladores, bem como analisar o efeito desses anticorpos na geração de células T com atividade supressora, *in vitro*.

Referências
Bibliográficas

Abbas, A. K. e Lichtman, A. H. Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders. 2003.

Bosshart, H.; Humphrey, J.; Deignan, E.; Davidson, J.; Drazba, J.; Yuan, L.; Oorschot, V.; Peters, P. J. e Bonifacino, J. S. The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol*, v. 126, p. 1157-1172. 1994.

Braren, I.; Greunke, K.; Umland, O.; Deckers, S.; Bredehorst, R. e Spillner, E. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Biochem*, v.47, n.4, p.205-14. 2007

Burtet, R. T.; Santos-Silva, M. A.; Buss, G. A.; Moraes, L. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Production of a recombinant Fab in *Pichia pastoris* from a monocistronic expression vector. *J Biochem*, v. 142, n.6, p. 665-669. 2007.

Campos-da-Paz, M.; Costa, C. S.; Quilici, L. S.; Simões, I. D.; Kyaw, C. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Production of Recombinant Human Factor VIII in Different Cell Lines and the Effect of Human XBP1 Co-Expression. *Mol Biotechnol*. 2008.

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

Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol*, v.3, n.2, Feb, p.123-132. 2003.

Cohen, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun*, Sep 19. 2007.

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

Cruz, H. J.; Conradt, H. S.; Dunker, R.; Peixoto, C. M.; Cunha, A. E.; Thomaz, M.; Burger, C.; Dias, E. M.; Clemente, J.; Moreira, J. L.; Rieke, E. e Carrondo, M. J. Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. *J Biotechnol*, v.26; n.96, p.169-183. 2002.

Denault, J. e Leduc, R. Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Letters*, v. 379, p. 113-116. 1996.

Dul, J. L.; Aviel, S.; Melnick, J. e Argon, Y. Ig light chains are secreted predominantly as monomers. *J. Immunol*, v.157, n.2969. 1996.

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

Fuller, R. S.; Brake, A. J. e Thorner, J. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, v.246, n.4929, p.482-6. 1989.

Furger, A.; O'Sullivan, J. M.; Binnie, A.; Lee, B. A. e Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes and Development*, v.16, p.2792-99. 2002.

Grahan, F.L.; Smiley, J.; Russel, W.C. e Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, v.36, n.1, p.59-74. 1977.

Herold, K. C.; Gitelman, S. E.; Masharani, U.; Hagopian, W.; Bisikirska, B.; Donaldson, D.; Rother, K.; Diamond, B.; Harlan, D. M. e Bluestone, J. A. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1 (Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes*, v.54, n.6, Jun, p.1763-1769. 2005.

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

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

http://en.wikipedia.org/wiki/monoclonal_antibody_therapy, acessado em 20 de março de 2008.

http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10479&tabno=2, acessado em 21 de abril de 2008.

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

Ishaque, A.; Thrift, J.; Murphy, J. E. e Konstantinov, K. Cell surface staining of recombinant factor VIII is reduced in apoptosis resistant BHK-21 cells. *J Biotechnol.*, v.10, n.137, p.20-27. 2008.

Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. e Shlomchik, M. *Immunobiology*. New York and London: Garland Publishing. 2001.

Kelley, D. E.; Coleclough, C. e Perry, R. P. Functional significance and evolutionary development of the 5'-terminal regions of immunoglobulin variable-region genes. *Cell*, v.29, n.2, p.681-689. 1982.

Kwek, K. Y.; Murphy, S.; Fung, A.; Thomas, B.; O'Gorman, W.; Kimura, H.; Proudfoot, N.J. e Akoulitchev, A. U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation. *Nature Structural Biology*, v.9, n.11, p.800-5. 2002.

Leitzgen, K.; Knittler, M. R. e Haas, I. G.; Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. *J. Biol. Chem*, v.272, p.3117. 1997.

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

- Li, J.; Menzel, C.; Meier, D.; Zhang, C.; Dübel, S. e Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *JIM*, v. 318, p.113-124. 2007.
- Li, B.; Wang, H.; Dai, J.; Ji, J.; Qian, W.; Zhang, D.; Sheng, H. e Guo, Y. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. *Immunology*, v.116, n.4, Dec, p.487-498. 2005.
- Liu, K.; Sandgren, E. P.; Pamiter, R. D. e Stein, A. Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment *in vitro* and in transgenic mice. *PNAS*, v.92, p.7724:28. 1995.
- Maggon, K. Monoclonal antibody "gold rush". *Curr Med Chem*, v.14, n.18, p.1978-1987. 2007.
- Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. v. IV. 2001.
- Mielke, C.; Tümmler, M.; Schübeler, D.; von Hoegen, I. e Hauser, H. Stabilized, long-term expression of heterodimeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene*, v.254, p.1–8. 2000.
- Penteado, F. C. L.; Medeiros, L.; Orellana, M. D.; Palma, P.; Fontes, A. M.; Takayanagui, O. M. e Covas, D. T. Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do retrovírus HTLV-1 em células de mamíferos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.2, p.169-173. 2006.
- Presta, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev*, v.58, n.5-6, Aug 7, p.640-656. 2006.
- Puck, T. T.; Cieciura, S. J. e Robinson, A. Long – Term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of Experimental Medicine*, v.108, n.6, p.945-56. 1958.

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

Reichert, J. e Pavolu, A. Monoclonal antibodies market. *Nature Rev Drug Discov*, v.3, n.5, p. 383-384. 2004.

Rockwell, N. C. e Thorner, J. W. The kindest cuts of all: crystal structures of kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *TRENDS*, v. 29, n. 2. 2004.

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

Ruggiero, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2002. 137 p.

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

Seidah N. G.; Chrétien, M. e Day, R. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie*, v.76, n.3-4, p.197-209. 1994.

Seidah, N. G.; Day, R.; Marcinkiewicz, M.; Chrétien, M. Mammalian paired basic amino acid convertases of prohormones and proproteins. *Ann NY Acad Sci*, v.680, p. 135-146. 1993.

Shapiro, J.; Sciaky, N.; Lee, J.; Bosshart, H.; Angeletti, R. H. e Bonifacino, J. S. Localization of Endogenous Furin in Cultured Cell Lines. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.45, n.1, p.3-12. 1997.

Shi, M.; Xie, Z.; Yu, M.; Shen, B. e Guo, N. Controlled growth of Chinese hamster ovary cells and high expression of antibody-IL-2 fusion proteins by temperature manipulation. *Biotechnol Lett.*, v.27, n.23-24, p.1879-84. 2005.

Shih, S. R.; Ho, M. S.; Lin, K. H.; Wu, S. L.; Chen, Y. T.; Wu, C. N.; Lin, T. Y.; Chang, L. Y.; Tsao, K. C.; Ning, H. C.; Chang, P. Y.; Jung, S. M.; Hsueh, C. e Chang, K. S. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res.*, v.68, n.2, p.127-36. 2000.

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

Silva, H. M.; Vieira, P. M. M. M.; Costa, P. L. N.; Pimentel, B. M. S.; Moro, A. M., Kalil, J.; Coelho, V.; Maranhão, A. Q. e Brigido, M. M. Induction of an immunoregulatory profile by low affinity humanized anti-CD3 antibodies in human peripheral blood mononuclear cells. Manuscrito em preparação, 2009.

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

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

Spector, D. L.; Goldman, R. D. e Leinwand, L. A. *Cells: a Laboratory Manual*. 1998. 1st Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., USA, CSHL Press, p 1.1 – 2.13.

Stoker, M. e MacPherson, I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. *Nature*, v.26, n.203, p.1355-1357. 1964.

Sung, Y. H. e Lee, G. M. Enhanced human thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of bcl-2-overexpressing CHO cells. *Biotechnology Progress*, v.21, n.1, p.50-7. 2005.

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

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

Whitcomb, E. A.; Haines, B. B.; Parmelee, A. P., Perlman, A. M. e Brodeur, P. H. Germiline structure and differential utilization of Igha e Ighb VH10 genes. *J. Immunol*, v. 162, n.3, p.1541-1550. 1999.

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

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

Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutic in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v.22, n.11, p.1393-8. 2004.

Xia, W.; Bringmann, P.; McClary, J.; Jones, P.P.; Manzana, W.; Zhu, Y.; Wang, S.; Liu, Y.; Harvey, S.; Madlansacay, M.R.; McLean, K.; Rosser, M.P.; MacRobbie, J.; Olsen, C.L. e Cobb, R.R. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*, v.45, n.1, p.115-24. 2006.

Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Watabe, A.I.; Uchida, E.; Mayumi, T. e Hayakawa, T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, v.272, p.149-56. 2001.

