



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

ANA PAULA COSTA ATHAYDE NUNES

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DO EPÍTOPO
RECONHECIDO POR ANTICORPOS TERAPÊUTICOS CONTRA O
ANTÍGENO CD3 HUMANO**

BRASÍLIA

2018

ANA PAULA COSTA ATHAYDE NUNES

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DO EPÍTOPO
RECONHECIDO POR ANTICORPOS TERAPÊUTICOS CONTRA O
ANTÍGENO CD3 HUMANO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo
Brígido

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Andrea Queiroz
Maranhão e o Prof. Dr. Rafael Trindade Burtet

BRASÍLIA

2018

ANA PAULA COSTA ATHAYDE NUNES

**SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS MIMÉTICOS DO EPÍTOPO
RECONHECIDO POR ANTICORPOS TERAPÊUTICOS CONTRA O
ANTÍGENO CD3 HUMANO**

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido e da Prof^a. Dr^a. Andrea Queiroz Maranhão.

BRASÍLIA, 03 de agosto de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Prof. Dr. Andre Nicola

Prof^a. Dra. Viviane Castelo Branco Reis

Prof^a. Dra. Isabel Garcia Sousa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho para que nos momentos mais difíceis dessa caminhada me fizesse persistir, me permitindo ter determinação nos momentos de dúvidas e serenidade nos momentos de conflitos.

Agradeço ao meu orientador Marcelo Brígido e aos coorientadores Andrea Maranhão e Rafael Burtet pela oportunidade que me deram. Por terem acreditado em mim e tido paciência. Agradeço por terem me auxiliado no meu crescimento científico e profissional.

A todos da minha família por acreditar nos meus sonhos. Ao meu pai Paulo Sérgio, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, me apoiando e fazendo acreditar que nada é impossível. A minha mãe Rosimeire, por ser dedicada e amiga, por ser a pessoa que me apoia e acredita na minha capacidade, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e mostrando que sou capaz. A minha irmã, Sarah, que teve paciência comigo nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos do grupo de Imunologia Molecular, entre ele em especial a Isabel, Manuela, Marciano, Nestor, Juan, Ronny, Renato, e a Maria José da bioinformática por me orientarem em meus experimentos no laboratório. Também a Mariana, Gabriela, Suelen, Maria José Chiabai, Maryani, Fernanda, Amanda, Vitor, Rafaela, Camila e Jacy pelos momentos de alegrias e descontração no laboratório e também nos dias de desesperos.

Aos amigos e primos que me auxiliaram na parte tecnológica em que tive dificuldades nessa trajetória. Minha prima Gabriela, meu primo Philippe e amigo Oscar. E aos demais que passaram pela minha vida nesses anos de dedicação e que entenderam minhas crises e ausência em especial minhas amigas Nathalia, Bianca e Camila.

Obrigada pelo carinho!

“Eu não falhei. Apenas descobri 10 mil maneiras que não funcionam!”

(Thomas Edison)

RESUMO

O CD3 como alvo terapêutico de anticorpos, pode induzir a depleção parcial dos linfócitos T circulantes, provocando uma imunossupressão, que pode ser explorada clinicamente. Com isso, a busca por anticorpos anti-CD3 humanizados tem relevância biotecnológica. Entretanto, o CD3 é um antígeno de membrana de difícil preparação. Desse modo, procuramos obter um antígeno mimético ao CD3 que se ligue com alta afinidade a um anticorpo conhecidamente imunomodulador, o anticorpo monoclonal OKT3, de forma a facilitar a busca de novos anticorpos terapêuticos. Para isso utilizou-se o *biopanning*, por *phage display*, para selecionar peptídeos ligantes, a partir de uma biblioteca de peptídeos randômicos construída de sete resíduos, PhDC7C (Biolabs). Um protocolo de seleção baseado em seleção negativa com IgG2a de camundongo, seguido de três ciclos sucessivos de seleção positiva. Para validação desses *biopanning* foi feita a titulação dos ciclos comparando-os a uma curva padrão, usando a biblioteca original amplificada por PCR, que foi utilizada para normalizar a quantidade de DNA. Foram obtidas sub-bibliotecas com um título em torno de 10^6 pfu/mL. Essas sub-bibliotecas foram analisadas por sequenciamento de DNA de alto desempenho e por bioinformática em busca de peptídeos selecionados especificamente pelo paratopo do anticorpo OKT3, um anti-CD3. Com a análise de bioinformática foi permitido à comparação das sequências obtidas aos bancos de dados, existentes. Assim, foram excluídos, os peptídeos conhecidamente resultante de seleção inespecífica. Em conclusão, não foi possível encontrar um peptídeo ligante ao alvo de interesse. Provavelmente o viés encontrado na biblioteca, interferiu no sucesso da técnica, mas modificações no protocolo de seleção deverão ser considerados na seleção de peptídeos ligantes, que sirvam de mimotopos.

Palavras-chave: Mimotopo. CD3. Anti-CD3. *Phage display*. *Biopanning*.

ABSTRACT

Anti-CD3 antibodies, a target for antibody therapy, may induce partial depletion of circulating T lymphocytes, causing immunosuppression, which can be explored clinically. Thus, a search for humanized anti-CD3 antibodies has a biotechnological relevance. However, CD3 is a difficult-to-prepare membrane antigen. Thus, we aim to obtain a CD3 antigen mimetic that binds with high affinity to a known immunomodulatory anti-CD3, the mouse monoclonal antibody OKT3. We use a seven-residue, phage display peptide library PhDC7C (Biolabs) to select for OKT3 mAb ligands peptides. The screening involves a negative selection with mouse IgG2a and three successive positive selection cycles. The validation of biopanning was done with PCR, which was used to quantify the amount of DNA. Sub-libraries with a titer of about 10^6 pfu / ml were obtained. These sub-libraries were analyzed by high-throughput DNA sequencing and by bioinformatics in search peptides selected specifically for the paratope of the OKT3 molecule. With a bioinformatics analysis it was possible to compare the sequences with the existing databases. Thus, peptides known as non-specific binding were excluded. However, a peptide binding to the target of interest could not be found. Further improvement in selection technique may yield to specific OKT3 binding mimotopes.

Key words: Mimotope. Anti-CD3, Phage-display. Biopanning

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método da produção do hibridoma.	17
Figura 2. Sistema de ligação de um linfócito T.....	18
Figura 3. Representação de uma molécula de proteína em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....	19
Figura 4. Molécula de IgG secretada.	20
Figura 5. Interação antígeno-anticorpo.	21
Figura 6. Esquematização da técnica do <i>biopanning</i>	25
Figura 7. Proteínas de sinalização selecionadas no complexo TCR-CD3.....	27
Figura 8. mAbs anti-CD3.	28
Figura 9. Sequência dos nucleotídeos randômico	33
Figura 10. Desenho experimental.....	35
Figura 11. Esquematização do <i>biopanning</i> por seleção negativa.....	38
Figura 12. Diluição da biblioteca comercial.	42
Figura 13. Titulação por PCR da IgG2a A.....	43
Figura 14. Titulação por PCR da IgG2a B.	43
Figura 15. Titulação por PCR do OKT3 A.	44
Figura 16. Titulação por PCR do OKT3 B.	44
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose.	45
Figura 18. Diversidade da bbl A.	47
Figura 19. Diversidade da bbl B.....	47
Figura 20. Diversidade das bibliotecas com 3 cópias.	48
Figura 21. Diversidade da parte 1 da biblioteca A.	49
Figura 22. Diversidade da biblioteca com 2 cópias.....	49
Figura 23. Diversidade do OKT3 A.	50
Figura 24. Diversidade do OKT3 B.	50
Figura 25. Diversidade do IgG2a A.	50
Figura 26. Diversidade da IgG2a B.....	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tabela dos mAbs utilizados na clínica	15
Tabela 2. Bibliotecas de peptídeos	22
Tabela 3. Anticorpos derivados de exibição de fagos	24
Tabela 4. Plataformas de sequenciamento de NGS	26
Tabela 5 <i>Primers</i> utilizados.....	31
Tabela 6. Detalhamento das amostras enviadas para sequenciamento.....	45
Tabela 7. Detalhamento das amostras sequenciadas	46
Tabela 8. Quantidade de sequências provenientes do sequenciamento.	46
Tabela 9. Tabela da razão entre o OKT3 e o IgG2a.	51
Tabela 10. Tabela de peptídeos não relacionados com crescimento rápido.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC *Antibody-dependent cellular cytotoxicity* (Citotoxicidade celular mediada por anticorpos)

Amp Ampicilina

APC *Antigen Presenting Cell* (Célula apresentadora de antígeno)

ATM Unidade de pressão atmosfera

BSA *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

CD *Cluster of differentiation* (Marcador de superfície celular)

DC *Dendritic cell* (Célula dendrítica)

dH₂O Água destilada

DMF Dimetilformamida

DNA *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DTT Ditioneitol

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiaminotetracético)

ELISA *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de ligação imunoenzimático)

Fc Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)

FITC *Fluorescein Isothiocyanate* (Fluoresceína isotiocianato)

Fv Fragmento variável de anticorpo

HAMA *Human Anti-Mouse Antibody*

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

ITAM *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif* (Motivos de ativação baseados no imunoreceptor tirosina)

mAb *Monoclonal Antibodies* (Anticorpo monoclonal)

MHC *Major Histocompatibility Complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

μ F Micro Faraday

OD *Optical Density* (Densidade óptica)

OKT3 Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3

pb Par de base

PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Célula mononuclear do sangue periférico)

PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia de polimerização)

PEG Polietilenoglicol

pH Potencial hidrogeniônico

Phage display técnica de apresentação de peptídeos em fagos

rpm Rotações por minuto

RNAse Ribonuclease

SDS Sódio Duodecil Sulfato

TBS Solução salina tamponada com Tris

TCR *T Cell Receptor* (Receptor de célula T)

TE Tampão Tris/EDTA

Treg Linfócito T Regulatório

Tris Tri (hidroximetil) aminometano

TUPs *Target-Unrelated Peptides* (Peptídeos não relacionados com o alvo)

U Unidade enzimática

VH *Variable Heavy* (Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo)

VL *Variable Light* (Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo)

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

Introdução	14
1. Anticorpos	14
1.1. Anticorpos monoclonais.....	14
1.2. Paratopo.....	19
1.3. Mimotopo	21
2. <i>Phage display</i>	23
2.1. Seleção de mimotopos por <i>phage display</i>	24
2.2. Sequenciamento NGS	25
3. Complexo TCR-CD3.....	26
4. Anti- CD3 biofarmacos	27
Justificativa e objetivos	30
Materiais e Métodos	31
5. Material	31
5.1. Linhagem bacteriana	31
5.2. <i>Primers</i> usados no sequenciamento e na reação de PCR	31
5.3. Soluções do <i>phage display</i>	31
5.4. Meios de cultura	32
5.5. Antibióticos	32
5.6. Anticorpos utilizados.....	33
5.7. Biblioteca de peptídeos apresentada em fagos	33
5.8. Soluções de uso em geral	34
5.9. Enzimas	34
5.10. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	34
6. Métodos.....	35
6.1. Desenho experimental	35
6.2. Protocolo de seleção por <i>phage display</i>	36

6.3.	Titulação do <i>Phage Display</i>	38
6.4.	Amplificação do <i>phage</i> por PCR.....	38
6.5.	Análise de DNA em gel de agarose.....	38
6.6.	Células competentes por eletroporação	39
6.7.	Purificação de DNA	40
6.8.	Sequenciamento por NGS	40
Resultados	42
7.	Experimentos de seleção por <i>phage display</i>	42
7.1.	Titulação utilizando PCR	42
7.2.	Experimento	43
7.3.	Preparação da amostra para o sequenciamento	44
8.	Sequenciamento por NSG	45
8.1.	Análise da diversidade dos peptídeos.....	46
Discussão	53
Conclusão e Perspectivas	58
Referências Bibliográficas	59

INTRODUÇÃO

O sistema imune humano é responsável pela manutenção da homeostase corpórea, sendo assim o principal combatente contra patógenos, células aberrantes, injúria tecidual e etc. A resposta imune para isso se divide em duas vertentes: a imunidade inata (a primeira linha de respostas a infecções) e a imunidade adaptativa (mais específica e eficaz após um segundo contato). (RIMER; COHEN; FRIEDMAN, 2014)

1. ANTICORPOS

Os linfócitos B são células que fazem parte da resposta imunológica adaptativa dos humanos. Além de trabalharem como células apresentadoras de antígenos (APC do inglês, *Antigen Presenting Cells*) são responsáveis pela produção dos anticorpos, que reconhecem antígenos específicos (BUSHNELL, 1903) (NANDAKUMAR, 2018). Os anticorpos ou imunoglobulinas são diferenciados em subtipos: IgM, IgD, IgE, IgA e IgG; essa última é a imunoglobulina mais utilizada para fins terapêuticos em humanos. (DARWICHE; GUBLER; PIER, 2018)

1.1. Anticorpos monoclonais

Nos últimos anos os anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *monoclonal antibody*) contribuíram no tratamento de doenças oncológicas e imunológicas. Estudos demonstraram que até 2013 mais de 50 anticorpos já estavam na clínica e mais de 500 produtos terapêuticos estavam sendo testados em ensaios clínicos (FRENZEL et al., 2017). Na **tabela 1** observamos os mAbs que foram aceitos de 2013 a 2018.

Inicialmente alguns mAbs utilizados na clínica provocaram imunogenicidade, por se tratar de anticorpos murinos, além de apresentarem outros efeitos colaterais, como a tempestade de citocinas; com intuito de minimizar esses intempéries, iniciaram estudos para a produção de novos anticorpos quiméricos (produzidos por engenharia genética), que traziam a região variável do anticorpo murino e a constante do correspondente humano (KIMBALL et al., 1995). Assim, pesquisadores começaram o desenvolvimento de mAbs humanizados e

humanos, e observaram que a resposta contra o anticorpo terapêutico diminuiu, mas não acabou na totalidade com a imunogenicidade antes relatada. (LAPTOŠ; OMERSEL, 2018) Logo se faz necessário um controle da fabricação desses mAbs com uma avaliação sistemática da sua imunogenicidade na clínica, para melhor compreender as respostas imunitárias aos mAbs.

Tabela 1. Tabela dos mAbs utilizados na clínica que são aprovados pela FDA de 2013 a 2018.

Anticorpo	Molécula Alvo	Tipo	Indicação	Empresa	Ano
Kadcyla (Ado-Trastuzumab emtansine)	HER2	Humano	Câncer de mama	Genentech	2013
Gazyva (Obinutuzumab)	CD20	Humanizado	Leucemia linfocítica crônica	Genentech	2013
Blinicyto (Blinatumomab)	CD19	Murino	Leucemia Linfoblástica aguda	Amgen	2014
Cyramza (Ramucirumab)	VEGF	Humano	Tumor sólido	Eli Lilly e CO	2014
Entyvio (Vedolizumab)	Integrina $\alpha 4\beta 7$	Humanizado	Colite ulcerativa e doença de crohn	Takeda pharms	2014
Keytruds (Pembrolizumab)	Receptor PD-1	Humanizado	Melanoma metastático	Merck	2014
Sylvant (Siltuximab)	IL-6	Quimérico	Câncer metastático renal, câncer de próstata	Janssen Biotech	2014
Cosentyx (Secukinumab)	IL-17*	Humano	Psoríase	Novartis Pharms corp	2015
Opdivo (Ado-trastuzumab emtasine)	HER2/neu	Humanizado	Câncer de mama	Bristol	2015
Unituxin (Dinutuximab)	GD2	Quimérico	Neuroblastoma	United Therap	2015
Darzalex (Daratumumab)	CD38	Humano	Mieloma múltiplo	Janssen Biotech	2015
Empliciti (Elotuzumab)	SLAMF7	Humanizado	Mieloma múltiplo	Bristol	2015
Nucala (Mepolizumab)	IL-5	Humanizado	Asma	Glaxosmithkline	2015
Portrazza (Necitumumab)	EGFR	Humano	Câncer de pulmão	Eli Lilly e CO	2015
Praluent (Alirocumab)	PCSK9	Humano	Hipercolesteremia	Sanofi aventis	2015
Praxbind (Idarucizumab)	Inibidor de trombina	Humanizado	Hemorragias	Boehringer Ingelheim	2015
Repatha (Evolocumab)	PCSK9	Humano	Hipercolesteremia	Amgen	2015
Amjevita (Adalimumab-ATTO)	TNF- α	Humano	AR, doença de crohn	Amgen	2016
Anthim (Obiltoxaximab)	B.anthraxisPA	Humano	Profilaxia do antrax	Elusys Therapeutics inc	2016
Cqair (Reslizumab)	IL-5	Humanizado	Asma	TEVA Respiratory	2016

				LLC	
Anticorpo	Molécula Alvo	Tipo	Indicação	Empresa	Ano
Inflixtra (Infliximab-DYYB)	TNF	Quimérico	Doença de crohn	Celltrion	2016
Lartruvo (Olaratumab)	PDFR- α	Humano	Sarcoma tissular	Eli Lilly e CO	2016
Taltz (Ixekizumab)	IL-17 ^a	Humanizado	Psoríase	Eli Lilly e CO	2016
Tecentriq (Atezolizumab)	PD-L1	Humanizado	Carcinoma metastático urotelial	Genentech	2016
Zinbryta (Daclizumab)	IL-2	Humanizado	Esclerose múltipla	Biogen IDEC	2016
Zinplava (Bezlotoxumab)	Clostridium Difficile Toxin	Humano	Infecções por clostridium	Merck	2016
Bavencio (Avelumab)	PD-L1	Humano	Carcinoma metastático de Merkel	EMD Serono inc	2017
Cyltezo (Adalimumab-ADBIM)	TNF	Humano	Artrite reumatóide	Boehringer Ingelheim	2017
Dupixent (Dupilumab)	IL-4	Humano	Dermatite atopica	Regeneron pharmaceuticals	2017
Fasenra (Bentalizumab)	IL-5	Humanizado	Asma	Astrazeneca AB	2017
Imfinzi (Durvalumab)	PD-L1	Humano	Carcinoma metastático urotelial	Astrazeneca AB	2017
Hemlibra (Emicizumab)	Factor 1Xa	Humanizado	Hemofilia A	Genentech	2017
Ixifi (Infliximab-QBTX)	TNF	Quimérico	Doença de crohn	Pfizer	2017
Mvasi (Bevacizumab-awwb)	VEGF	Humanizado	Câncer metastático colorectal	Amgen	2017
Ocrevus (Ocrelizumab)	CD20	Humanizado	Esclerose múltipla	Genentech	2017
Ogivri (Trastuzumab-DKST)	HER2	Humanizado	Câncer de mama	Mylan GMBH	2017
Renflexis (Infliximab-abda)	TNF	Quimérico	Doença de Crohn	Sansung bioepsis	2017
Siliq (Brodalumab)	IL-7	Humano	Psoríase	Valeant Luxembourg	2017
Tremfya (Guselkumab)	IL-23	Humano	Psoríase	Janssen Biotech	2017
Crysvita (Burosumab-TWZA)	FGF23	Humano	XLH	Eli Lilly e CO	2018
Ilumya (Tildrakizumab-asmn)	IL-23	Humanizado	Psoríase	Merck	2018
Trogarzo (Ibalizumab)	CD4	Humanizado	HIV	Taimed Biologics	2018

Fonte: Adaptada de (REICHERT, 2012) (FDA n.d.)

O desenvolvimento da técnica de produção de anticorpos monoclonais propiciou aos pesquisadores Georges J. F. Kohler e César Milstein o Prêmio Nobel de Medicina de 1984. (1975) Desde então, a descoberta revolucionou a pesquisa biomédica, e viabilizou o desenvolvimento de novas tecnologias, consideradas hoje fundamentais para o diagnóstico médico. A formação de imunoglobulinas em resposta a um patógeno, ou a uma toxina resulta

na produção de moléculas de alta afinidade e especificidade. Sabendo disso, a produção dos anticorpos monoclonais, que são produzidos a partir de um único clone de linfócito B imortalizado, apresentando especificidade por um único tipo de molécula (antígeno), se faz necessária para o fomento da ciência (**figura 1**). (KÖHLER; MILSTEIN, 1976) A especificidade desses anticorpos monoclonais permite que ele reconheça e reaja com o antígeno mesmo que esse se encontre diluído em uma mistura complexa. (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001)

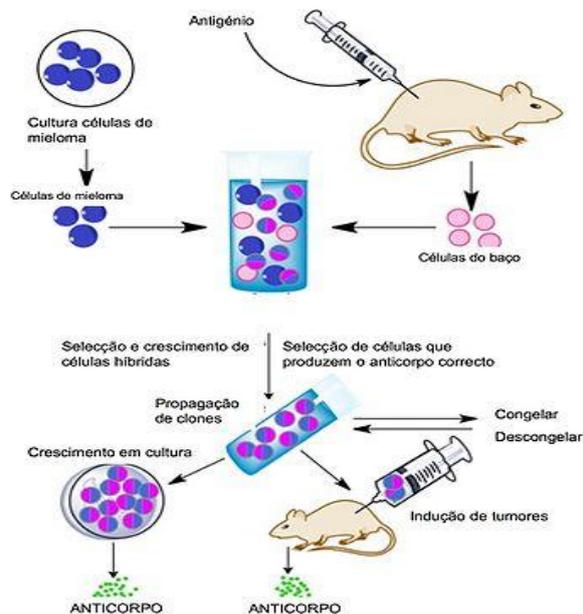


Figura 1. Método da produção do hibridoma. Temos o esquema da preparação do hibridoma, que secretam anticorpos monoclonais contra um antígeno alvo. O antígeno a que se quer produzir o anticorpo é inoculado no camundongo, então as células do baço são extraídas e fundidas com células de mieloma, após formação dos híbridos, eles são separados e seus clones propagados e assim a partir de um único clone se obtêm o anticorpo monoclonal. Fonte: Adaptado de (KOCH, 2010)

Kung *et al* demonstram em 1979 a geração do OKT3 (Ortho Kung T3) um mAb que identificou antígenos de células T (KUNG et al., 1979). Comercializado com nome Muromonab - CD3 (Orthoclone- OKT3 Johnson & Johnson), ele alcançou a fase clínica (JAFFERS et al., 1986), sendo o primeiro mAb murino utilizado em terapia com seres humanos. O OKT3 era indicado na inibição à rejeição em transplantados. Esta IgG2a murina específica para a cadeia épsilon do complexo CD3/TCR tratava rejeição do aloenxerto nos transplantes renais, hepáticos e cardíacos (KUHN; WEINER, 2016), seu sucesso proporcionou o desenvolvimento de outros anticorpos monoclonais, que vinham com grande

promessa para medicina (ZIEGELBAUER; LIGHT, 2008). Porém, o uso clínico do anticorpo monoclonal OKT3 foi descontinuado (JANSSEN-CILAG, 2010). Por se tratar de um anticorpo murino, um produto heterólogo, que causa o desenvolvimento de uma resposta imune no paciente, caracterizada pela presença de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*), além dos demais efeitos colaterais que o OKT3 apresentou como o da síndrome de tempestade de citocinas (KIMBALL et al., 1995) (KJERNIENSEN et al., 2004). Na **figura 2** observamos a ligação do mAbs OKT3 ao CD3.

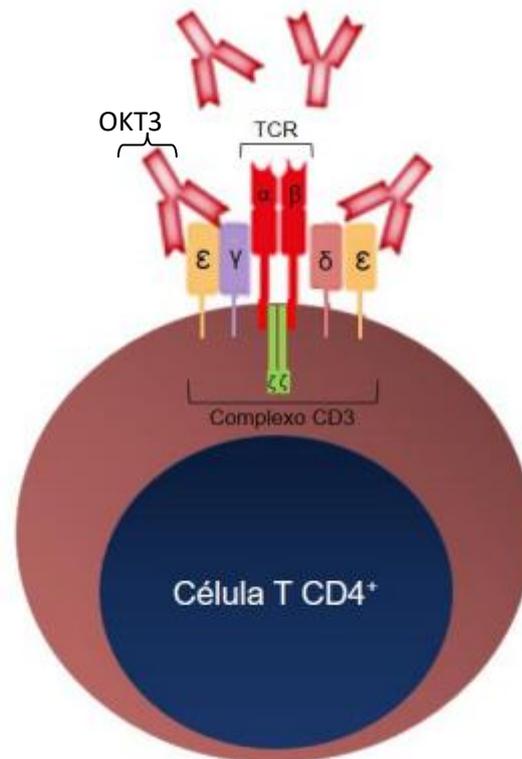


Figura 2. Sistema de ligação de um linfócito T. Esquema de ligação de uma célula T em que pode ser observado a ligação de um anti-CD3, Muromonab-CD3, ao CD3. Fonte: Adaptada de (SOUSA, 2015)

Modelos animais demonstraram que o anti-CD3, ao se ligar ao FcR (receptor do Fc), induz uma imunoregulação dos linfócitos T presentes no sangue periférico, que é capaz de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*). A sinalização celular também pode levar a um estado de anergia clonal. (CHATENOUD. BLUESTONE, 2007)

A partir de pesquisas feitas no laboratório de Imunologia Molecular da UNB foram traçadas estratégias inovadoras para a produção de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamíferos. Foram analisados os efeitos dos anticorpos anti-CD3 humanizados, versões FvFcs e anticorpo inteiro, observando a ligação dos anticorpos recombinantes à superfície dos linfócitos na molécula CD3 humana; todas as versões dos FvFcs anti-CD3 humanos foram capazes de competir pela molécula CD3 presente na superfície dos linfócitos T com o anticorpo OKT3 conjugado a FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) e induzir um perfil imunomodulador em PBMC (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) humano, marcado por uma indução de IL10 e uma baixa produção de IFN γ (SILVA 2009). Os anticorpos são também capazes de redirecionar a expressão gênica em células T humanas de forma comparável ao anticorpo OKT3 (I. G. SOUSA, 2015, 2017). A versão quimérica, HIL M, foi capaz de competir com o OKT3 conjugado a FITC, mostrando uma inibição de ligação de 41% (BEZERRA, 2014). Na **figura 3** observamos um esquema comparativo da molécula de IgG com fragmentos gerados pelas técnicas do DNA recombinante.

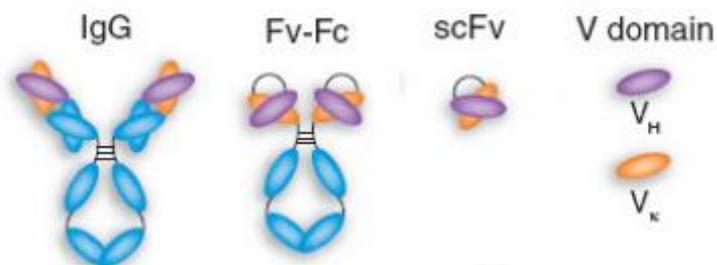


Figura 3. Representação de uma molécula de proteína em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. Na figura pode se observar o anticorpo do tipo IgG inteiro, o anticorpo somente com a região Fv-Fc, e o fragmento scFv. Fonte: Adaptada de (HOLLINGER; HUDSON, 2005)

1.2. Paratopo

O Paratopo é a região da porção variável do anticorpo onde se liga o epítipo. É normalmente formado por uma concavidade complementar ao epítipo formada por aminoácidos, estes, envolvidos diretamente no contato com o antígeno. O paratopo possui a superfície capaz de acomodar estruturas conformacionais distintas, permitindo a ligação dos

anticorpos às macromoléculas. (SYPEK et al., 2017) Essa interação se dá pela estrutura dos anticorpos que são formados por dois tipos de cadeias, as leves (L, do inglês *Light*) e as pesadas (H, do inglês *Heavy*); cada cadeia leve é ligada covalentemente por pontes dissulfeto a uma cadeia pesada e essa junção forma o anticorpo. Ambas as cadeias consistem em regiões variáveis (V, do inglês *Variable*), que reconhecem os epitopos, e regiões constantes (C, do inglês *Constants*) responsável pelas funções efetoras. A porção VL e CL associada ao VH e CH são chamados fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *Fragment antigen binding*) e os domínios constantes CH2 e CH3 formam a fração cristalizável (Fc do inglês, *Fragment crystallizable*), que interage com células e moléculas do sistema imune exercendo suas funções efetoras e mediando a maioria das funções biológicas de um anticorpo. (JANEWAY et al., 2001) Na **figura 4** pode-se observar as frações de um anticorpo do tipo IgG.

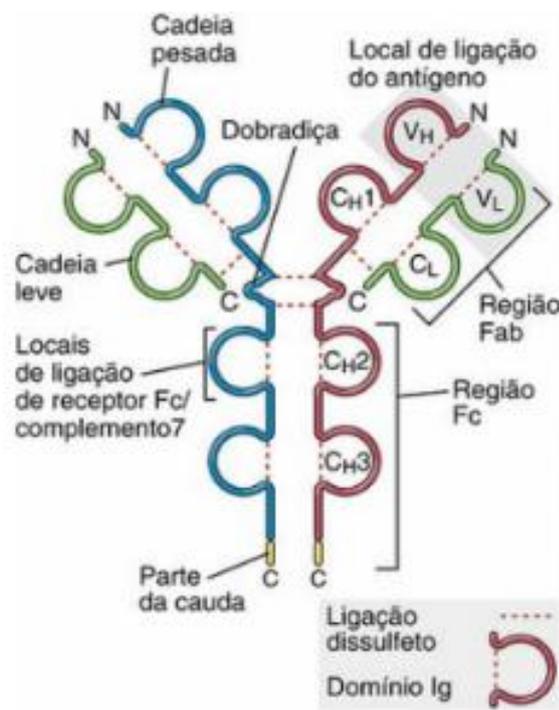


Figura 4. Molécula de IgG secretada. Esquema de um anticorpo IgG evidenciando as regiões de ligação ao antígeno e sua formação estrutural. Fonte: Adaptado de (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2012)

As imunoglobulinas possuem três regiões hipervariáveis (CDR1, CDR2 e CDR3), distribuídos, em regiões determinantes de complementaridade CDRs (do inglês, *Complementarity Determining Regions*), que com sua conformação tridimensional e variabilidade, se ligam a diversos antígenos. Essa estrutura propicia heterogeneidade das

imunoglobulinas em reconhecer antígenos e promove maior proteção contra patógenos mantendo o equilíbrio do sistema imune. (REGENMORTEL; HV, 2016)

1.3. Mimotopo

Antígeno é uma substância capaz de ativar uma resposta imunológica através de seu reconhecimento pelos anticorpos. A mínima sequência de aminoácidos necessária para a ligação de um anticorpo é chamada de epítipo, esses aminoácidos podem ter diversas estruturas conformacionais oriundas do dobramento dos peptídeos, assim uma proteína pode apresentar epítipos distintos e ser alvo de diferentes anticorpos específicos (ABBAS; PILLAI; LICHTMAN, 2012). Os peptídeos que são capazes de mimetizar epítipos de antígenos são chamados de mimotopos. Na **figura 5** pode-se observar uma representação gráfica da interação do antígeno com o anticorpo. (MALEK et al., 2016)

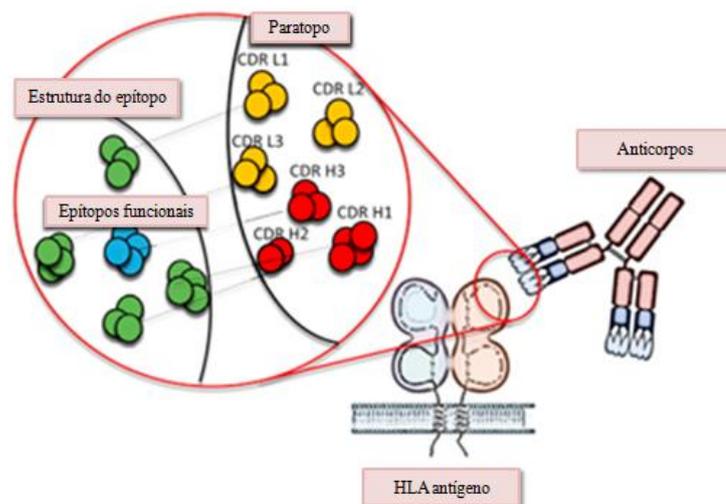


Figura 5. Interação antígeno-anticorpo. Demonstração da interação do antígeno com o anticorpo evidenciando a ligação do epítipo e do paratopo. Fonte: Adaptado de (SYPEK et al., 2017)

O mimotopo mimetiza a estrutura de um epítipo podendo competir pela ligação de um anticorpo específico com o antígeno original, são imunogênicos e induzem respostas ao ser reconhecido pelo anticorpo específico do epítipo a que se está mimetizando. (CUI et al., 2016) Esses mimotopos são geralmente isolados de bibliotecas randômicas de peptídeos cujas sequências de aminoácidos não necessariamente são idênticas ao epítipo que está

mimetizando, uma vez que a carga dos aminoácidos faz com que o anticorpo se ligue ao mimotopo. (REGENMORTELL; HV, 2016)

A produção *in vitro* dos mimotopos trouxeram a possibilidade de produzir vacinas, que desencadeiam respostas de anticorpos *in vivo*. A utilização de peptídeos em vacinas como imunógenos ativando o sistema imune vem sendo discutido em diversas doenças (ZHANG; et al., 2017). A **tabela 2** mostra mimotopos de patógenos isolados pela técnica de *biopanning* de exibição de fagos podendo ser composto para vacinas (AGHEBATI-MALEKI; et al., 2016).

Tabela 2. Bibliotecas de peptídeos combinatórios de fagos contra diferentes patógenos para identificação de mimotopos

Agente infeccioso	Tipo de patógeno
<i>Anaplasma marginale</i>	Bactéria
<i>Avibacterium paraglinarum</i>	Bactéria
<i>Brucella sp.</i>	Bactéria
<i>Entamoeba histolytica</i>	Protozoário
<i>Fasciola hepática</i>	Flatworm
Vírus da hepatite A (HAV)	Vírus
Vírus da hepatite B (VHB)	Vírus
Vírus da hepatite C (HCV)	Vírus
Vírus do herpes simples-2 (HSV-2)	Vírus
Vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1)	Vírus
<i>Ixodes scapularis</i>	Carraça
Vírus da encefalite japonesa	Vírus
<i>Leishmania infantum</i>	Protozoário
<i>Leishmania major</i>	Protozoário
<i>Leptospira interrogans</i>	Bactéria
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Bactéria
Vírus Niaph	Vírus
<i>Plasmodium Falcipaarum</i>	Protozoário
<i>Rhipicephalus microplus</i>	Carraça
<i>Schistosoma japonicum</i>	Flatworm

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bactéria
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Lombriga
<i>Taenia solium</i>	Tênia
<i>Toxoplasma gondii</i>	Protozoário
Coronavírus por gastroenterite transmissível (TGEV)	Vírus
<i>Trichinella spiralis</i>	Lombriga
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoário

Fonte: Adaptado de (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016) (SANTOS et al., 2012) (WANG et al., 2006) (MERTENS et al., 2001) (MELZER et al., 2002) (VILLA-MASCERA et al., 2008) (LERRALD et al., 2002) (ZHANG et al., 2001) (EL-ATTAR, L. M; PARTIDOS, C. D.; HOWARD, C.R. 2010) (GREBOWSKA et al., 2000) (CHEN, 2010) (SHCHERBAKOVA et al., 2016) (BECKER et al., 2015) (LIN, C. W; WU, S. C. 2004) (COSTA et al., 2004) (TOLEDO-MACHADO et al., 2015) (COSTA et al., 2015) (RHAJEM, R. B; HOVIMEL, M; 2016) (RAMASOOTA et al., 2005) (YANG et al., 2005) (ESHAGHI, M; TAN, W. S; YUSOFF, K. 2005) (ADDA et al., 1999) (PRUDENCIO et al., 2010) (TONG et al., 2004).

2. PHAGE DISPLAY

A produção de anticorpos apresentados em fagos foi desenvolvida por George P. Smith em 1985 e aprimorada independentemente por Breitling e Dübel, McCafferty et al (1992) e por Barbas (1993). A Tecnologia do *phage-display* tem muitas aplicações em biotecnologia, como a produção de anticorpos recombinantes, a produção de imunoterapêuticos, e isolamento de peptídeos, em todos os órgãos do corpo humano. Também é possível selecionar moléculas ligantes a paratopos específico, podendo identificar ligantes de receptores celulares, e mapear epitopos de anticorpos monoclonais e também selecionar substratos enzimáticos (CRISCUOLO et al., 2017). Assim proporcionando o avanço em diversas áreas da saúde: hematologia, doenças auto imunes, e neurológicas (SAEED; WANG; LING, 2017). Na **tabela 3** temos os anticorpos aprovados pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) utilizando a técnica de *phage display*.

O *Phage-display* quando comparado a técnica de hibridoma mostra ter um grande potencial, por ser uma técnica com condições controladas, com protocolos estabelecidos e confiáveis, e bibliotecas comerciais baseadas em genes de imunoglobulina humanos gerando anticorpos totalmente humanos. A técnica de hibridoma está normalmente relacionada à produção de anticorpos de camundongos desencadeando respostas de anticorpos humanos *anti-mouse* limitando assim seu uso terapêutico (SAEED, WANG; LING, 2017). A biblioteca,

que geralmente é ligada à proteína de superfície do fago (pIII) do tipo M13, e cada fago expressa um peptídeo ou proteína diferente. Essa biblioteca tem o potencial de apresentar peptídeos capazes de se ligar ao alvo escolhido imitando um dado epitopo. (FRENZEL et al., 2017)

Tabela 3. Anticorpos derivados de exibição de fagos aprovados pelo FDA ou EMA

Anticorpo	Tipo	Formato final do anticorpo
Humira (Adalimumab -D2E7)	Humanização por seleção guiada, scFv	IgG1c
Benlysta (Belimumab)	Naive, scFv	IgG1
Portrazza (Necitumumab-IMC-11F8)	Naive, Fab	IgG1
Cyramza (Ramucitumumab-IMC-1121B)	Naive, Fab	IgG1
Lucentis (Ranibizumab)	Maturação por afinidade do bevacizumab pela exibição de fagos	Fab
Raxibacumab	Naive, scFv	IgG1

Fonte: Adaptado de (FRENZEL et al., 2017)

2.1. Seleção de mimotopos por *phage display*

A técnica de *phage display* inicia com a sensibilização da placa com um antígeno ou anticorpo que serve como alvo de ligação para a biblioteca de peptídeos associadas ao fago, onde os fagos com maior afinidade se ligam e os demais são lavados, esses fagos ligados são eluídos e amplificados em bactérias servindo de *input* para o novo ciclo, assim após três a cinco ciclos, clones expressando peptídeos com maior afinidade ao alvo serão selecionados (**figura 6**). Os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA e ELISA para alcançar os detalhes estruturais e funcionais resultantes. (SAEED, WANG; LING, 2017)

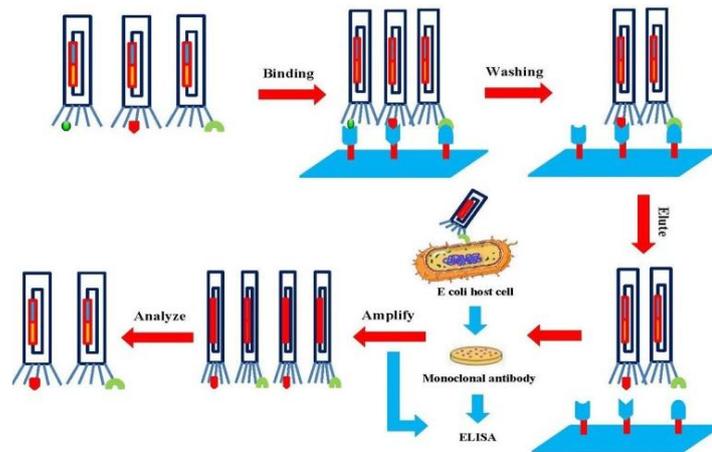


Figura 6. Esquematização da técnica do *biopanning*. A biblioteca de fago se liga ao alvo imobilizado na superfície, os fagos não ligados são lavados e os específicos são eluídos e amplificados, para obtenção de peptídeos afins. Fonte: Adaptado de (SAEED, WANG; LING, 2017)

Uma das desvantagens do *Phage display* são os fagos intrusos, que são observados na fase final do *biopanning*, esses fagos não específicos se ligam a outra região do anticorpo que não o paratopo e são chamados de peptídeos não relacionados com o alvo (TUPs, do inglês *Target-Unrelated Peptides*), que não foram eliminados nas lavagens. Para diminuir esse viés a tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) pode ser utilizada, comparando essas sequências com os bancos de dados, exemplos de programas para minimizar os TUPs são: o programa INFO da RELIC (S. MANDAVA et al., 2004), o *Biopanning Data Bank* (HE et al., 2016), o RANKPEP, nHLAPred, NetMHC também são exemplos de programas utilizados para previsão de epítopos ligante. (SAEED, WANG; LING, 2017) (ZADE et al., 2017).

2.2. Sequenciamento NGS

O sequenciamento de nova geração é comumente utilizado para sequências curtas entre 100 – 200 pb, mas já existem instrumentos capazes de fazer sequenciamento com sequências longas. Na **tabela 4** podem-se observar as tecnologias mais usadas em NGS. (ROUET et al., 2018)

Tabela 4. Plataformas de sequenciamento de NGS para análise de bibliotecas de exibição.

Plataforma	Comprimento de leitura	Max. Profundidade	Tipo de erro (porcentagem)
Illumina Miseq	300 pb	40 x 10 ⁶ reads	Substituições (~0.1)
Illumina Miseq 2500	250 pb	600 x 10 ⁶ reads	Substituições (~0.1)
Ion Torrent PMG	400pb	5,5 x 10 ⁶ reads	Indels (~0.1)
454 GS FLX	Até 1 kb	1 x 10 ⁶ reads	Indels (~0.1)
PacBio	250 pb - 40kb	0,4 x 10 ⁶ reads	Indels (~0.1)

Fonte: Adaptado de (ROUET et al., 2018) (RAUNET et al., 2010) (FANTINI et al., 2017) (HU et al., 2015) (LARMAN et al., 2012) (GLANVILLE et al., 2009) (MOUTEL et al., 2016) (PENG et al., 2017) (TILLER et al., 2013) (VOLLMERS et al., 2015).

3. COMPLEXO TCR-CD3

Os linfócitos T são células participantes da resposta imunológica adaptativa, seu amadurecimento ocorre no timo e se diferenciam em linfócitos T CD8 (citotóxicos) e os T CD4 (auxiliares). (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014). Os linfócitos T são responsáveis pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos que são apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC do inglês, *Antigen Presenting Cells*) para isso possuem receptores específicos de células T, os TCR (do inglês, *T cell receptor*) que interagem com moléculas do complexo de histocompatibilidade o MHC, em que o MHC de classe II auxilia no amadurecimento dos linfócitos CD4 e o MHC de classe I os linfócitos CD8. (WEISS; LITTMAN, 1994).

O TCR é formado pelas cadeias α e β que interagem com o CD3 (o CD3- γ , $-\delta$, $-\epsilon$ e $-\zeta$) formando o complexo TCR-CD3 que ativa a cascata de sinalização em resposta ao antígeno (AGUADO; MARTINEZ-FLORENSA; APARICIO, 2006). O CD3 é um receptor de membrana presente nos linfócitos T, composto de heterodímeros de ligação ao antígeno com caudas transmembrânicas que contém domínios ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) que são responsáveis pela ativação de cascatas de sinalizações e de múltiplas moléculas sendo um ponto crítico da regulação e especificidade na transdução de sinais. (NGOENKAM; SCHAMEL; PONGCHAROEN, 2017)

Na **figura 7** observamos o complexo TCR-CD3 e interações de ativação do linfócito T provocando sua proliferação a fim de combater o patógeno. Quando anticorpos específicos

para o CD3 se ligam ao complexo TCR-CD3 ocorre uma fosforilação parcial das cadeias ζ imunoregulando a resposta celular. (NGOENKAM; SCHAMEL; PONGCHAROEN, 2017)

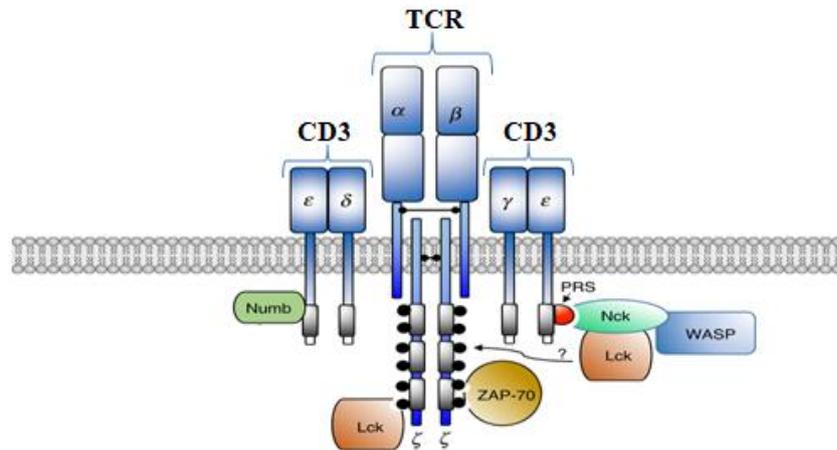


Figura 7. Proteínas de sinalização selecionadas no complexo TCR-CD3. O TCR é formado pelas subunidades α e β que se associa com a cadeia ζ , e com o complexo proteico CD3 que é formado pelas cadeias ϵ , γ e δ . Fonte: Adaptado de (NGOENKAM; SCHAMEL; PONGCHAROEN, 2017)

Esse processo é dinâmico e complexo, pois envolve a membrana celular, o citoesqueleto, a orientação e organização molecular na nanoestrutura da superfície celular e as interações moleculares de adesão e co-estimulação/inibição (DAVIS et al., 2003). Diversos modelos a fim de caracterizar o funcionamento da célula T com o foco nas interações do TCR com os co-receptores foram desenvolvidos nos últimos 20 anos, seus resultados continuam inconclusivos. (HUANG; MEYER; ZHU, 2012)

4. BIOFÁRMACOS ANTI-CD3.

O OKT3 foi o primeiro anti-CD3 aprovado para uso clínico, utilizado para inibir a rejeição no transplante de órgãos sólidos. Com a descontinuidade do OKT3 se viu a necessidade de desenvolver novos mAb anti-CD3 que minimizem os efeitos colaterais causado pelo OKT3. (KUHN; WEINER, 2016) Na **figura 8** observamos o desenvolvimento de novos anti-CD3.

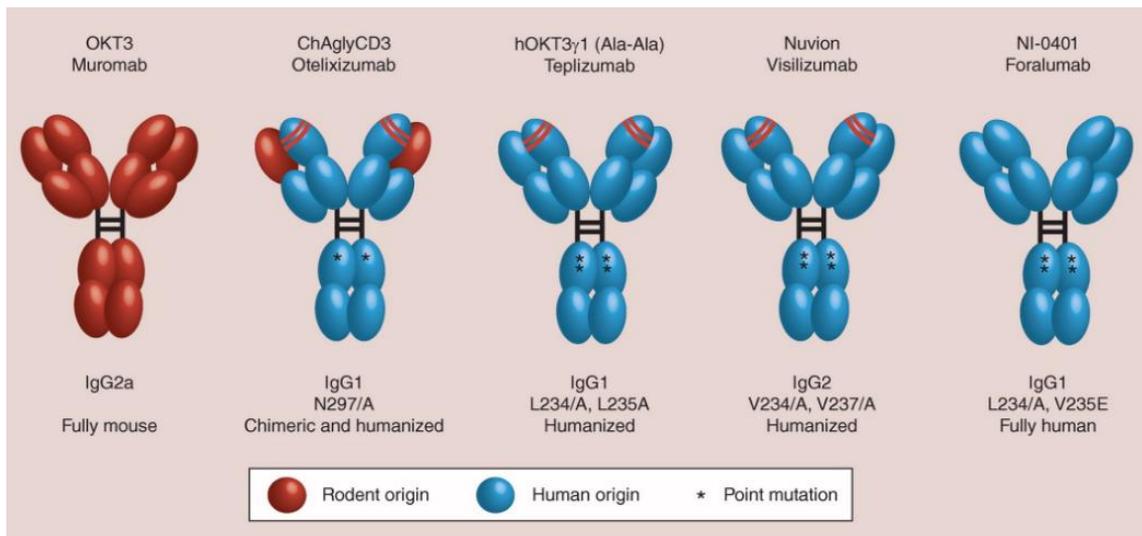


Figura 8. mAbs anti-CD3. Esquema da evolução da produção dos anticorpos monoclonais anti-CD3, em que se tem um mAbs totalmente murino, um quimérico, com porções murinas; os humanizados com a região de ligação murina, e um anticorpo anti-CD3 totalmente humano. Fonte: Adaptado de (KUHN; WEINER, 2016)

Com a melhor caracterização dos anti-CD3 e melhor aproveitamento da sua função reguladora nas doenças autoimunes diversas pesquisas com sua utilização estão em desenvolvimento. As pesquisas desenvolvidas no grupo da Chatenoud et al demonstraram remissão rápida, e duradoura da diabetes em camundongos; desde então a administração de anti-CD3 foi testada com sucesso em modelos animais com doenças autoimune, incluindo EAE (*Encefalomielite Autoimune Experimental*) (KOHM et al., 2005), colite (LUDVIKSSON; EHRHARDT; STROBER, 1997) e artrite reumatoide (HUGHES et al., 1994). Além da autoimunidade, o mAb anti-CD3 também melhorou o resultado da doença do enxerto contra o hospedeiro. (BLAZAR; JENKINS; TAYLOR, 1997) (CHATENOUD, 2003)

O anti-CD3 mais recente é o Foralumab que é totalmente humano, sendo o único com essa característica, até agora, possui modificações na região Fc que proporciona uma redução na ativação das células T, diminuição da tempestade de citocinas e também melhora a tolerabilidade, testes in vivo do foralumab com administração oral apresentaram baixa absorção não apresentando os resultados esperados de um anti-CD3. Assim novos ensaios com o Foralumab estão em andamento com a combinação com outras drogas (ILAN; SHAILUBHAI; SANYAL, 2018)

Não foi encontrado ainda uma dose terapêutica dos anti-CD3 que não ocasionasse efeitos adversos nos pacientes, logo faz necessária estratégias para produzir com sucesso as

propriedades imunorreguladoras dos mAbs anti-CD3 na clínica (DEAN; DÉPIS; VILBOIS, 2012). Para isso estudos e ensaios clínicos com mAbs anti-CD3 são importantes; pois, possuem um grande potencial para a indústria com o crescente uso de anticorpos humanizados aprovados pela FDA. (CHAN; CARTER, 2010) (KUHN; WEINER, 2016)

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O reconhecimento do antígeno pelo TCR e a associação do CD3 determina a resposta das células T. Logo se um anticorpo anti-CD3 se liga ao CD3 pode induzir a anergia ou supressão de linfócitos T, podendo por exemplo prolongar a sobrevivência de pacientes transplantados (NGOENKAM; SCHAMEL; PONGCHAROEN, 2017). Para um tratamento eficaz de imunossupressores faz-se necessário que seu uso seja contínuo, além dos diversos cuidados com a saúde após seu uso, pois o sistema imune fica debilitado. A utilização de um anticorpo específico, para imunossupressão de linfócitos T, diminui a amostragem das células depletadas por tais medicamentos. O anticorpo anti-CD3 fez parte de protocolos pós-transplante, sendo indicado para profilaxia, e se mostrando relevante na prevenção de rejeições em pacientes hipersensibilizados ou com risco imunológico (SCHROEDER et al., 1989).

Visto a importância do anti-CD3 como biofármaco em diversas doenças do sistema imunológico e em pacientes transplantados. Temos a necessidade de caracterizar melhor os anticorpos monoclonais produzidos no laboratório de imunologia da UnB, para isso foi proposto produzir um mimético de CD3 que se ligue com alta afinidade, de forma a facilitar a comparação entre os anticorpos. Com isso o objetivo dessa dissertação é a produção de peptídeos miméticos de CD3, que possam ser utilizados como substitutos sintéticos do antígeno biológico, por meio da seleção, sequenciamento e análise desses peptídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAL

5.1. Linhagem bacteriana

- **XL1-Blue (Stratagene®)** - recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F[']proAB lacIqZ M15Tn10 (TetR)] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

5.2. Primers usados no sequenciamento e na reação de PCR

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso total de 10 miliMolar por µL. A tabela mostra as sequências de cada um dos oligonucleotídeos, os dois primeiros *primers* foram utilizados para amplificação por PCR e os dois últimos para adicionar os adaptadores necessários para o sequenciamento.

Tabela 5 Primers utilizados

Primer	Sequência	Utilização
Gene3 C7C R	5' -ACT TTC AAC AGT TTC GGC CG-3'	Amplificação por PCR
Gene3 C7C F	5' -ATT CGC AAT TCC TTT AGT AC-3'	Amplificação por PCR
Gene3 C7C R com adaptadores	5' -GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GAC TTT CAA CAG TTT CGG CCG-3'	Amplificação por PCR
Gene3 C7C F com adaptadores	5' -TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG ATT CGC AAT TCC TTT AGT GGT AC-3'	Amplificação por PCR

5.3. Soluções do *phage display*

5.3.1. Tampão Bloqueio

0,1M de NaHCO₃ pH-8,6, 5mg/mL de BSA

5.3.2. Tampão de eluição

0,2M glicina pH-2,2

5.3.3. Tampão de neutralização

1M tris pH- 9,0

5.3.4. TBS

50mM Tris-HCL pH- 7,5 NaCl 150mM , para as lavagens foi adicionado mais 0,1% de Tween-20

5.3.5. PEG + NaCl

20% de polietileno-glicol-8000, 2,5M de NaCl

5.4. Meios de cultura

Todos meios de cultura e soluções foram produzidos com água destilada e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos a 1 ATM.

5.4.1. 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.

5.4.2. Meio LB ágar

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

5.4.3. Top ágar

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a 0,7%(p/v).

5.5. Antibióticos

5.5.1. Ampicilina

A ampicilina 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 µm. Após a filtração, ela foi estocada a 4°C e protegida da luz. Este antibiótico foi utilizado como marca de seleção para plasmídeos transformados em células de *E. coli*.

5.8. Soluções de uso em geral

5.8.1. Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v) Esta solução era utilizada para a conservação dos tampões TBS mais BSA e nos amplificadores do *phage* em concentração final de 0,02% (p/v).

5.8.2. Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

5.8.3. Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

5.8.4. Solução de Glicerol

Glicerol 10% (v/v)

5.8.5. Solução de IPTG/X-Gal

Misturar 1,25g de IPTG e 1g de Xgal em 25mL de DMF. Solução armazenada a -20°C e protegida da luz. Usada nas placas de titulação e placas de crescimento do plasmídeo com o inserto.

5.9. Enzimas

- Amp Taq Gold 1U/uL (biosystem)

5.10. Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

5.10.1. Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA pH 8,0- 0,02 M

dH₂O q.s.p. 1 L

5.10.2. Tampão de corrida TAE 50X

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA pH 8,0- 0,05 M

dH₂O q.s.p. 1 L

5.10.3. 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)

5.10.4. Solução de brometo de etídeo 20.000X

Brometo de etídeo 10 mg/mL

5.10.5. Marcador de massa molecular para DNA

1 Kb Plus ladder (Invitrogen)

5.10.6. Kits comerciais

Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen)

QIAquick PCR Purification (QIAGEN)

DNA Extraction From Agarose Gels (Millipore Ultrafree-DA)

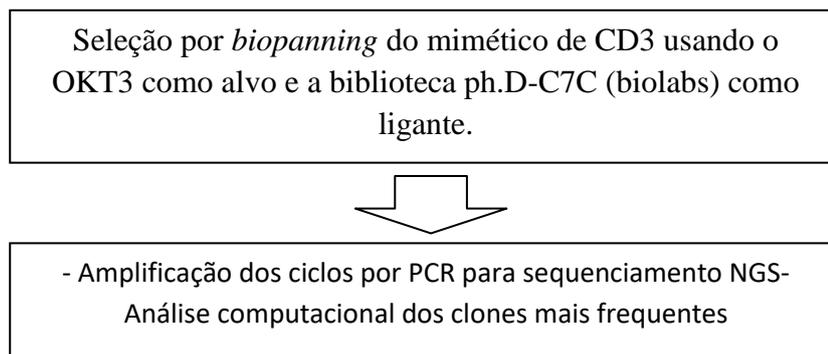
6. MÉTODOS**6.1. Desenho experimental**

Figura 10. Desenho experimental

6.2. Protocolo de seleção por *phage display*

6.2.1. Sensibilização

O anticorpo IgG2a foi adsorvido em um placa de micro titulação de 96 poços por uma hora na estufa a 37°C depois ficou mais uma hora com o tampão de bloqueio em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com TBS com 0,1% de *Tween-20*. Dois µL da biblioteca ph.D-C7C diluído em 200 µL de TBS foi adicionado aos poços por 2h na estufa 37°C. Concomitantemente outro poço foi sensibilizado com o OKT3 por 1h a 37°C, bloqueado e lavado como descrito anteriormente.

6.2.2. Seleção negativa

Após a incubação da biblioteca no poço sensibilizado com IgG2a, retiramos a biblioteca subtraída e transferimos para o poço previamente sensibilizado com o OKT3 por 2h a 37°C. A seleção negativa com IgG2a foi executada para remover fagos ligantes inespecíficos. Os fagos que não ligaram ao poço, (biblioteca subtraída) foram reservados.

Na placa com OKT3 o *panning* foi continuado separadamente do sensibilizado com o IgG2a. No primeiro ciclo de ambos os *panning* foram feitas 5 lavagens para retirada dos fagos não ligantes, todas feitas com TBS mais *Tween* fazendo 10 ressuspensão e esperando por 5 minutos de uma lavagem para outra.

6.2.3. Eluição

Para cada poço sensibilizado com OKT3, foi colocado 100 µL do tampão de eluição; após 10 minutos, o tampão de eluição foi retirado dos poços e colocados em um único tubo eppendorf contendo 6 µL do tampão de neutralização para cada poço utilizado. Nesse tubo teremos o eluído que chamamos de *output*.

6.2.4. Amplificação da biblioteca selecionada

100 µL do eluído foi adicionado a um erlemeyer de 125 ml contendo 20 ml de meio LB contendo células XL1-Blue crescidas na OD de 0,8 a 1. O frasco foi colocado no agitador a temperatura 37°C por 5h. Após essa amplificação em células, partiu-se para o processo de precipitação. As células infectadas com os fagos foram transferidas para um tubo falcon de 50 ml e centrifugadas a 5000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante é transferido para outro falcon de 50 ml e centrifuga novamente por mais 10 minutos a 7000rpm. Ao sobrenadante foi

adicionado um sexto do volume de solução de PEG/NaCl e deixado precipitando durante a noite a 4°C. No outro dia, centrifuga por 40 minutos a 6200g na temperatura de 4°C. Após esse procedimento, pode-se observar um borrão de fagos. Esse sedimento foi ressuspense em 1 ml de TBS contendo 1% de BSA e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C para retirada de qualquer resíduo insolúvel. Esse sobrenadante contém os fagos selecionados, e que serviu de *input* para o próximo ciclo de seleção.

6.2.5. Ciclos de seleção

O sobrenadante acima serviu como *input* de um novo ciclo de seleção. No segundo ciclo os fagos foram incubados por 2h, e o número de lavagens foi aumentado para 10 vezes. No terceiro ciclo foram feitas 15 lavagens após a incubação dos fagos. Assim obtivemos apenas os fagos melhores ligante e conseqüentemente os com maior afinidade ao anticorpo em questão. No caso da seleção do IgG2a que usamos como controle negativo não fazemos a seleção negativa, após a incubação da biblioteca fizemos as lavagens, sendo aumentado o número de lavagens em cada ciclo e a amplificação e a precipitação como descritas anteriormente.

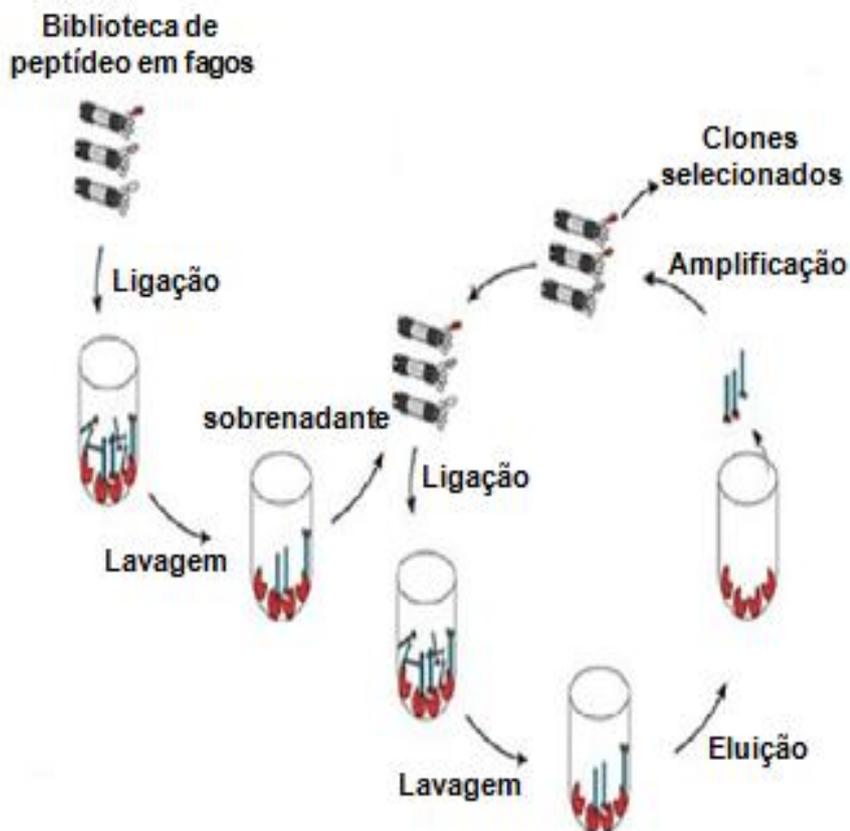


Figura 11. Esquematização do *biopanning* por seleção negativa. Em que se tem uma ligação ao controle negativo antes do início do *biopanning*, para que diminua os TUPs.

6.3. Titulação do *Phage Display*

A titulação dos ciclos foi feita por diluições seriadas do *output* (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e do *input* (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-10}). Foi adicionado 2 μL de cada diluição em 200 μL de célula crescida na OD 1 e plaqueadas com 3 ml de top ágar em placa com LB ágar/IPTG/Xgal tetraciclina colocadas na estufa 37°C durante a noite. Os halos de inibição formados pela infecção do fago foram contados e foi feito o cálculo (foi feita a média do *output* e *input* e encontrada a razão do *output* pelo *input*) do *output* sob o *input* para determinar o número de fagos perdidos para cada 1 fago selecionado.

6.4. Titulação e amplificação do *phage* por PCR

Foi feita uma diluição da biblioteca de fagos original e uma curva padrão por PCR, como um segundo critério de quantificação, observando a intensidade das bandas em relação às bandas do *output* e do *input* de cada ciclo.

DNA molde (obtido dos ciclos do *phage display*) 10 μL

Primer 5' 10 μM

Primer 3' 10 μM

Tampão de reação da enzima 10X

MgCl₂ 50mM

dNTPs 10mM de cada

Taq DNA polimerase 2U/ μL

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

1) 94°C 3 min

2) 25 ciclos:

94 °C 1 min

55°C 1 min

72°C 1 min

3) 72°C 5 min

4) 4°C infinito

6.5. Análise de DNA em gel de agarose (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A agarose era preparada numa concentração de 0,8 a 2,0% 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 (Life Technologies) com digitalização instantânea da imagem.

6.5.1. 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 por *Freeze Squeeze - DNA Extraction From Agarose Gels* (Millipore Ultrafree-DA):

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 -20° C, durante a noite.

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 do kit de Ultrafree DA

5 – O material era centrifugado por 10 minutos a 5.000g a temperatura ambiente conforme as informações do fabricante

6 – As quantificações das amostras de DNA foram realizadas no espectrofotômetro *Nanodrop One* (*Thermo Scientific*).

6.6. Células competentes 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 250 rpm durante a noite.

2- Era inoculado 500 µL 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 250 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 ressuspendido em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir eram adicionados mais 50 mL de glicerol 10% gelado.

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

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

6- O sedimento final era ressuspendido em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células eram aliquotadas, 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 (BioRad®) também já resfriada.

8- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 μ F e 200 Ω , no aparelho *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* 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 250 rpm, diluições da transformação eram semeadas em placas contendo ampicilina a 200 μ g/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C durante a noite.

6.7. Purificação de DNA

As amostras foram purificadas utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

As quantificações das amostras de DNA foram realizadas no espectrofotômetro *Nanodrop One (Thermo Scientific)*.

6.8. Sequenciamento por NGS

6.8.1. Preparo das amostras para sequenciamento e análise das sequências

As amostras purificadas foram aliquotadas seguindo as recomendações da empresa Macrogen (Seoul-Coreia), que realizou o sequenciamento utilizando a metodologia NGS. As amostras foram preparadas em duplicatas para manter a reprodutibilidade dos dados.

6.8.2. Análise das sequências

Os dados de sequenciamento foram analisados separadamente para cada amostra. Os arquivos FASTQ foram filtrados e cada sequência flanqueada por um sítio de KpnI e EagI foram armazenadas.

Para a análise de dados, as sequências foram traduzidas com o programa *transeq* (pacote EMBOSS) utilizando a opção *-frame +2*. Sequências correspondentes ao vetor m13 foram retiradas, obtendo apenas os peptídeo de 7 resíduos flanqueado por Cisteínas, característica dessa biblioteca. As sequências únicas foram identificadas utilizando o comando *sort e uniq -c*. Assim organizamos as amostras pela ordem alfabética e retiramos os peptídeos que não apresentaram cisteína nas extremidades também foram retirados os que apresentavam *stop códon* na região de interesse.

Com o auxílio do site da BDB (do inglês, *Biopanning data bank*) <http://immunet.cn/bdb/index.php/target/index> foi utilizada a ferramenta *TUPScan*, para retirada de peptídeos com motivos conhecidos que não se relacionam ao alvo, como peptídeos que interagem com a região FC do anticorpo, e o *TUPredict*, para retirada de peptídeos que se ligam a poliestireno e avaliar os peptídeos que possuem crescimento acelerado. (MANDAVA et al., 2004)

Para reduzir o efeito dos erros de amplificação e sequenciamento, foram mantidas apenas as sequências peptídicas que tiveram pelo menos quatro cópias por amostra. A análise da distribuição dos peptídeos foi realizada com a ferramenta presente na página WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). O WebLogo é um aplicativo capaz de criar uma representação gráfica de um alinhamento múltiplo de aminoácidos auxiliando na comparação da sua diversidade em cada posição. (CROOKS et al., 2004)

RESULTADOS

7. EXPERIMENTOS DE SELEÇÃO POR *PHAGE DISPLAY*

7.1. Titulação utilizando PCR

Foi feito o *phage display* com uma biblioteca comercial de fagos para selecionar epitopos que tem como alvo a anticorpo OKT3. Feita com uma seleção negativa, utilizado um anticorpo IgG2a como controle negativo.

A titulação por placa, por ser um método complexo e com diversos passos, não sendo possível realizar uma padronização dos títulos em todas as amostras. Optando assim por uma titulação por PCR, a titulação por PCR é feita por comparação da intensidade das bandas, com a utilização do marcador de massa o *Low mass*.

Com isso realizou-se uma curva padrão (**figura 12**) usando a biblioteca original amplificada por PCR, que foi utilizada para normalizar a quantidade de DNA. A biblioteca comercial tem um título de 10^{12} pfu/mL foram feitas diluições para obter títulos de 10^8 , 10^6 , 10^4 e 10^2 pfu/mL. Também foi feita a titulação por placa da biblioteca e foi encontrado os valores 10^3 (aproximadamente 5.200 colônias), 10^6 (aproximadamente 3.200 colônias), 10^8 (64 colônias), 10^9 (10 colônias) e 10^{10} (1 colônia).

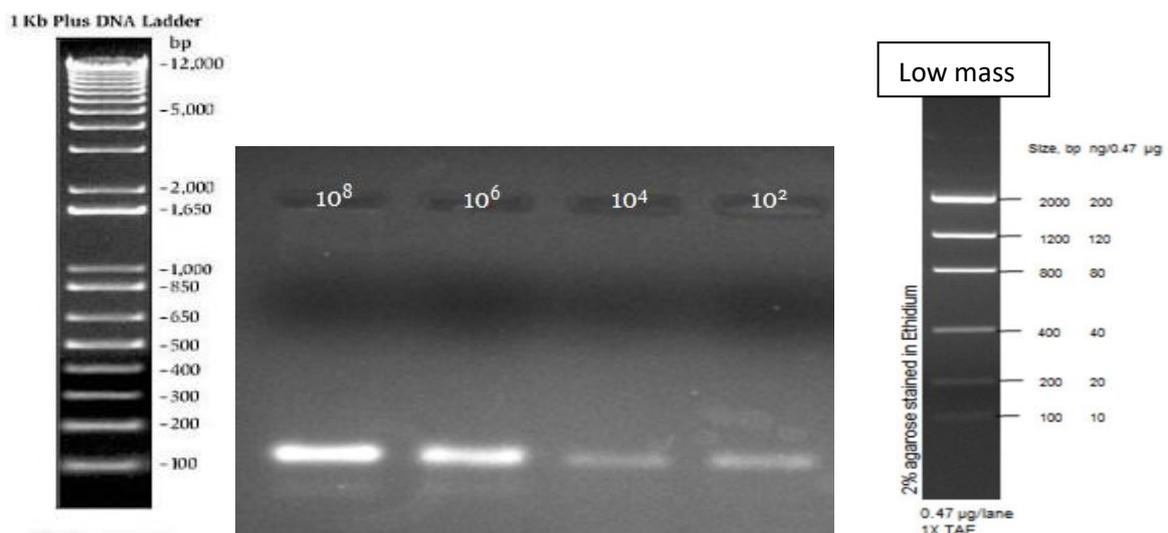


Figura 12. Diluição da biblioteca comercial. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen) e o marcador low DNA mass ladder (Thermo Fisher). A biblioteca original foi diluída (10^8 , 10^6 , 10^4 e 10^2 pfu/mL), e foi feito o PCR de cada diluição, assim o título de cada diluição pode ser usado como padrão para uma análise comparativa das bandas de cada ciclo de *biopanning*.

7.2. Experimento

Após realização de diversos experimentos para padronizar das amostras que seriam escolhidas para o sequenciamento foi determinado que a titulação relevante fosse a por PCR, e que todas as amostras teriam bandas em torno de 10^6 pfu/mL. Foi feita uma seleção negativa. Isso foi feito antes da realização dos ciclos do *phage display*, para reduzir os ligantes inespecíficos ao paratopo do OKT3. Nas **figuras 13 e 14** pode-se observar as bandas em gel de agarose da titulação feito por PCR das amostras IgG2a A e IgG2a B respectivamente.

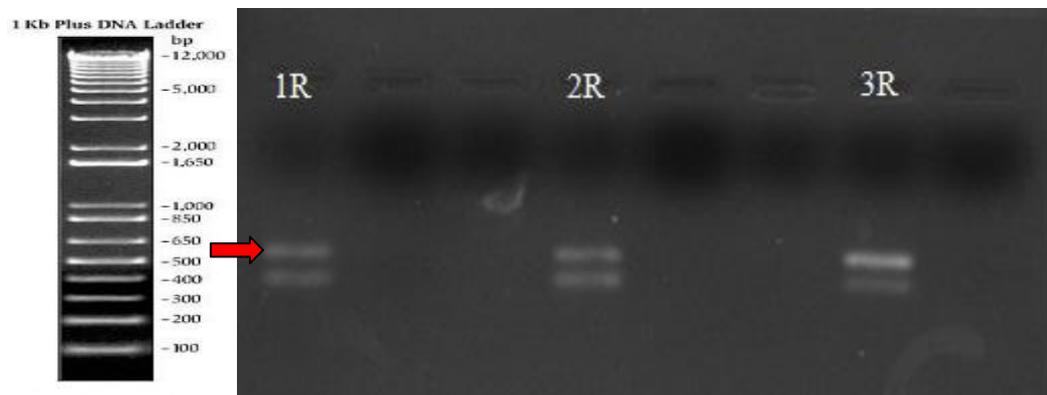


Figura 13. Titulação por PCR da IgG2a A. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen), em que o 1R- primeiro round; 2R- segundo round; 3R- terceiro round. As bandas que apareceram no gel de agarose possuem um tamanho aproximadamente de 100pb, marcada com a seta vermelha, o tamanho aproximado dos peptídeos das amostras.

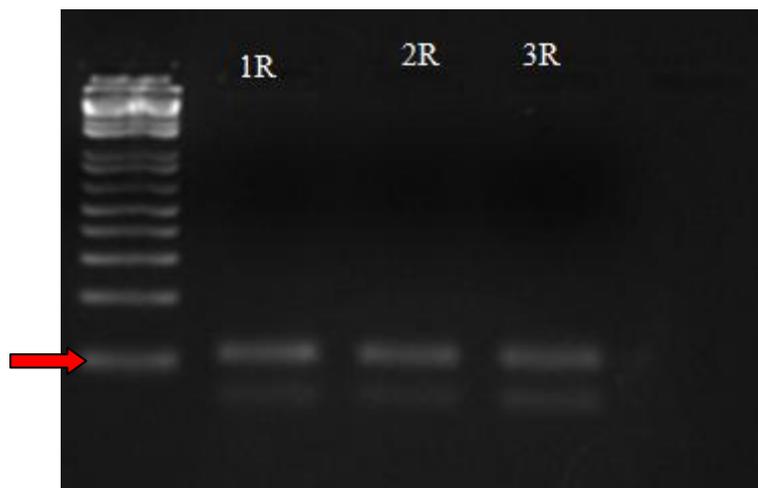


Figura 14. Titulação por PCR da IgG2a B. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen), em que o 1R- primeiro round; 2R- segundo round; 3R- terceiro round. As bandas que apareceram no gel de agarose possuem um tamanho aproximadamente de 100pb, demonstrado pela seta vermelha.

Nas **figuras 15 e 16** observam-se as bandas referentes às amostras de titulação por PCR do OKT3 A e B, que foram preparadas para o sequenciamento por NGS.

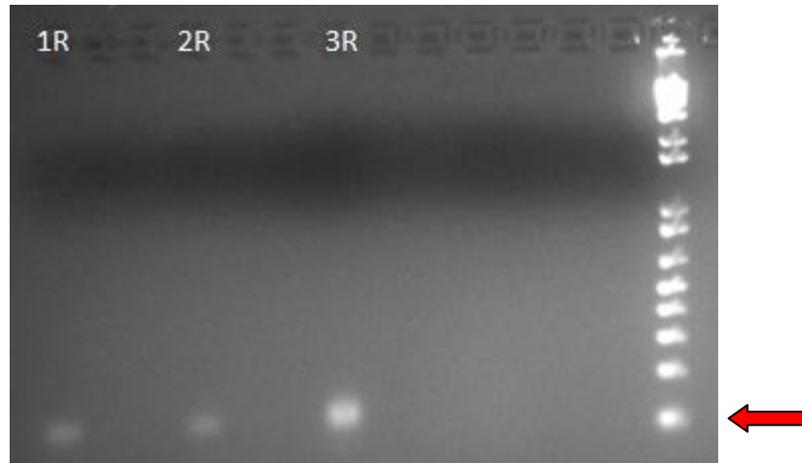


Figura 15. Titulação por PCR do OKT3 A. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen), em que o 1R- primeiro round; 2R- segundo round; 3R- terceiro round. As bandas que apareceram no gel de agarose possuem um tamanho aproximadamente de 100pb, demonstrado pela seta vermelha.

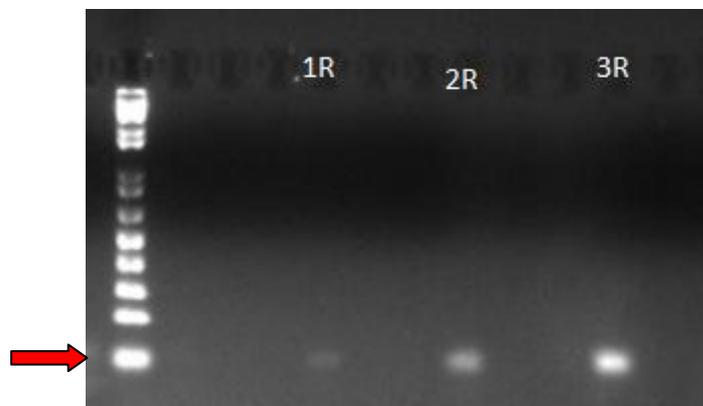


Figura 16. Titulação por PCR do OKT3 B. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen), em que o 1R- primeiro round; 2R- segundo round; 3R- terceiro round. As bandas que apareceram no gel de agarose possuem um tamanho aproximadamente de 100pb, demonstrado pela seta vermelha.

7.3. Preparação da amostra para o sequenciamento

O terceiro ciclo de cada amostra obtida no experimento anterior foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Para isso foi feita uma amplificação a fim de se obter maior quantidade de DNA (ng/ μ L), após a amplificação dessas amostras, elas foram eluídas e purificadas para obtenção de amostras livre de impurezas ocasionadas pelo PCR. Com as amostras preparadas foi feito mais um PCR, com o intuito de adicionar os adaptadores

necessários para a realização do sequenciamento. Na **figura 17** se observa as bandas em gel de agarose das amostras que foram enviadas para o sequenciamento NGS, com o marcador de tamanho o 1Kb *lader* e o marcador de massa o *low mass*.

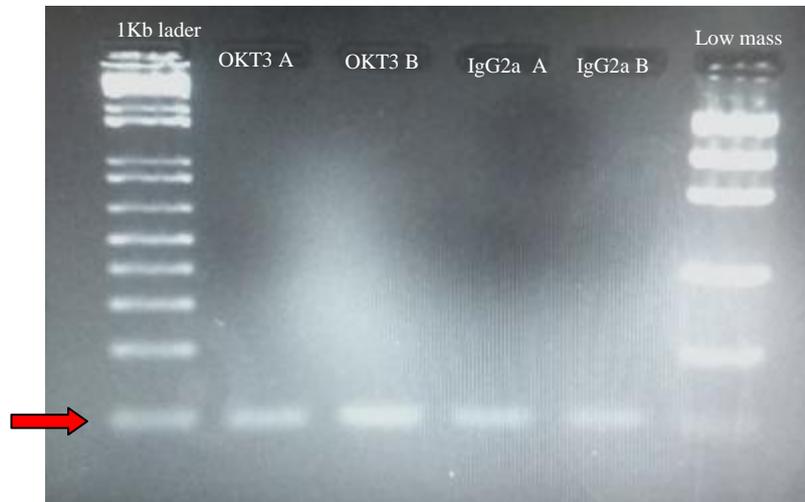


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose. Amplificação por PCR após eluição e purificação das bandas de cada amostra. Titulação de PCR em gel de agarose 2% com o marcador 1Kb plus DNA lader (invitrogen) e o marcador low DNA mass ladder (Thermo Fisher). As bandas que apareceram no gel de agarose possuem um tamanho aproximadamente de 100pb, demonstrado pela seta vermelha.

Na **tabela 6** se observa a concentração, aferida no *nanodrop*, e volume das amostras enviadas para sequenciamento.

Tabela 6. Detalhamento das amostras enviadas para sequenciamento

Amostras	Concentração (ng/ μ L)	Volume (μ L)
Bbl A	97,9	10
Bbl B	92,3	10
OKT3 A	101,6	10
OKT3 B	87,9	10
IgG2a A	95,9	10
IgG2a B	98,4	10

8. SEQUENCIAMENTO POR NGS

Para a realização do sequenciamento NGS as amostras foram enviadas para empresa Macrogen (Seul, Coreia do Sul), onde foram preparadas e sequenciadas utilizando a plataforma *Illumina Mi-Seq* tipo de leitura *paired-ended* com aproximadamente 150 bp. Na

tabela 7 pode se observar a qualidades das amostras e o total de leituras de cada amostra sequenciada.

Tabela 7. Detalhamento das amostras sequenciadas. Total de leituras, número total de sequências obtidas e o Q20 e Q30 (%), percentagem de bases que possuem escore de qualidade *phred* acima de 20 ou 30, respectivamente. Em que o IgG2a A e B são as amostras que tiveram como alvo o IgG2a; OkT3 A e B são as amostras que tiveram como alvo o anticorpo OKT3 e Bbl A e B são as amostras das bibliotecas usadas.

Amostras	Total de leituras	Q20 (%)	Q30(%)
IgG2a A	910.707	98.328	97.674
IgG2a B	1.009.884	98.416	97.741
OKT3 A	1.250.853	98.607	98.048
OKT3 B	1.037.899	98.450	97.847
Bbl A	2.924.602	96.991	95.539
Bbl B	3.200.638	96.773	95.200

8.1. Análise da diversidade dos peptídeos

Os dados das amostras sequenciadas podem ser vistos na **tabela 8**, em que temos o detalhamento de todas as amostras sequenciada, com a análise do total de sequências obtidas após o sequenciamento e o total de sequências únicas em que foi utilizado um software para tal análise, também foi feita a razão entre essas sequências a fim de destacar a seleção ocorrida nas amostras.

Tabela 8. Quantidade de sequências provenientes do sequenciamento. Comparação das sequências únicas dentre todas sequências obtidas do sequenciamento, delimitadas entre os sítios de *KpnI* e *EagI*.

Amostras	Sequências M13	Sequências únicas	Razão únicas/total
Bbl A	2010093	2009787	0,9998477682
Bbl B	1979784	1979180	0,9996949162
IgG2a A	889800	113392	0,1274353787
IgG2a B	988798	128790	0,1302490499
OKT3 A	1199155	139237	0,116112596
OKT3 B	1012854	143311	0,1414922585

As seqüências de DNA compreendidas entre os sítios de *KpnI* e *EagI* foram traduzidas gerando conjuntos de peptídeos. A diversidade dos peptídeos em cada posição foi feita utilizando o programa Weblogo disponível livremente na internet. Na **figura 18** observamos a diversidade de cada posição dos aminoácidos da biblioteca A, e na **figura 19** a diversidade da biblioteca B dos peptídeos que apresentaram quatro ou mais cópias da mesma seqüência.

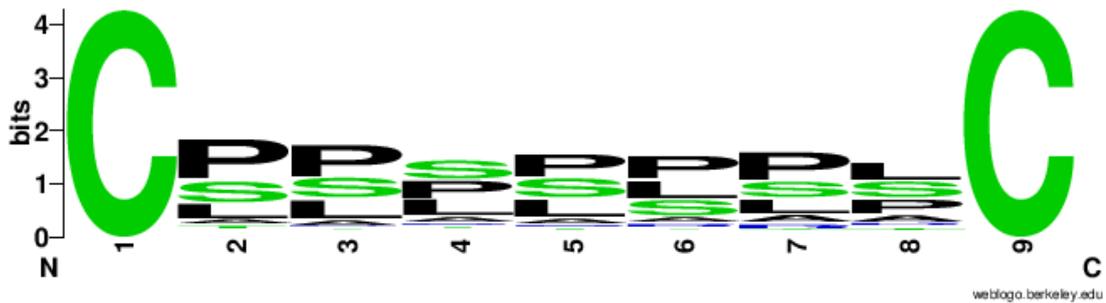


Figura 18. Diversidade da bbl A. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra bbl A que apresenta quatro ou mais cópias, sendo um total de 23.473 mil seqüências.

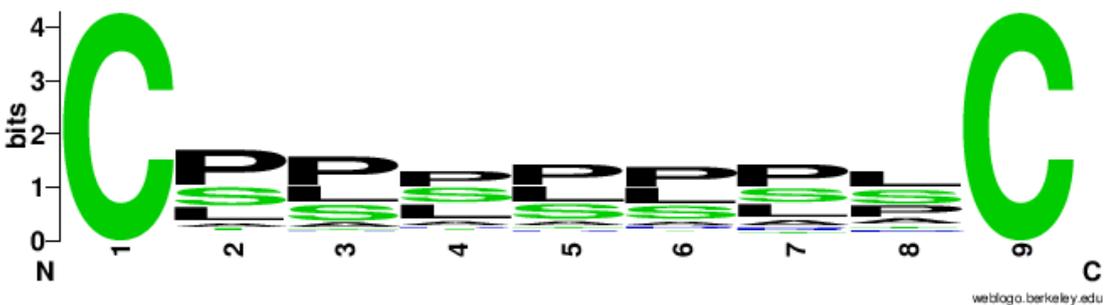


Figura 19. Diversidade da bbl B. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra bbl B com quatro ou mais cópias, sendo um total de 24.987 mil seqüências.

Ao colocar todas as seqüências com 3 cópias no programa Weblogo, o sistema não conseguiu processar os dados, devido ao alto número de seqüências únicas, assim essas seqüências foram divididas em duas vezes e analisadas, e assim foi obtidos dois gráficos para cada amostra. Na **figura 20** temos a diversidade dos peptídeos, da biblioteca A nos dois gráficos superiores, e da biblioteca B nos inferiores em que as seqüências apresentavam 3 cópias.

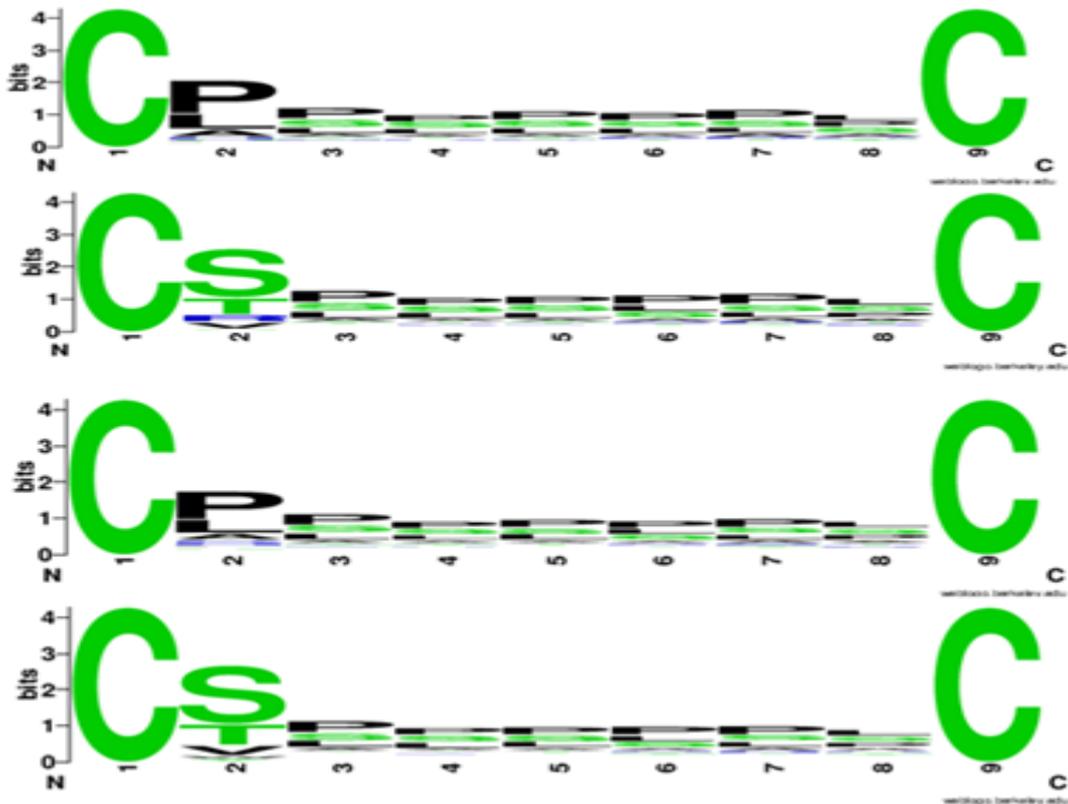


Figura 20. Diversidade das bibliotecas com 3 cópias. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra biblioteca A e B. Os dois gráficos superiores são referentes a biblioteca A, que possuem 37.316 mil seqüências únicas, e as duas de baixo são as seqüências da biblioteca B, com 43.129 seqüências com 3 cópias.

Conforme o número de cópias por seqüência foi diminuindo maior era o número de seqüências com cópias únicas, em decorrência deste alto número de seqüências a biblioteca A foi dividida em duas parte para análise pelo Weblogo. Assim na **figura 21** observamos a parte 1 da diversidade da biblioteca A que possuem apenas duas cópias de cada seqüência, e na **figura 22** ao lado esquerdo temos a diversidade da parte 2 da biblioteca A e ao lado direito a diversidade da biblioteca B, todas que apresentaram apenas duas cópias do peptídeo.

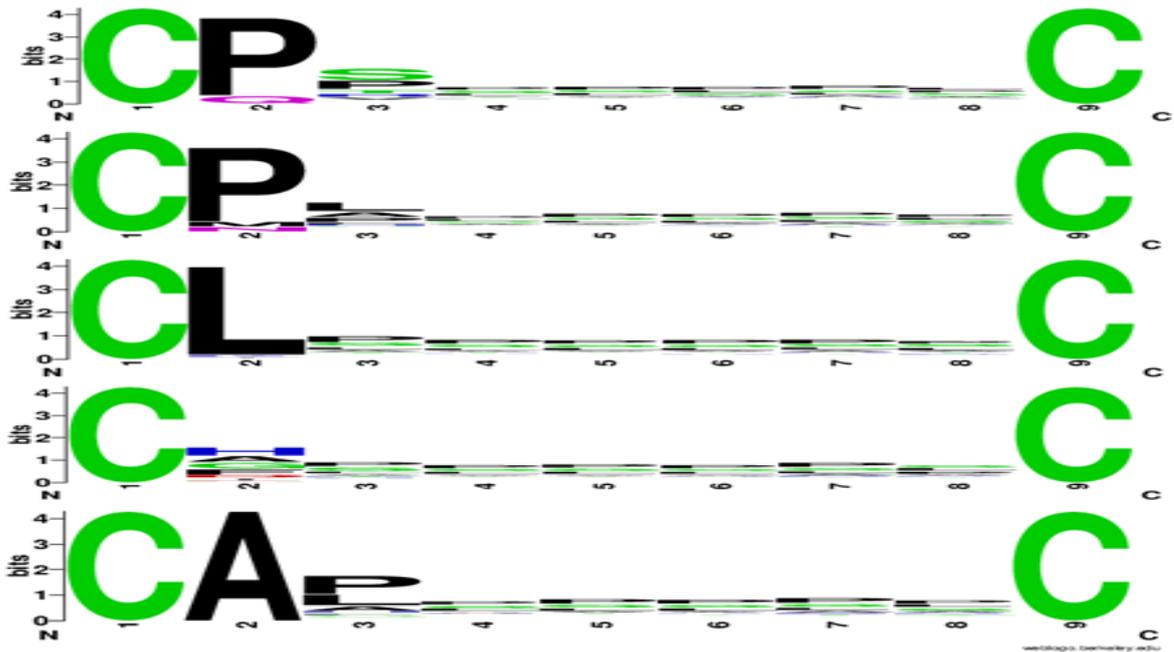


Figura 21. Diversidade da parte 1 da biblioteca A. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra biblioteca A. Os cinco gráficos são referentes as sequências da parte 1 da biblioteca A que possuem 2 cópias por sequência, a parte 1 da biblioteca A apresenta aproximadamente 109.194 mil sequências únicas

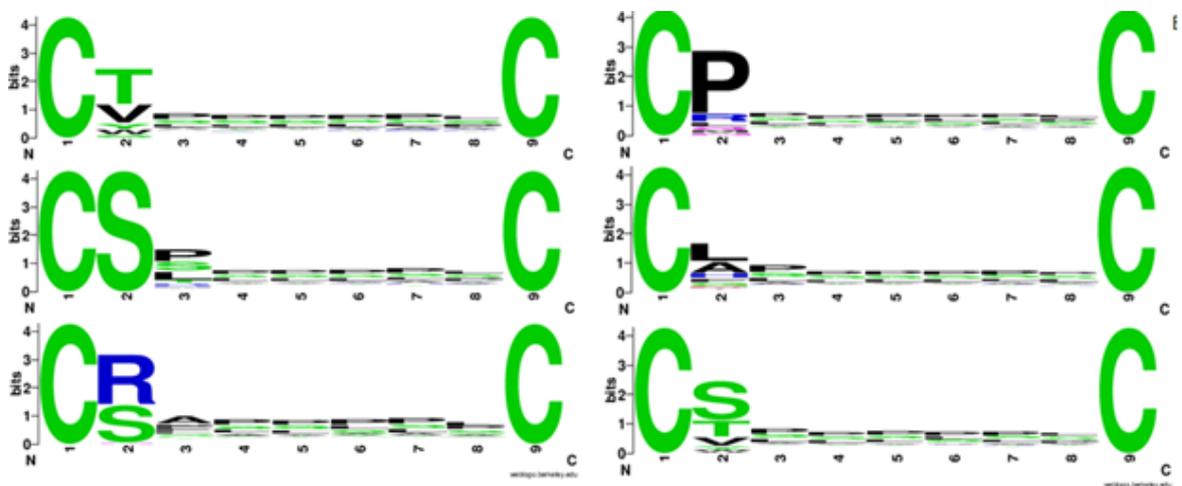


Figura 22. Diversidade da biblioteca com 2 cópias. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra. A diversidade das bibliotecas é representada pela soma de todos os gráficos, a esquerda pode se observar a parte 2 da biblioteca A que possui 61.280 mil sequências únicas com 2 cópias. Na direita observa-se a biblioteca B que se apresenta com 185.782 mil sequências

Para a análise das amostras do OKT3 e do IgG2a foram escolhidas as sequências com 4 ou mais cópias para se fazer a análise pela ferramenta Weblogo. Na **figura 23** observamos a diversidade dos aminoácidos do OKT3 A e na **figura 24** a diversidade do OKT3 B, na **figura 25** temos do IgG2a A e na **figura 26** do IgG2a B todas com sequências que se repetiam quatro ou mais vezes.

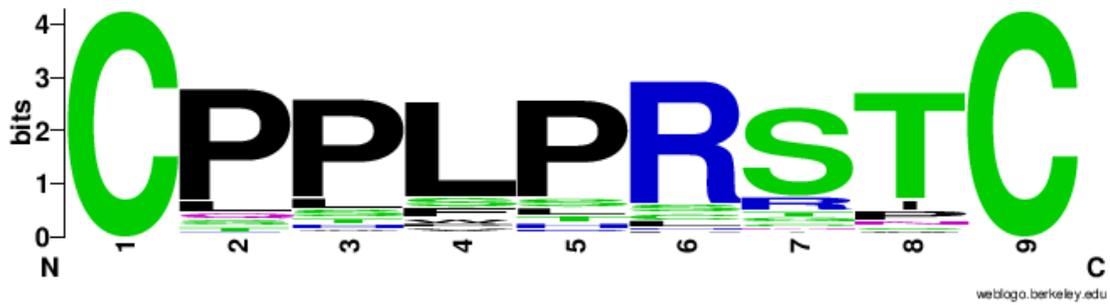


Figura 23. Diversidade do OKT3 A. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra OKT3 A, que possui 418 sequências com 4 ou mais cópias.

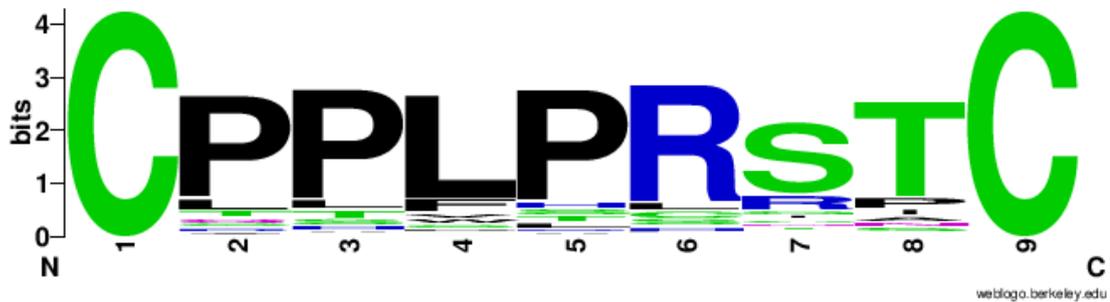


Figura 24. Diversidade do OKT3 B. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra OKT3 B, que possui 437 sequências com 4 ou mais cópias.

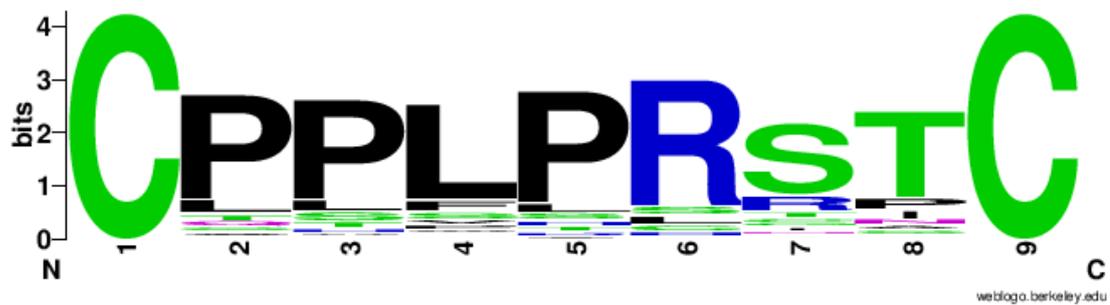


Figura 25. Diversidade do IgG2a A. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra IgG2a A, que apresentou 465 sequências com 4 ou mais cópias.

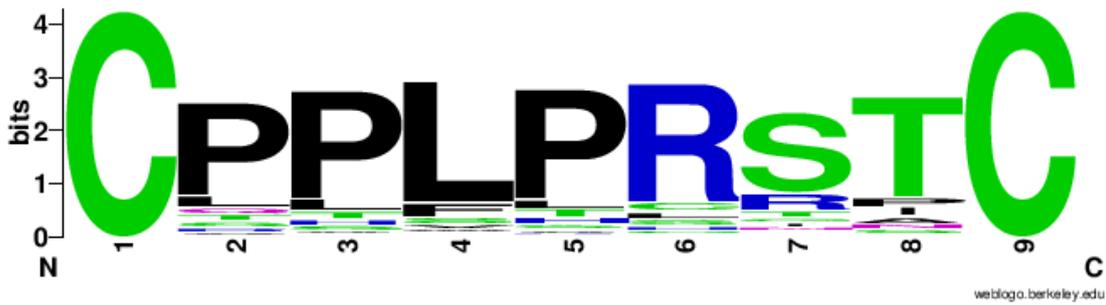


Figura 26. Diversidade da IgG2a B. Sequências analisadas no site WebLogo, em que demonstra a diversidade da amostra IgG2a B, que se apresenta com 452 seqüências com cópias superiores a 4.

O CPPLPRSTC, como observado, foi a seqüência que mais predominou em todas as amostras e nas bibliotecas com a presença de 1.140.250 cópias no OKT3 A, 954.749 no OKT3 B, 839.989 no IgG2a A, 933.663 no IgG2a B, 202 na biblioteca A e 16.599 na biblioteca B.

Para uma análise comparativa entre a amostra que tinham como alvo o OKT3 e as que tinham como alvo o IgG2a. Foi feita a média das amostras OKT3 A e B depois a média das amostras IgG2a A e B e feita à razão entre elas OKT3/IgG2a. Para isso foram excluídos os peptídeos não específicos, essa análise foi feita pelas ferramentas do site BDB. Na **tabela 9** se tem a representação da razão da média dos peptídeos OKT3/IgG2a.

Tabela 9. Tabela da razão entre o OKT3 e o IgG2a. Foi feita a média das amostras OKT3 A e OKT3 B e a média do IgG2a A e IgG2a B após isso foi feita a razão do OKT3 sob o IgG2a.

Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a
CPPLPRTIC		CPPLPRGTC	1,23	CPPLRRSPC	1,05	CPLLSRSTC	0,89	CQPLPSSTC	0,71
CPPLTRTTC		CPSLPRSTC	1,23	CPHLPRSTC	1,04	CPPLARRTC	0,86	CTPLPRSPC	0,71
CPTLPRSNC	2,62	CPPLPRITC	1,22	CPPLHRSTC	1,04	CPPLPRRIC	0,86	CSLLPRSTC	0,7
CPPLPCRTC	1,85	CSPLPRSTC	1,22	CPPLPGRTC	1,04	CLPLSRSTC	0,86	CPLSPRSTC	0,7
CQHLPRSTC	1,78	CPPLPRNTC	1,2	CRPLPRSTC	1,01	CPTLPRRTC	0,86	CAPLPRRTC	0,68
CPFFPLSTC	1,7	CPLLLRSTC	1,2	CPPLPSRTC	1,01	CLPLPRRTC	0,86	CPFFPRTTC	0,68
CPPLPRSKC	1,6	CPPLPRGPC	1,2	CPPPRSTC	1,01	CPPLRRSTC	0,85	CSPLPCSTC	0,67
CTTLPRSTC	1,6	CPPLPRSLC	1,19	CPPLPRSNC	1	CLTLPRSTC	0,84	CLPLHRSTC	0,66
CPFFPRSSC	1,5	CPPLPLCTC	1,18	CPALPRSPC	1	CPLVPRSTC	0,84	CPPLPLTTC	0,66
CPTLPRSPC	1,5	CPLLPRSPC	1,18	CPFFPRNTC	1	CSPLLRSTC	0,84	CLPLPSSTC	0,65
CPLLRSPC	1,5	CPPLPRLTC	1,16	CPPLSSNC	1	CPPLRRNC	0,82	CPHLPRSPC	0,65
CPLLRRRTC	1,46	CPPLPLSPC	1,16	CPRLPRSTC	0,98	CAPLPRSTC	0,81	CPPLTRSNC	0,64

Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a	Peptídeos	OKT/ IgG2a	Peptídeos	OKT3/ IgG2a
CPPLPRISC	1,44	CPPLPLSTC	1,15	CPPLPRSIC	0,97	CPPLPRRPC	0,81	CPPLPRSRC	0,63
CPLPCSTC	1,4	CPPLSRRTC	1,14	CPPLPRSSC	0,97	CPPFPRRTC	0,78	CPPLPRHTC	0,62
CPPLHRSNC	1,4	CPLFPRSTC	1,14	CPRLPRRTC	0,97	CPPLHSSTC	0,78	CLSLPRSTC	0,61
CPPLPRSMC	1,38	CPPLPRIPC	1,14	CPPLSSTC	0,96	CPPMPRRTC	0,77	CSPLPRSIC	0,59
CPPVPRSTC	1,35	CPPLPLSIC	1,13	CPPFPRSAC	0,96	CPPLPR TTC	0,77	CLPLPRITC	0,58
CPHLPRRTC	1,32	CPALPRSTC	1,13	CPPLPLRTC	0,96	CPPLLSSTC	0,76	CPPLPRRSC	0,58
CQPLRSNC	1,29	CPPWPRRTC	1,11	CPPLARSTC	0,95	CLPFPRSTC	0,76	CPLLRSTC	0,57
CPPLPHSTC	1,29	CPPLTRSTC	1,11	CPPLPHRTC	0,95	CQPLPRRTC	0,76	CSPFPRSTC	0,54
CPPLPRSTC	1,28	CPPFPRSTC	1,11	CQPLPRSTC	0,94	CLLLPRSTC	0,76	CPPLRSIC	0,5
CPSSPRSTC	1,27	CPPLPRRTC	1,1	CPLPRSIC	0,93	CPPLTRSIC	0,76	CPPLPRTPC	0,47
CPPLLCSTC	1,27	CPLLLRSTC	1,09	CLPLPCSTC	0,93	CTPLPRRTC	0,75	CPPLRSPC	0,45
CPPLPCSTC	1,25	CPPLPRSAC	1,09	CPPLTRRTC	0,92	CPPLPRRAC	0,74	CPTFPRSTC	0,45
CLPLPRSTC	1,25	CPPLRSPC	1,07	CTPLPRSTC	0,92	CPPLPRSHC	0,72	CLHLPRSTC	0,4
CPLLRSTC	1,25	CPFLPRSTC	1,07	CPPFPRSPC	0,91	CQPLRSPC	0,72	CPHLLRSTC	0,33
CPPLNRSTC	1,25	CPTLPRSTC	1,06	CPPLPRMTC	0,91	CPPLPRNPC	0,71		
CPPLHRRTC	1,23	CPLLRRTC	1,06						

Com uma das ferramentas do site da BDB foi possível a análise das sequências que estavam relacionadas ao crescimento rápido. Esta análise se faz necessária, pois um peptídeo que apresente característica que facilitem sua amplificação pode se apresentar com um alto número de cópias e este não ser necessariamente relacionado com o alvo. Mas isso não exclui que um peptídeo com rápido crescimento seja ligante do paratopo escolhido. Na **tabela 10** pode observar os peptídeos que não se apresentaram com essa característica, de crescimento rápido.

Tabela 10. Tabela de peptídeos não relacionados com crescimento rápido. Para essa análise foi excluído os peptídeos que se ligaram inespecificamente, para isso também foi usada ferramentas do site BDB.

OKT3 A	OKT3 B	IgG2a A	IgG2a B
CAPVPRSTC	CAPLPGSTC	CAPVPRRTC	CAPVPRSTC
CHSHRSTAC	CAPWPRSTC	CHSHRSTAC	CHSHRSTAC
CHSHRSTVC	CPHFPRSTC	CHSHRSTVC	CPALPRSIC
CPALPRSIC	CPPFHRSTC	CPALPRSIC	CPALRRSTC
CPALTRSTC	CPPFPHSTC	CPAVPRSTC	CPALTRSTC
CPASPRSTC	CPPFPRVTC	CPPCPRSTC	CPAVPRSTC
CPHLHRSTC	CPPLHPSTC	CPPFGRRTC	CPPFARRTC

OKT3 A	OKT3 B	IgG2a A	IgG2a B
CPPCPRSTC	CPPLYRSTC	CPPFPRGPC	CPPFPGRTC
CPPFARSTC	CPPVARSTC	CPPFPRGTC	CPPFPRGTC
CPPFPCSTC	CPPVSRSTC	CPPFPRITC	CPPFPRHTC
CPPFPGSTC	CPPWARSTC	CPPFPRMTC	CPPFPRITC
CPPFPRGTC	CPPWPGSTC	CPPFPRRSC	CPPFPRMTC
CPPFPRITC	CPPWPHSTC	CPPFPRSIC	CPPFPRSIC
CPPFPRSIC	CPPWSRSTC	CPPFPRSNC	CPPFPRSNC
CPPFPRSNC	CPSFPRSTC	CPPGPRSTC	CPPIPRRTC
CPPFRRSTC	CPSLHRSTC	CPPLHRGTC	CPPLHRGTC
CPPGPRSTC	CPSLRRSTC	CPPMPRSIC	CPPLHRSIC
CPPLARGTC	CPTLSRSTC	CPPQPRSTC	CPPVPLSTC
CPPLHRGTC	CRPWPRSTC	CPPVPGSTC	CPPVPRGTC
CPPVPLSTC	CSLLSRSTC	CPPVPLSTC	CPPVPRRTC
CPPVPRGTC	CTPLSRSTC	CPPVPRCTC	CPPVPRSIC
CPPVPRRTC		CPPVPRGTC	CPPVPRSNC
CPPVPRSAC		CPPVPRRTC	CPPVPRSTC
CPPVPRSIC		CPPVPRSAC	CPPVPR TTC
CPPVPRSPC		CPPVPRSIC	CPPWPRGTC
CPPVPRSTC		CPPVPRSNC	CPPWPRSNC
CPPVPR TTC		CPPVPRSPC	CQPFPRRTC
CPPVRRSTC		CPPVPRSTC	CQPFPRSTC
CPPVTRSTC		CPPVPR TTC	CQPLHRSTC
CPPWPRGTC		CPPWPRGTC	CQPMPRSTC
CPPWPRITC		CPPWPRITC	CQTLPRSTC
CPPWPRSNC		CPPWPRMTC	CTPVPRSTC
CPTLHRSTC		CPPWPRSNC	
CQPFPRSTC		CPRMPRSTC	
CQPLHRSTC		CPTLARSTC	
CQPLSRSTC		CQPFPRSTC	
CQPMPRSTC		CQPLHRSTC	
CQPWPRSTC		CQTLPRSTC	
CQTLPRSTC		CTPVPRSTC	
CTPVPRSTC			

DISCUSSÃO

A identificação de um mimético de CD3, que se ligue com alta afinidade a anticorpos monoclonais anti-CD3, como proposto neste trabalho, poderá facilitar a comparação entre diferentes anticorpos monoclonais anti-CD3 e servir como um padrão. Neste estudo foi utilizada a técnica de *phage display* para selecionar esses peptídeos. Para isso foi utilizada uma biblioteca de peptídeos randômicas construída de sete resíduos, pH.D.-C7C disponível comercialmente (Biolabs). O estudo de mimotopos está muito difundido no meio científico, com intuito de selecionar mimotopos miméticos, para produção de vacinas, tratamentos em respostas antitumorais, além de diversas disciplinas que vão da imunopatologia à produção de fármacos. (KIEBER-EMMONS et al., 2014) (MONZAVI-KARBASSI et al., 2006)

Pela dificuldade em se padronizar os resultados da titulação, que é o passo que valida os ciclos do *biopanning*, se fez necessária a realização de uma titulação alternativa feita pela comparação das bandas obtidas por PCR. Foi feita uma curva padrão com a biblioteca original amplificada por PCR, que foi utilizada para normalizar a quantidade de DNA. A biblioteca comercial tem um título de 10^{12} pfu/mL, foram feitas diluições para obter títulos de 10^8 , 10^6 , 10^4 e 10^2 pfu/mL. As sub-bibliotecas obtidas (*input* e *output* de cada ciclo) foram comparadas com as bandas da figura 12 e selecionadas as sub-bibliotecas do terceiro ciclo de cada amostra que obtinham um título em torno de 10^6 pfu/mL.

Foram feitas inúmeros experimentos a fim de escolher uma seleção com maior rendimento. Após vários testes e no sentido de padronizar as técnicas de titulação foram escolhidas as amostras que apresentassem na titulação por PCR bandas com intensidade aproximada de 10^6 pfu/mL, o rendimento dos ciclos pela titulação por placa, não foi usado por não ter encontrado uma padronização dos resultados. Assim nas figuras de 13 a 16 pode-se observar o título das amostras escolhidas para dar continuidade ao trabalho. Com uma análise comparativa com a figura 12, pode ser observado que as bandas das figuras 13 a 16 possuem intensidade maior, conforme os ciclos vão aumentando, demonstrando o enriquecimento das amostras.

Após a seleção com *phage display* foi realizado PCR, para acrescentar os adaptadores, necessários para realização do sequenciamento por NGS. Após a amplificação, as amostras foram eluídas, do gel de agarose, a fim de obter um DNA mais puro; o DNA eluído foi novamente amplificado, e por fim purificado. Na figura 17 podem ser observadas as bandas

que foram enviadas para o sequenciamento. A biblioteca comercial foi diluída, e a partir da diluição 10^8 foi feita amplificações também por PCR, para obtenção de DNA suficiente para sequenciamento por NGS, na tabela 6 está demonstrada a concentração (ng/ μ L) das amostras que foram enviadas para o sequenciamento.

A tabela 7 apresenta o total de leituras e os parâmetros de qualidade Q20 e Q30 das amostras sequenciadas em que representa a qualidade dos resultados obtidos. O Q20 (%) é a proporção de bases que possuem escore de qualidade *phred* acima de 20 (O escore de qualidade de *Phred* expressa numericamente à probabilidade de erro para cada base. Um maior número Q significa maior precisão. Por exemplo, se o *Phred* atribuir um índice de qualidade de 30 a uma base, as chances de ter erro de leitura de base é 1 em 1000. *Phred Quality Score Q* é calculado com $-10\log_{10}P$, onde P é a probabilidade de uma leitura de base errada). Assim com a porcentagem acima de 95% no Q30 quer dizer que foram obtidas amostras com pelo menos 95% das bases com qualidade igual ou maior que 30, ou seja, um qualidade muito boa.

Com a análise dos resultados provenientes do sequenciamento foi evidenciado que houve a seleção de peptídeos. Isso foi confirmado na tabela 8 que a razão entre as sequências únicas e as sequências totais se manteve próxima a um nas bibliotecas sugerindo uma grande variabilidade presente nesta biblioteca. Já nas bibliotecas selecionadas com OKT3 e do IgG2a o número de sequências únicas quando comparada as sequências totais das amostras sugere uma diminuição da diversidade de peptídeos evidenciando que houve seleção.

A análise relacionada à distribuição dos peptídeos no item 8.1 corrobora com os dados anteriores que demonstra que houve seleção, em que os gráficos das bibliotecas se apresentam com peptídeos mais randômicos que os das amostras do OKT3 e do IgG2a. Na figura 18 e 19, em que se tem a diversidade das replicatas das bibliotecas A e B respectivamente, com quatro ou mais cópias por sequência peptídica, observa-se a similaridade esperada entre as duas, e um padrão predominante, mas de certa forma variável. Conforme a diminuição das repetições das cópias da biblioteca há maior variabilidade, como pode ser visto nas figuras 20, 21, e 22, mesmo assim observamos a preponderância de alguns aminoácidos em todos os gráficos.

Apesar da variabilidade da biblioteca, foi observada uma predominância com um elevado número de cópias de um único peptídeo, o CPPLPRSTC. Além de ser o padrão de peptídeos que mais aparece como pode ser visto nas figuras 23 a 26 também teve maior número de cópias em todas as amostras incluindo nas bibliotecas. Consequentemente, talvez

por causa do viés na composição de aminoácidos presentes na biblioteca seja esse o padrão que mais se destacou. Tais sequências tendenciosas não necessariamente se ligam a região específica do OKT3, pois também aparecem no IgG2a. Não havendo grande diferença entre os aminoácidos dos dois grupos, sugerindo que esses peptídeos se liguem a sítios alternativos comum aos dois grupos. O objetivo proposto foi que houvesse ligação a um local específico, que seria o sítio de ligação do OKT3, e que não fizesse a ligação ao IgG2a, por ser usado como controle negativo.

Foi feita a razão da média das amostras do OKT3 pela média das amostras do IgG2a, para relacionar as amostras do OKT3 com a amostra do IgG2a. Porém o resultado não acrescentou muito, pois a razão apresentou números baixos, mostrando que a quantidade de sequências repetidas em ambas são similares, não diferenciando o peptídeo que liga ao OKT3 e que não liga ao controle negativo, o IgG2a. Na tabela 9 pode se observar a razão da média OKT3/IgG2a dos peptídeos que apareceram nas duas amostras de OKT3 e pelo menos uma amostra de IgG2a.

Ao analisar os peptídeos que não estão relacionados com crescimento rápido na tabela 10, foi observado que a sua maioria é de peptídeos que não aparecem em todas as amostras, contendo menos de 25 cópias por sequência. Apenas dois peptídeos não seguem o padrão CPPLPRSTC; o CHSHRSTAC que no OKT3 A e no IgG2a A possui 8 cópias e no IgG2a B 4 cópias; já no CHSHRRTVC aparecem apenas no OKT3 B e possui 4 cópias. Comparando esses peptídeos, percebemos similaridade entre eles. Também foi visto que eles possuem uma semelhança com um dos peptídeos que foi excluído por se ligar ao plástico, o CHSHRSTVC. Ao ampliar a análise para as demais sequências, foi observado que duas sequências que não possuem similaridade com o padrão (CLSPSSPPC e CLSPSSPRC) estão presentes entre os peptídeos, mas também possuem similaridade com outro peptídeo que foi excluído por ser ligante de plástico, o CLSPSSPQC.

O objetivo principal desse trabalho é encontrar uma sequência que mimetize o CD3, sabe-se que o OKT3, que foi usado para selecionar o mimotopo mimético, possui afinidade com a região épsilon do CD3. Com isso foi feita a comparação da sequência mais predominando nas amostras, o CPPLPRSTC, com a região épsilon do CD3 (1SY6:A) (KJERNIENSEN et al., 2004), não mostrou nenhuma similaridade estrutural. O que não elucidada se esses mimotopos realmente não são ligantes do OKT3, pois estudos demonstraram haver mimotopos distintos que se ligam com mesma eficiência ao mesmo alvo demonstrando que

moléculas sequencialmente e estruturalmente não relacionadas podem possuir o mesmo ligante. (HOFFMÜLLER et al., 2000) (KIEBER-EMMONS et al., 2014)

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O *phage display* é uma técnica inovadora que está ganhando grande espaço no mundo científico, sendo útil na produção de vacinas, com seleção de ligantes específicos, como os mimotopos. Estes com capacidade de imitar estruturas antigênicas, podendo competir pelo alvo específico.

A técnica de *phage display* utilizada neste trabalho proporcionou a seleção de peptídeos, mas conforme a análise demonstrada foi visto que esses peptídeos selecionados provavelmente não são ligantes do OKT3, pois os mesmos peptídeos foram encontrados nas seleções do controle negativo, o IgG2a. Supõe-se que a técnica não seja apropriada para o tipo de seleção proposto, e que o viés encontrado na biblioteca, que se demonstrou pouco variável e com alguns peptídeos de crescimento rápido, tenha interferido, evitando que a seleção do ligante do OKT3 fosse encontrada.

O enriquecimento de peptídeos específicos usando bibliotecas randômicas pode ser feito por uma seleção com concentrações menores do alvo, com a diminuição do tempo de incubação, etapas de lavagens mais longas, e menos ciclos de seleção para assim evitar os TUPs e as sequências com taxas de amplificação mais rápida contamine a seleção. Também é possível acrescentar ao processo de seleção uma etapa em que se utilize o IgG2a como competidor do alvo ao invés de apenas um etapa de seleção negativa, pode-se realizar a eluição dos fagos usando o antígeno, CD3, isso provavelmente reduzira os peptídeos intrusos. Com o progresso da técnica de exibição de fagos para seleção de mimotopos, surgirão novas estratégias de seleção que minimizem esses vieses.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 7.edição. Brasil: Elsevier, 2012.
- ADDA CG, TILLEY L, ANDERS RF, FOLEY M. **Isolation of peptides that mimic epitopes on a malarial antigen from random peptide libraries displayed on phage**. *Infect Immun*. 67(9):4679–88, 1999.
- AGUADO, E; MARTINEZ-FLORENSA, M.; APARICIO, P. **Activation of T lymphocytes and the role of the adapter LAT**. *Transplant immunology*, 23-26, 2006.
- BARBAS III, C. F. et al. **Phage Display**. A Laboratory Manual, 2001.
- BARBAS, C. F. **Recent advances in phage display**. *Current Opinion in Biotechnology*, 526-530, 1993.
- BEZERRA, M. A. G. *Estudo do perfil imunorregulatório de anticorpos*. Tese - UnB, Brasília, 2014.
- BECKER M, et al. **Application of M13 phage display for identifying immunogenic proteins from tick (*Ixodes scapularis*) saliva**. *BMC Biotechnol*. 15:43, 2015.
- BLAZAR, B. R, ENKINS, M. K.; TAYLOR, P. A. **Anti-CD3 epsilon F(ab')₂ fragments inhibit T cell expansion in vivo during graft-versus-host disease or the primary immune response to nominal antigen**. *Journal immunology*, 159(12), 5821-5833, 1997.
- CHAN, A. C; CARTER, P. J. **Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation**. *nature reviews immunology*, 10(5), 301-316, 2010.
- CHANG, J. T.; WHERRY, J.; ANANDA, W. G.. **Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation**. *Nature immunology*, 1104-1115, 2014.
- CHATENOUD, L. **CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside**. *Nat Rev Immunol*, 3:123-32, 2003.
- CHATENOUD; LUCIENNE; JEFFREY A BLUESTONE. **CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity**. *Nature Review Immunology*, 622-632, 2007.
- CHEN X, et al. **Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes**. *Nat Med*. 7(11):1225–31, 2001.
- CHISWELL, D. J.; MCCAFFERTY, J. **Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies?** *Trends Biotechnol*, 10(3):80-4, 1992.
- COSTA LE, et al. **Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications**. *Clin Vaccine Immunol*. 21(1):96–106, 2014.
- COSTA LE, et al. **Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection**. *Parasitology*. 142(10):1335–47, 2015.

- CRISCUOLO, E.; et al. **Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats**. Journal of immunology research, 2017.
- CROOKS, G. E.; HON, G.; JOHN-MARC, C.; STEVEN; BRENNER. **WebLogo: A Sequence Logo Generator**. Genome Research, 14(6): 1188–1190, 2004.
- CUI, Y.; et al. **Mimotope identification of dust mite allergen Der f 5 using phage displayed random peptide libraries**. Molecular medicine reports, 4816-48822, 2016.
- DARWICHE, W.; BRIGITTE G.; JEAN, P. **Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cell Normal Cellular Counterpart: Clues From a Functional Perspective**. Frontiers in Immunology, 9:683, 2018.
- DAVIS, M. M; et al. **Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition**. Annual Review of Biochemistry, 72:717-742, 2003.
- DEAN, Y.; DÉPIS, F.; KOSCO, V. **Combination therapies in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune diseases**. Swiss Medical Weekly, 142:13711, 2012.
- EL-ATTAR LM, PARTIDOS CD, HOWARD CR. **A peptide mimotope of hepatitis C virus E2 protein is immunogenic in mice and block human anti-HCV sera**. J Med Virol. 82(10):1655–65, 2010.
- ESHAGHI M, TAN WS, YUSOFF K. **Identification of epitopes in the nucleocapsid protein of Nipah virus using a linear phage-displayed random peptide library**. J Med Virol; 75(1):147–52, 2005.
- FANTINI M, et al. **Assessment of antibody library diversity through next generation sequencing and technical error compensation**. PLoS One, 2017.
- FDA. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process> - accessed 2018 26-maio.
- FRENZEL, A.; et al. **Designing Human Antibodies by Phage Display**. Transfusion Medicine and Hemotherapy, 44 (5): 312-318, 2017.
- GLASSMAN, P. M.; JOSEPH, P. BALTHASAR. **Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy**. Cancer Biology & Medicine, vol1, No 11, 2014
- GLANVILLE J, et al. **Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire**. Proc Natl Acad Sci U S A, 106:20216–21.10.1073, 2009.
- GRABOWSKA AM, et al. **Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2**. Virology. 269(1):47–53, 2000.
- HANSEL, T. T.; HARALD, K.; SINGER, T.; ANDREW, J. G. **The safety and side effects of monoclonal antibodies**. Nature Reviews Drug Discover, 325-38, 2010.
- HE, B, et al. **BDB: biopanning data banck**. Nucleic acids Res, 44(DI): D1127-D1132, 2016.

HOFFMÜLLER, U; et al. **Evolutionary transition pathways for changing peptide ligand specificity and structure.** The Embo Journal, 19(18): 4866–4874, 2000.

HOLLINGER, P.; HUDSON, P. J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** Nature Biotechnology, 1126-1142, 2005.

HU D. et al. **Effective optimization of antibody affinity by phage display integrated with high-throughput DNA synthesis and sequencing technologies.** PLoS One, 2015.

HUANG, J.; CHRISTINA, M.; ZHU, C. **T cell antigen recognition at the cell membrane.** Molecular Immunology , 52(3-4): 155-164, 2012.

HUGHES, C.; WOLOS, J. A.; GIANNINI, E. H.; HIRSCH, E. **Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody.** Journal immunology, 153(7), 3319-3325, 1994.

ILAN, Y. K; SHAILUBHAI, SANYAL, A. **Immunotherapy with oral administration of humanized anti-CD3 monoclonal antibody: A novel gut-immune system-based therapy for metaflammation and NASH.** Clinical & Experimental Immunology, 2018.

JAFFERS, G; et al. **Monoclonal antibody therapy.** Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression. Transplantation, 572-8, 1986.

JANEWAY, C. A; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology.** New York and London: London: Garland Publishing, 2001.

JANSSEN-CILAG .www.cochrane-renal.org/docs/Newsletter_October_2010.pdf. *cochrane-renal*. 04-01. (accessed 2018, 24-01)- 2010.

KIEBER-EMMONS, T; et al. **Carbohydrate-Mimetic Peptides for Pan Anti-Tumor Responses.** Frontiers in immunology, 5: 308, 2014.

KIMBALL, J. A; et al. **The OKT3 antibody response study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation.** Transplant immunology, 212-221, 1995.

KJER-NIELSEN, L.; et al. **Crystal structure of the human T cell receptor CD3(epsilon)(gamma) heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101 (20): 7675-7680, 2004.

KOCH, LIZANNE. http://www.google.com/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wiki/books/en/7/73/Monoclonal_antibodies_smaller.jpg&imgrefurl=http://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteínas/Sources_of_production_of_Monoclonal_antibody_&USG=__4j.2010_йил_21-abril. https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/File:Preparation_of_mAbs.jpg (accessed 24-janeiro)- 2014.

KÖHLER, G; MILSTEIN, C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** Nature, 256:495–7.10.1038/256495a0, 1975.

KÖHLER, G, MILSTEIN, C. **Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion.** European Journal of immunology, 1976.

KOHN, A. P.; et al. **Treatment with Nonmitogenic Anti-CD3 Monoclonal Antibody Induces CD4+ T Cell Unresponsiveness and Functional Reversal of Established Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** Journal Immunology, 174(8) 4525-4534, 2005.

KUHN, C.; WEINER, H. L. **Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside.** Future Medicine, 2016.

KUNG, P. C; et al. **Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens.** Science, 347-349, 1979.

LANE, D. P.; STEPHEN, C. W. **Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries.** Current opinion in immunology, 268-271, 1993.

LAPTOŠ, T.; OMERSEL, J. **The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies.** Experimental and therapeutic medicine, 15(4): 3161–3168, 2018.

LARMAN HB, XU GJ, PAVLOVA NN, ELLEDGE SJ. **Construction of a rationally designed antibody platform for sequencing-assisted selection.** Proc Natl Acad Sci U S A 109:18523–8.10.1073, 2012.

LARRALDE OG, et al. **Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity.** J Virol Methods. 140(1-2):49–58, 2007.

LIN CW, WU SC. **Identification of mimotopes of the Japanese encephalitis virus envelope protein using phage-displayed combinatorial peptide library.** J Mol Microbiol Biotechnol. 8(1):34–42, 2004.

LITTLE, M; et al. **Universal antibody libraries on phage and bacteria.** Year Immunol, 7: 50-5, 1993.

LUDVIKSSON, B. R; EHRHARDT, R. O.; STROBER, W. **TGF-beta production regulates the development of the 2,4,6-trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2-deficient mice.** journal immunology, 159(7), 3622–3628, 1997.

AGHEBATI-MALEKI, L; et al. **Phage display as a promising approach for vaccine development.** Journal of biomedical science, 23.1: 66, 2016.

MANDAVA, S; et al. **A bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites.** Proteomics, 4:1439-1460, 2004.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. **Anticorpos humanizados.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 38-43, 2001.

MARSHALL; MICHAEL, J. E. **Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going?.** Frontiers in immunology, 1245, 2017.

- MELZER H, et al., **Antigenicity and immunogenicity of phage library-selected peptide mimics of the major surface proteophosphoglycan antigens of *Entamoeba histolytica***. *Parasite Immunol.* 24(6):321–8, 2002.
- MERTENS P, et al., **Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Brucella***. *Int Rev Immunol.* 20(2):181–99, 2001.
- MONZAVI-KARBASSI; et al. **Evaluating strategies to enhance the anti-tumor immune response to a carbohydrate mimetic peptide vaccine**. *International journal of molecular medicine*, 17(6):1045-52, 2006.
- MOUTEL S; et al. **NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies**. *Elife* 5:e16228.10.7554, 2016.
- NANDAKUMAR, SELVA, K. **Targeting IgG in Arthritis: Disease Pathways and Therapeutic Avenues**. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.3: 677, 2018.
- NGOENKAM, et al. **Selected signalling proteins recruited to the T cell receptor-CD3 complex**. *Immunity*, 2017.
- PARMLEY; STEPHEN, F.; SMITH, G. **Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes**. *Gene*, 305-318, 1988.
- PATRONOV, A.; DOYTCHINOVA, I. **Mimotope identification of dust mite allergen Der f 5 using phage displayed random peptide libraries**. *Open biology*, 120-139, 2013.
- PENG H, et al. **Mining naive rabbit antibody repertoires by phage display for monoclonal antibodies of therapeutic utility**. *J Mol Biol* 429(19):2954–73.10.1016, 2017.
- PRUDENCIO CR, MARRA AO, CARDOSO R, GOULART LR. **Recombinant peptides as new immunogens for the control of the bovine tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. *Vet Parasitol.* 172(1-2):122–31, 2010.
- RAMASOOTA P, et al., **Epitope mapping of monoclonal antibodies specific to serovar of *Leptospira*, using phage display technique**. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 36(Suppl 4):206–12, 2005.
- RAVN U, GUENEAU et al. **By-passing in vitro screening – next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silico candidate selection**. *Nucleic Acids Res*, 38:e193.10.1093/nar/gkq789, 2010
- REGENMORTEL, V.; MARC H. V. **Structure-based reverse vaccinology failed in the case of HIV because it disregarded accepted immunological theory**. *International journal of molecular sciences*, 17.9: 1591, 2016.
- REICHERT, J M. **Marketed therapeutic antibodies compendium**. *mAbs*, v.4,n.3,p.413-415, 2012.
- RHAIEM RB, HOUIMEL M. **Targeting *Leishmania* major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library**. *Acta Trop.* 159:11–19, 2016.

- RIMER, J.; COHEN, I. R.; FRIEDMAN, N. **Do all creatures possess an acquired immune system of some sort?** *Bioessays*. 36(3):273-81, 2014.
- ROUET, R; et al. **Next-Generation Sequencing of Antibody Display Repertoires.** *Frontiers in Immunology*, 9: 118, 2018.
- SAEED, A. F. U. H; WANG, R.; LING, S. **Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future.** *Frontiers in Microbiology*, 8: 495, 2017.
- SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **molecular cloning.** A laboratory manual. 3a edição. Cold. Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SANTOS PS, et al. **Functional epitope core motif of the Anaplasma marginale major surface protein 1a and its incorporation onto bioelectrodes for antibody detection.** *PLoS One*. 7(3):e33045, 2012.
- SERPIERI, F. *Geração de linhagens de células CHO transfectadas com vetores para expressão de anticorpos monoclonais humanizados anti-determinantes leucocitários: anti-CD3 e anti-CD18.* Universidade de São Paulo - Tese de Doutorado - 2009.
- SHCHERBAKOVA NS, et al., **Artificial polyepitope HIV-1 immunogen containing mimotope of 2 F5 epitope.** *Protein Pept Lett.*;23(2):159–68, 2016.
- SILVA, H. M; et al. **Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly.** *Immunology Letters*, v. 125, n. 2, p. 129–136, 2009.
- SILVA, H. M. **Caracterização da atividade ligante e da função efetora de anticorpos humanizados Anti-CD3 humano,** 2008.
- SMITH, G. P. **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science*, 1315-1317, 1985.
- SMITH, G. P; PETRENKO, V. A. **Phage display.** *Chemical reviews*, 391-410, 1997.
- SOUSA, I G. **MicroRNA expression profiles in human CD3+ T cells following stimulation with anti-human CD3 antibodies.** *BMC Research Notes*, v.10, n. 1, p. 124, 2017.
- SOUSA, I G. *Perfil de expressão de microRNAs em células T CD3+ humanas após estimulação com anticorpos anti-CD3 humanos.* Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília- Tese (Doutorado), Brasília- 2015.
- SYPEK, M.; et al. **HLA Epitope Matching in Kidney Transplantation: An Overview for the General Nephrologist.** *American Journal of Kidney Diseases*, 2017.
- TANG LF; et al., **Schistosoma japonicum: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 36(3):206–10, 2004.
- TOLEDO-MACHADO CM, et al., **Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes.** *Parasit Vectors*. 8:133, 2015.

- TILLER T, et al. **A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties.** *MAbs* 5:445–70.10.4161, 2013.
- VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. **How regulatory T cells work.** *Nature Reviews Immunology*. *Nature Reviews immunology*, 523-532, 2008.
- VILLA-MANCERA A, et al., **Induction of immunity in sheep to Fasciola hepatica with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library.** *Parasitology*. 135(12):1437–45, 2008.
- VOLLMERS C, PENLAND L, KANBAR JN, QUAKE SR. **Novel exons and splice variants in the human antibody heavy chain identified by single cell and single molecule sequencing.** *PLoS One*, 10:e0117050.10.1371, 2015.
- WANG H, et al. **Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of Avibacterium paragallinarum from a phage display peptide library.** *Vet Microbiol*. 119(2-4):231–9, 2007.
- WANG, X.; et al. **IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions.** *Protein & Cell*, 1-11, 2017.
- WEISS, A.; LITTMAN, D. R. **Signal transduction by lymphocyte antigen receptors.** *Cell*, 263-274, 1994.
- WU, Z.; CHEUNG, N. V. **T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics.** *Pharmacology & therapeutics*, 2017.
- YANG WJ, et al., **Epitope mapping of Mycoplasma hyopneumoniae using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes.** *J Immunol Methods*. 5;304(1-2):15–29, 2005.
- ZADE, H. M.; et al. **Biased selection of propagation-related TUPs from phage display peptide libraries.** *Amino acids*, 1293-1308, 2017.
- ZHANG, Y. X.; et al. **A mimotope of A β oligomers may also behave as a β -sheet inhibitor.** *FEBS letters*, 591.21: 3615-3624, 2017.
- ZHANG WY, WAN Y, LI DG, TANG Y, ZHOU W. **A mimotope of pre-S2 region of surface antigen of viral hepatitis B screened by phage display.** *Cell Res*. 11(3):203–8, 2001.
- ZIEGELBAUER, K.; LIGHT, D. R. **Monoclonal antibody therapeutics: Leading companies to maximise sales and market share.** *Journal of Commercial Biotechnology*, 65-72, 2008.