



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

***Evolução in vitro de anticorpos anti-CD3  
pela seleção de cadeias leve (VL) humanas  
por phage display***

**Yuri Santos Oliveira**

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

Brasília – DF

Fevereiro de 2009

# **Evolução *in vitro* de anticorpos anti-CD3 pela seleção de cadeias leve (VL) humanas por phage display**

**Yuri Santos Oliveira**

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Dissertação apresentada ao  
Programa de pós-graduação em  
Biologia Molecular do Instituto de  
Ciências Biológicas da Universidade  
de Brasília como requisito parcial à  
obtenção do grau de mestre em  
Biologia Molecular.

Brasília - DF

Fevereiro de 2009

## **Banca examinadora**

Dr. Spartaco Astolfi Filho – UFAM (Titular – Membro externo)

Dra Maria Cristina Mattar – EMBRAPA-CENARGEN (Titular – Membro interno)

Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UnB (Presidente da Comissão Examinadora – UnB)

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

Dr. Ricardo Henrique Krüger – (Suplente)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação da Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão e co-orientação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

Este trabalho é dedicado a  
minha família, Edileuza, Jorge e  
Mariella, pelo apoio  
incondicional mesmo à distância.  
Amo vocês.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus por tudo que conquistei em minha vida, devo tudo a ELE, e pelas pessoas maravilhosas que me rodeiam em todas as horas.

Aos meus orientadores Andréa e Marcelo por terem me recebido com tanto respeito, e me dado todo apoio de caráter científico, pessoal e de mesa de bar, os quais tem sido de grande valia nesta jornada de aprendizado. Pela confiança depositada e pela paciência em me esperar escrever!! Por estarem sempre dispostos a me ajudar em todos os problemas que encontramos no decorrer deste projeto. Por terem me ensinado que tudo tem solução. Espero que os próximos 4 anos sejam tão animados e proveitosos quanto os 2 últimos! Foi muito bom encontrar vocês!! Enfim, por tudo. Muito obrigado. Adoro e admiro muito vocês!

À minha família, que vou tentar colocar inteira aqui, pois foi só com a ajuda de todos eles que cheguei até aqui, a meu pai, minha mãe, minha irmã, tia Nevinha, tia Deise, tio Dotor, tia Vera, tia Dalvinha, tio Ivanildo e tia Mércia, tia Ilza, tio Zé Antonio, Pedro e minha querida prima Simone, tia Ângela tio Vila e tia Helena (mesmo de longe me ajudaram bastante) e em especial a minha avó. E claro em especial aos meus primos Rodrigo (você é demais!), Ivan, Edy e Sabrina, Hugo (Lapão!!) e Carol, Mauricinho e Janine, Bruno (meu querido!!) e Paula, Monyk, Marcelly, Teo, Maíra, Daniel, Danielle e todas as outras pessoas que contribuíram de alguma forma com esta longa jornada que comecei em 2005 ao vir morar em Brasília. Sou também muito grato a toda ajuda que recebi dos amigos que fiz aqui nesta cidade, mesmo se dizendo que os brasilienses são pessoas frias isto não ocorreu comigo, fiz muitos amigos aqui, alguns deles são, Aline e Henrique, Lílíam e Aloísio, tio Gentil e tia Sueli (gosto muito de vocês, obrigado por tudo), Milena e Artur, Alex e Dani, Álvaro, ao meu grande amigo Léo (parceiro de tênis), Heidi, a toda turma da biologia da Aline (Guilherme, Felipão, Vinícius, Natália, Isabela...) por todas as festas suas que fui. Ao Helder, Silvan, Alex (biologia) e Taís, Caio.

Agradeço em especial ao Prof. César Martins de Sá, à Profa Beatriz Dolabella, e a minha amiga Lílíam por terem me recebido muito bem no laboratório LaBioGene onde iniciei meus primeiros passos na biologia molecular. Especialmente à Profa Cynthia Maria Kyaw por ter sido sempre solícita em me ajudar e ensinar.

À Fernanda minha amiga em especial que entrou junto comigo no mestrado e desde então construímos uma bela amizade que parecia já existir antes mesmo de nos conhecermos.

À Maryani (minha melhor amiga de mentirinha!! Rsrtrs) pelas brigas e discussões muitas vezes proveitosas e que movimentam o lab 1 (sem nós seria muito monótono não acha?) e pela ajuda sempre que precisei.

Ao meu amigo Léo pelas histórias sempre muito engraçadas, pelas farras, e pela figura que é.

Ao Victor (“as uvas”) rtrs por estar 99% dos dias de bom humor, espero que essa fase tempestuosa passe logo.

Ao Rafael sempre muito solícito em ajudar em especial na manutenção dos pipetadores (se não fôssemos nós...!!), e pelos conselhos muito úteis sobre proteína.

À Kelly (ximi) por, mesmo involuntariamente, inibir as palavras de baixo calão que são tão danosas ao perfeito equilíbrio do ambiente de trabalho (rsrtrsrsrtrsrsr!!!).

Ao Hernandez que sempre me ajudou no que precisei, faz muita falta sua companhia.

À Flávia, sempre prestativa, alegre e por adorar limpar minha bancada, muito obrigado(rsrtrs).

À Mariana e ao Alex (grandes amigos) pelas reuniões sempre bastante tranquilas para jogar WAR, pelo apoio e amizade.

À Carol que me ensinou a transformar por eletroporação.

Ao Marciano (que é de todos os labs na prática) pela ajuda e amizade desde que cheguei em bsb praticamente.

À Luana e Isabela pela amizade e ajuda “via telefone” sempre que precisei.

E a todos os amigos do Lab 1 Janaína, Paulo, Taíssa, Izabel e Diogo (obrigado pelas minipreps às pressas), que foram de grande ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos demais professores do laboratório: Ildinete, Márcio, Élide, Sueli e Fernando e Lídia por estarem sempre dispostos a ajudar nos questionamentos. Aos professores e alunos da Enzimologia muito prestativos e solícitos em dividir seu espaço. Ao pessoal do sequenciamento automático (Marcus e Camila) pela grande ajuda e compreensão dos meus prazos, muito obrigado. Aos demais colegas do laboratório, que continuam e já não estão

mais lá, Túlio, Thiago, Lorena, Davi, Tiago, Hugo, Saulo, Juliana, Andrelisse, Vivis, Rose e Janice por também sempre se mostrarem dispostas a ajudar quando fosse preciso.

À Dona Fátima e Dona Ivanilde pela paciência e prontidão. À Ana da secretaria pela atenção e dedicação.

À família da minha linda, que me recebeu de braços abertos como se já fizesse parte dela desde que me conheceram, e praticamente mobiliaram minha casa (muito obrigado por tudo), Danilo, tia Denise e Léo, dona Valda, em especial à minha sogra Dulcinéia pela amizade e apoio em todas as horas (gosto muito de todos vocês!!) e ao meu sogro Willam uma pessoa muito agradável.

E é claro, ao grande amor da minha vida, minha Linda Bárbara, futura esposa, a mulher que escolhi para passar o resto da vida ao meu lado, que foi fundamental na conclusão deste trabalho em todos os aspectos. Acho que nunca conseguirei retribuir tudo que você fez e faz por mim meu amor. Te amo demais!!!

Muito obrigado a todos!

## Sumário

<b>Índice de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Termos e Abreviaturas</b>	<b>xiv</b>
<b>Resumo</b>	<b>xvii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xviii</b>
<b>1 - Introdução</b>	<b>1</b>
<i>1.1 - Anticorpos</i>	<b>1</b>
<i>1.2 - O OKT3 e o Mercado de Imunoglobulinas</i>	<b>5</b>
<i>1.3 - Mecanismo de ação do OKT3</i>	<b>8</b>
<i>1.4 - Humanização do OKT3 pelo Grupo de Imunologia Molecular –         Resultados anteriores</i>	<b>11</b>
<i>1.5 - Phage Display</i>	<b>15</b>
<b>2 - Objetivos</b>	<b>20</b>
<i>2.1 - Objetivo geral</i>	<b>20</b>
<i>2.2 - Etapas metodológicas</i>	<b>20</b>
<b>3 - Materiais e Métodos</b>	<b>21</b>
<b>3.1 - Materiais</b>	<b>21</b>
3.1.1 - Linhagens bacterianas	<b>21</b>
3.1.2 - Plasmídeos utilizados	<b>21</b>
3.1.3 - Meios de cultura	<b>22</b>
3.1.4 - Soluções e tampões de uso geral	<b>23</b>
3.1.5 - Soluções para preparo de células competentes	<b>24</b>
3.1.6 - Soluções para extração de DNA plasmidial	<b>24</b>
3.1.7 - Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida	<b>25</b>
3.1.8 - Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Dot blotting</i> )	<b>27</b>

3.1.9 - Oligonucleotídeos sintéticos específicos	28
3.1.10 - Resinas cromatográficas	28
3.1.11 - Soluções para cromatografias	29
3.1.12 - Materiais utilizados para concentração e quantificação de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas	29
3.1.13 - Marcadores para DNA e proteína	29
3.1.14 - Enzimas	30
3.1.15 - Anticorpos	30
3.1.16 - Kits comerciais	30
<b>3.2 - Métodos</b>	<b>31</b>
3.2.1 - Preparação de DNA plasmidial em pequena escala	31
3.2.2 - Digestão do DNA com enzimas de restrição	32
3.2.3 - Análise de DNA em gel de agarose	32
3.2.4 - Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose	33
3.2.5 - Ligação de fragmentos de DNA	33
3.2.6 - Preparação de células competentes e transformação bacteriana	33
3.2.6.1 - Por choque térmico – CaCl <sub>2</sub>	33
3.2.6.2 - Por eletroporação	34
3.2.7 - Amplificação das seqüências variáveis humanas – PCR	37
3.2.8 - Expressão da proteína recombinante (CD3) em <i>E. coli</i> .	35
3.2.9 - Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE	36
3.2.10 - Coloração do gel de SDS-PAGE com prata	37
3.2.11 - Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®) – CD3	37
3.2.12 – Análise de proteínas por <i>Dot Blotting</i>	37
3.2.13 - Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA	37
3.2.14 - Avaliação do antígeno recombinante por imuno ensaio (ELISA - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	38
3.2.15 – Seleção da biblioteca	39
3.2.15.1 - Preparação do Fago Auxiliar	39

3.2.15.2 - Obtenção de Placas de Lise	39
3.2.15.3 - Amplificação de Placas de Lise	39
3.2.15.4 - Determinação do Título da Preparação de Fagos Auxiliares	40
3.2.15.5 – Ligação da Biblioteca de seqüências codificadoras de VLs no vetor pCIg 316 RM	40
3.2.15.6 – Seleção da biblioteca de VLs ligantes ao antígeno CD3 recombinante adsorvido em placa de microtitulação	42
3.2.15.7 <i>Phage</i> ELISA – Análise dos fagos obtidos nos <i>rounds</i> de seleção por ELISA	43
<b>4 - Resultados e Discussão</b>	<b>45</b>
<i>4.1-Amplificação dos Segmentos Gênicos Codificadores de Cadeias Leves Humanas</i>	45
<i>4.2 – Construção do Fagomídeo pCIg 316 RM</i>	47
<i>4.3 – Expressão da Proteína Recombinante CD3εγ</i>	49
<i>4.4 Seleção da biblioteca de seqüências VL por Phage Display</i>	53
<b>5 - Conclusões e Perspectivas</b>	<b>57</b>
<b>6 - Referências Bibliográficas</b>	<b>58</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Representação de um anticorpo inteiro e dos fragmentos gerados após o tratamento brando com pepsina (F(ab') <sub>2</sub> ) e com papaína(Fab).	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático do complexo receptor de celular T (TCR).	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação Do CD3 ao $\alpha\beta$ TCR.	<b>10</b>
<b>Figura 6.</b> Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b> Análise do ensaio de competição dos scFvs recombinantes na diluição 1/5 com o anticorpo monoclonal anti-CD3-FITC pela ligação ao antígeno CD3 na superfície de linfócitos.	<b>13</b>
<b>Figura 8.</b> Apresentação esquemática da molécula scFv fusionada a pIII do fago.	<b>17</b>
<b>Figura 9.</b> Amplificação de fragmentos VL por PCR.	<b>45</b>
<b>Figura 10.</b> Sequenciamento do clone 12.	<b>45</b>
<b>Figura 11.</b> Estratégia de clonagem.	<b>48</b>
<b>Figura 12.</b> Obtenção do plasmídeo pCIg 316 RM.	<b>49</b>

<b>Figura 13.</b> Figura esquemática do vetor utilizado para expressão do antígeno recombinante.	<b>50</b>
<b>Figura 14.</b> <i>Dot Blotting</i> das frações purificadas na coluna HisTrap FF.	<b>51</b>
<b>Figura 15.</b> Análise da proteína purificada.	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Imunoensaio enzimático (ELISA) utilizando a proteína recombinante purificada.	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Atividade ligante das partículas virais (monoclonais) selecionadas nos ciclos 2, 3 e 4.	<b>55</b>
<b>Figura 18.</b> Confirmação da ligação ao CD3 de diferentes clones.	<b>56</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Anticorpos monoclonais aprovados nos EUA para uso terapêutico*.	<b>6</b>
<b>Tabela 2.</b> Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.	<b>28</b>
<b>Tabela 3.</b> Anticorpos utilizados.	<b>30</b>
<b>Tabela 4.</b> Oligonucleotídeos sintetizados para clonagem da biblioteca de VLs no vetor pCIG 316.	<b>46</b>
<b>Tabela 5.</b> Fagos Obtidos Durante a Seleção.	<b>54</b>
<b>Tabela 6.</b> Frequência de clones positivos.	<b>55</b>

## Lista de Termos e Abreviaturas

<b>Amp<sup>R</sup></b>	Gene de resistência à ampicilina ( $\beta$ -lactamase).
<b>APS</b>	Persulfato de Amônio.
<b><i>AOX1, 2</i></b>	Genes da álcool oxidase 1 e 2.
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato.
<b>Bret</b>	Brometo de Etídeo.
<b>BSA</b>	Albumina bovina sérica.
<b>°C</b>	Graus Celsius.
<b>CD</b>	Marcador de superfície de célula ( <i>Cluster of differentiation</i> ).
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar.
<b>CDR</b>	Região determinante de complementaridade.
<b>CH1, 2, 3</b>	Domínios constantes da cadeia pesada de um anticorpo.
<b>CL</b>	Domínio constante da cadeia leve de um anticorpo.
<b>ColE1</b>	Origem de replicação de <i>E. coli</i> .
<b>Da</b>	Dalton.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico.
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos.
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético.
<b>Fab</b>	Fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno.
<b>Fc</b>	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante).
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> .
<b>Fv</b>	Fragmento variável do anticorpo.
<b>FvFc</b>	Fragmento variável fusionado ao Fc.
<b>g</b>	Grama.
<b>g</b>	Gravidade.
<b>h</b>	Hora.
<b><i>HIS4</i></b>	Gene histidinol desidrogenase.
<b>Ig</b>	Imunoglobulina.
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo.
<b>kb</b>	Quilobase.

<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio.
<b>kDa</b>	Quilodalton.
<b>kV</b>	Quilovolts.
<b>L</b>	Litro.
<b>M</b>	Molar.
<b>µg</b>	Microgramas.
<b>µl</b>	Microlitros.
<b>µF</b>	Microfaraday.
<b>µm</b>	Micrômetro.
<b>µM</b>	Micromolar.
<b>mA</b>	Miliamper.
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal.
<b>mg</b>	Miligrama.
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio.
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnésio.
<b>min</b>	Minuto.
<b>mL</b>	Mililitro.
<b>mM</b>	Milimolar.
<b>MM</b>	Massa molecular.
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico mensageiro.
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio.
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio.
<b>NBT</b>	<i>Nitro Blue Tetrazole.</i>
<b>ng</b>	Nanograma.
<b>nm</b>	Nanômetros.
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidade ótica a 600nm.
<b>OKT3</b>	Anticorpo monoclonal anti-CD3.
<b>Ori</b>	Origem de replicação.
<b>Ω</b>	ohm
<b>pb</b>	Pares de base.
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato - Salina.

<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase.
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico.
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub> .
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonato.
<b>p/v</b>	Peso/Volume.
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para.
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico.
<b>RNase</b>	Ribonuclease.
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto.
<b>scFv</b>	Fragmento variável de anticorpo cadeia única ( <i>Single chain Fragment Variable</i> ).
<b>SDS</b>	Sódio Dodecil Sulfato.
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS).
<b>spA</b>	Proteína A.
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina.
<b>Tet<sup>R</sup></b>	Gene de resistência a tetraciclina.
<b>Tris-Base</b>	Tris(hidroximetil)aminometano.
<b>τ</b>	Tempo de choque.
<b>v</b>	Volume.
<b>VH</b>	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo.
<b>VL</b>	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo.
<b>v/v</b>	Volume/Volume.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>YNB</b>	<i>Yeast Nitrogen Base</i> .
<b>X-GAL</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosideo.

## RESUMO

Nos últimos 20 anos a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) para fins terapêuticos vêm revolucionando o tratamento de diversas enfermidades. Desde a aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration – USA), em 1986, do anticorpo murino anti-CD3, Orthoclone OKT3 o mercado de anticorpos monoclonais vem crescendo a passos largos. Esse trabalho teve como objetivo o melhoramento do anticorpo OKT3 humanizado utilizando a técnica de *domain shuffling*.

Para tanto scFvs contendo a região codante da cadeia variável pesada humanizada foram obtidos variando-se os genes de cadeias leves, clonadas a partir de uma biblioteca humana. Esses scFvs foram produzidos na forma de partículas virais de fusão para serem utilizados em procedimentos de seleção de acordo com a técnica de *phage display*.

Para dar início a seleção de partículas virais ligantes, foi necessária a expressão e purificação do antígeno CD3 recombinante em *E. coli*. Esse antígeno foi expresso na fração citoplasmática solúvel de células da linhagem BL21. Foi realizada a purificação e constatou-se a manutenção das características antigênicas do CD3 por imunoensaio com anticorpos anti-CD3 comerciais ou recombinantes. Em seguida, averiguou-se se os fagos selecionados eram capazes de se ligar ao antígeno e a quais ciclos de seleção eles pertenciam.

Concluiu-se com o presente trabalho que o procedimento de seleção de anticorpos na forma de scFv pela estratégia de *shuffling* de cadeia aliada à técnica de *Phage Display* foi eficaz em selecionar clones com capacidade de ligação ao antígeno recombinante. Esse trabalho aponta para a validação dos anticorpos obtidos em comparação com os anticorpos comerciais (OKT3 e UCHT).

## ABSTRACT

In the last 20 years the use of monoclonal antibodies (mAbs) for therapeutic purposes are revolutionizing the treatment of various diseases. Since the approval by the FDA (Food and Drug Administration - USA) in 1986, the murine anti-CD3 antibody, Orthoclone OKT3, monoclonal antibodies market is scaling up. This work aimed the improvement of a humanized OKT3 antibody using the technique of domain shuffling.

The strategy chosen was keeping constant the anti-CD3 humanized heavy chain coding region combined with light chains genes, cloned from a human Fab library. These scFvs were fused to filamentous phage gene protein III. These fusion virions were used in selection procedures as stated by Phage Display technique.

To proceed the selection we first expressed and purified the CD3 recombinant antigen in *E. coli*. This antigen was recovered from the soluble cytoplasmatic fraction of *E. coli* strain BL21 cells. Purification was carried out by metal affinity chromatography, and the recombinant protein antigenic features were assessed by immunoassay using commercial or recombinant anti-CD3 antibodies.

The selection procedure was performed in four selection rounds, and the selected phages were screened by their ability of antigen recognition. The bound phages were found predominantly among those from round four (86 % of the assayed phage clones).

In conclusion, this work was able to select new anti-CD3 antibodies and these new molecules must now be further characterized to validate them in comparison with commercial antibodies (OKT3 and UCHL1) and as a second generation of biopharmaceuticals.

## 1- Introdução

### 1.1 Anticorpos

Os anticorpos (Ab) são glicoproteínas que possuem uma massa molecular em torno de 150 kDa, sendo compostos por dois tipos de cadeias polipeptídicas: uma, chamada de cadeia pesada (H) e outra chamada de cadeia leve (L) (Janeway *et al.* 2001). Cada cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, já ligadas às cadeias leves, são mantidas juntas covalentemente, também por pontes dissulfeto, formando o anticorpo (Abbas *et al.* 2003) (Figura 1). Tanto a cadeia leve quanto a cadeia pesada apresentam regiões amino-terminais variáveis denominadas domínios VL (variável leve) e VH (variável pesado) respectivamente, e de regiões carboxi terminais constantes(C).

A cadeia leve possui um único domínio constante (CL) enquanto que a cadeia pesada é composta de 3 ou 4 domínios constantes, dependendo da classe da imunoglobulina, chamados CH1, CH2, CH3 e CH4 . Os domínios VH e VL juntos formam o fragmento variável (Fv) sendo responsáveis pela ligação ao antígeno e os domínios constantes CH2 e CH3 constituem o fragmento cristalizável (Fc), sendo capaz de interagir e recrutar outras moléculas efetoras e células do sistema imune. (Janeway *et al.* 2001) (Figura 1).

Os genes que codificam as cadeias leve e pesada das imunoglobulinas são organizados em segmentos gênicos. Os genes da cadeia leve de mamíferos contêm os segmentos V, J e C (Figura 1). O primeiro segmento gênico, V, codifica os primeiros 97 aminoácidos da região variável da cadeia leve. Existem cerca de 300 seqüências V diferentes agrupadas em *tandem* no genoma de camundongo. O segundo segmento, J, consiste de 4 ou 5 seqüências de DNA possíveis que codifica os últimos 15-17 resíduos de aminoácidos da região variável. O terceiro segmento gênico, C, codifica a região constante da cadeia leve. Durante a diferenciação da célula B em plasmócito, a qual ocorre durante a sua maturação na medula óssea, um dos 300 segmentos V e um dos 5 segmentos J são combinados para formar a região variável do gene de anticorpo (Hozumi e Tonegawa, 1976).

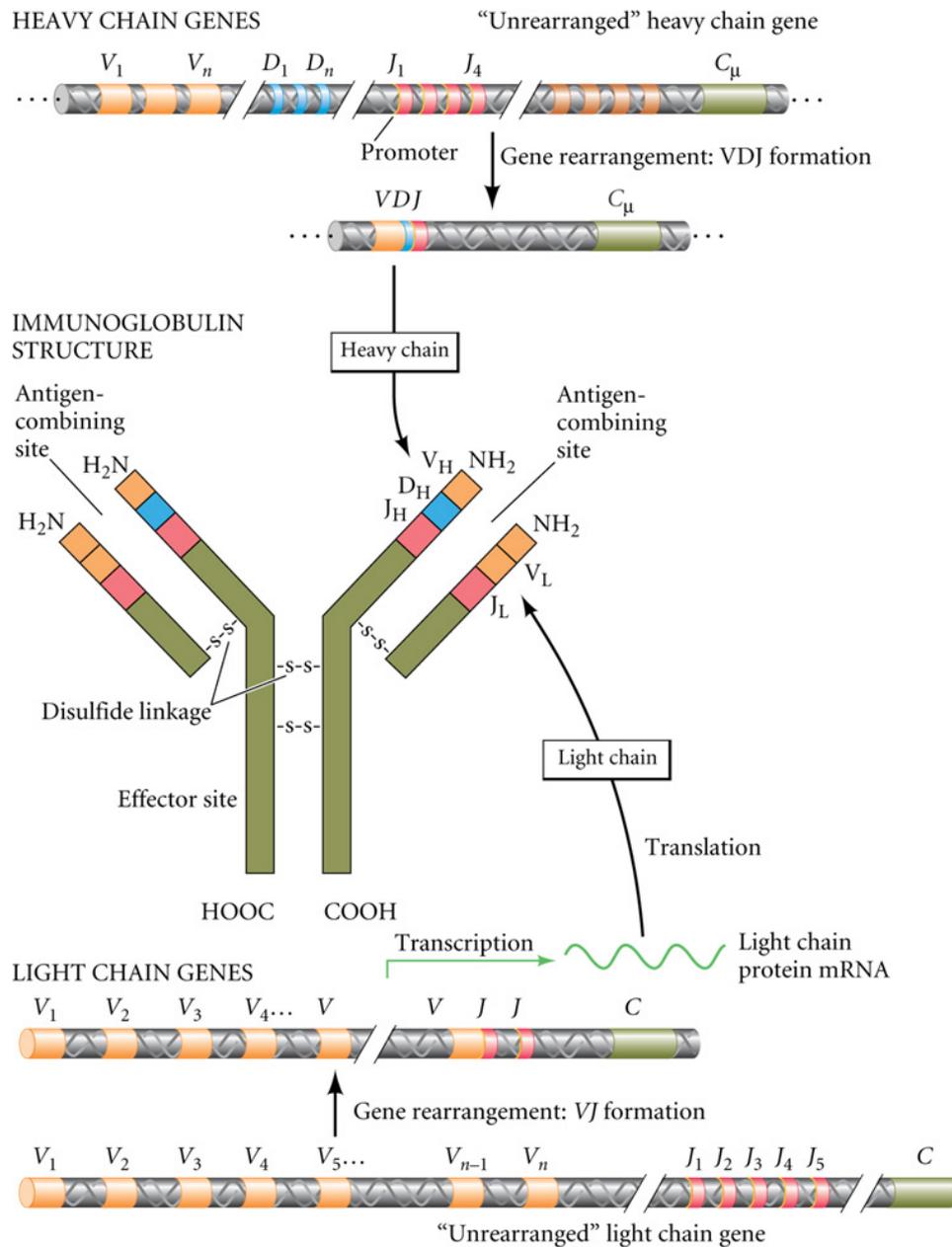
Os genes da cadeia pesada possuem ainda mais segmentos que os da cadeia leve. Os genes da cadeia pesada são constituídos por um segmento V (200 seqüências

diferentes codificando os primeiros 97 resíduos de aminoácidos), um segmento D (10-15 seqüências diferentes codificando mais 3-14 aminoácidos), e um segmento J (4 seqüências para os últimos 15-17 aminoácidos da região variável). O próximo segmento, C, codifica a região constante. A porção variável da cadeia pesada é formada pela junção de um segmento V, um D e um J (Figura 1). Esta seqüência variável VDJ, após o rearranjo, fica adjacente à primeira região constante dos genes de cadeia pesada – a região C<sub>μ</sub>, que é específica para anticorpos que podem se inserir na membrana celular.

Dessa forma, uma molécula de imunoglobulina é formada a partir de dois genes criados durante a fase antígeno-independente do desenvolvimento do linfócito B. Cerca de 10<sup>3</sup> cadeias leves diferentes e por volta de 10<sup>4</sup> cadeias pesadas diferentes podem ser formadas. Visto que cada uma é formada independente da outra, cerca de 10<sup>7</sup> tipos de imunoglobulinas podem ser criadas a partir da união das cadeias leve e pesada na célula. Cada célula B produz apenas um dos 10<sup>7</sup> tipos de anticorpos possíveis (revisado por Scott F. Gilbert, 2006).

O linfócito B não é o único tipo celular que altera seu genoma durante a diferenciação, o mesmo ocorre com os linfócitos T durante a produção do seu receptor de antígeno (TCR). As enzimas responsáveis por estes eventos de recombinação de DNA são chamadas RAG 1 e 2 (Agrawal *et al.*, 1998; Bassing *et al.*, 2002), estas duas proteínas reconhecem regiões sinalizadoras no DNA imediatamente a jusante aos segmentos de DNA recombináveis e formam um complexo que inicia quebras na fita dupla. Além disso, os genes dessas recombinases estão ativos apenas em linfócitos pre-B e pre-T, nos quais os genes estão sendo recombinados. Mutações que eliminam a função de ambas as recombinases levam a imunodeficiências severas que se manifestam ao nascimento (Schwarz *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1998).

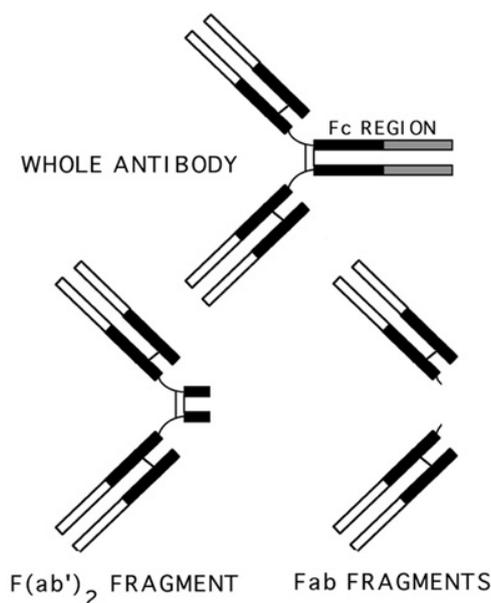
As cadeias variáveis leves e pesadas possuem regiões de suma importância para ligação ao antígeno, chamadas de região determinantes de complementariedade (CDR). Essas regiões são caracterizadas por serem ilhas hipervariáveis em um arcabouço relativamente conservado. É a estrutura tridimensional formada por essas regiões é que vai se complementar a estrutura do antígeno possibilitando a ligação antígeno-anticorpo. Ao todo são 3 CDRs em cada cadeia (CDR1, CDR2 e CDR3), sendo que dessas a CDR3 é a que possui a maior variabilidade e é classificada como a mais importante na determinação da especificidade pelo antígeno (Abbas *et al.*, 2003).



**Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.** Rearranjo dos segmentos gênicos que codificam para as cadeias leve e pesada. (Scott F. Gilbert, 2006).

As imunoglobulinas podem ser divididas em diversos fragmentos. Uma molécula de IgG ao ser clivada proteoliticamente por papaína na região da dobradiça gera duas moléculas constituídas da cadeia leve ligada ao fragmento  $VH-CH1$  da cadeia pesada. Essas moléculas são chamadas de Fab (Fragmento de ligação ao antígeno), além disso, há a liberação do fragmento cristalizável (Fc) após a clivagem. Já ao ser clivada

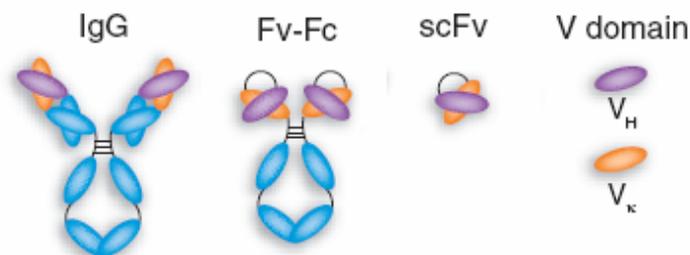
por pepsina a região Fc é degradada e um fragmento com os dois Fabs ligados é gerado, formando um  $F(ab')_2$ . Esses fragmentos possuem alta relevância na utilização para diagnósticos e no tratamento de doenças onde a função efetora do anticorpo não é requerida (Figura 2).



**Figura 2. Representação de um anticorpo inteiro e dos fragmentos gerados após o tratamento brando com pepsina ( $F(ab')_2$ ) e com papaína (Fab) ([www.dartmouth.edu/~celllab/pix/fab.jpg](http://www.dartmouth.edu/~celllab/pix/fab.jpg)).**

Utilizando-se técnicas moleculares de manipulação de DNA, é possível desenhar sequências que codificam fragmentos de anticorpos e gerar diferentes modelos de fragmentos, estes servindo como alternativas para utilização na clínica. Um dos modelos mais utilizados é o scFv, que consiste no VH ligado VL por um peptídeo conector flexível ((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, por exemplo) com o intuito de mimetizar a região Fv do anticorpo e manter a especificidade. Como vantagens, devido ao seu tamanho reduzido, ele possui alto poder de penetração em tecidos (Revisto por Holliger e Hudson, 2005), facilitando a ação, por exemplo, dentro de tumores sólidos (Figura 3).

Além disso, uma vez que se trata de uma construção monocistônica, apresenta a característica de fácil manipulação gênica. Outro aspecto é o fato de não possuir região Fc o que contribui para tratamentos onde a função efetora não é necessária.



**Figura 3. Representação de uma molécula de imunoglobulina (IgG) em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante (Fv-Fc e scFv).** Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

### ***1.2 O OKT3 e o Mercado de Imunoglobulinas***

Nos últimos 20 anos a utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) para fins terapêuticos vêm revolucionando o tratamento de diversas enfermidades. Desde a aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration – USA), em 1986, do anticorpo murino anti-CD3, Orthoclone OKT3, para o tratamento da rejeição aguda do transplante de rins e subsequentemente para o tratamento da rejeição de transplantes cardíacos e hepáticos (Li *et al.*, 2005), o mercado de anticorpos monoclonais vem crescendo a passos largos. Em 2004, existiam 17 anticorpos aprovados pelo FDA no mercado (tabela 1), variando entre murinos, quiméricos e humanizados sendo que mais 16 novos produtos estavam previstos para entrar no mercado entre 2004 e 2008 (Reichert e Pavlou, 2004). Entre os anos de 2001 e 2002 o mercado de anticorpos monoclonais cresceu 37, 5% chegando a um patamar de US\$ 5,4 bilhões, se as previsões de entrada de novos produtos no mercado se confirmarem esse mercado poderá chegar a um valor total de US\$ 16,7 bilhões em 2008 (Pavlou e Belsey, 2005).

O início tímido da terapia com anticorpos em nada se compara ao visto hoje na indústria de biofármacos, o grande investimento em anticorpos de uso clínico gerou uma ampla variedade de moléculas modificadas com o propósito tanto de direcionar especificamente sua ação quanto de minimizar seus efeitos colaterais. Atualmente existem anticorpos monoclonais (mAbs) em forma de fragmentos (abciximab), conjugados a toxinas (gemtuzumab ozogamicin), marcados com radioisótopos (ibritumomab, tositumomab) e derivados de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos (adalimumab) já aprovados para o uso terapêutico (Presta, 2006). Há ainda em desenvolvimento mAbs de sequência humana obtidos a partir de camundongos

transgênicos, derivados de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos, de ribssomos e de leveduras (Lonberg N, 2005 ; Hoogenboom H.R., 2005).

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

<b>Nome (Genérico)</b>	<b>Molécula Alvo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Doença indicada</b>	<b>Categoria Terapêutica</b>	<b>Empresa</b>	<b>Data de Aprovação</b>
OKT3 (Muromonab-CD3)	CD3	Murino	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Johnson & Johnson	19.06.1986
ReoPro (Abciximab)	CA17-1A	Quimérico	PTCA	Homeostase	Centocor	22.12.1994
Panorex (edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer colorretal	Anti-Neoplástica	Centocor	1995
Rituxan (Rituximab)	CD20	Quimérico	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Biogen IDEC	26.11.1997
Zenapax (Daclizumab)	IL2R	Humanizado	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Protein Design Labs	10.12.1997
Simulect (Basiliximab)	IL2R	Quimérico	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Novartis	12.05.1998
Synagis (Palivizumab)	RSV F	Humanizado	Profilaxia de RSV	Anti-infectivo	MedImmune	19.06.1998
Remicade (Infliximab)	TNF- $\alpha$	Quimérico	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Centocor	24.08.1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her2/neu	Humanizado	Metástase de câncer de	Anti-Neoplástica	Genentech	25.09.1998
Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	CD33	Humanizado	Leucemia mieloide	Anti-Neoplástica	Wyeth	17.05.2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica	Anti-Neoplástica	Millennium/ILEX	07.05.2001
Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	CD20	Murino	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Biogen IDEC	19.02.2002
Humira (Adalimumab)	TNF- $\alpha$	Humano	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Abbott	31.12.2002
Xolair (Omalizumab)	IgE	Humanizado	Asma	Imunológica	Genentech	20.06.2003
Bexxar (Tositumomab-I 131)	CD20	Murino	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Corixa	27.06.2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Imunológica	Genentech	27.10.2003
Erbitux (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer colorretal	Anti-Neoplástica	Imclone Systems	12.02.2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer colorretal, renal.	Anti-Neoplástica	Genentech	26.02.2004

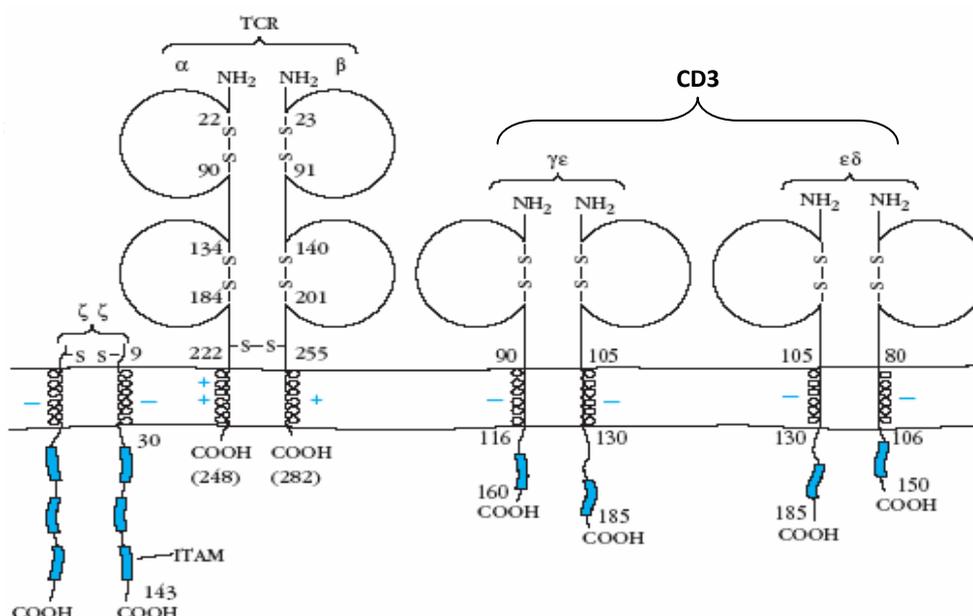
Tysabri (Natalizumab)	Integrina A4	Humanizado	Doença de Crohn e esclerose	Imunológica	Biogen IDEC	23.11.2004
Lucentis (Renibizumab)	VEGF-A	Humanizado	Degeneração macular	Anti- Neoplástica	Genentech	30.06.2006
Vectibix(Panitu mumab)	EGFR	Humano	Câncer colorectal	Anti- Neoplástica	Amgen	27.09.2006
Soliris (Eculizumab)	C5	Humanizado	Paroxysmal hemoglobinú ria (PNH)	Imunológica	Alexion Pharm	16.03.2007
Milatuzumab	CD74	Humanizado	Mieloma múltiplo linfoma Non-Hodgkin	Anti-Neoplásica	Immunom edics, Inc.	11.03.2008

\*Adaptado de (Reichert, 2004; Kim et al., 2005)

O OKT3 vem sendo utilizado, desde 1986 na prevenção da rejeição de órgãos transplantados. Mais recentemente tem sido proposta a sua utilização no tratamento da diabetes Tipo 1 autoimune (Herold *et al.*, 2005), psoríase e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Utset *et al.*, 2002). Além do OKT3 outros anticorpos anti-CD3 tem sido testados em modelos murinos para a prevenção da rejeição de transplante do coração (Plain *et al.*, 1999), da GVHD aguda (do inglês, *Graft Versus Host Disease*) (Blazar *et al.*, 1997), da encefalomielite auto-imune experimental (EAE, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Kohm *et al.*, 2005), para o tratamento da artrite induzida por colágeno (Hughes *et al.*, 1994) e da doença inflamatória de Bowel (colite ulcerativa e doença de crohn) (Ludviksson *et al.*, 1997). Em humanos, testes clínicos de fase I e II em pacientes com artrite psorítica mostram que o anticorpo humanizado anti-CD3 não ligante a receptor Fc, teplizumab, reduz a inflamação das articulações e a dor em pacientes com a doença em estágio avançado (Utset *et al.*, 2002). Além disso, um teste clínico está em andamento em pacientes com colite ulcerativa e outros estão planejados para serem realizados em pacientes com esclerose múltipla, psoríase e em transplante de órgãos (Chatenoud e Bluestone, 2007). Atualmente, os anticorpos anti-CD3 são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, podendo promover a cura de auto-imunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (Chatenoud, 2003).

### 1.3 Mecanismo de ação do OKT3

A molécula alvo do OKT3, o CD3, faz parte de um complexo de fundamental importância para a resposta imune adaptativa, o complexo receptor de célula T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*). Esse complexo é formado pelo próprio TCR e pelas moléculas acessórias CD3 e cadeias  $\zeta$  (Figura 4). O TCR é responsável pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados por moléculas chamadas complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), presentes na superfície de todas as células humanas. Após o reconhecimento do antígeno pelo TCR, ocorre a fosforilação dos domínios ITAMs (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes no CD3 e nas cadeias  $\zeta$ , sendo esse o ponto de partida para o desencadeamento de uma cascata de transdução de sinal que pode acarretar na ativação e proliferação dessas células, e, assim, desempenhar as funções efetoras, como a produção de citocinas, como por exemplo, IL-2 e citotoxicidade celular.

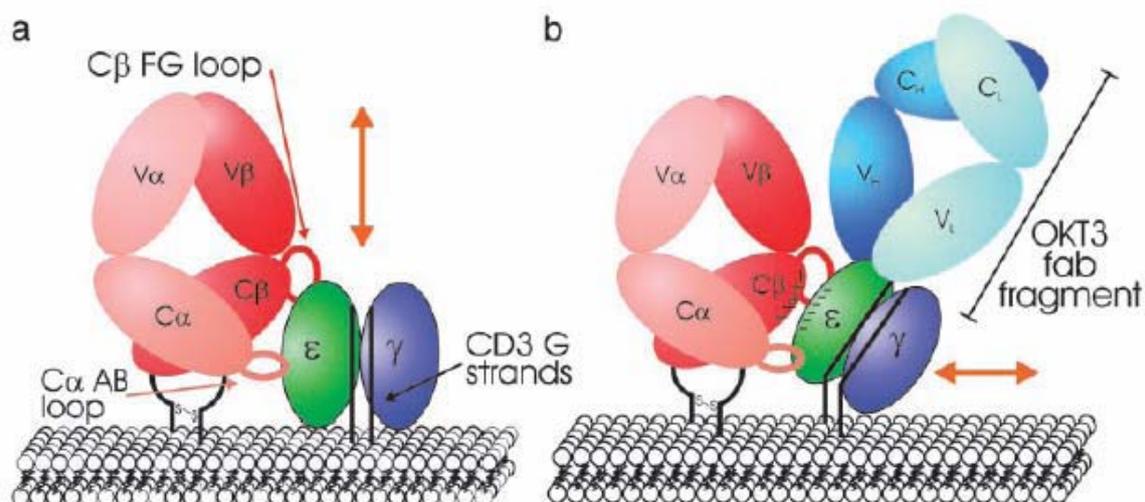


**Figura 4. Diagrama esquemático do complexo receptor de célula T (TCR).** Ele é constituído pelo TCR, cadeias  $\zeta$  e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias  $\zeta$  do CD3 apresentam uma seqüência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), o qual irá agir no processo de transdução de sinal (Kindt *et al.*, 2002).

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

Estudos estruturais revelam uma ligação lateral oblíqua entre o OKT3 e a molécula CD3 (Figura 5). De acordo com o modelo proposto, essa ligação promoveria um deslocamento molecular diferente do observado na correta estimulação do complexo TCR (Figura 5, setas laranja). Esse arranjo aumenta a possibilidade de uma mudança conformacional no complexo TCR-CD3, podendo ser o modo de iniciação da sinalização da célula T mediado por anticorpos anti-CD3. Nesta ligação, o fragmento variável leve (VL) do anticorpo OKT3 contribui com 31% (de um total de 510 Å<sup>2</sup>) da BSA (do inglês, *buried surface area*) de interface com a subunidade CD3 $\epsilon$  (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

Este modelo estrutural é corroborado por outro modelo geométrico mais recente de ativação do TCR-CD3 (Minguet S. & Schamel W.W.A., 2007) no qual a ligação do antígeno às subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR, simultaneamente, acarretaria o deslocamento em diagonal dos heterodímeros de CD3 ( $\delta\epsilon$  e  $\epsilon\gamma$ ) posicionados em lados opostos da molécula do TCR ocasionando um movimento em forma de tesoura de seus respectivos domínios intracelulares expondo sítios alvo de fosforilação nos domínios ITAM das cadeias  $\zeta\zeta$ .



**Figura 5. Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação do CD3 ao  $\alpha\beta$  TCR.** (a) Modelo de sinalização após a ligação de antígeno ao TCR, onde ocorre um deslocamento vertical do CD3 e assim desencadeando uma cascata de transdução de sinal. (b) Dinâmica de ligação do OKT3 ao CD3 mostrando a mudança no padrão de deslocamento do CD3 e alteração na iniciação da sinalização da célula T (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

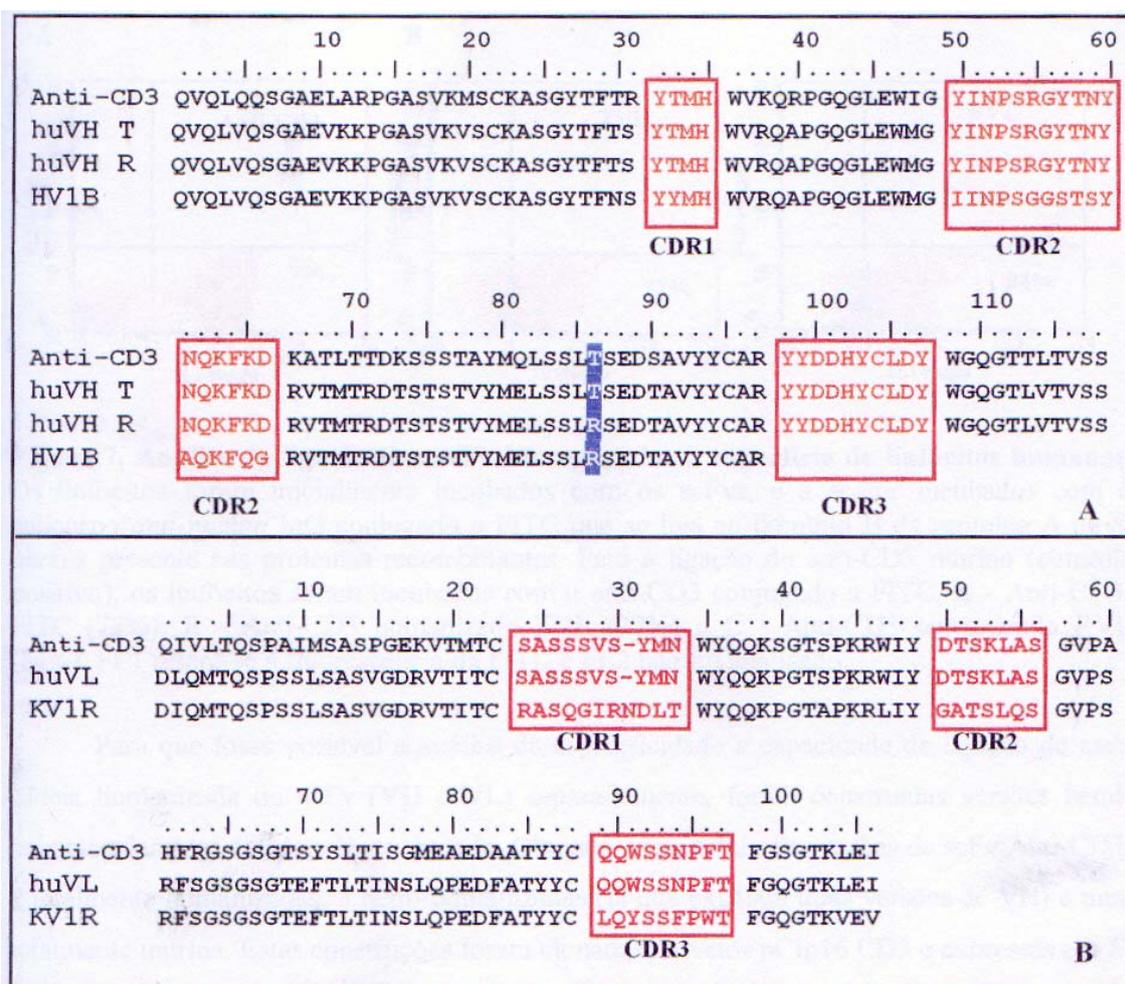
Apesar de todas as suas vantagens, o único anticorpo anti-CD3 aprovado para uso clínico, o OKT3, possui algumas limitações. O caráter murino da molécula gera o desenvolvimento de uma resposta imunogênica, pelo paciente, denominada resposta a anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas (principalmente IgM e IgG) contra anticorpos murinos promovendo uma rápida remoção e neutralização do OKT3 e, assim, reduzindo sua eficácia (Li *et al.*, 2005). Outra limitação do OKT3 é a sua mitogenicidade. Ensaios realizados *in vitro*, mostram que esses anticorpos induzem a proliferação de células T e a produção de citocinas, conferindo a esse Ac um perfil inflamatório indesejado nos processos terapêuticos em que se almeja uma imunomodulação (Van Wauwe *et al.*, 1980). *In vivo*, essa atividade mitogênica permite a liberação em larga escala de citocinas, incluindo citocinas derivadas de células T, horas após a primeira injeção do anticorpo (Ferran *et al.*, 1990). Essa liberação inclui citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , produzidas por células T e não por macrófagos (Ferran *et al.*, 1994). Essa capacidade mitogênica do OKT3 é, entretanto, dependente de macrófagos/monócitos e envolve a produção de IL-6 e IL-1 (citocinas pró-inflamatórias) por esse tipo celular (Chatenoud, 2003). Apesar de ser um evento transiente, essa liberação de citocinas causa uma síndrome semelhante a uma pneumonia, caracterizada por febre, calafrios, dores de cabeça, náusea, vômitos,

diarréia, insuficiência respiratória, meningite séptica e hipotensão (Sgro, 1995).

Diante dos problemas relacionados à origem murina do OKT3, a utilização da engenharia de anticorpos pode ser a chave para a solução desses entraves na utilização de anticorpos originados de camundongos. Atualmente, existem fortes evidências de que anticorpos humanizados e totalmente humanos são menos imunogênicos em relação aos anticorpos murinos originais (Chatenoud, 2003; Tahir *et al.*, 2005).

#### ***1.4 Humanização do OKT3 pelo Grupo de Imunologia Molecular - Resultados anteriores***

O grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília desenvolveu uma estratégia de humanização do anticorpo anti-CD3 por meio da técnica de *CDR grafting* (Citado em Maranhão e Brígido, 2001). Para tal, foram escolhidos arcabouços humanos para cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) que possuíam a maior similaridade com a seqüência do anticorpo murino, visando, assim, reter a especificidade de ligação característica do OKT3 (Figura 6).

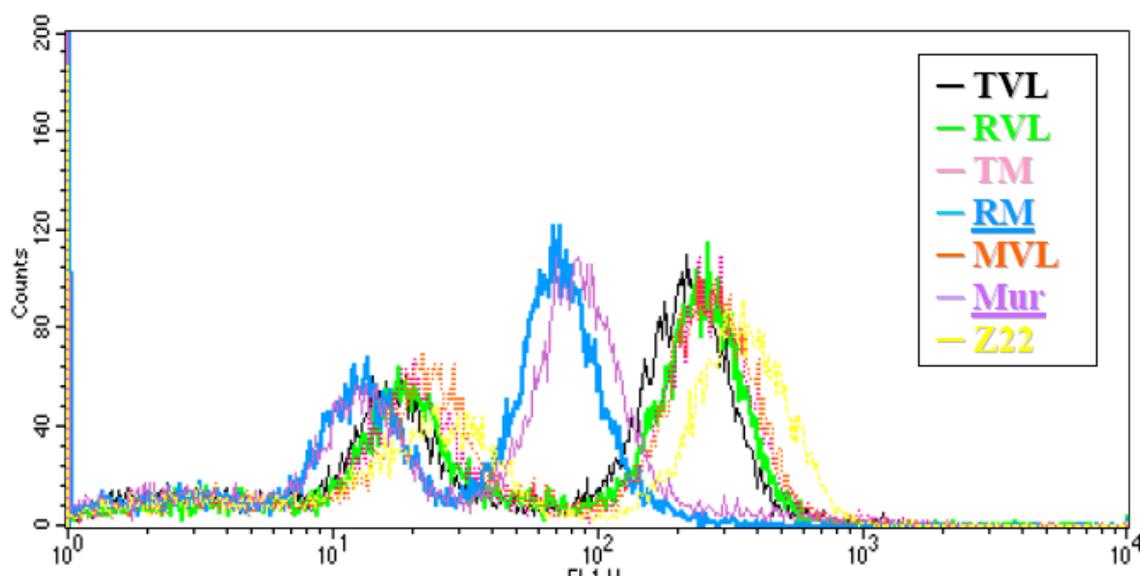


**Figura 6. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.** Seqüência codificadora do OKT3 (anti-CD3), versões humanizadas do anti-CD3 para as cadeias pesada (huVH T e R) e leve (huVL) e seqüências humanas utilizadas como arcabouço para as CDRs do anti-CD3 (HV1B e KV1R). A- Cadeia pesada. B- Cadeia Leve. São destacadas em vermelho as seqüências das CDRs 1, 2 e 3 de cada cadeia e em branco com fundo azul o resíduo 86 que diferencia as duas versões de VH humanizados (Fonseca, 2000).

Na humanização da cadeia variável pesada foi utilizada uma seqüência germinal humana que possuía a maior similaridade com a VH do OKT3, a HV1B, tendo uma identidade de 71,4% com a VH do OKT3 (Reis, 2000), variando-se apenas o resíduo 86, entre uma treonina (T) e uma arginina (R).

Já para a humanização da cadeia variável leve foi adotada uma estratégia um pouco diferente. Primeiro, cada fragmento do arcabouço da seqüência do VL murino foi utilizado como base na procura de um anticorpo humano, ao contrário da cadeia pesada, que foi utilizada toda a seqüência do anticorpo murino. Deste modo, a procura resultou em um grupo de seqüências similares para cada arcabouço do VL murino.

Para verificação da manutenção da atividade ligante dos anticorpos humanizados foram construídas seis versões de scFvs recombinantes: duas humanizadas, uma com o hVH<sup>T86</sup> e outra com o hVH<sup>R86</sup>; três versões hemi-humanizadas, duas compostas das respectivas cadeias pesadas humanizadas em conjunto com a cadeia leve murina e outra contendo a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada; e por último, uma versão totalmente murina. Essas construções permitiram verificar se o processo de humanização dos fragmentos variáveis foi bem sucedido e, no caso de perda de afinidade da ligação ao antígeno, foi possível visualizar que as construções contendo a cadeia leve humanizada eram incapazes de competir com o OKT3 original (Costa, 2004, Figura 7).



**Figura 7. Análise do ensaio de competição dos scFvs recombinantes na diluição 1/5 com o anticorpo monoclonal anti-CD3-FITC pela ligação ao antígeno CD3 na superfície de linfócitos.** Histograma de sobreposição. TVL e RVL, versões humanizadas com os hVH<sup>T86</sup> e hVH<sup>R86</sup>, respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os hVH<sup>T86</sup> e hVH<sup>R86</sup>, respectivamente. MVL, versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado. MUR, versão murina. Z22, anticorpo anti-DNA na conformação Z utilizado como controle negativo. Observa-se que somente as versões RM e MUR (azul e roxo) conseguem deslocar eficientemente a ligação do anti-CD3-FITC ao CD3, enquanto as demais versões provocam um deslocamento próximo do controle (Z22, amarelo) (Costa, 2004).

Diante desse problema, foi realizada (Silva, 2008) uma nova humanização da cadeia variável leve (hVL), adotando como estratégia a técnica de transplante de CDR por melhor encaixe (Best Fit). Dessa forma, buscou-se seqüências germinais humanas

que possuíam maior similaridade com a sequência do anticorpo murino, visando a manutenção da especificidade de ligação característica do OKT3.

Com essa nova proposta em mãos e com o intuito de verificar a eficácia desse novo processo de humanização, foram construídas versões recombinantes humanizadas com as cadeias variáveis pesadas hVH<sup>R86</sup> e hVH<sup>T86</sup> em conjunto com a nova cadeia leve (hVL). Para a produção dessas versões recombinantes foram utilizadas células de mamíferos da linhagem CHO, por ser a linhagem utilizada predominantemente para expressão de anticorpos recombinantes e por suas diversas vantagens já citadas anteriormente. Os anticorpos selecionados por este trabalho tiveram uma perda de afinidade quando comparados com o anticorpo murino (OKT3).

Em trabalho realizado por Fonseca, 2000, foi mostrado por modelagem molecular que 6 resíduos de aminoácidos presentes na cadeia leve murina do OKT3 podem manter interações com a cadeia pesada provavelmente no sentido de estabilizar a estrutura das duas cadeias e promover o correto arranjo estrutural do seu paratopo. Ao se comparar a sequência da cadeia leve murina com a da versão humanizada utilizada neste trabalho, foram observadas três alterações (K44R, S42A e R45L) sendo que essas duas últimas substituições não foram conservativas. A serina na posição 42, um aminoácido polar não carregado, foi substituída por uma alanina na versão humanizada, com características apolares. E o aminoácido arginina presente na posição 45, polar e com carga positiva, foi substituído pelo aminoácido leucina, que é apolar. Essa última substituição deve ter gerado grande impacto na estrutura do anticorpo visto a grande diferença nas características dos aminoácidos e devido ao resíduo arginina na posição 45 poder realizar três pontes de hidrogênio e uma interação eletrostática com resíduos de aminoácidos D102, H103, Y104 e D107, respectivamente, presentes na HCDR3 da cadeia pesada. Assim, essa substituição por um resíduo apolar pode ter levado a eliminação dessas interações e conseqüentemente levando a uma desestabilização da HCDR3, considerada a mais importante na ligação ao antígeno.

Além do papel importante das interações inter-cadeia na manutenção do paratopo. Alterações em resíduos importantes na manutenção da estrutura interna da cadeia podem alterar a conformação dos sítios de ligação ao antígeno (Silva, 2008).

### ***1.5 Phage display***

Visando então melhorar a afinidade da versão hemi-humanizada hVH<sup>R86</sup>, este trabalho propõe o *shuffling* da cadeia leve deste gene usando a técnica de *Phage Display*.

A técnica de apresentação de polipeptídeos na superfície de bacteriófagos filamentosos foi inicialmente descrita por Smith (1985) quando foi demonstrado que a fusão de peptídeos exógenos à porção amino – terminal da proteína III de bacteriófagos filamentosos não impedia a montagem da partícula viral e possibilitava a incorporação do peptídeo exógeno ao seu capsídio de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante. Nas bibliotecas construídas em fagos filamentosos, a seleção de formas com maior ou menor afinidade por um ligante alvo é feita possibilitando-se a interação dos fagos de fusão, produzidos e liberados para o sobrenadante de cultura de células infectadas, com a molécula reconhecida pelo peptídeo recombinante fixa em um suporte (Friedman *et al.*, 2007).

O processo de seleção para uma biblioteca apresentada em fago pode ser resumido nos seguintes passos (Brígido & Maranhão, 2002): 1-as diversas formas do gene de interesse (pares VH-VL) são clonadas, fusionadas a um dos genes do capsídio viral; 2- Os fagos de fusão são produzidos em cultura de células infectadas, 3- Os fagos são incubados com o ligante-alvo que está preso a um suporte (placa de microtitulação ou resina de afinidade); 4-realizam-se lavagens extensivas deste suporte para se eliminar os fagos de menor afinidade; 5-eluem-se os fagos retidos. Esse processo de seleção pode se repetir como um ciclo, onde as formas selecionadas na primeira etapa são amplificadas e novamente selecionadas pelo ligante. A cada procedimento de seleção formas mais afins de Ac são obtidas (Rader & Barbas, 1997). Vários trabalhos mostram a construção de bibliotecas combinatórias de Ac apresentadas na superfície de fagos filamentosos e a seleção de Ac de alta afinidade contra diferentes Ag (Sheets *et al.*, 1998; Cirino *et al.*, 1999; Giovannoni *et al.*, 2001, dentre outros). A apresentação de fragmentos de anticorpos na superfície de fagos torna possível mimetizar a seleção que ocorre em nível do sistema imune, mesmo utilizando-se repertório não imune (Vaughan *et al.*, 1996 e Griffiths *et al.*, 1994).

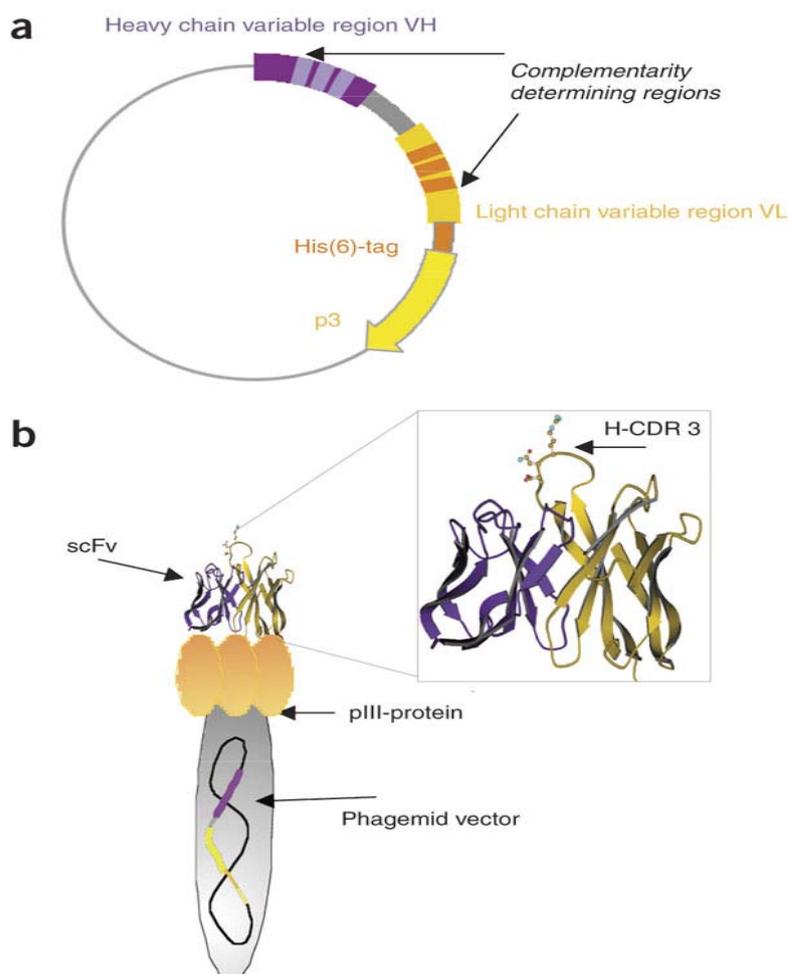
Apesar da complexidade dessa técnica, vários anticorpos totalmente humanos já foram e estão sendo produzidos dessa forma com sucesso, como: anti-CD38 para o tratamento de mielomas (Stevenson, 2006), anti transcriptase reversa do vírus da

hepatite B (Park *et al.*, 2007), anticorpos neutralizadores do rotavírus humano (Higo-Moriguchi *et al.*, 2004), anti-TNF- $\alpha$  para o tratamento de artrite reumatóide (Machold & Smolen, 2003), dentre outros. O Humira (Adalimumab) anticorpo totalmente humano anti-TNF- $\alpha$ , usado no tratamento da artrite reumatóide e doença de Crohn, derivado da tecnologia de *phage display*, foi recentemente liberado (2002) para uso clínico pelo FDA (Weiner, 2006).

Os anticorpos foram uma das primeiras proteínas a serem eficientemente expressas na superfície de fagos tendo sido obtidas pela fusão das seqüências codantes das regiões variáveis dos anticorpos (V) à região amino-terminal da proteína pIII do fago (McCafferty e Griffiths, 1996). Normalmente, os trabalhos de construção de bibliotecas combinatórias de anticorpos são realizados a partir da construção de fragmentos de anticorpos recombinantes na forma de scFv ou Fab (Figuras 2,3 e 8).

Fragmentos de anticorpos na forma de scFv com seqüência totalmente humana, podem ser isolados a partir de bibliotecas apresentadas em fagos onde os genes codificadores dos domínios VH e VL de um scFv ligante são trocados por um repertório de genes codificadores destes domínios variáveis V (*shuffling* de cadeia). Nesta técnica, durante processo de clonagem mantém-se o gene de um dos domínios, por exemplo, o VL, enquanto que o outro, codificando o VH, é trocado por inúmeras variações dele. Em seguida é feita a seleção contra determinado antígeno, para se obter o fragmento scFv (VH e VL) com a afinidade desejada. Schier e colaboradores em 1996, usaram o *shuffling* de cadeia para aumentar a afinidade de scFvs humanos de uma biblioteca não-imune, os quais reconhecem o antígeno tumoral glicoproteico *c-erbB-2* com uma afinidade de  $1,6 \times 10^{-8}$ M, neste estudo a afinidade do scFv parental foi aumentada em seis vezes ( $K_d = 2,5 \times 10^{-9}$ M) pelo *shuffling* da cadeia leve e em cinco vezes ( $K_d = 3,1 \times 10^{-9}$ M) pelo *shuffling* da cadeia pesada, valores comparáveis àqueles para anticorpos contra o mesmo antígeno produzidos por hibridomas.

Com o intuito de selecionar uma cadeia leve (VL) totalmente humana contra TAG-72 (do inglês, *tumor-associated glycoprotein*), foi feita a seleção por *phage display* a partir de um repertório não-imune de seqüências codificadoras de fragmentos variáveis leves (VL *shuffling*) usando-se como guia na seleção a cadeia pesada (VH). Foi demonstrado que os Fabs selecionados por esta técnica apresentaram maior afinidade pelo antígeno que o anticorpo parental CC49 (versão humanizada) (Sang J. K. & Hyo J. H., 2007).



**Figura 8. Apresentação esquemática da molécula scFv fusionada a pIII do fago.**(a) Mapa do fagomídio que codifica para o scFV, mostrando as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e o peptídeo linker (em cinza) que separa a cadeia leve e a pesada. (b) O scFV fusionado à pIII na superfície do fago M13. A cadeia pesada é ilustrada em roxo e a cadeia leve em amarelo. Ampliação da estrutura em 3D de um típico scFV onde se verificam as folhas  $\beta$  anti-paralelas e a formação em loop das CDRs. O modelo foi criado com o visualizador Rasmol-pdb (University of Massachusetts).

A seleção dos fagos que expressam um ligante de interesse envolve um enriquecimento seqüencial de fagos que se ligam especificamente ao antígeno dentre um repertório vasto onde há excesso de clones que não se ligam ao antígeno. Isso é conseguido por meio de ciclos sucessivos de seleção com o antígeno, onde cada ciclo compreende uma etapa de ligação do fago ao antígeno, captura dos fagos ligados, eluição e amplificação (Marks *et al.*, 1991). Em geral, após 3 ou 4 ciclos de infecção e re-infecção obtêm-se populações de fagos que expressam a melhor combinação de

fragmento scFv ou Fab para o antígeno em questão (Vaughan *et al.*, 1996). Qualquer método que permita isolar os fagos ligados pode ser usado na seleção, assim sendo várias metodologias de seleção foram propostas, desde antígeno aderido a um substrato sólido, ou em colunas de afinidade, utilização de antígenos biotinilados ou magnéticos, seleção em células procarióticas fixas, em células de mamíferos, seleção subtrativa, enriquecimento em fragmentos de tecidos e até em animais vivos (Hoogenboom *et al.*, 1998).

À medida que o antígeno alvo se torna mais complexo, caso da superfície celular, a seleção se torna mais difícil. A célula possui em sua membrana um vasto panorama de antígenos que diferem também em relação aos níveis de expressão, além da presença de antígenos não específicos na forma de proteínas, carboidratos e lipídeos o que representa um desafio ainda maior durante o processo de seleção. No entanto, na superfície celular esses potenciais alvos de ligação encontram-se na sua forma nativa sem os possíveis danos estruturais que podem ser acarretados durante os procedimentos de purificação. Apesar da complexidade, vários anticorpos apresentados em fagos foram selecionados na superfície de células e as metodologias vêm sendo aprimoradas, de modo a validar essa prática (Dantas-Barbosa, 2005).

No presente projeto utilizamos uma biblioteca de Fab humano apresentada na superfície de fagos filamentosos que foi construída por nosso grupo a partir do repertório imune de 11 pacientes com osteosarcoma (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca apresenta  $1,45 \times 10^8$  formas diferentes de Fab e foi construída a partir da amplificação dos genes de domínios variáveis pesados de IgM e IgG e domínios variáveis leve de cadeias capa, a partir de cDNA de linfócitos periféricos desses pacientes. Os pares VH-VL foram clonados no fagomídeo pComb 3X (Andris-Whidhopf *et al.*, 2000). As análises de *fingerprinting* com enzimas de restrição e de seqüências de nucleotídeos clones aleatórios revelam que a biblioteca apresenta grande diversidade (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Essa biblioteca foi utilizada para selecionar Fab com capacidade de reconhecimento de células derivadas de tumores ósseos em cultura. Diversos anticorpos, reconhecendo diferentes antígenos dessas linhagens celulares foram selecionadas (Manuscrito em preparação).

Nessa proposta essa biblioteca foi utilizada como fonte de Ac para selecionar painéis distintos de Ac ligantes a diferentes antígenos. A literatura está repleta de exemplos bem sucedidos que relatam a utilização de bibliotecas não imunes para se obter Ac de alta afinidade a diferentes Ag (Hoogenboom *et al.*, 1999; Wozniak *et al.*,

2003; de Haard *et al.*, 1999 ; Okamoto *et al.*, 2004; Watkins *et al.* 2003 , dentre outros). Isso tem sido particularmente importante para a seleção de Fab ou scFv humanos capazes de se ligarem a antígenos de interesse clínico (Ridgway *et al.*, 1999; Stausbol-Gron *et al.*, 2001; Amersdorfer *et al.*, 2002; De Lorenzo *et al.*, 2002, dentre outros) Assim pretendemos usar a nossa biblioteca de Fab humanos e selecionar anticorpos capazes de se ligarem aos componentes presentes na peçonha de animais (*Bothrops atrox*), como também em um peptídeo derivado da proteína do envelope do vírus HIV 1 (gp41) e especificamente neste trabalho selecionar a partir desta biblioteca scFvs, ligantes ao antígeno CD3.

## 2- Objetivos

### 2.1 - Objetivo Geral

◆ Seleção de fragmentos de anticorpos no formato scFv de alta afinidade contra o antígeno CD3 por meio do *shuffling* da cadeia variável leve (VL), usando bibliotecas de sequências codificadoras de VLs humanos apresentadas na superfície de fagos.

### 2.2 - Etapas Metodológicas

◆ Clonagem do inserto que codifica o scFV anti-CD3 do vetor pCIgRM no fagomídio pCIg316 Z22.

◆ Construção dos iniciadores para amplificação por PCR dos genes da cadeia leve (VL).

◆ Padronização das condições da PCR para amplificação dos genes VL.

◆ Construção da biblioteca dos genes VL de pacientes

◆ Expressão do antígeno CD3 $\epsilon\gamma$  recombinante em bactéria.

◆ Seleção de novos Ac anti-CD3 apresentados em fagos.

### 3 – Materiais e Métodos

#### 3.1 – Materiais

##### 3.1.1 – Linhagens Bacterianas

- **XL1-Blue (Stratagene<sup>®</sup>)** → *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZ M15Tn10* (Tet<sup>R</sup>)] (Sambrook *et al.*, 1989).

- **BL21 (DE3) (Stratagene<sup>®</sup>)** → *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal* λ(DE3).

- **BL21 (DE3) pLysE (Stratagene<sup>®</sup>)** → F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* λ(DE3)pLysE.

- **BL21 (DE3) pLysS (Stratagene<sup>®</sup>)** → *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS* (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal* λ(DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>].

##### 3.1.2 - Plasmídios Utilizados

- **pGEM-T EASY** – 3,015kB, promotores T7 e Sp6, ori ColE1, ori f1, Amp<sup>R</sup>, múltiplos sítios de clonagem, contendo resíduos de deoxitimidil desparrados, adicionados nas extremidades geradas pela digestão com a endonuclease *EcoR* V (Promega<sup>®</sup>, n.º. cat. A 1360). Utilizado para clonagem de fragmentos de PCR.

- **pCIg 316 RM** – 5241 pb, VH-linker-VL-His anti-CD3 (scFv conjugado a uma cauda de histidina), múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp<sup>R</sup>. Utilizado para a construção dos fragmentos scFvs. Este plasmídio foi construído a partir do pCIg 316 z22 (Maranhão, 2001) e do pCIg RM anti-CD3.

- **pGS-21a (SD0121)** – Maiores informações no endereço [www.genscript.com](http://www.genscript.com).

### 3.1.3 - Meios de cultura

#### **Meio LB (*Luria-Bertani*)**

Peptona de caseína      1,0% (p/v)

Extrato de levedura      0,5% (p/v)

NaCl                      1,0% (p/v)

Ajustar pH para 7,0.

#### **Meio LB ágar**

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

#### **Meio SB (*Super Broth*)**

Peptona de caseína      3,0% (p/v)

Extrato de levedura      2,0% (p/v)

MOPS                      1,0% (p/v)

Ajustar pH para 7,0.

#### **Meio SOB**

Bacto-triptona            2,0% (p/v)

Extrato de levedura      0,5% (p/v)

NaCl                      0,06% (p/v)

KCl                        0,002% (p/v)

Ajustar pH para 7,0.

#### **Meio SOC**

Meio SOB                      98mL

Solução estoque de Mg<sup>2+</sup> 2M      1mL

Solução estoque de glicose 2M      1mL

#### **Solução estoque de glicose 2M**

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

**Solução estoque de Mg 2M**MgCl<sub>2</sub> 1MMgSO<sub>4</sub> 1M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. A seguir adicionava-se, quando necessário, o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina, na concentração final de 100 µg/mL ou 200 µg/mL no caso de eletroporação, ou carbenicilina 100 µg/mL e tetraciclina 50 µg/mL para as células infectadas por fagos.

## 3.1.4 - Soluções e tampões de uso geral

**Azida Sódica – Solução estoque 100X**

Azida sódica 5% (p/v)

Esta solução era utilizada para a conservação dos tampões PBS e PBST e nas soluções estoque dos anticorpos em concentração final de 0,05%.

**Tampão TE**

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

**Glicerol – Solução estoque**

Glicerol 50% (v/v)

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

NaCl 1,37M

KCl 27mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM**Tampão PBST 1X, pH 7,4**

PBS 1X acrescido de Tween 20 na concentração final de 0,5% (v/v)

**IPTG 0,1M**

Solução estoque a 0,1M

Dissolvido em H<sub>2</sub>O e estocado a 4°C ao abrigo da luz.

**X-GAL**

Solução estoque 20mg/ml

Dissolvido em N,N,dimetil formamida e estocado a 4°C ao abrigo da luz.

**3.1.5 – Soluções para preparo de células competentes****Glicerol 10% (v/v)**

Esterilizado por filtração ou autoclavagem e estocada a 4°C

**3.1.6 - Soluções para extração de DNA plasmidial****Solução I**

Tris-HCl pH 8,0      25mM

EDTA pH 8,0        10mM

Glicose                50mM

**Solução II**

NaOH                0,2M

SDS                 1,0% (p/v)

**Solução III**

Acetato de potássio    3M

Ácido Acético        2M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

**RNase A**

RNase A Invitrogen, número de catálogo 12091-021.

**Clorofane**

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

**Clorofil**

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

## 3.1.7 – Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

**Tampão de corrida TEB 10X**

Trizma base	0,89M
Ácido Bórico	0,89M
EDTA	0,02M
pH 8,0	

**Tampão de amostra para gel de agarose 10X**

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

**Solução de brometo de etídio 20.000X**

Brometo de etídeo	10mg/ml
-------------------	---------

**Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X**

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

**Tampão de amostra 2X para SDS-PAGE**

Tris-HCl pH 6,8	62,50mM
SDS	5% (p/v)
Glicerol	25% (v/v)
β-mercaptoetanol	5% (v/v)
Azul de bromofenol	0,01% (p/v)

**Acrilamida 30% (29:1)**

Acrilamida	145g
Bis-acrilamida	5g
H <sub>2</sub> O q.s.p.	500mL

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris	36,34g
H <sub>2</sub> O q.s.p.	200mL

pH ajustado para 8,8 com HCl.

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

Tris	12,11g
H <sub>2</sub> O q.s.p.	200mL

pH ajustado para 6,8 com HCl.

**SDS 10%**

SDS	10g
H <sub>2</sub> O q.s.p.	100mL

**APS 10% (p/v)**

Persulfato de amônio 100mg/mL de água

**Gel Concentrador SDS-PAGE**

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

**Gel Separador SDS-PAGE**

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	12% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

3.1.8 - Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, *Western*, e *Dot blotting*)

**Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)**

Tris-HCl pH 9,5	100mM
NaCl	100mM
MgCl <sub>2</sub>	5mM

**Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas**

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

**Solução de Bloqueio**

Leite em pó desnatado Molico 5% (p/v) ou BSA 5%  
Dissolvido em PBS 1X

**Solução Reveladora para ELISA**

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

Dissolvido em APB

**Solução Reveladora para Western e Dot blotting (n°. cat. 00-2209  
Zymed/Invitrogen)**

**Membrana de Nitrocelulose**Hybond-C Extra Amersham Bioscience<sup>®</sup> (n°. cat. RPN 303E)

3.1.9 – Oligonucleotídeos sintéticos específicos

**Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.**

<b>Oligo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Utilização</b>
5' VL <i>Bgl</i> II	5' <b>AGATCT</b> GGCGGCCGAGCTC 3'	Para amplificação da extremidade 5' das cadeias VL humanas criando sítio de <i>Bgl</i> II
3' VL <i>Nco</i> I	5' <b>CCATGG</b> AAGACAGATGGTGCAGCCACAGT 3'	Para amplificação da extremidade 3' da cadeia VL murina criando sítio de <i>Nco</i> I

3.1.10 - Resinas cromatográficas

- HisTrap<sup>™</sup> FF 1mL (GE Healthcare, n°. cat. 17-5247-01). Para purificação do CD3 solúvel.

### 3.1.11 – Soluções para cromatografia

#### **Tampão de Ligação HisTrap FF**

20 mM fosfato de sódio

0.5 M NaCl

30 mM imidazol

pH 7.4

#### **Tampão de Eluição HisTrap FF**

20 mM fosfato de sódio

0.5 M NaCl

500 mM imidazol

pH 7.4

### 3.1.12 – Materiais utilizados para concentração e quantificação de proteínas purificadas

- Concentradores Amicon<sup>®</sup> Bioseparations:

Centricon YM-30 (nº. cat. 4208)

Centriprep YM-10 (nº. cat. 4305)

- Kit BCA – Ácido Bicinrônico Pierce<sup>®</sup> (nº. cat. 23225)

### 3.1.13 – Marcadores para DNA e proteína

- 1Kb plus DNA Ladder – Invitrogen (nº. cat. 10787-026)

- Low Mass DNA Ladder – Para quantificação de DNA de baixa massa molecular -  
Invitrogen (nº. cat. 10068-013)

- High Mass DNA Ladder Para quantificação de DNA de alta massa molecular -  
Invitrogen (nº. cat. 10496-016)

- Page Ruler<sup>™</sup> Prestained Protein Ladder Plus – Fermentas (nº. cat. SM1811)

- Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas (nº. cat. SM0431)

### 3.1.14 - Enzimas

- Enzimas de restrição: Todas as enzimas de restrição utilizadas, como *Xma* I, *Xba* I, *Bgl* II, *Nco* I, *EcoR* I e *Pst* I, utilizadas foram das empresas Biolabs ou Fermentas *Fast Digest*, juntamente com seus tampões de reação 10X e BSA 10X, e usadas conforme instrução do fabricante.

- T4 DNA Ligase – Invitrogen (nº. cat. 15224-017) e Promega (nº. cat. M 1801).

- Taq DNA Polimerase – CENBIOT.

### 3.1.15 – Anticorpos

**Tabela 3. Anticorpos utilizados.**

Nome	Produzido em:	Titulação Imunoblottings	Titulação ELISAS	Origem	Nº Catálogo
Anti-IgG Ovelha (Ap)*	Jumento	-	1:1.000	Santa Cruz®	sc-2474
Anti-Fc humano (AP)*	Coelho	1:1.000	1:5.000	Pierce®	31142
Anti-IgG camundongo(AP)*	Cabra	1:5.000	1:5.000	Pierce®	31160
UCHT-FITC	Hibridoma	-	Diversas [ ]	eBiosciences	11-0038
FvFc anti-CD3	CHO	-	Diversas [ ]	(Silva, 2008)	-
OKT3-FITC	Hibridoma	-	Diversas [ ]	eBiosciences	11-0037
Anti-M13	Ovelha	-	1:1.000	Pharmacia Biotech	27-9410-01

NA: Não se aplica.

\* AP: Anticorpo conjugado a fosfatase alcalina.

### 3.1.16 – Kits comerciais

- pGEM-T EASY vector – Para clonagem dos fragmentos de PCR oriundos das ampliações feitas nas cadeias variáveis murinas (VH e VL) para inserção dos sítios de restrição (Promega, nº. cat. A 1360).

- QIAGEN Plasmid Mini Kit 100 – Para preparação de DNA em pequena escala (Qiagen, n°. cat. 27106).
- QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação de DNA em escala intermediária (Qiagen, n°. cat. 12145).
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25 – Para preparação de DNA em larga escala (Qiagen, n°. cat. 12163).
- PROMEGA Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System – Para preparação de DNA em pequena escala (Promega, n°. cat. A1460).
- Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen, n°. cat. 28704).
- Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para sequenciamento (Qiagen, n°. cat. 28104).
- PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE Healthcare, n°. cat. 17-1150-01).
- Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore, n°. cat. 42600).
- Kit BCA – Ácido Bicíntrico (Pierce<sup>®</sup>) para quantificação de proteínas. (n°. cat. 23225).

### **3.2 – Métodos**

3.2.1 – Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

1- Coletavam-se 3,0mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (100µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em tubos “eppendorfs”, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.

2- Ressuspendia-se o sedimento em 200µL de Solução I. Incubavam-se as amostras no gelo por 5 min.

3- Adicionavam-se 400µL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.

4- Adicionavam-se 300µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 10 min.

4- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

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

6- Adicionava-se 1/2v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 10.000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

7- Adicionava-se 1/2v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.

8- O DNA era então precipitado com 2,5v de etanol 100% por, no mínimo 2 horas a -20°C.

9- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.

10- Adicionavam-se 200µL de etanol 70% e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

11- Após secagem o sedimento era ressuspendido em 40µL de TE. E as amostras conservadas a 4°C.

### 3.2.2 – Digestão de DNA com enzimas de restrição.

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

### 3.2.3 – Análise de DNA em gel de agarose (segundo Sambrook *et al.*, 1989).

A agarose era preparada de 0,8 a 1,0% em tampão TEB 1X com 0,5µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose eram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese em tampão TEB 0,5X, como descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador (Pharmacia-LKB) e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação (*Video Graphic Printer UP-895 CE*, Sony®).

### 3.2.4 – Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

Os fragmentos de DNA a serem eluídos eram cortados do gel de agarose após eletroforese. A eluição do DNA do gel era feita de acordo com as instruções do fabricante do kit utilizado (Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen) ou submetido a *Freeze-Squeeze*. No *freeze-squeeze* o fragmento de gel, contendo o DNA de interesse era congelado e após ser macerado era transferido para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore). Após a centrifugação o DNA era precipitado com acetato de sódio 0,3M e 2,5v etanol 100% a -20°C overnight.

### 3.2.5 – Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor:inserir) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente numa razão molar de 1:2, 1:3, 1:5 (ligações simples) ou 1:7 (na ligação da biblioteca). A reação de ligação era realizada de acordo com instrução do fabricante da T4 DNA Ligase utilizada. E após incubação, em geral de 16 horas a 4°C, eram usados para transformar células de *E. coli*.

### 3.2.6 – Preparação de células competentes e transformação bacteriana

3.2.6.1 – Por choque térmico – CaCl<sub>2</sub> (adaptado de Maranhão in Azevedo *et al.*, 2003).

1- Inoculavam-se 500µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD<sub>600nm</sub>) de 0,1 a 0,3.

2- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.

3- O sedimento era ressuspenso em 10mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.

4- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.

5- O sedimento era ressuspenso em 1mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.

6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram aliqotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.

7- Incubavam-se de 100 a 200µL de célula competente com o DNA de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.

8- Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.

9- Adicionava-se imediatamente 1mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C.

10- Semeavam-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 100µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

#### 3.2.6.2 – Por eletroporação (adaptado de Maranhão *et al.*, 2003).

1- Inoculava-se uma colônia isolada da célula de interesse em 10mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.

2- Inoculava-se 1mL do pré-inóculo em 500mL de meio SB acrescido de 2,5mL da solução estoque de Glicose 2M e 2,5mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD<sub>600nm</sub> de 0,7 a 0,9.

2- Centrifugava-se a 3.000 x g por 20 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante e mantendo sempre a célula gelada a partir desse momento.

3- O sedimento era ressuscitado em 25mL de Glicerol 10% estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de Glicerol 10% gelado.

4- Centrifugava-se a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo-se a etapa anterior.

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

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

#### 3.2.7 – Amplificação das sequências variáveis humanas – PCR

As reações de PCR eram feitas da seguinte forma:

DNA molde (Biblioteca de Fabs clonadas no pComb3XSS)	200ng
Taq DNA polimerase CENBIOT (5u/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Primer 5' (tabela 2)	0,6 $\mu$ M
Primer 3' (tabela2)	0,6 $\mu$ M
Tampão de reação da enzima 10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	3mM
dNTPs	0,25mM de cada

O volume final de reação era de 50 $\mu$ L e a reação era feita no termociclador Eppendorf ou Techne nas seguintes condições:

1)	94°C	3 min (em seguida era adicionada a enzima)
2) ciclos: 5	94°C	1 min
	42°C	2 min
	72°C	2 min
3) ciclos: 40	94°C	1 min
	57°C	2 min
	72°C	2 min
4) Extensão final	72°C	10 min
5) Hold	4°C	$\infty$

### 3.2.8 – Expressão da proteína recombinante (CD3) em *E. coli*.

1- Inoculavam-se 100 mL de meio LB contendo 100 $\mu$ g/mL de ampicilina com 100 $\mu$ L do pré-inóculo (células transformadas segundo o protocolo 3.2.6.1) e incubava-se a 37°C a 250rpm.

2- Checava-se periodicamente a OD<sub>600nm</sub> da cultura até que chegasse a 0,5 – 0,6.

3- Separava-se 1mL da cultura como o controle não-induzido.

4- Induzia-se a cultura com IPTG na concentração final de 1mM

5- Crescia-se a cultura a 37°C por 3 horas

6- Coletavam-se as células por centrifugação a 3000 x g a 4°C por 10 min, removiam-se e descartava-se o sobrenadante. Ressuspendiam-se as células em 6 mL de PBS gelado

e centrifugava-se a 3000 x g a 4°C por 10 min. Removia-se e descartava-se o sobrenadante.

7- Congelava-se o sedimento de células a -80°C por 1 hora (ponto opcional de parada)

8- Descongelava-se o sedimento em gelo e ressuspensava-se em 6 mL de PBS gelado adicionado de NP-40 na concentração final de 1%.

9- Lisavam-se as células por breves pulsos de sonicação no gelo até que a amostra perdesse a viscosidade.

10- Centrifugava-se a 12.000 x g a 4°C por 10 min e cuidadosamente transferia-se o sobrenadante (fração solúvel) para um tubo pré-resfriado e o sedimento (fração insolúvel) era ressuspensado em 6mL de PBS gelado.

### 3.2.9 – Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE

(adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

Após a expressão e purificação, as amostras de CD3 recombinante eram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida.

1- Inicialmente preparava-se o gel separador em concentração de 12% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.

2- Após a polimerização do gel separador, vertia-se o gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v), tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.

3- Uma vez vertido o gel concentrador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços. E uma vez polimerizado o gel era acoplado ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços eram lavados com tampão de corrida.

4- Imediatamente antes da aplicação das amostras, procedia-se à fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.

5- Após a corrida do gel, de 50 a 80mA, o mesmo era submetido aos procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250) ou prata, especificados respectivamente no item 4.2.14 de métodos.

### 3.2.10 – Coloração do gel de SDS-PAGE com prata

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

### 3.2.11 – Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®) – CD3

A purificação foi feita de acordo com o protocolo n° 11-0008-88 AE fornecido pelo fabricante (GE Healthcare®).

### 3.2.12 – Análise de proteínas por *Dot Blotting* (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

Para monitoramento do procedimento de purificação, adicionavam-se de 5 a 10 µL das frações protéicas obtidos diretamente a uma membrana de nitrocelulose. Com a membrana seca, contendo as proteínas ligadas, era realizado o mesmo procedimento de bloqueio e revelação descrito para o experimento de *Western Blotting* (4.2.15).

### 3.2.13 – Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA

Para quantificação das proteínas purificadas utilizou-se o kit – Ácido Bicíntrico (Pierce®). Para se obter a curva-padrão eram utilizadas diferentes concentrações de BSA, utilizado conforme instruções do fabricante.

1- Adicionavam-se 100 µL de cada padrão diluído (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL de BSA) e da amostra a ser quantificada em placas de microtitulação, tudo em triplicata.

2- A essas amostras adicionavam-se 2mL de reagente WR presente no kit em cada. Incubava-se a placa por 1 hora a 37°C.

3- Após essa incubação determinava-se a absorbância a 450nm utilizando-se PBS 1X como branco.

A partir desses dados eram feitos os cálculos e a curva-padrão de BSA, a partir da qual podia-se estimar a concentração das proteínas recombinantes purificadas.

### 3.2.14 – Avaliação do antígeno recombinante por imuno ensaio (ELISA -*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Foram realizados ensaios do tipo ELISA e *Phage*-ELISA de ligação direta, usando-se como antígeno a proteína recombinante. Após cada lavagem as placas de microtitulação (Nunc) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções e todos eram revelados com pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1mg/mL dissolvido em APB, 100µL por poço e a revelação era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*”<sup>®</sup> modelo 450 a um comprimento de onda de 405nm. Os anticorpos utilizados estão detalhados na Tabela 3.

1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com o antígeno (CD3 recombinante), 100ng por poço, durante 1 hora a 37°C.

2- Lavava-se 3X com PBST 1X, 120µL por poço.

3- Bloqueava-se com BSA 5%, 150µL por poço, durante 1 hora a 37°C ou durante a noite a 4°C.

4- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com os anticorpos de interesse, FvFc humanizado anti-CD3 (Silva, 2008), OKT3-FITC (eBiosciences) e UCHT (eBiosciences) nas seguintes concentrações: 15 / 7.5 / 3.75 / 1.87 / 0.93 / 0.46 / 0.23 / 0.11 µg/mL . Nesta etapa os poços controle eram incubados com PBS 1X. Tudo era feito em diluições seriadas e em triplicatas. Incubava-se por 1 hora a 37°C.

5- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina 1:1.000 para o FvFc humanizado e com o anticorpo anti-Mouse conjugado a fosfatase alcalina 1:1.000 para OKT3 e UCHT por 1 hora a 37°C.

6- Lavava-se 3X com PBST 1X e 1x com tampão para fosfatase alcalina (APB) e procedia-se com a revelação.

### 3.2.15 – Seleção da biblioteca

#### 3.2.15.1 – Preparação do Fago Auxiliar

Segundo Rader *et al.*, 2000.

#### 3.2.15.2 – Obtenção de Placas de Lise

Inoculavam-se 2  $\mu\text{L}$  de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes (preparadas de acordo com o protocolo 4.2.6.2) em 2mL de meio SB contendo tetraciclina a uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubava-se a 37°C por cerca de 1 hora em agitador a 250 rpm.

Paralelamente, preparavam-se diluições do fago auxiliar VCSM13 da ordem de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>. Em seguida 1 $\mu\text{L}$  de cada uma destas diluições do fago era utilizada para infectar alíquotas de 50 $\mu\text{L}$  da cultura de XL1-Blue. Após incubação por 15 min a temperatura ambiente adicionava-se os 50 $\mu\text{L}$  de células a 3mL de meio LB top Agar liquefeito (45-50°C), misturava-se em seguida o tubo por inversão e, posteriormente espalhava-se em placas pré-aquecidas de meio LB ágar. As placas eram incubadas a 37°C durante a noite. Após esse período eram observadas placas de lise (colônias de bactérias com retardo no crescimento devido à infecção pelo fago (VCSM13).

#### 3.2.15.3 – Amplificação de Placas de Lise

Em um tubo tipo Falcon de 50mL contendo 10mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, acrescido de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina foram inoculados 10  $\mu\text{L}$  de XL1- Blue eletrocompetente. A cultura foi incubada a 37°C por 1 hora sob agitação (250 rpm). Com o auxílio de uma ponteira estéril, transferiu-se uma placa de lise, obtida no procedimento anterior, para a cultura de XL1-Blue, seguido de incubação nas mesmas condições por 2 horas. Após este período, a cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, acrescido de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tetraciclina e 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de kanamicina. Após homogeneização metade da cultura foi transferida para outro Erlenmeyer de 1 L e ambos os frascos foram incubados a 37°C durante a noite sob agitação de 250 rpm.

Na manhã seguinte a cultura foi transferida para dez tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugada a 2.500 x g por 15 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos que foram incubados a 70°C por 20 min, com o objetivo de eliminar células ainda presentes na cultura. Em seguida, as amostras foram centrifugadas novamente a 2.500 x g por 15 min e os sobrenadantes transferidos para novos tubos e estocados a 4°C.

#### 3.2.15.4 – Determinação do Título da Preparação de Fagos Auxiliares

O título do fago foi obtido em um procedimento de infecção de cultura de células XL1-Blue como descrito para a obtenção de placas de lise (protocolo 4.2.22.1.1). Após a incubação durante a noite, o título foi determinado pela contagem do número de placas de lise presentes multiplicados pela diluição do fago.

#### 3.2.15.5 – Ligação da Biblioteca de seqüências codificadoras de VLs no vetor pCIg 316 RM

1- Para ligação preparou-se a seguinte reação:

pCIg 316 RM digerido com <i>Bgl</i> II e <i>Nco</i> I	1000 ng
seqüências codificadoras de VLs amplificadas por PCR	500 ng
T4 DNA ligase	10 µL
Tampão de ligase 5X	40 µL
H <sub>2</sub> O milliQ q.s.p.	200 µL

2- A ligação foi incubada durante a noite a 4°C. Na manhã seguinte foi precipitada com a adição de 3 µL de glicogênio (20 mg/mL), 20 µL de acetato de sódio 3M e 440 µL de etanol absoluto gelado e em seguida incubada a - 80°C durante a noite.

3- Em seguida a biblioteca precipitada foi centrifugada a 14.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70%(v/v), seco e ressuspenso em 15 µL de água milliQ.

4- Foi então dividido este volume em cinco partes de 3 µL e cada uma incubada com uma alíquota de XL1-Blue eletrocompetente (150 µL) durante 1 min.

5- Em seguida cada alíquota foi transferida para uma cubeta. As células foram então submetidas à eletroporação nas seguintes condições: voltagem de 2,5 kV, 25µF de capacitância e 200 Ω de resistência, gerando pulsos de cerca de 4 a 5 mili segundos de duração.

6- Imediatamente após, adicionou-se 1 mL de meio SOC à cubeta, repetindo-se este processo por mais duas vezes, o mesmo foi feito com as 5 cubetas, o total de 15 mL de meio com as células transformadas obtido foi colocado em um tubo plástico (50 mL) do tipo Falcon e incubado a 37°C sob a agitação de 250 rpm por 1 hora.

7- Inoculou-se 100 / 10 / 1 e 0,1 µL em meio LB ágar em placa de petri adicionado de carbenicilina e tetraciclina na concentração final de 25 e 5 µg/mL respectivamente para no dia seguinte ser determinada a eficiência da transformação. E paralelamente foram também incubados em placa de petri contendo os antibióticos nas mesmas concentrações os controles negativos da ligação (1:0 com ligase e 1:0 sem ligase)

8- Ao restante da cultura foram adicionados 3 µL de carbenicilina (100mg/mL) e 7,5 µL de tetraciclina (20 mg/mL). Os 15 mL de cultura foram incubados por 1 hora a 37°C/250 rpm, em seguida foram adicionados mais 4,5 µL de carbenicilina e a cultura incubada por mais 1 hora nas mesmas condições.

9- Os 15 mL de cultura foram então transferidos para um Erlenmeyer de 1L e a esses foram adicionados 2 mL de fago auxiliar VCSM13 ( $10^{12}$  a  $10^{13}$  pfu/mL) e 183 mL de meio SB pré-aquecido a 37°C, contendo 92,5 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 92,5 µL de tetraciclina (20 mg/mL)

10- A cultura de 200 mL foi incubada em agitador por 1,5 – 2 horas, a 37°C/300 rpm.

11- Adicionou-se 140 µL de kanamicina (50 mg/mL) e a agitação, nas condições descritas no passo anterior, foi mantida durante a noite.

12- A cultura crescida durante a noite foi submetida a uma centrifugação a 3.000 x g por 15 min a 4°C. O sedimento foi estocado para futuras preparações plasmidiais.

13- Ao sobrenadane foram adicionados 8g, isto é 4% (p/v) de PEG 8.000 (polietilenoglicol) e 6g, ou seja 3% (p/v), de cloreto de sódio. A fase sólida foi dissolvida por agitação a 250 rpm por 5 min a 37°C. Em seguida o sobrenadante foi incubado no gelo por 30 min.

14- Os fagos foram coletados por centrifugação a 15.000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa deixada invertida sobre papel toalha por pelo menos 10 min para garantir a secagem do sedimento.

15- Após este tempo as proximidades da boca da garrafa foram enxugadas com papel toalha e o sedimento ressuspendido em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v), e adicionado de azida sódica na concentração final de 0,02% e estocado a 4°C.

### 3.2.15.6 – Seleção da biblioteca de VLs ligantes ao antígeno CD3 recombinante adsorvido em placa de microtitulação

1- Sensibilizaram-se dois poços da placa de microtitulação com 1 µg de proteína (CD3) em TBS/BSA 1% (p/v) num volume final de 100 µL por poço e incubou-se por 1 hora a 37°C.

2- Descartou-se esta solução e incubou-se a solução de bloqueio (TBS/BSA 3%) por 1 hora a 37°C.

3- Descartou-se a solução de bloqueio e colocaram-se-se 100 µL dos fagos obtidos no protocolo anterior (fagos de entrada) e incubou-se por 2 horas. Paralelamente foram inoculados 10 µL de XL1-Blue eletrocompetente em 10mL de meio SB adicionado de 5 µL de tetraciclina (20mg/mL) e incubou-se por 1 – 1.5 horas, até a  $OD_{600nm} = 0.7$ .

4- Descartaram-se os fagos e adicionaram-se 150 µL de 0,5% (v/v) Tween 20 em TBS em cada poço, pipetou-se 5 vezes vigorosamente.. Esperou-se 5 min, descartou-se esta solução e repetiu-se este ciclo de lavagem por 5 vezes no primeiro *round* , e por 10 vezes nos *rounds* subsequentes.

5- Após o último ciclo de lavagem, adicionaram-se 100 µL do tampão de eluição ácida (100 mM glicina-HCl, pH 2,2).Incubou-se por 10 min a temperatura ambiente, pipetou-se 10 vezes vigorosamente e transferiram-se os fagos eluídos para tubos de microcentrífuga contendo 6 µL da solução neutralizante (2 M Tris). Em seguida adicionaram-se os 100 µL de fagos eluídos à cultura de *E. coli* crescida no passo 3 e incubou-se a temperatura ambiente por 15 min.

6- Adicionaram-se 6 mL de meio SB pré-aquecido (37°C) e 1,6 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 3 µL de tetraciclina (20 mg/mL). Nesta etapa foram inoculadas, em meio LB ágar + carbenicilina/tetraciclina, diluições desta cultura para serem determinados os títulos dos fagos de saída. Paralelamente, foram também inoculadas, em LB ágar + carbenicilina/tetraciclina, diluições de uma cultura infectada por 15 min pelos fagos de entrada para serem determinados seus títulos. Incubaram-se os 8 mL de cultura por 1 hora a 37°C/250 rpm, adicionaram-se 2,4 µL de carbenicilina (100 mg/mL), e incubou-se nas mesmas condições anteriores.

7- Adicionou-se 1 mL do fago auxiliar VCSM13 ( $10^{12}$  a  $10^{13}$  pfu/mL) aos 8 mL de cultura e transferiu-se a mesma para um Erlenmeyer de 1.000mL. Adicionaram-se 91 mL de SB pré-aquecido (37°C) contendo 46 µL de carbenicilina (100 mg/mL) e 46 µL

de tetraciclina (20 mg/mL). Incubaram-se os 100 mL de cultura por 1.5 – 2 horas a 37°C/300 rpm.

8- Adicionaram-se 140 µL de kanamicina (50 mg/mL), e incubou-se durante a noite a 37°C/300 rpm.

9- Na manhã seguinte centrifugou-se a cultura a 3.000 x g por 15 min a 4°C. O sedimento foi reservado para futuras extrações de DNA. O sobrenadante foi transferido para uma garrafa de centrífuga (500 mL) e adicionou-se 4 g de PEG-8000 (4% [p/v]) e 3 g cloreto de sódio (3% [p/v]). Para dissolver a fase sólida incubou-se a garrafa por 5 min a 37°C/300 rpm. Incubou-se no gelo por 30 min.

10- Centrifugou-se a precipitação a 15.000 x g por 15 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, a garrafa foi colocada invertida sobre uma toalha de papel por no mínimo 10 min e com o auxílio da toalha de papel retirou-se o excesso remanescente de líquido da boca da garrafa.

11- O fagos precipitados foram então ressuspensos em 2 mL de TBS/BSA 1% (p/v).

12- Estes passos foram executados por mais 3 vezes consecutivas originando os dados dos 4 *rounds* de seleção.

### 3.2.15.7 Phage ELISA – Análise dos fagos obtidos nos *rounds* de seleção por ELISA

1- As culturas de bactérias infectadas pelos fagos eluídos em cada ciclo da seleção foram crescidas em meio LB ágar em placa de *petri* com 100µg/mL de carbenicilina. Na manhã seguinte as colônias isoladas foram então inoculadas separadamente em 1mL de meio SB em placas do tipo *deep well* adicionado de 100 µg carbenicilina e 10 µg de tetraciclina.

2- A placa foi selada e sobre cada poço foram feitos três furos para melhorar a aeração e em seguida a placa foi incubada por 20 horas a 37°C, sob agitação de 300 rpm.

3- Na manhã seguinte 100 µL da cultura foram transferidos para outra placa do tipo *deep well* (o restante da cultura foi centrifugado por 15 min a 4000 rpm a 4°C, descartado o sobrenadante e o sedimento congelado a -80°C para futuras análises) contendo 900 µL de meio SB adicionado de 100 µg de carbenicilina e 10 µg de

tetraciclina, em seguida a placa com as 96 culturas foi incubada por 9 horas a 37°C/300 rpm.

4- Foram então adicionados 10 µL de fago auxiliar VCSM13 a cada poço e incubou-se a placa por 1.5 horas a 37°C/300 rpm.

5- Adicionou-se então 1,4 µL de kanamicina (50mg/mL) em cada poço e incubou-se a placa a 37°C/300 rpm durante a noite.

6- Na manhã seguinte a placa foi centrifugada por 15 min a 4°C/4000 rpm e 100 µL do sobrenadante de cada poço incubado por 1 hora a 37°C em uma placa de microtitulação previamente sensibilizada com o antígeno CD3 recombinante e bloqueada com uma solução 3% de BSA em PBS.

7- Incubou-se com o anticorpo anti-M13 (tabela 3) por 1 hora a 37°C.

8- Incubou-se com o anticorpo anti-IgG de ovelha conjugado à fosfatase alcalina por 1 hora.

9-Procedeu-se então a revelação.

## 4- Resultados e Discussão

### 4.1-Amplificação dos Segmentos Gênicos Codificadores de Cadeias Leves Humanas

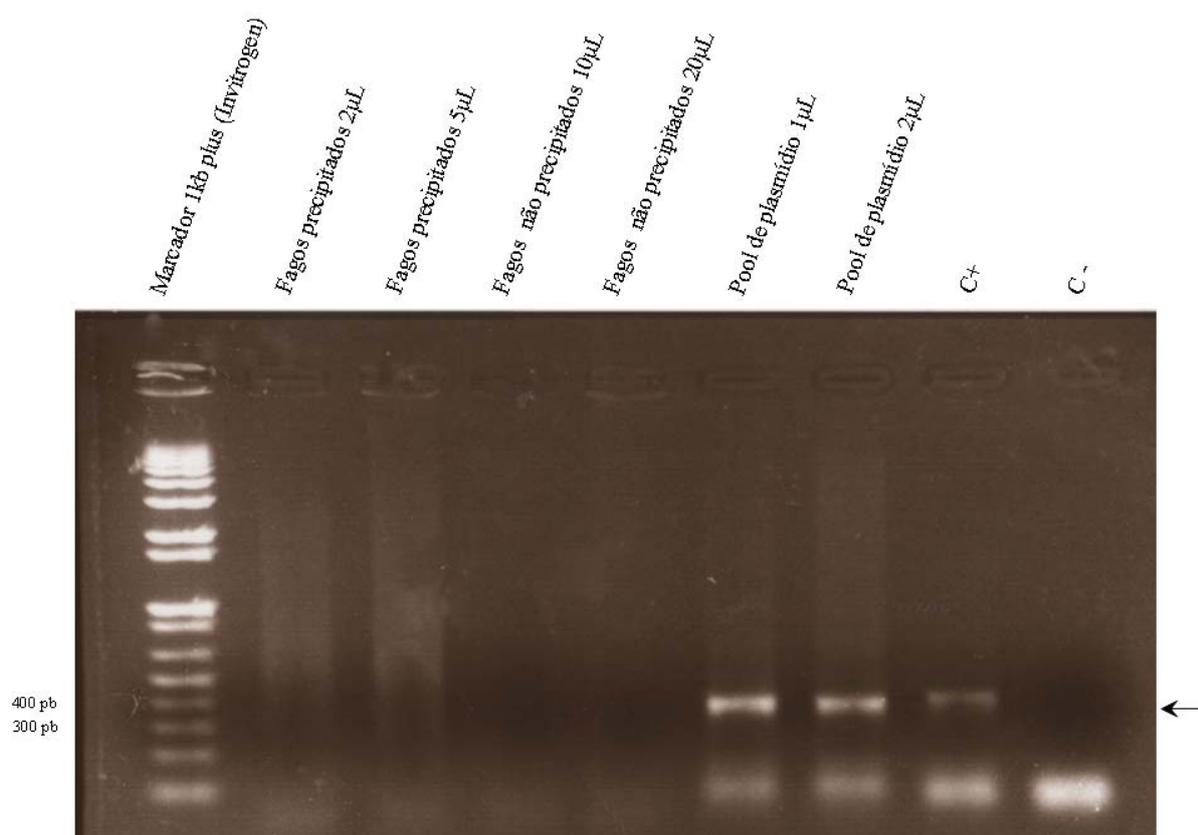
Foram desenhados oligonucleotídeos com o objetivo de amplificar os fragmentos VL a partir da biblioteca de Fab humana, previamente construída (Dantas-Barbosa, 2004) e cloná-los em vetor de apresentação em fago. Durante o processo foram inseridos sítios de clonagem (*Bgl* II e *Nco* I) flanqueando os produtos da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A amplificação ocorreu somente quando o DNA molde utilizado foi o obtido a partir da minipreparação de plasmídeos de *E. coli* infectadas com a biblioteca de fagos.

Esses fragmentos amplificados pela reação de PCR foram submetidos a uma reação de polimerização, onde o único deoxinucleotídeo adicionado foi dATP (adenilação) e então clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Doze clones foram então submetidos ao sequenciamento pelo método do dideoxi utilizando o sequenciador automático MegaBace 500Plus (GE Healthcare).

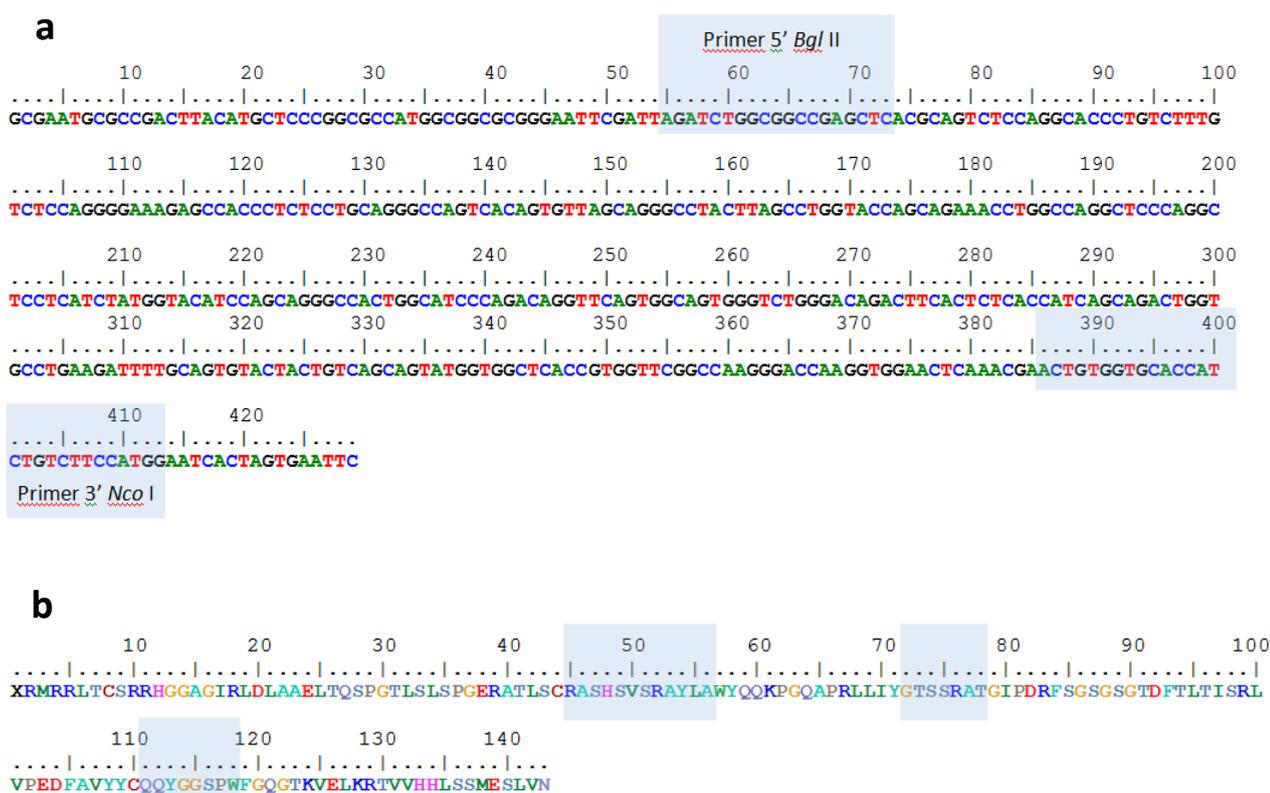
As sequências geradas foram analisadas utilizando os serviços Blastn, Blastx e Blast2seq no site do “National Center for Biotechnology Information” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e viu-se que se tratavam de sequências de VL humano.

**Tabela 4. Oligonucleotídeos sintetizados para clonagem da biblioteca de VLs no vetor pCIG 316**

Oligonucleotídeos	Sequência
5' VL <i>Bgl</i> II	5' <b>AGATCT</b> GGCGGCCGAGCTC 3'
3' VL <i>Nco</i> I	5' <b>CCATGA</b> AAGACAGATGGTGCAGCCACAGT 3'



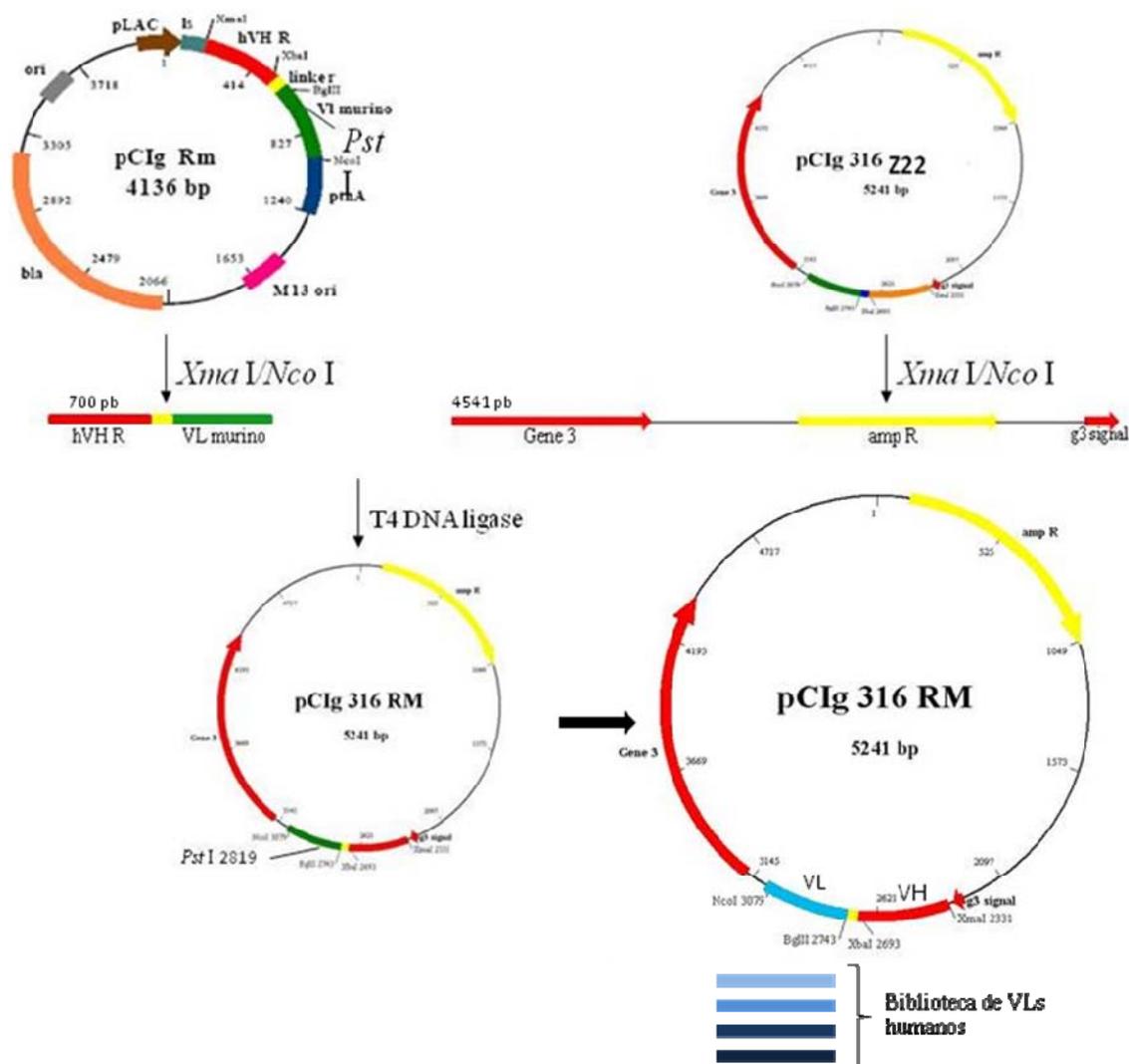
**Figura 9. Amplificação de fragmentos VL por PCR.** Biblioteca de fragmentos Fab selecionados contra osteossarcoma amplificados por PCR e analisados em gel de agarose 1%. A seta indica o fragmento de DNA esperado de tamanho aproximado de 350 pb. As diferentes amostras utilizadas como molde estão indicadas. C -, controle negativo, sem DNA molde. C+, plasmídeo contendo um Fab já clonado.



**Figura 10. Sequenciamento do clone 12.** Sequenciamento mostrando em (a) o fragmento de DNA amplificado na reação de PCR flanqueado pelos sítios de clonagem inseridos pelos oligonucleotídeos destacados em azul. E em (b) o polipeptídeo resultante com as CDRs destacadas em azul.

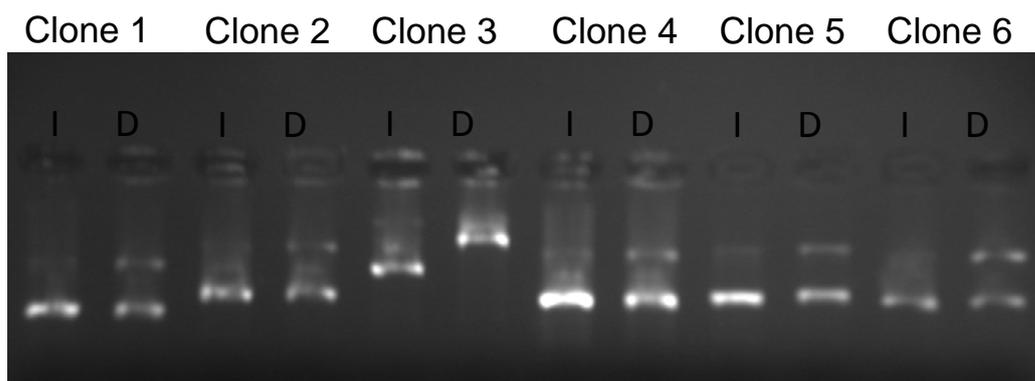
#### 4.2 – Construção do Fagomídeo pCIg 316 RM

Paralelamente foi feita a clonagem do inserto RM anti-CD3 (hVH<sup>R86</sup> humanizado versão R e VL murino) (Costa, 2004) com o objetivo de trazer o VH humanizado anti-CD3 para o fagomídeo pCIg 316 Z22 (Maranhão & Brígido, 2000). Tal clonagem é indispensável para a posterior na seleção de VLS ligantes ao CD3 recombinante. Vale salientar que, em trabalhos anteriores do grupo (Costa, 2004), foi demonstrado a eficácia da ligação deste VH em conjunto com a VL murina original no reconhecimento ao antígeno na superfície de células humanas, em níveis comparáveis ao anticorpo monoclonal murino (OKT3). Nesta clonagem, o plasmídeo pCIg Rm (4136 pb) (Fonseca, 2000) foi digerido com as enzimas de restrição *Xma* I e *Nco* I, com isso o fragmento de 700pb liberado na digestão foi eluído em gel de eluição 0,8%. Procedeu-se então, a mesma digestão (*Xma* I e *Nco* I) com o plasmídeo pCIg 316 Z22, e em gel de eluição 0,7% foi eluído o fragmento desejado de 4541 pb (Figura 11).



**Figura 11. Estratégia de clonagem.** Figura esquemática da clonagem da sequência codificadora do scFv anti-CD3 do plasmídeo pCIg RM no vetor pCIg 316, em seguida a clonagem da biblioteca de VLs humanos no plasmídeo pCIg 316 RM em *Bgl* II e *Nco* I no lugar do VL murino. Amp R – gene de resistência a ampicilina. Gene 3 – sequência codificadora da proteína pIII do fago.

Como nem o vetor pCIg Rm nem o plasmídeo pCIg 316 Z22, mas apenas o inserto RM (scFv anti-CD3) possuía o sítio reconhecimento para a enzima *Pst* I procedeu-se a digestão dos clones obtidos com esta enzima, para confirmar a obtenção do plasmídeo pCIg 316 RM. Na figura 12 visualiza-se o clone 3 linearizado após a digestão com a enzima *Pst* I confirmando que o inserto RM foi clonado no vetor pCIg 316 Z22.

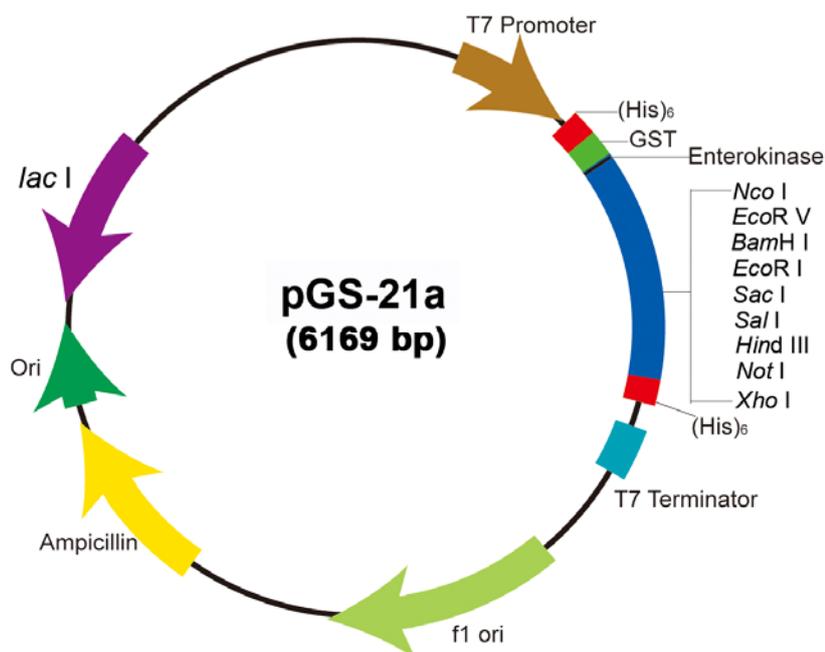


**Figura 12. Obtenção do plasmídeo pCIg 316 RM.** Digestão, com *Pst* I, de seis clones da minipreparação de plasmídeos a partir de colônias recombinantes, transformadas com o sistema de ligação (vetor pCIg 316 + inserto RM) analisados em gel de agarose 0,8%. I- intacto, D- digerido.

Agora de posse destes dados, foi feita a amplificação em larga escala dos fragmentos codificadores de VLs humanos da biblioteca construída por Dantas-Barbosa e colaboradores em 2005, foram realizadas 20 reações iguais utilizando-se como DNA molde da reação, 1  $\mu$ L do *pool* de plasmídeos (Figura 9).

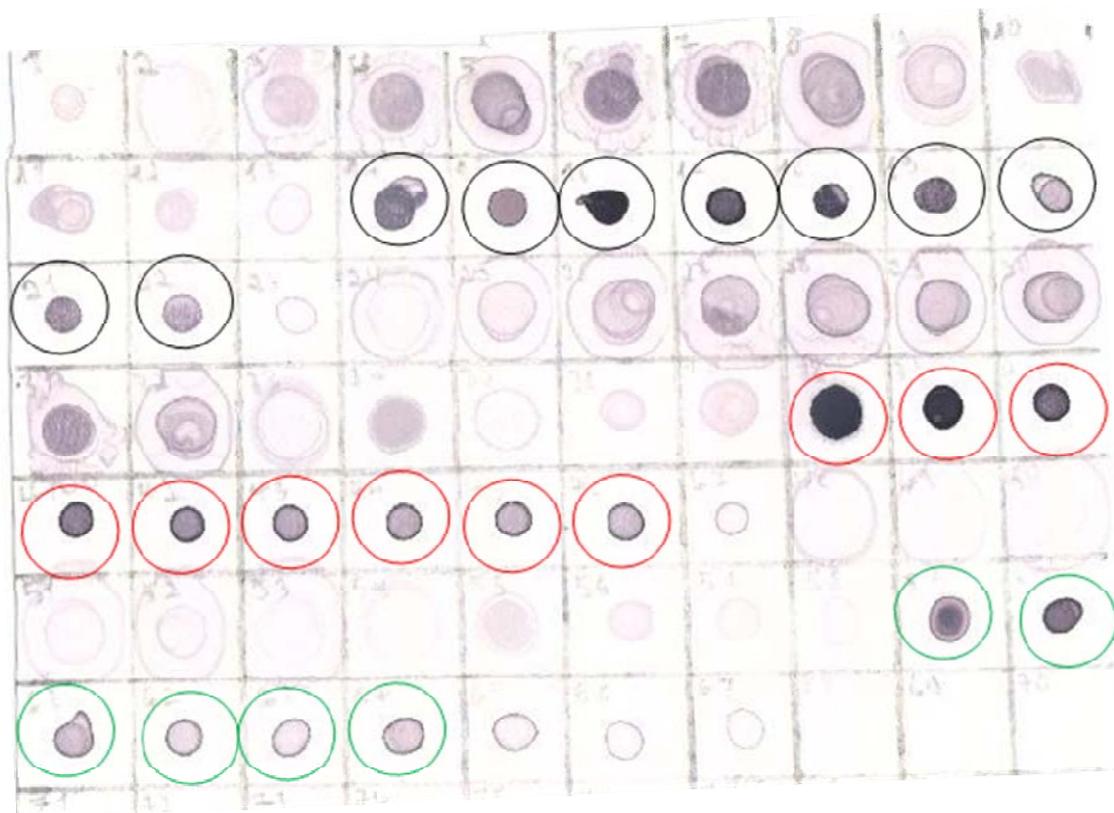
#### 4.3 – Expressão da Proteína Recombinante CD3 $\epsilon\gamma$

Para dar início à seleção de fagos, foi necessária primeiramente a expressão do antígeno CD3. A sequência de nucleotídeos codificadores do antígeno recombinante foi escolhida com base no trabalho de Kjer-Nielsen e colaboradores em 2004, esta sequência codifica um polipeptídeo de cadeia única onde as subunidades  $\epsilon$  e  $\gamma$  estão ligadas, por um conector polipeptídico com 26 resíduos de aminoácidos, que faz a junção da extremidade carboxi-terminal do CD3 $\gamma$  à extremidade amino-terminal do CD3 $\epsilon$ . A sequência foi sintetizada quimicamente e clonada em vetor de expressão pGS-21a (Figura 13) ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)). O produto de expressão é um polipeptídeo de 56 kDa fusionado a GST (Glutathione-S-Transferase) e flanqueado por duas caudas de histidina (cada uma com 6 resíduos). Esse plasmídeo foi utilizado para transformar três diferentes linhagens celulares de BL21 (DE3, pLys E, pLys S). A expressão da proteína recombinante foi procedida de acordo com o item 3.2.11, a Figura 14 mostra um *Dot Blotting* (item 3.2.13) onde as frações protéicas obtidas durante a purificação em coluna de Ni<sup>2+</sup> foram sondadas com o anticorpo anti- GST (Tabela 2), indicando a presença da proteína nas frações de eluição, assim como nas frações de lavagem, devido provavelmente a uma sobrecarga da coluna. Foram utilizadas para a purificação as frações solúveis da expressão das respectivas linhagens, e como era esperado as linhagens de BL21 (pLysE e pLysS) parecem ter expressado uma quantidade maior de proteína, provavelmente devido ao fato de possuírem a inserção do gene da lisozima T7 (figura 14).



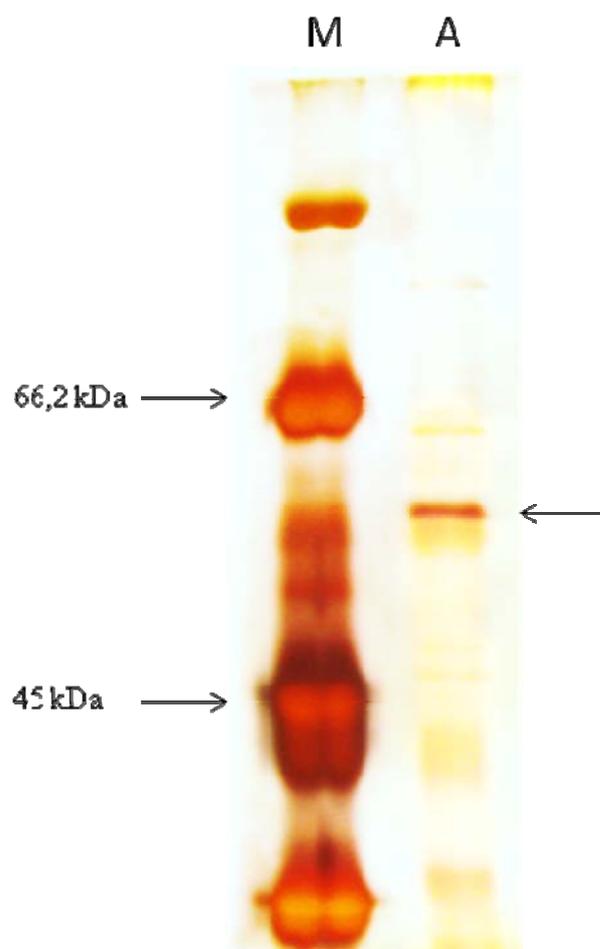
**Figura 13. Figura esquemática do vetor utilizado para expressão do antígeno recombinante.** (GenScript Corporation Catalog No.: SD0121)

As frações eluídas da coluna foram reunidas dando um volume total de aproximadamente 20 mL em seguida foram concentradas e dialisadas com o centriprep YM-10 (Amicon) segundo instruções do fabricante, ao final do procedimento obteve-se 2 mL de solução. Com o intuito de retirar da amostra possíveis artefatos da purificação, foi realizada outra diálise com o auxílio do centricon YM-30 (Amicon) após este procedimento foram obtidos 1,5 mL de solução na concentração de 100  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  de proteína (quantificação realizada de acordo com o protocolo 3.2.13). Em seguida 10  $\mu\text{L}$  desta solução foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida para análise (Figura 15).

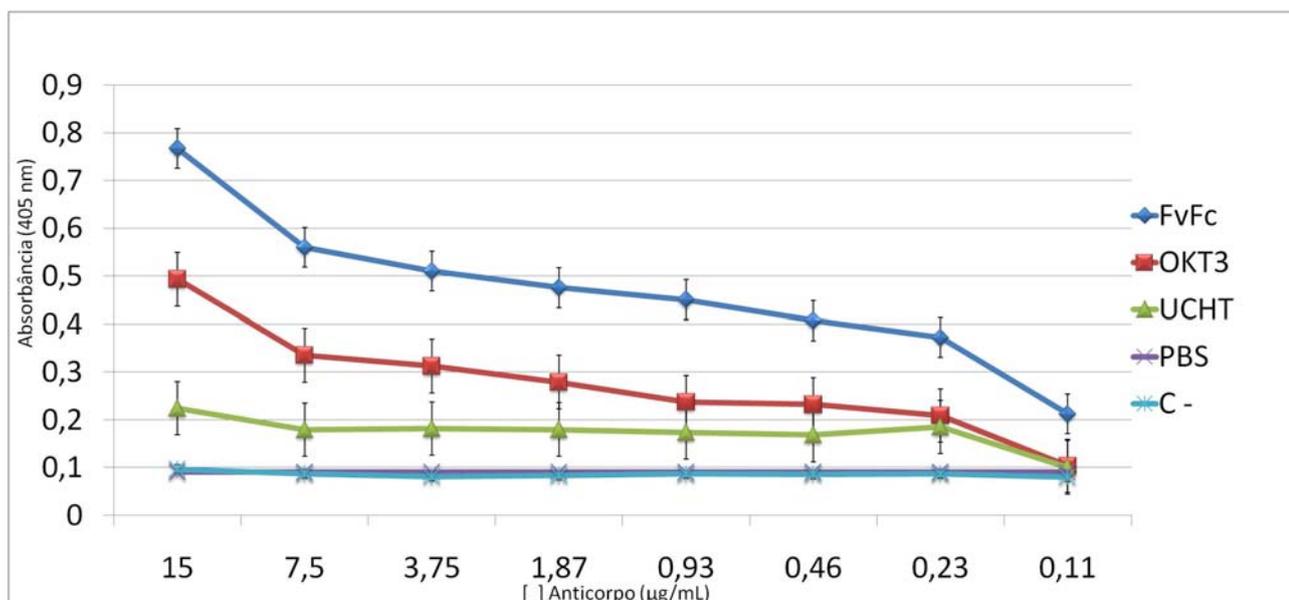


**Figura 14 - Dot Blotting das frações purificadas na coluna HisTrap FF.** Dot Blotting das frações obtidas durante a purificação. Estão marcadas com elipses coloridas as frações escolhidas para concentrar. Elipses em preto, vermelho e verde marcam as eluições das frações solúveis de BL21DE3, BL21DE3 pLysE e BL21DE3 pLysS, respectivamente.

Visando agora averiguar se a proteína recombinante obtida mantinha a atividade biológica como antígeno, foram feitos ensaios do tipo ELISA (protocolo 3.2.15). A Figura 16 mostra a ligação observada quando diferentes anticorpos anti-CD3 foram utilizados em diferentes concentrações. Foi então observada a eficácia de ligação de diferentes anticorpos anti-CD3 tanto os comerciais (OKT3 e UCHL1) como o FvFc produzido pelo grupo anteriormente (Silva, 2008), denotando que a proteína recombinante produzida resguardava as suas características antigênicas. O como já foi demonstrado por Kjer-Nielsen e colaboradores em 2004 quando este fragmento foi purificado em coluna de afinidade pelo Fab do Ac OKT3 murino e posteriormente co-cristalizados.



**Figura 15. Análise da proteína purificada.** As frações protéicas eluídas após a purificação foram reunidas e submetidas à eletroforese em gel SDS-page 12 %, e em seguida corada com prata. Após a corrida foi identificado um fragmento com massa molecular em torno de 56kDa o que corresponde ao tamanho esperado do CD3 recombinante. Seta no poço A indicando a banda no tamanho esperado. M – Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas<sup>®</sup>).



**Figura 16. Imunoensaio enzimático (ELISA) utilizando a proteína recombinante purificada.** Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com a proteína recombinante. Após o bloqueio diferentes concentrações dos anticorpos OKT3, UCHT e o fragmento recombinante FvFc (Silva, 2008) foram incubados nesses poços. A ligação dos anti-CD3 foi evidenciada após a adição de anticorpos secundários conjugados a fosfatase alcalina e do substrato PNPP. Como controle negativos, os anticorpos anti-CD3 foram omitidos (PBS) ou a reação foi realizada em poços não sensibilizados (C-).

#### 4.4 Seleção da biblioteca de sequências VL por Phage Display

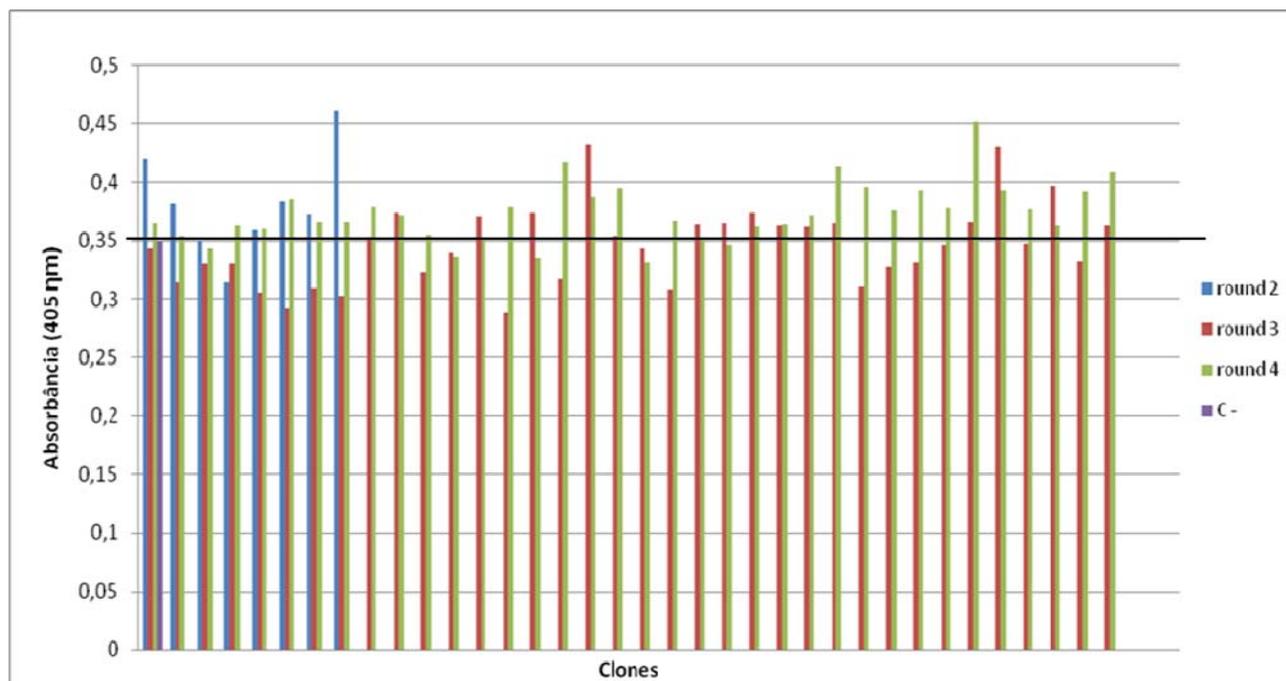
Após a constatação da manutenção das características antigênicas do CD3 recombinante com a atividade biológica de antígeno verificada e da obtenção da biblioteca de sequências VL humanas, procedeu-se a seleção. Vale ressaltar que as sequências codificadoras de VL humanas amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram clonadas no vetor que codifica a proteína pIII do fago filamentoso M13 (figura 11). Dessa forma, esperava-se obter os fragmentos de anticorpos na forma de scFv, sendo o VH<sup>R86</sup> humanizado apresentado na superfície de seu capsídeo fusionados a proteína pIII, como já havia sido demonstrado pelo grupo esse VH mantinha a capacidade de ligação ao antígeno (Costa, 2004). Assim, com essa estratégia, a seleção dos VLs totalmente humanos (*shuffling* de cadeia) se dá baseada em sequências peptídicas que não apenas possuem CDRs que se liguem ao antígeno mas que também carregue em seu arcabouço os resíduos necessários à correta montagem do paratopo anti-CD3, para ser obtido assim um fragmento scFv que mantenha a capacidade de se ligar ao CD3 de forma eficiente, constituído pelo par VH humanizado e o VL de sequência totalmente humana (Sang J. K. & Hyo J. H., 2007 ; Schier *et al.*, 1996).

O protocolo da seleção está descrito no item 3.2.16.6. Na tabela 5 são mostrados em escala logarítmica o título de fagos obtidos em cada ciclo de seleção. Verificou-se com esses dados que o título de fagos retidos na placa de microtitulação aumentou em cada ciclo de seleção e principalmente no ciclo 4 indicando que foram selecionados fagos ligantes ao antígeno adsorvido na placa durante o processo (Brígido & Maranhão, 2002).

Em seguida, infectaram-se bactérias com os diferentes conjuntos de fagos selecionados em cada ciclo e essas culturas foram incubadas em placas de *petri* contendo o agente seletivo para se obter colônias isoladas infectadas (item 3.2.16.6). A partir daí as colônias isoladas foram crescidas em 1 mL de meio SB em placa *Deepwell* de 96 poços e adicionado o fago auxiliar para serem produzidas as partículas virais com os fragmentos scFvs montados em sua superfície. Essas culturas foram então centrifugadas e os respectivos sobrenadantes incubados em uma placa de microtitulação previamente sensibilizada com o antígeno recombinante e bloqueada (item 3.2.16.7). Em seguida, procedeu-se um ensaio do tipo ELISA utilizando como anticorpo primário, um anticorpo anti-M13 feito em ovelha. Após a adição do anticorpo secundário e adição de substrato colorimétrico a placa foi lida a uma absorbância de 405 nm. Assim averiguou-se se os fagos eram capazes de se ligar ao antígeno e a quais ciclos de seleção eles pertenciam.

**Tabela 5. Fagos Obtidos Durante a Seleção**

	<b>n° de lavagens</b>	<b>Título de entrada</b>	<b>Título de saída</b>	<b>Saída/Entrada</b>
ciclo 1	5	$5,15 \cdot 10^{12}$	$2,72 \cdot 10^3$	$5,28 \cdot 10^{-10}$
ciclo 2	10	$3,08 \cdot 10^{14}$	$2,8 \cdot 10^6$	$9,09 \cdot 10^{-9}$
ciclo 3	10	$1,3 \cdot 10^{14}$	$5,63 \cdot 10^3$	$4,33 \cdot 10^{-9}$
ciclo 4	10	$8,1 \cdot 10^{14}$	$7,96 \cdot 10^3$	$9,82 \cdot 10^{-8}$



**Figura 17. Atividade ligante das partículas virais (monoclonais) selecionadas nos ciclos 2, 3 e 4.** Análise da capacidade de ligação dos fagos selecionados de acordo com o protocolo 3.2.16.7 adaptado de (Rader & Barbas, 1997). A linha horizontal delimita a absorbância do controle negativo. Apenas os clones com OD acima do C- (controle negativo), que se refere ao sobrenadante de cultura de células infectadas apenas com o fago auxiliar VCSM13.

Em seguida foi feita uma análise estatística do percentual de clones positivos em cada ciclo de seleção, o dados obtidos são mostrados na tabela 6.

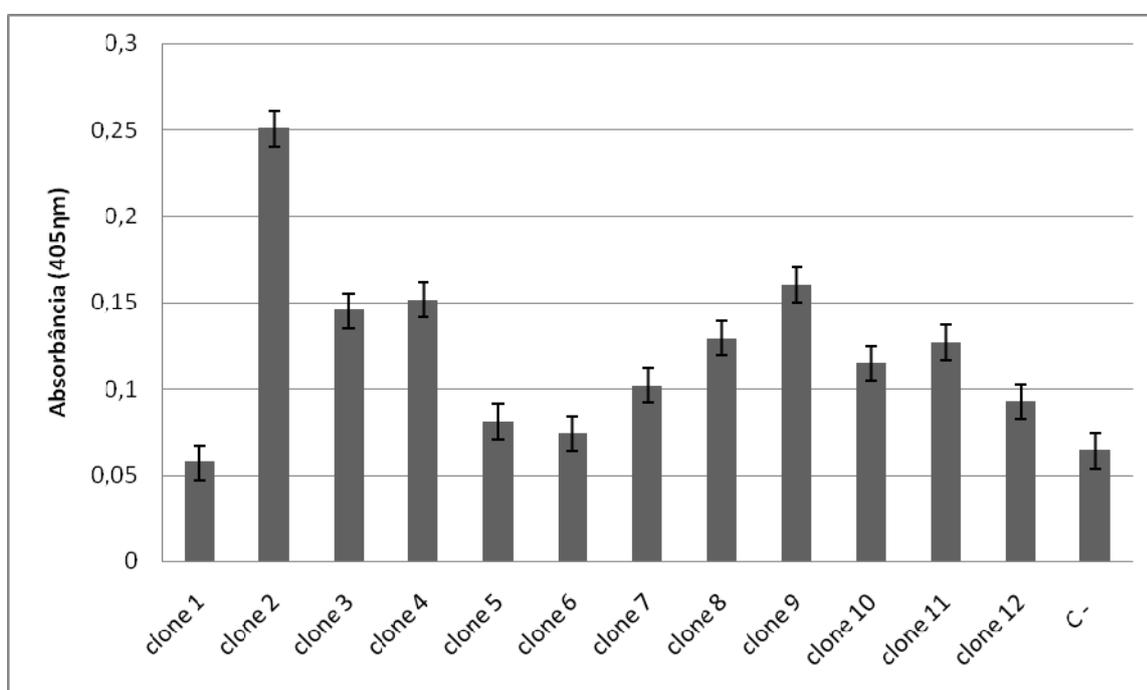
**Tabela 6. Frequência de clones positivos**

	Total de clones analisados	Frequência de clones positivos por ciclo de seleção
Ciclo 2	23	0,43
Ciclo 3	36	0,44
Ciclo 4	36	0,86

Os dados obtidos mostram um acentuado aumento na frequência de clones positivos no ciclo4 da seleção o que indica o sucesso do procedimento, visto que um número bem maior de clones positivos foram observados no último ciclo de seleção o que está de acordo com trabalhos anteriores relacionados ao tema (Rader & Barbas, 1997 ; Vaughan *et al.*, 1996 ; Griffiths *et al.*, 1994 ; Machold & Smolen, 2003).

Em conjunto, os dados de frequência de clones positivos (Tabela 6), cujo número cresce ao longo dos ciclos de seleção e o enriquecimento observado pela diminuição razão entre o título de entrada e o de saída, mostram um enriquecimento da ordem de 52 vezes. Tal enriquecimento é ainda pequeno, mas cada ser

melhorado realizando-se um novo ciclo de seleção com um número maior de lavagens (Tabela 5). A partir deste resultado, doze clones foram escolhidos e o ensaio repetido em triplicata, sendo 2 clones do ciclo 2, 2 clones do ciclo 3 e 8 clones do ciclo 4. A maioria dos clones manteve sua capacidade de ligação, embora outros não (clones 1, 5 e 6) talvez devido ao tempo entre sua produção e a realização do ensaio (5 dias), e de acordo com a literatura as proteínas apresentadas na superfície de fagos filamentosos são relativamente instáveis quanto a sua estrutura tridimensional, perdendo suas propriedades ligantes ao longo do tempo, sendo recomendado o seu uso em até 24 horas após sua produção (Rader & Barbas, 1997). O segundo *Phage-ELISA* apenas pode ser executado 5 dias após a produção dos fagos, visto que o procedimento é muito longo e não tínhamos tempo hábil.



**Figura 18. Confirmação da ligação ao CD3 de diferentes clones.** *Phage* – ELISA dos clones que apresentaram OD maior que o controle negativo. C- controle negativo (fago auxiliar).

## 5- Conclusões e Perspectivas

A estratégia adotada na construção dos oligonucleotídeos usados para amplificar a biblioteca de fragmentos VL a partir do repertório de Fabs construídos por Dantas e colaboradores em 2004, se mostrou bastante eficaz.

O procedimento de expressão e a estratégia de purificação se mostraram satisfatórios no que diz respeito ao rendimento do processo e a preservação das propriedades antigênicas, mas o seu grau de pureza ao fim do procedimento foi abaixo do desejado, visto que na coloração com prata foram observadas bandas inespecíficas acima e abaixo do tamanho da amostra. Como perspectiva, pretendemos ajustar o procedimento de expressão com a linhagem BL21 pLysE, já que esta apresentou um maior rendimento de produção, e quanto a purificação outras estratégias serão abordadas.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir com o presente trabalho que o procedimento de seleção de anticorpos na forma de scFv pela estratégia de *shuffling* de cadeia aliada à técnica de *Phage Display* foi eficaz em selecionar clones com capacidade de ligação ao antígeno recombinante, muito embora, a razão dos títulos (saída/entrada) no ciclo 4 não ter sido muito alta sendo talvez necessário mais um ciclo de seleção e análises posteriores dos clones selecionados quanto as suas propriedades ligantes (avidéz, sensibilidade) pela técnica de SPR por exemplo, como também comparar sua atividade ligante com a dos anticorpos em uso na clínica (OKT3 e UCHT) e em comparação com fragmento scFv parental construído pelo grupo (Costa,2004; Silva ,2008). Para isso pode ser utilizada a técnica de FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) em ensaios de competição. Uma outra hipótese para explicar este enriquecimento menor que o geralmente encontrado na literatura é o fato de que o fragmento variável pesado usado como guia na seleção das partículas virais ser bastante eficiente na ligação ao antígeno o que pode ter contaminado os ciclos de seleção com amostras iguais ou bastante semelhantes desde os primeiros ciclos, isto poderá ser confirmado quando forem analisadas as sequências de VLs geradas pelo sequenciamento automático de nucleotídeos (dado em construção).

## 6- Referências Bibliográficas

- ABBAS A., LICHTMAN A. (2003) Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company 5<sup>th</sup> ed.
- AGRAWAL A., EASTMAN Q.M. E SCHATZ D. G. (1998) Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* **394**: 744–751.
- AMERSDORFER, P., WONG, C., SMITH, T., CHEN, S., DESHPANDE, S., SHERIDAN, R., MARKS, J.D. (2002) Genetic and immunological comparison of anti-botulinum type A antibodies from immune and non-immune human phage libraries. *Vaccine*. **20**(11-12):1640-8.
- BASSING C.H., SWAT W. E ALT F. W. (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109**: S45–S55.
- BLAZAR B. R., JENKINS M. K., TAYLOR P. A., WHITE J., PANOSKALTSIS-MORTARI A., KORNGOLD R., *et al.* (1997) Anti-CD3 epsilon F(ab')<sub>2</sub> fragments inhibit T cell expansion in vivo during graft-versus-host disease or the primary immune response to nominal antigen. *J Immunol*, v.159, n.12, Dec 15, p.5821-5833.
- BRIGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q. (2002) Bibliotecas Combinatórias em Phagos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **26**: 44-51
- CHATENOUD L. E BLUESTONE J. A. (2007) CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, v.7, n.8, Aug, p.622-632.
- CHATENOUD, L. (2003) CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol*, v.3, n.2, Feb, p.123-132.

- CIRINO, N.M., SBLATTERO, D., ALLEN, D., PETERSON, S.R., MARKS, J.D., JACKSON, P.J., BRADBURY, A., LEHNERT, B.E. (1999) Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. *Infect Immun.* 67(6):2957-63.
- COSTA P. L. N. (2004) Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.
- DANTAS-BARBOSA C., BRÍGIDO M.M, MARANHÃO A.Q. (2005). Construction of a human Fab phage display library from osteosarcoma patient antibody repertoire. *Genetic and Molecular Research.* 4:126.
- DE LORENZO, C., PALMER, D.B., PICCOLI, R., RITTER, M.A., D'ALESSIO, G. (2002) A new human antitumor immunoreagent specific for ErbB2. *Clin Cancer Res.* 8(6):1710-9.
- FONSECA A. S. D. (2000) Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3 Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 106 p.
- FRIEDMAN M., NORDBERG E., HOIDE'N-GUTHENBERG I., BRISMAR H., ADAMS G.P., NILSSON F.Y., CARLSSON J. e STAHL S. (2007) Phage display selection of Affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Engineering, Design & Selection*, 20 n°4: 189-199.
- FUJIMOTO S. E YAMAGISHI H. (1987) Isolation of an excision product of T cell receptor  $\alpha$ -chain gene rearrangements. *Nature* 327: 242–244.
- GILBERT, S.F. (2006) *Developmental Biology* 8<sup>th</sup> ed.
- GIOVANNONI, L., VITI, F., ZARDI, L., NERI, D. (2001). Isolation of anti-angiogenesis antibodies from a large combinatorial repertoire by colony filter

screening. *Nucleic Acids Res.* 1;29(5):E27.

HAARD, H.J., VAN NEER, N., REURS, A., HUFTON, S.E., ROOVERS, R.C., HENDERIKX, P., DE BRUÏNE, A.P., ARENDS, J.W., HOOGENBOOM, H.R. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem.* **274**(26):18218-30.

HEROLD K. C., GITELMAN S. E., MASHARANI U., HAGOPIAN W., BISIKIRSKA B., DONALDSON D., *et al.* (2005) A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes*, v.54, n.6, Jun, p.1763-1769.

HIGO-MORIGUCHI, K., AKAHORI, Y., IBA, Y., KUROSAWA, Y., TANIGUCHI, K. (2004). Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J Virol.* 78(7):3325-32

HOLLIGER P. e HUDSON P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, **23**: 1126 – 1136.

HOOGENBOOM H.R., BRUÏNE A.P., HUFTON S.E., HOET R.M., ARENDS J.W. e ROOVERS R.C. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, **4**: 1-20.

HOZUMI, N. E TONEGAWA, S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3628–3632.

HUGHES C., WOLOS J. A., GIANNINI E. H. E HIRSCH R. (1994) Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol*, v.153, n.7, Oct 1, p.3319-3325.

- HOOGENBOOM H.R., (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nat. Biotechnol.* **23** 1105– 1116.
- JANEWAY C.A., TRAVERS P., WALPORT M., SHLOMCHIK M. (2001) *Immunobiology*. 5<sup>th</sup> ed. New York and London: Garland Publishing.
- KINDT T. J., OSBORNE B. A. E GOLDSBY R. A. KUBY (2002) *Immunology*: W.H. Freeman. 574 p.
- KOHM, A. P., WILLIAMS, J. S., BICKFORD, A. L., MCMAHON, J. S., CHATENOUD, L., BACH, J. F., *et al.* (2005) Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, v.174, n.8, Apr 15, p.4525-4534.
- KJER-NIELSEN L., DUNSTONE M. A., KOSTENKO L., ELY L. K., BEDDOE T., MIFSUD N. A., *et al.* (2004) Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.20, May 18, p.7675-7680.
- LI B., WANG H., DAI J., JI J., QIAN W., ZHANG D., HOU S. e GUO Y. (2005) Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. *Immunology*, **116**: 487-498.
- LUDVIKSSON B. R., EHRHARDT R. O. E STROBER W. (1997) TGF-beta production regulates the development of the 2,4,6-trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol*, v.159, n.7, Oct 1, p.3622-3628.
- MARKS J.D., HOOGENBOOM H.R., BONNERT T.P., MCCAFFERTY J., GRIFFITHS A.D. e WINTERG. (1991) By-passing immunization of human antibodies from V-genes libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, **222**:581-97.

- MCCAFFERTY J. e GRIFFITHS J. (1996) Phage display of peptides and proteins, a Laboratory Manual. *San Diego: Academic Press*.
- N. LONBERG (2005) Human antibodies from transgenic animals, *Nat.Biotechnol.* **23**: 1117– 1125.
- OKAMOTO T, MUKAI Y, YOSHIOKA Y, SHIBATA H, KAWAMURA M, YAMAMOTO Y, NAKAGAWA S, KAMADA H, HAYAKAWA T, MAYUMI T, TSUTSUMI Y. (2004) Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* **323**(2):583-91
- PARK, S.J., SEOL, S.Y., JEE, S.R., PARK, E.T., LEE, Y.J., LEE, S.H., CHUNG, J.M., CHO, H.D., JEONG, Y.J., CHOI, I.H., PARK, S.G. (2007). Human monoclonal antibody inhibiting reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase protein. *Korean J Gastroenterol.* 49(2):85-92.
- PAVLOU A., e BELSEY M. J. (2005) The therapeutic antibodies market to 2008. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **59**: 389–396.
- PLAIN K. M., CHEN J., MERTEN S., HE X. Y. e HALL B. M. (1999) Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. *Transplantation*, v.67, n.4, Feb 27, p.605-613.
- POSNER B., SMILEY J., LEE I. e BENKOVIC S. (1994) Catalytic antibodies: perusing combinatorial libraries. *Trends Biochem. Sci*, **19**: 145-150.
- PRESTA L.G. (2006) Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 640– 656.

- RADER, C. AND BARBAS III, C.F. (1997) Phage Display of Combinatorial Antibody Libraries. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 503-508.
- REICHERT J., e PAVLOU A. (2004) Monoclonal antibodies market. *Nature Reviews*, **3**: 383-384.
- RIDGWAY, J.B., NG, E., KERN, J.A., LEE, J., BRUSH, J., GODDARD, A, CARTER, P. (1999) Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines. *Cancer Res.* **59**(11):2718-23.
- SANG J. K. e HYO J. H. (2007) Guided Selection of Human Antibody Light Chains against TAG-72 Using a Phage Display Chain Shuffling Approach. *The Journal of Microbiology* **45**(6): 572-577.
- SCHIER R., BYE J., APELL G., MCCALL A., ADAMS G.P., MALMQVIST M., WEINER L.M. e MARKS J. D. (1996) Isolation of High-affinity Monomeric Human Anti-c-erbB-2 Single chain Fv Using Affinity-driven Selection. *J. Mol. Biol.*, **255**: 28-43.
- SCHWARZ K. *et al.* (1996) *Rag* mutations in human B cell-negative SCID. *Science* **274**: 97-99.
- SHEETS, M. D., AMERSDORFER, P., FINNEM, R., SARGENT, P., LINDQVIST, E., SCHIER, R., HEMINGSEN, G., WONG, C., GERHART, J. C., MARKS, J. D. (1999). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95** : 6157.
- SMITH J. A., TANG Q. E BLUESTONE J. A. (1998) Partial TCR signals delivered by FcR-nonbinding anti-CD3 monoclonal antibodies differentially regulate individual Th subsets. *J Immunol*, v.160, n.10, May 15, p.4841-4849.
- STEVENSON, F.K., RICE, J. (2006). Optimizing cancer immunotherapy trials: back to

- basics. *Eur J Immunol.* 36(5):1070-3.
- STAUSBØL-GRØN, B., JENSEN, K.B., JENSEN, K.H., JENSEN, M.Ø., CLARK, B.F. (2001) De novo identification of cell-type specific antibody-antigen pairs by phage display subtraction. Isolation of a human single chain antibody fragment against human keratin 14. *Eur J Biochem.* **268**(10):3099-107.
- UTSET T. O., AUGER J. A., PEACE D., ZIVIN R. A., XU D., JOLLIFFE L., *et al.* (2002) Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol*, v.29, n.9, Sep, p.1907-1913.
- VAUGHAN T.J., WILLIAMS A.J., PRITCHARD K., OSBOURN J.K., POPE A.R., EARNSHAW J.C., MCCAFFERTY J., HODITS R.A., WILTON J. e JOHNSON K.S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized *Phage Display* library. *Nat Biotechnol*, **14**:309-314.
- VILLA, A. *et al.* (1998) Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome. *Cell* **93**: 885–896.
- WATKINS, N.A., DU, L.M., SCOTT, J.P., OUWEHAND, W.H., HILLERY, C.A. (2003) Single-chain antibody fragments derived from a human synthetic phage-display library bind thrombospondin and inhibit sickle cell adhesion. *Blood.* **102**(2):718-24.
- WEINER, L.M. (2006). Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J Immunother* **29**: 1.
- WILLIAMS B.R. e SHARON J. (2002) Polyclonal anti-colorectal cancer Fab phage display library selected in one round using density gradient centrifugation to separate antigen-bound and free phage. *Immunol Lett*, **81**: 141-148.
- WOZNIAK, G., OBERMAYR, E., JERAS, M., KNEZEVIC, M., RÜKER, F. (2003) An ELISA for the detection of TIMP-1 based on recombinant single chain Fv fusion proteins. *Clin Chim Acta.* **335**(1-2):49-57.