



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

Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano

HERNANDEZ MOURA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Co – Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Brasília – DF
2008



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

Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano

HERNANDEZ MOURA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Co – Orientadora: Prof^ª. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

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

Brasília – DF
2008

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edécio Cunha - Neto – Incor/USP

Prof^a. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca – UnB

Prof^a. Dra. Cynthia Maria Kyaw - UnB

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido – UnB

Prof^a. Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UnB

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, e parte no Laboratório de Imunologia de Transplantes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação do Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

*Eu dedico esse trabalho aos meus pais, Ari e Ana, pelo enorme apoio e compreensão. Sem vocês a subida da montanha seria muito mais complicada. Obrigado por tudo.
Amo Vocês.*

“Não somos como aqueles que chegam a formar pensamentos senão no meio dos livros - o nosso hábito é pensar ao ar livre, andando, saltando, escalando, dançando (...).”

Friedrich Nietzsche

"É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas."

Karl Marx

Agradeço do fundo do meu coração ao meu grande orientador, professor e amigo Marcelo Brígido, por ter me acolhido nesse grupo logo que eu entrei na graduação e ter acreditado no meu potencial. O aprendizado da ciência não teria a mesma graça sem você. Obrigado pela ótima orientação nesse mestrado e pelos momentos engrandecedores.

Agradeço também a minha Co-orientadora, amiga e mãe Andréa Maranhão, pela paciência, suporte, pelas opiniões objetivas e sensatas no laboratório e na vida. Não tenho palavras para dizer o quanto aprendi com você.

Muito Obrigado por me acolherem nesse grupo, não haveria forma melhor de iniciar minha vida científica do que com vocês ao meu lado.

Agradecimentos Especiais

Primeiramente gostaria de agradecer a DEUS pela forte presença nos momentos difíceis, me dando a força necessária, e nos momentos de alegria. Agradeço por me dar essa fé de continuar traçando esse caminho e me fazer acreditar que trabalhar com essas “águinhas” pode no futuro melhorar a vida de alguém.

Agradeço aos meus pais pelo grande apoio, sabendo compreender e tolerar o meu isolamento e a minha impaciência. Vocês são a semente de tudo, sem a força de vocês não teria alcançado tudo o que alcancei, serei eternamente grato a vocês.

A minha irmã que fez parte de toda essa caminhada.

Aos meus padrinhos de batizado Elzy e Arnaldo, e de crisma Bia, por sempre mandarem pensamentos positivos mesmo eu estando afastado.

Aos meus amigos muito especiais, Henrique, André, Pedro Ivo, Pedro Marra, Saulo. Amigos de longa data e que apesar de às vezes distantes sempre estiveram presentes. Pessoas que sei que sempre vou poder contar.

Gostaria de agradecer especialmente ao Henrique pela ótima convivência, grande amizade e companheirismo. Obrigado pelas diversas lições de vida. Por experiências engrandecedoras como o nosso mega lava-jato SUPER BRILHO. Pelas farras, viagens, etc. Você é uma pessoa fantástica que considero como o irmão que não tive.

As minhas grandes amigas Vivi, Fernanda e Vanessa. Obrigado pelos momentos divertidos, momentos importantes na minha vida onde vocês sempre estiveram presentes.

Ao grande tio Orlando (Tio Brother), ótima pessoa com quem sempre gosto de estar, sempre trazendo uma super energia positiva.

A minha mãe na biologia molecular, Chrisinha, pessoa simplesmente fantástica com quem aprendi muito. Gostaria de ter sua serenidade no exercício da ciência. Você abriu meus olhos para esse mundo fantástico e sempre lembrarei disso.

Ao meu amigo do peito Pedrão Vieira, no início éramos só colegas de bancada e hoje vejo nele uma pessoa super atenciosa, divertida e companheira. Agradeço enormemente as diversas farras que fizemos, ao nosso super bugão de búzios, e ao enorme apoio e força em São Paulo, me ajudando bastante no início dessa nova caminhada nessa cidade completamente louca.

Aos meus grandes amigos de Lab1 de ontem, hoje e sempre (o melhor laboratório do mundo) Gaúcho (Rafael), guri sentirei sua falta, do seu companheirismo e da sua bagunça na bancada. Maryani, sem você o lab não teria a mesma graça nem as mesmas discussões. Luana, obrigado pela força em tudo, no começo não nos dávamos muito bem, mas hoje vejo como o meu mestrado não seria igual sem você. Victor, o eterno brincalhão, tu é uma figura. Carol, a intelectual, substituta da Paty lu, só não demos o nome de bruxa

heheh, obrigado pela amizade no lab, nos cursinhos e na vida. Mariana (ursinho), com seu estilo diferente de ser e com a frase de sempre (não to ouvindo nada, conta de novo!) sentirei falta do war, ao Diorge cabeção, aprendi muito com ele. Henrique, Bia, Carmela, Yuri o aspira, tu é um comédia. Leo, Fernanda, Isabel, Taíssa, Kelly, Isabela, Paulo, Janaina. A Ceci, chinchila, grande amiga e agora companheira de Zé paulino e 25 de março em SP. A Paty Lu, bruxa do norte, também companheira em SP. Gabi, Flávia. Nunca esquecerei das louváveis reuniões de quinta.

A Barbarela (não esqueci de você não) pessoa maravilhosa, a minha primeira tutelada na bancada, amiga de mestrado e hoje ta ai, mandando bem em tudo que faz. Adoro você apesar das nossas sempre intermináveis discussões sem acordo, mas se lembre que concordei com você uma vez hehehe. Sentirei muito a sua falta em São Paulo. Obrigado mesmo pela amizade, aprendi muito com você.

Aos amigos da biomol Alex, Marciano, Mauro, Andreisse, Juliana, Hugo, Marcos, Davi, Thiago (Lab3), Thiago (Lab 0), Eveline, Lorena, Lelê (agora polícia e futura mamãe), Saulo, Simoneide, Rose, Larissa, Luciano, Túlio, Renata, Basti, Viviane, Camila e aos outros que não lembrei de colocar, afinal é gente demais, não dá pra lembrar, hehehe.

Aos professores do laboratório de Biologia Molecular: Lídia Pepe (cadê o jaleco), Fernando Araripe, Sueli, Marcio (e a sua umbrellá), Marcos, Elida, Ildinete (AL).

A Fofita (Fátima) e Violência (Ivonildes) por terem suportado minhas bagunças e pentelhação no laboratório, obrigado pela força e toda assistência. A Ana pela ajuda na secretaria.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunologia do Incor-USP, futuros amigos de trabalho, obrigado pela ótima recepção. A Sandra Maria por me ensinar a fazer FACS e outras coisas. Cresci muito com vocês em tão pouco tempo. A prof^a Verônica Coelho (minha futura orientadora) por me acolher tão bem nesse grupo durante essa etapa do meu mestrado e por contribuir significativamente para discussão do projeto e dos resultados.

Ao prof. Antônio Teixeira e demais colegas do laboratório multidisciplinar de pesquisa em doenças de chagas por permitirem gentilmente a utilização do aparelho de FACS para os resultados finais desse projeto. Ao prof. Enrique Argañaraz e colegas do laboratório de Virologia Molecular por disponibilizarem o computador da apple para análise dos resultados obtidos no citometro de fluxo e geração das figuras da dissertação.

Aos companheiros de Ministério de Meio Ambiente. Experiência muito enriquecedora.

Aos meus eternos amigos da biologia, fazer faculdade sem vocês não teria a mesma graça, pessoas maravilhosas por quais guardo grande estima. Estar com vocês sempre é um enorme prazer e mesmo a vida levando cada um a traçar o seu caminho, espero que ele sempre se reencontre.

As instituições de formento que vêm me patrocinando nas experiências malucas e apesar do pequeno investimento em ciência garantem que esse país esteja entre os maiores publicadores do mundo.

E por último, não poderia esquecer essa pessoa maravilhosa que entrou na minha vida no final de 2006, graças à ciência, e que hoje tem mudado meus dias. As coisas ficaram muito mais fáceis com você ao meu lado, obrigado pela tolerância e compreensão, obrigado por estar ao meu lado minha linda namorada Fernanda.

Sumário

Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas.....	xviii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxii
Introdução.....	2
1.1 O Sistema Imune.....	2
1.2 Os Anticorpos.....	3
1.3 Os Receptores Fc.....	10
1.4 Os Anticorpos na Clínica.....	12
1.5 O Anticorpo Anti-CD3.....	14
1.6 A Engenharia de Anticorpos.....	21
1.7 Expressão Heteróloga de Anticorpos.....	23
1.8 A Humanização do Anticorpo Monoclonal Anti-CD3.....	27
Objetivos.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
Materiais e Métodos.....	36
3.1 Materiais.....	36
3.1.1 Células.....	36
3.1.2 Plasmídios utilizados.....	37
3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento.....	38
3.1.4 Soluções estoques de inibidores de proteases.....	39
3.1.5 Meios de cultura e soluções para bactérias.....	39
3.1.6 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos.....	40
3.1.7 Soluções e tampões de uso geral.....	43
3.1.8 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação-bactéria.....	43
3.1.9 Soluções para extração de DNA plasmidial.....	44
3.1.10 Tampões de endonucleases de restrição.....	45
3.1.11 Tampões de outras enzimas.....	46

3.1.12	Soluções e reagentes para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	47
3.1.13	Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com <i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250).....	49
3.1.14	Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Western e Dot blotting</i>).....	50
3.1.15	Coluna de cromatografia de afinidade.....	51
3.1.16	Soluções para cromatografia de afinidade.....	51
3.1.17	Materiais utilizados para concentração de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas.....	51
3.1.18	Marcadores moleculares para DNA e proteína.....	51
3.1.19	Kits comerciais.....	52
3.1.20	Soluções e materiais para os experimentos com citometria de fluxo.....	53
3.1.21	Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, <i>Western Blot</i> , <i>Dot Blot</i> e FACS.....	54
3.2	Métodos.....	57
3.2.1	Preparação de DNA plasmidial.....	57
3.2.2	Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	59
3.2.3	Análise do DNA plasmidial em gel de agarose.....	59
3.2.4	Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	59
3.2.5	Reação de Desfosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP).60	
3.2.6	Modificação no DNA plasmidial utilizando a enzima Mung Bean Nuclease.....	60
3.2.7	Ligação de fragmentos de DNA.....	61
3.2.8	Preparação de células competentes e transformação bacteriana.....	61
3.2.9	Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.....	63
3.2.10	Cultura de células de mamíferos.....	63
3.2.11	ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	70
3.2.12	Concentração de sobrenadante de cultura.....	71
3.2.13	Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.....	72
3.2.14	Análise de proteínas por <i>Dot Blotting</i>	72
3.2.15	Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE.....	73
3.2.16	Coloração do gel de SDS-PAGE.....	74

3.2.17	Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i>	74
3.2.18	Separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	75
3.2.19	Reação de Imunofluorescência para FACS.....	76
3.2.20	Leitura da reação de FACS no citômetro de fluxo.....	77
3.2.21	Ensaio de proliferação de CMSP com CFSE.....	78
Resultados.....		81
4.1	Construção dos vetores contendo as seqüências codificadoras dos anticorpos recombinantes.....	81
4.1.1	Clonagem da seqüência codificadora do FvFc anti-CD3 murino em vetor de expressão para célula de mamíferos com marca seletiva.....	82
4.1.2	Construção do vetor codificador do scFv anti – CD3 humanizado hVH ^{T86} hVL.....	87
4.1.3	Construção do vetor codificador do scFv anti – CD3 humanizado hVH ^{R86} hVL.....	89
4.1.4	Montagem das seqüências codificadoras dos FvFcs humanizados anti-CD3.....	91
4.1.5	Clonagem das seqüências codificadoras dos anticorpos recombinantes humanizados no vetor pMIREs.....	92
4.2	Transfecção das células de ovário de <i>hamster</i> chinês (CHO) com os plasmídeos pMIREs FvFc T e R.....	94
4.3	Seleção das células transfectadas utilizando Geneticina [®] (G418).....	96
4.4	Produção dos FvFcs recombinantes em garrafas de 75 e 150 cm ²	100
4.5	Purificação e quantificação dos FvFcs T e R.....	101
4.6	Teste dos FvFcs humanizados anti-CD3 quanto a capacidade de ligação a superfície de linfócitos.....	105
4.11	Avaliação do potencial mitogênico dos FvFcs humanizados.....	109
4.12	Análise da especificidade dos FvFcs recombinantes pelo antígeno CD3.....	112
4.13	Adaptação da cultura de células CHO a baixos níveis de soro fetal bovino, seleção de clones produtores estáveis e produção dos anticorpos humanizados utilizando SFB low IgG.....	116
4.14	Purificação e quantificação dos FvFcs T e R produzidos pelos clones estáveis com meio contendo soro fetal bovino low IgG.....	119

4.15 Análise da especificidade dos FvFcs R e T produzidos em meio com SFB low IgG pelo antígeno CD3.....	123
Conclusão e Perspectivas.....	132
Referências Bibliográficas.....	135
Anexos.....	144

Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada.....	4
Figura 2. Representação de um anticorpo inteiro e dos fragmentos gerados após o tratamento com pepsina (F(ab') ₂) e com papaína (Fab).....	5
Figura 3. Representação esquemática de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos.....	6
Figura 4. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante.....	7
Figura 5. Dobramento de imunoglobulina.....	8
Figura 6. Desenho esquemático das interações dos oligossacarídeos adicionados à cadeia polipeptídica da região Fc de um anticorpo.....	9
Figura 7. Glicofomas apresentadas em IgGs.....	9
Figura 8. Interações entre anticorpos e FcγR.....	11
Figura 9. Diagrama esquemático do complexo receptor de celular T (TCR).....	16
Figura 10. Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação do CD3 ao αβ TCR.....	17
Figura 11. Modos de ação mediados por anticorpos anti-CD3.....	18
Figura 12. Representação esquemática das técnicas de humanização de anticorpos.....	22
Figura 13. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, <i>Internal Ribosome Entry Site</i>) em um processo de tradução.....	26
Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3.....	28
Figura 15. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos.....	30
Figura 16. 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.....	31
Figura 17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da cadeia leve (VL) dos anticorpos anti-CD3.....	32
Figura 18. Representação esquemática do vetor pMIREs.....	83
Figura 19. Estratégia de construção do vetor pMIREs FvFc mur.....	84
Figura 20. Seqüência codificadora do FvFc mur presente no vetor pMIREs FvFc mur.....	86
Figura 21. Representação esquemática do gene dos FvFcs construídos.....	87

Figura 22. Estratégia para construção do vetor pIg CD3 scFv T.....	88
Figura 23. Confirmação da construção do vetor pIg CD3 scFv T.....	89
Figura 24. Estratégia para construção do vetor pIg CD3 scFv R.....	90
Figura 25. Estratégia para montagem das seqüências codificadoras dos FvFcs R e T.....	92
Figura 26. Representação esquemática da construção do plasmídio pMIREs FvFc (R ou T).....	93
Figura 27. Análise de restrição do vetor pMIREs FvFc (R ou T).....	94
Figura 28. Produção dos FvFcs anti-CD3 e Anti-CD18 em células da linhagem CHO.....	95
Figura 29. Níveis de produção dos anticorpos humanizados anti-CD3 e CD18 durante a seleção das células transfectadas com o antibiótico geneticina [®]	98
Figura 30. Níveis de expressão dos FvFcs recombinantes durante o cultivo em garrafas de 75cm ² e 150 cm ²	100
Figura 31. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação dos FvFcs humanizados.....	102
Figura 32. Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFcs humanizados.....	103
Figura 33. Análise da purificação dos FvFcs humanizados anti-CD3 por <i>Western Blot</i>	104
Figura 34. Análise de dispersão de leucócitos de sangue periférico de doador normal.....	106
Figura 35. Tripla marcação de linfócitos com os anticorpos anti-IgG humana-FITC e com os anti-CD4 e anti-CD8 PE.....	107
Figura 36. Análise de ligação dos FvFcs humanizados a linfócitos T humanos.....	108
Figura 37. Análise do potencial mitogênico dos FvFcs humanizados T e R.....	111
Figura 38. Bloqueio da ligação do anticorpo anti-CD3 UCTH1 a linfócitos humanos.....	113
Figura 39. Bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3 a linfócitos humanos.....	114
Figura 40. Níveis de produção dos anticorpos humanizados em diferentes concentrações de soro fetal bovino.....	117
Figura 41. Seleção de clones estáveis produtores dos FvFcs R e T humanizados.....	119
Figura 42. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação dos FvFcs humanizados produzidos por clones estáveis em meio com SFB low IgG.....	120
Figura 43. Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFcs humanizados produzidos em cultura com SFB low IgG.....	121
Figura 44. Análise da purificação dos FvFcs R e T produzidos em cultura com SFB low IgG por <i>Western Blot</i>	122

Figura 45. Análise de dispersão de leucócitos de sangue periférico de doador normal.....	123
Figura 46. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC...	125
Figura 47. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da cadeia leve do OKT3 e da cadeia leve humanizada (hVL).....	128
Figura 48. Análise estrutural da cadeia leve murina do anti-CD3 utilizando o programa Jmol.....	129

Índice de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados nos EUA para uso terapêutico.....	13
Tabela 2. Anticorpos monoclonais anti-CD3 terapêuticos em doenças imune-mediadas.....	15
Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.....	38
Tabela 4. Inibição da ligação do anticorpo OKT3-FITC a linfócitos humanos pelos FvFcs R e T e pelo OKT3 não conjugado.....	124

Lista de Abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos
AICD	Morte celular induzida por ativação
Amp ^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase)
APS	Persulfato de amônio
<i>AOXI</i>	Gene da álcool oxidase 1
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato
°C	Grau Celcius
CD	Marcador de superfície celular (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDR	Região determinante de complementariedade
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo
CHO	Células de ovário de <i>hamster</i> chinês
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
C-Terminal	Extremidade carboxi – terminal
Da	Dalton
dH ₂ O	Água destilada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de ligação imunoenzimática
Fab	Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
FACS	<i>Fluorescence Activeted Cell Sorter</i>
Fc	Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
FcR	Receptor de Fc
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FL	Fluorescência
FR	Arcabouço (<i>Framework</i>)
FSC	Dispersão frontal (<i>Forward scattering</i>)
Fv	Fragmento (do anticorpo) varável
g	Grama

<i>g</i>	Força gravitacional
<i>h</i>	Hora
<i>His4</i>	Gene histidinol desidrogenase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Motivos de ativação baseados no imunoreceptor tirosina
ITIM	Motivos de inibição baseados no imunoreceptor tirosina
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
mAb	Anticorpo Monoclonal
mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Massa Molecular
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ms	Milisegundo
NBT	Nitro Blue Tetrazole
ng	Nanograma
OD	densidade ótica
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
ori	Origem de replicação
p	Peso
pb	Par de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação polimerásica em cadeia
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenoglicol

pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
PLC γ 1	Fosfolipase C γ 1
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
ptnA	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
RE	Retículo endoplasmático
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAase	Ribonuclease
scFv	Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
SDS	Sódio Duodecil Sulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida / SDS
SSC	Dispersão lateral (<i>Side scattering</i>)
TCR	Receptor de Célula T
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodimetilamina
Th	Células T auxiliares
Treg	Células T regulatórias
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidade enzimática
UCTH	Anticorpo monoclonal anti-CD3 do clone UCTH
UTR	Região não traduzida do gene
UV	Raios ultravioleta
v	Volume
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
μ F	Micro Faraday
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar

Resumo

O anticorpo anti-CD3 tem sido utilizado como imunoterápico na prevenção da rejeição a órgãos transplantados e considerado um fármaco promissor para o tratamento de doenças auto-imunes. Entretanto, o único anticorpo anti-CD3 utilizado para uso clínico aprovado pelo FDA, o OKT3, possui origem murina o que gera uma resposta imunogênica quando administrado, impossibilitando uma utilização prolongada e, assim, diminuindo sua eficácia.

Uma técnica que vem ao encontro da solução desse problema é a humanização de anticorpos, que por meio de manipulações gênicas propicia um aspecto “mais humano” a essa molécula, atenuando a resposta imunogênica desencadeada.

Nesse sentido, foi avaliada a atividade ligante e a função efetora de duas versões humanizadas do anticorpo anti-CD3 apresentando o resíduo murino treonina (T) ou o resíduo humano arginina (R) na posição 86 da cadeia variável pesada. Posição essa, considerada importante estruturalmente.

Para expressão dos anticorpos humanizados foram construídos vetores de expressão dicistrônicos, os quais foram utilizados para produção das imunoglobulinas em células de mamíferos da linhagem CHO, de forma estável. Os anticorpos produzidos foram purificados por cromatografia de afinidade para posterior análise da atividade ligante e da função efetora. Os resultados indicam que os anticorpos humanizados são capazes de se ligar ao CD3 na superfície de linfócitos. Contudo, são incapazes de bloquear completamente a ligação do anticorpo murino OKT3 à superfície de linfócitos, em ensaios de competição. Em conjunto com análises estruturais, esses dados indicam uma perda de afinidade das versões humanizadas provavelmente devido à substituição de resíduos importantes estruturalmente na cadeia leve humanizada.

As versões humanizadas também apresentam uma capacidade mitogênica menor que a apresentada pelo OKT3, corroborando a perda de afinidade desses anticorpos.

Esses dados sugerem que os anticorpos humanizados são capazes de se ligar ao CD3 na superfície de linfócitos, mas o processo de humanização levou a uma diminuição da afinidade original desses anticorpos. Nesse sentido, para se restabelecer a atividade ligante dos anticorpos recombinantes sugerimos a realização de algumas mutações específicas para com isso avaliar o seu futuro uso clínico.

Abstract

Anti-CD3 antibodies have been used for the prevention of organ allograft rejection and are also considered a promising immunotherapeutic for autoimmune diseases treatment. Currently, there is only one anti-CD3 antibody approved by FDA for clinical use, the OKT3. Unfortunately, due to its murine origin, it promotes an immunogenic reaction when administrated, limiting its long-term use and reducing the treatment effectiveness.

To solve this problem we have proposed humanized versions of this anti-CD3 to avoid its immunogenic properties. In this work was evaluated the binding activity and effector function of two humanized anti-CD3 antibodies. The first one has the murine residue threonine (T) 86 VH position while the second version shows the human residue arginine (R) at position 86 in VH. Modeling analysis indicated that this position is structurally important.

To express the recombinant antibodies we constructed a dicistronic expression vector and produced the immunoglobulins in CHO cell lines. To analyze the binding activity and effector function, the recombinant proteins were previously purified by affinity chromatography. The results show that humanized antibodies were able to binding to the human CD3 on the T lymphocyte surface. However, they weren't able to completely block OKT3 binding to T lymphocyte surface on competitive assays. Along with structural analysis, this data indicate an affinity loss of humanized versions probably due the substitution of important residues on humanized VL.

The humanized versions also presented a less mitogenic activity than that observed by OKT3, corroborating the affinity loss of these antibodies.

These data suggest that the humanized antibodies are able to bind to human CD3, but the humanization procedure caused a decrease on recombinant antibody affinity, compared with OKT3. To restore the binding activity of these antibodies specific mutations and back mutations must have to be taken in order to permit its future clinical use evaluation.

Introdução

Introdução

1.1 O SISTEMA IMUNE

Desde os primeiros relatos na Grécia antiga de que indivíduos contaminados com determinadas doenças se tornavam refratários a uma segunda infecção, o estudo da imunologia vem se tornando essencial para a medicina. A palavra imunologia surgiu do latim *immunis*, que significa isento, dessa forma, eram denominadas imunes aquelas pessoas refratárias à infecção com algumas doenças (Kindt *et al.*, 2002).

Inicialmente, o sistema imune era classificado como um sistema de defesa presente nos animais com o intuito de protegê-los contra microrganismos patogênicos. Atualmente o sistema imune pode ser visto como um tipo de sistema de manutenção da homeostase do indivíduo. Em termos fisiológicos, pode-se dizer que as células e as moléculas do sistema imune agem no gerenciamento da inflamação garantindo a homeostase (Cohen, 2000b; Cohen, 2000a).

A inflamação é classicamente definida como o processo ativado por uma injúria em tecido vascularizado que leva a cicatrização (Ebert, 1965). O sistema imune inicia e gerencia a inflamação, mantém a saúde pela cura de feridas, contém patógenos, organiza a estrutura de tecidos conectores, gerencia o crescimento (angiogênese) ou destruição de vasos sanguíneos, ativa a regeneração de determinados órgãos, ativa a apoptose de células velhas, doentes ou perigosas, degrada moléculas anormais acumuladas, elimina resíduos, além de outras atividades vitais (Cohen, 2000b). Dessa forma, o sistema imune garante a integridade do organismo em resposta às injúrias sofridas no seu convívio com o ambiente, às infecções, ao acúmulo de produtos metabólicos e seus resíduos e a outras intoxicações. Desse modo, o sistema imune nada mais é do que um sistema de manutenção da homeostase (Cohen, 2007).

O sistema imune pode mediar respostas, como por exemplo, a imunidade inata, sendo a primeira linha de defesa contra infecções, e a imunidade adaptativa, que surge a partir da ativação de linfócitos T ou B pelo encontro com o antígeno. Essa última tem por característica responder à infecção por determinado antígeno com um alto grau de especificidade, podendo ser subdividida em dois tipos: a imunidade mediada por células, a qual envolve os linfócitos T e é responsável pela resposta a micróbios intracelulares, como vírus e algumas bactérias; e a imunidade humoral, mediada por moléculas presentes no sangue e em mucosas, chamadas de

anticorpos. Os anticorpos são produzidos por células, denominadas linfócitos B. Essas moléculas possuem a capacidade de reconhecer antígenos microbiais, de neutralizar a infectividade de micróbios e marcá-los para eliminação por vários mecanismos efetores. A imunidade humoral é a principal defesa contra micróbios extracelulares e suas toxinas porque os anticorpos secretados podem se ligar a esses antígenos de forma específica e ajudar na sua eliminação (Abbas e Lichtman, 2003).

1.2 OS ANTICORPOS

Os anticorpos (Ab) são glicoproteínas de massa molecular em torno de 150 kDa, compostos por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). As cadeias leve e pesada possuem a capacidade de se dimerizar devido à interações hidrofóbicas, assim como, pela formação de pontes dissulfeto entre as cadeias. Esse heterodímero irá se dimerizar com outro idêntico formando a molécula de anticorpo (Figura 1). Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas apresentam regiões amino-terminais variáveis denominadas VL e VH respectivamente, e 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, denominados de CH1, CH2 e assim por diante. Os domínios VH e VL formam o fragmento variável (Fv), sendo responsável pela ligação ao antígeno. Já os domínios constantes CH2 e CH3 formam o fragmento cristalizável (Fc) (Figura 1), envolvido diretamente com o recrutamento de células do sistema imune que irão mediar a ativação de mecanismos efetores que levaram a neutralização do antígeno. Dentre eles, podemos citar a degranulação, a fagocitose, a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*), a expressão de citocinas e a liberação de mediadores inflamatórios (Janeway *et al.*, 2001).

As cadeias das imunoglobulinas podem ser diferenciadas pelos seus isotipos. A cadeia leve é subdividida nos isotipos κ e λ , enquanto que a cadeia pesada se subdivide em cinco isotipos: α , δ , ϵ , γ e μ . Esses isotipos de cadeia pesada são utilizados para diferenciar as classes de imunoglobulinas, sendo elas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Em humanos, os isotipos IgA e IgG ainda podem ser subdivididos em subclasses relacionadas, ou subtipos, chamadas de IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A classe mais comum e abundante de anticorpo é a IgG, sendo também a mais utilizada para fins terapêuticos.

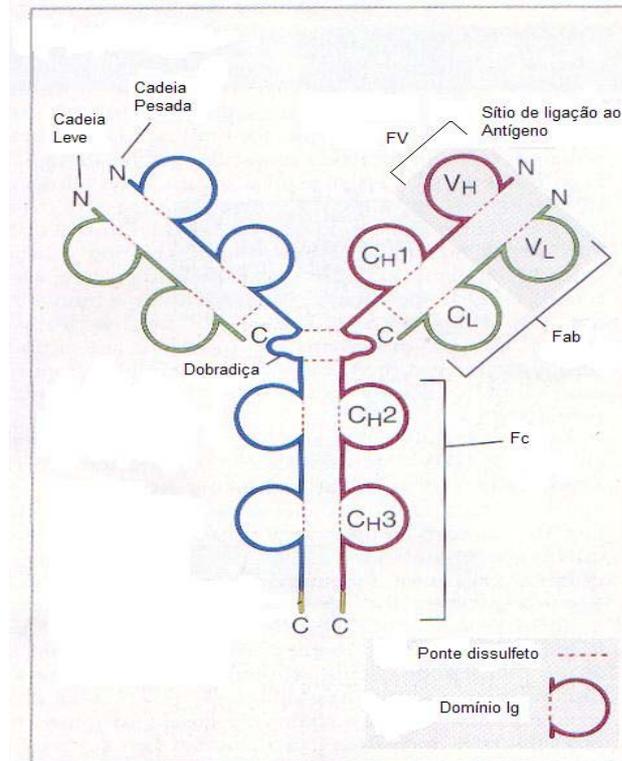


Figura 1. Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. (Adaptada de (Abbas e Lichtman, 2003).

As cadeias variáveis leve e pesada 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. A estrutura tridimensional dessa região é caracterizada pela formação de voltas (do inglês, *loops*) que se complementam à estrutura do antígeno, possibilitando a ligação antígeno-anticorpo (Paul, 2003). Ao todo são três CDRs em cada cadeia (CDR1, CDR2 e CDR3), sendo que dessas três, a CDR3 é que apresenta a maior variabilidade e é classificada como a mais importante na determinação da especificidade pelo antígeno (Abbas e Lichtman, 2003).

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 fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês, *Fragment antigen binding*). Além disso, há a liberação do fragmento cristalizável (Fc) após a clivagem. Por sua vez, quando o anticorpo é clivado 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 (Holliger e Hudson, 2005) (Figura 2).

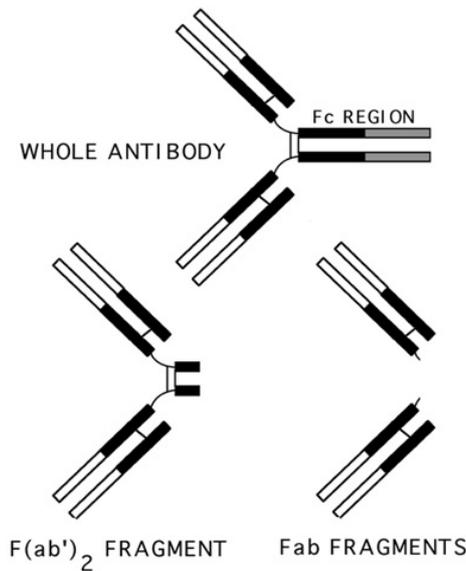


Figura 2. Representação de um anticorpo inteiro e dos fragmentos gerados após o tratamento com pepsina (F(ab')₂) e com papaína (Fab) (Www.Dartmouth.Edu/~Celllab/Pix/Fab.Jpg).

Além desses fragmentos, é possível por técnicas do DNA recombinante, manipulando seqüências codificadoras dos fragmentos de anticorpos, gerar novas possibilidades de fragmentos, esses emergindo como alternativas para utilização na clínica. Um dos formatos mais populares é o scFv, o qual consiste no VH ligado ao VL por um linker polipeptídico flexível ((Gly₄Ser)₃, por exemplo) onde se mimetiza a região Fv do anticorpo com a mesma especificidade. Como vantagens, ele possui alto poder de penetrabilidade em tecidos (revisado por (Holliger e Hudson, 2005), facilitando sua ação, por exemplo, dentro de tumores. Além disso, por se tratar de uma construção monocistrônica, apresenta a característica de fácil manipulação gênica e a estequiometria correta entre as cadeias variáveis leve e pesada é assegurada. Outro aspecto é o fato de não possuir região Fc, contribuindo para tratamentos onde a função efetora é indesejada. Além desse fragmento, podemos obter scFv bi-específicos, onde dois scFvs são ligados, *triabody* onde três cadeias de VHs ligados diretamente à VLs se conjugam formando três regiões de reconhecimento ao antígeno, dentre outros (Figura 3).

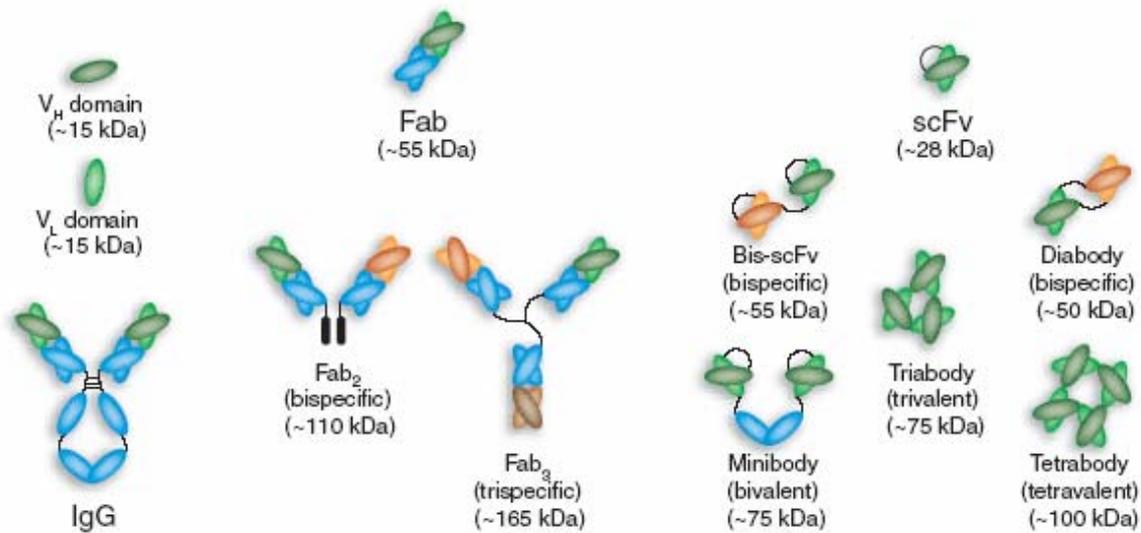


Figura 3. Representação esquemática de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos. É mostrada a clássica molécula de IgG e uma variedade de fragmentos de anticorpos, incluindo Fab, scFv e formatos multiméricos como Bis- scFv, *diabodies*, *triabodies*, *tetrabodies* e multímeros de Fab conjugados quimicamente. (Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

Outra característica importante desses pequenos fragmentos é a sua rápida remoção da circulação sanguínea do paciente. Se a estratégia de tratamento visa aumentar a meia vida do fragmento no soro do paciente, geralmente se recorre à expressão do anticorpo completo. Recentemente uma nova opção é a junção do scFv à região Fc formando o fragmento FvFc (Andrade *et al.*, 2000). Esse fragmento alia em parte as vantagens de um Ab inteiro, como uma maior meia vida no soro do paciente (Kenanova *et al.*, 2005) e a possibilidade de recrutar as funções efetoras do sistema imune via Fc. E as vantagens de um scFv, como a facilidade de manipulação gênica, visto que, o scFv com o Fc forma também um único cistron o que garante novamente a estequiometria correta entre as cadeias variáveis leve e pesada. Esse cistron é traduzido em uma única cadeia polipeptídica e processado no RE em um dímero, mimetizando uma molécula de Ab inteira (Figura 4).

Em trabalho realizado por Andrade e colaboradores (2000) foi observado que fragmentos do tipo scFv e FvFc retêm a capacidade de se ligarem especificamente ao antígeno, sendo o poder de ligação da forma FvFc comparável ao anticorpo monoclonal (mAb) do qual se originou. Devido a sua forma dimérica é esperado que o FvFc apresente uma avidéz similar ao de uma molécula de anticorpo inteiro.

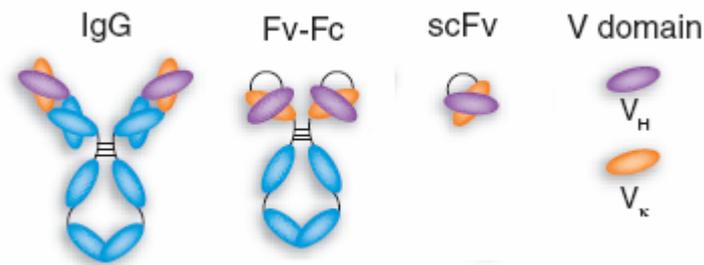


Figura 4. Representação de uma molécula de imunoglobulina em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante. (Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

No quesito estabilidade, estudos realizados *in vitro* utilizando agentes desnaturantes mostram que esses fragmentos expressos de forma heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, apresentam uma perda da estabilidade quando comparado com o anticorpo inteiro (Andrade *et al.*, 2005). Entretanto, experimentos realizados em camundongos com FvFcs conjugados a compostos radioativos contra células tumorais indicam que essa molécula retém a capacidade de ligação ao tumor, de biodistribuição e a meia vida similar ao do anticorpo inteiro do qual se originou (Kenanova *et al.*, 2005). Além desses dados, o fato de tais fragmentos manipulados geneticamente serem capazes de se dobrar corretamente em sistemas de expressão eucarióticos, de apresentarem uma relativa estabilidade conformacional e de preservarem a atividade específica de seu paratopo contra o antígeno comparável ao do anticorpo inteiro sugerem que fragmentos recombinantes de anticorpos podem ser usados na maioria dos processos biológicos que envolvam anticorpos convencionais (Andrade *et al.*, 2005).

Toda essa versatilidade de manipulação dos domínios da molécula de imunoglobulina deve-se ao arranjo estrutural que garante grande estabilidade a essas moléculas. A unidade estrutural central dos anticorpos é chamada de dobramento de imunoglobulina (dobramento Ig). Esse dobramento é composto de dois “sanduíches” de folhas β antiparalelas. Cada folha β pode apresentar uma composição estrutural diferente dependendo do domínio usado pela molécula. Nos domínios variáveis a conformação consiste de nove fitas antiparalelas, com cinco na primeira folha β e quatro, na segunda. Já os domínios constantes apresentam sete fitas antiparalelas sendo três na primeira folha e quatro, na segunda (Figura 5). Apesar das diferenças conformacionais, esses domínios compartilham resíduos de cisteína que possibilitam a formação de pontes dissulfeto ligando as duas folhas β do “sanduíche”. Essas pontes dissulfeto fornecerão a estabilidade característica do dobramento de imunoglobulina (Paul, 2003). Essas particularidades possibilitam a manutenção da conformação

tridimensional dos fragmentos de anticorpos e de suas funções. Devido à sua estabilidade, a estrutura do dobramento Ig se conservou evolutivamente e é compartilhada por diversas proteínas, como por exemplo, diversos receptores de membrana, complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Hiscompatibility Complex*), dentre outros (Abbas e Lichtman, 2003).

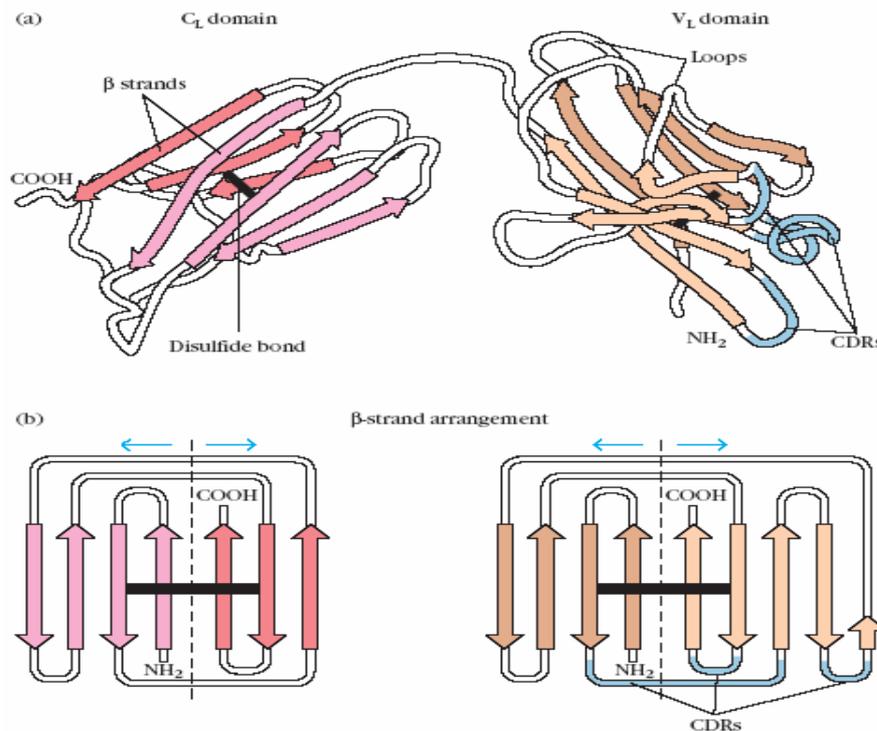


Figura 5. Dobramento de imunoglobulina. (a) Diagrama de uma cadeia leve demonstrando o dobramento de Ig dos domínios constante e variável. As duas folhas β em cada domínio são mantidas unidas por interações hidrofóbicas e por pontes dissulfeto conservadas. (b) As folhas β pregueadas estão abertas para revelar a relação entre as fitas individuais e os *loops* de ligação. CDR, regiões determinantes de complementariedade (Kindt *et al.*, 2002).

As moléculas de imunoglobulinas são classificadas como glicoproteínas devido ao seu processamento pós-traducional, onde ocorre a adição de resíduos de açúcares na sua estrutura. Todos os anticorpos possuem carboidratos em posições conservadas das regiões constantes das cadeias pesadas, sendo que cada classe apresenta um arranjo específico de açúcares N-ligados (o açúcar está ligado ao nitrogênio da amida de uma asparagina), resultando no dobramento, secreção e função da proteína (Wright e Morrison, 1997).

As imunoglobulinas dos tipos A e D (IgA e IgD) são as únicas que possuem carboidratos O-ligados (o açúcar está ligado ao grupo hidroxila da serina ou treonina via *N*-acetilgalactosamina ou ao grupamento hidroxila da hidroxilisina via galactose). O ponto de

glicosilação melhor estudado em IgGs é o resíduo asparagina 297 presente no domínio CH2 da cadeia pesada. Estudos cristalográficos (Deisenhofer, 1981) mostram que os dois domínios CH2 não interagem entre si por contatos protéicos, mas sim por uma região intersticial formada por oligossacarídeos onde interações proteína – oligossacarídeos e oligossacarídeos-oligossacarídeos mantêm a geometria relativa dos domínios CH2 (Rudd *et al.*, 2001) (Figura 6).

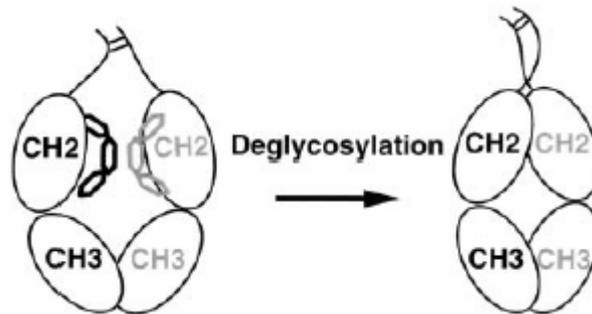


Figura 6. Desenho esquemático das interações entre oligossacarídeos adicionados à região Fc de um anticorpo (Radaev e Sun, 2001).

Essa cadeia lateral de açúcar consiste de uma estrutura central conservada formada por um heptassacarídeo com duas ramificações contendo manose e *N*-acetilglicosamina (GlcNac). A esse arcabouço central, ocorrem adições variáveis de resíduos terminais e laterais como de fucose, GlcNac, até dois resíduos de galactose e eventualmente a adição de resíduos de ácido siálico (Arnold *et al.*, 2007) (Figura 7). A glicosilação da porção Fc do anticorpo possui papel fundamental no desempenho das funções efetoras dessa molécula (Rudd *et al.*, 2001).

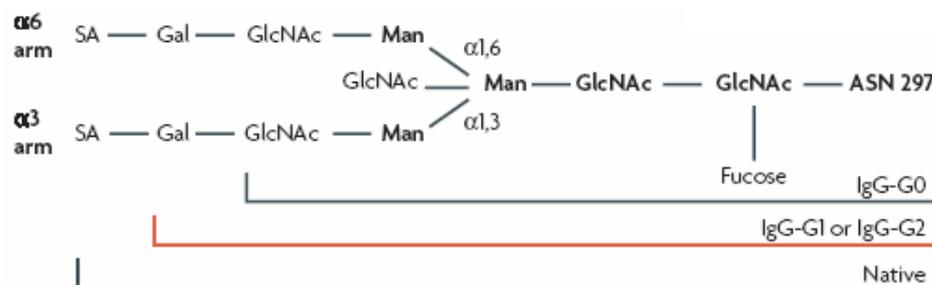


Figura 7. Glicofomas apresentadas em IgGs. A estrutura básica (IgG-G0) é normalmente composta de Asn297-Nδ2-GlcNAc (fucose)-GlcNAc-manose-(manose-GlcNAc)₂, onde GlcNAc é *N*-acetilglicosamina. As variações presentes em algumas glicofomas incluem a ligação de uma (IgG – G1) ou duas (IgG – G2) unidades de galactoses terminais, a ligação de ácido siálico à galactose terminal e/ou a ligação de um terceiro braço com GlcNAc (Native). (Adaptado de (Nimmerjahn e Ravetch, 2008).

1.3 OS RECEPTORES Fc

O reconhecimento dos resíduos de açúcar na porção Fc de imunoglobulinas e o desencadeamento das funções efetoras nas células do sistema imune são dependentes de uma classe de receptores chamados de receptores Fc (FcR, do inglês, *Fc Receptors*). Em mamíferos, foram definidas quatro classes desses receptores para imunoglobulinas do isotipo IgG, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) e Fc γ RIV, os quais irão controlar a progressão ou o término da resposta imune (Nimmerjahn e Ravetch, 2006). Esses receptores são amplamente expressos por todo sistema hematopoiético (Paul, 2003). Por exemplo, células da resposta inata como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, basófilos e mastócitos expressam Fc γ Rs ativadores e inibitórios. Dentre os linfócitos, estudos iniciais indicaram que certas subpopulações de células T poderiam apresentar Fc γ R, fato contestado por Takai e colaboradores (2002). Já em linfócitos B, há somente a presença de receptores inibitórios Fc γ RIIB. Outra célula que apresenta um único tipo de Fc γ R são as células NK (*Natural Killer*) nas quais são expressos apenas receptores ativadores Fc γ RIII. O Fc γ RIIB expresso em células B age como um importante regulador dos sinais ativadores que são transmitidos pelo receptor de célula B (BCR, do inglês, *B cell receptor*). Em contrapartida, a falta de um Fc γ R inibitório em células NK sugere que essas células podem ser potentes mediadores da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Nimmerjahn e Ravetch, 2008).

Tradicionalmente, as famílias dos Fc γ Rs são categorizadas de acordo com o grau de afinidade do receptor à subclasses de IgG e pela via de sinalização por ele desencadeada, seja ela uma via inibitória ou ativadora (Hulett e Hogarth, 1994; Paul, 2003). O Fc γ RIIB é o único receptor inibitório conhecido. Ele transmite os sinais inibitórios via um motivo inibitório chamado de ITIM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) contido na região citoplasmática do receptor. Todos os outros receptores ativam as vias de sinalização via motivos ativadores chamados de ITAMs (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*).

O Fc γ RI é o único receptor conhecido com alta afinidade, os demais receptores possuem uma afinidade de 100 a 1000 vezes menor (Paul, 2003). Essa baixa afinidade da maioria dos Fc γ R desempenha um papel importante, já que ela previne a ligação a moléculas de anticorpos monoméricas presentes em altos níveis na circulação, impedindo, assim, uma potencial ativação inespecífica de respostas pró-inflamatórias (Nimmerjahn e Ravetch, 2008). Havendo o reconhecimento de Fcs de imunoglobulinas em um contexto favorável, ou seja,

com vários anticorpos ligados ao antígeno expondo seus Fcs, ocorrerá o desencadeamento da via de sinalização.

Assim como os anticorpos, os receptores Fc são glicoproteínas. Dados recentes sugerem uma possível associação entre a ligação do receptor aos fragmentos Fc e o nível de glicosilação do receptor. Um exemplo é o caso do Fc γ RIIIA, na qual o açúcar ligado a asparagina 162 pode ser responsável por reconhecer a presença de resíduos de fucose (Figura 8). Observou-se que a forma glicosilada desse receptor apresenta alta afinidade por fragmentos Fc que não possuem o resíduo de fucose. Já o mesmo receptor não glicosilado foi incapaz de detectar essas diferenças (Ferrara *et al.*, 2006), indicando a existência de uma possível correlação entre o grau de glicosilação dos Fc γ Rs e a afinidade desses receptores por fragmentos Fcs.

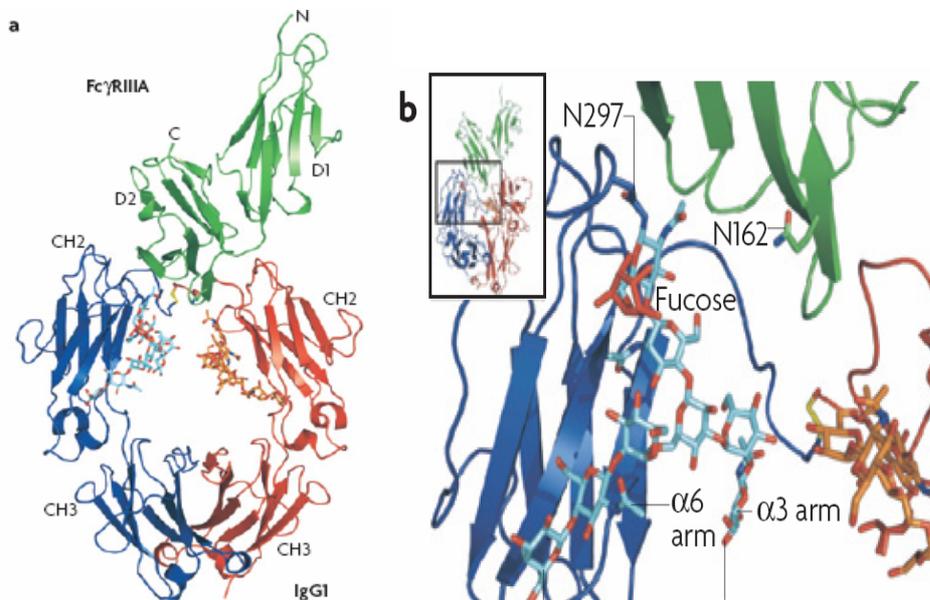


Figura 8. Interações entre anticorpos e o Fc γ R. **a-** Estrutura dos domínios extracelulares D1 e D2 do receptor Fc γ RIIIA (em verde) se ligando às duas cadeias pesadas de uma IgG1 humana. **b-** Visão aproximada das cadeias de açúcar presentes nas duas cadeias pesadas. O resíduo Asn-297 da cadeia pesada do anticorpo e o resíduo Asn-162 do Fc γ RIIIA, contendo um açúcar ligado ao FcR, estão marcados. A estrutura do açúcar adicionado à cadeia pesada do anticorpo é mostrada com ênfase na ramificação de fucose que possivelmente age desestabilizando a ligação junto ao Asn-162 diminuindo a estabilidade da ligação. (Adaptada de (Nimmerjahn e Ravetch, 2008).

Além dos resíduos de açúcar presentes nos Fc γ Rs, a glicosilação presente nos fragmentos Fc é vital para a ligação do anticorpo ao Fc γ R. A deleção desses grupos provoca mudanças estruturais na região Fc que resultam na diminuição significativa da ligação aos FcRs (Arnold *et al.*, 2007). Outras variações na glicosilação das imunoglobulinas também impactam na sua ligação ao Fc γ R e na atividade do anticorpo *in vivo*. A presença de

ramificações com resíduos como fucose e Glcnac na estrutura central heptassacarídica tem papel determinante na atividade dos anticorpos *in vitro* e *in vivo* (Shields *et al.*, 2002; Shinkawa *et al.*, 2003; Ferrara *et al.*, 2006). Conforme citado anteriormente, a falta do resíduo de fucose aumenta a afinidade de todas as subclasses de IgG pelo receptor ativador FcγRIIIA de 10 a 50 vezes. Esses dados são de alta relevância na engenharia de anticorpos terapêuticos. Em anticorpos onde há interesse de uma alta citotoxicidade, por exemplo, no caso do tratamento de cânceres, a manipulação para retirada do resíduo de fucose pode ser interessante. O fato da perda desse resíduo gerar uma maior afinidade pelo receptor de Fc sugere que anticorpos terapêuticos que utilizam a ADCC podem, em doses menores, atingir resultados na clínica similares à altas doses de anticorpos fucosilados (Shields *et al.*, 2002).

1.4 OS ANTICORPOS NA CLÍNICA

Nos últimos 20 anos, a utilização de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos vem revolucionando o tratamento de diversas enfermidades. Desde a aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration – EUA), em 1986, do anticorpo murino anti-CD3, Orthoclone OKT3, para o tratamento da rejeição aguda do transplante de rins e subseqüentemente 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 18 anticorpos aprovados pelo FDA no mercado (tabela 1), variando entre murinos, quiméricos, humanizados e totalmente humanos. Nessa época, previa-se que mais 16 novos produtos no mercado até 2008 (Reichert, 2004), dos quais quatro se confirmaram, o Eculizumab (2007), o Natalizumab (2004), o Panitumumab (2006) e o Renibizumab (2006), sendo três humanizados e um totalmente humano (http://en.wikipedia.org/wiki/Monoclonal_antibody_therapy). Entre os anos de 2001 e 2002, o mercado de anticorpos monoclonais cresceu 37, 5% chegando a um patamar de US\$ 5,4 bilhões. Essa taxa de crescimento vem se mantendo, apresentando dados de vendas globais para o ano de 2006 em torno de US\$ 20,6 bilhões (Maggon, 2007).

Quando comparada ao início, a indústria biotecnológica apresenta um crescimento robusto dos investimentos em engenharia de anticorpos, desenvolvendo outros tipos de moléculas, como os fragmentos de anticorpos e imunocombinados (Presta, 2006). Nesse sentido, o desenvolvimento de novas imunoglobulinas recombinantes tornou-se peça chave no tratamento de diversas doenças, visto que a sua especificidade característica faz com que sejam consideradas como “balas mágicas” atuando em um alvo específico, assim, aumentando a eficiência do tratamento.

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

Nome (Genérico)	Molécula Alvo	Tipo	Doença indicada	Categoria Terapêutica	Empresa	Data de Aprovação
OKT3 (Muromonab-CD3)	CD3	Murino	Rejeição de Transplantes	Imunológica	Johnson & Johnson	19.06.1986
ReoPro (Abciximab)	<u>CA17-1^a</u>	Quimérico	PTCA	Homeostase	Centocor	22.12.1994
Panorex (edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer colorctal	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- α	Quimérico	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Centocor	24.08.1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her2/neu	Humanizado	Metástase de câncer de mama	Anti-Neoplástica	Genentech	25.09.1998
Mylotarg (Gemtuzumab ozogamicin)	CD33	Humanizado	Leucemia mielóide	Anti-Neoplástica	Wyeth	17.05.2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica	Anti-Neoplástica	Millennium/ILEX	07.05.2001
Zevalin (Ibritumomab tiuxetan)	CD20	Murino	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Biogen IDEC	19.02.2002
Humira (Adalimumab)	TNF- α	Humano	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Imunológica	Abbott	31.12.2002
Xolair (Ornalizumab)	IgE	Humanizado	Asma	Imunológica	Genentech	20.06.2003
Bexxar (Tositumomab-I 131)	CD20	Murino	Linfoma de Non-Hodgkins	Anti-Neoplástica	Corixa	27.06.2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Imunológica	Genentech	27.10.2003
Erbitux (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer colorctal	Anti-Neoplástica	Imclone Systems	12.02.2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer colorctal, renal.	Anti-Neoplástica	Genentech	26.02.2004
Tysabri (Natalizumab)	Integrina A4	Humanizado	Doença de Crohn e esclerose múltipla	Imunológica	Biogen IDEC	23.11.2004
Lucentis (Renibizumab)	VEGF-A	Humanizado	Degeneração macular	Anti-Neoplástica	Genentech	30.06.2006
Vectibix (Panitumumab)	EGFR	Humano	Câncer colorctal	Anti-Neoplástica	Amgen	27.09.2006
Soliris (Eculizumab)	C5	Humanizado	Paroxysmal hemoglobinúria (PNH)	Imunológica	Alexion Pharm	16.03.2007

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

1.5 O ANTICORPO ANTI-CD3

Dentre os anticorpos terapêuticos utilizados na clínica o OKT3 se destaca. Ele vem sendo largamente usado na prevenção da rejeição de órgãos transplantados.

Com o advento da produção de versões humanizadas de anticorpos CD3 específicos com regiões Fc mutadas e a demonstração que o tratamento de curto tempo com anticorpos monoclonais CD3 específicos pode induzir um estado de tolerância operacional (estado de tolerância a um determinado antígeno que é sustentado sem o uso de imunossupressores) novas aplicações clínicas têm emergido para essa molécula. Como exemplo podemos citar o tratamento da diabetes Tipo 1 autoimune (Herold *et al.*, 2005), psoríase e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Tabela 2) (Utset *et al.*, 2002). Em modelos murinos, anticorpos anti-CD3 específicos vêm sendo usados na 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), na artrite induzida por colágeno (Hughes *et al.*, 1994) e em doenças inflamatórias intestinais (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, reduziu 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 sobrevivida duradoura de órgãos transplantados (Chatenoud, 2003).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais anti-CD3 terapêuticos em doenças imune-mediadas. *

Doença	Pré-Clínico		Clínico	
	Modelo	Anticorpo	Teste	Anticorpo
Doenças inflamatórias intestinais	Camundongo com colite induzida por TNP-KLH	Parenteral 145-2C11(anticorpo anti-CD3 de camundongo)	Tratamento da doença de Crohn	Anticorpo humanizado Vizilizumab
Doenças neurológicas mediadas pelo sistema imune	EAE em ratos	G4.18 (anticorpo anti-CD3 de ratos)	Até o momento não há testes clínicos	
	EAE em camundongos	145-2C11 ou 145-2C11 F(ab') ₂		
Artrite inflamatória mediada pelo sistema imune	Artrite induzida por colágeno em camundongos	145-2C11 F(ab') ₂	Tratamento da artrite psorítica	Anticorpo humanizado Teplizumab
			Tratamento da rejeição aguda ao transplante renal	Anticorpo humanizado Teplizumab
Rejeição de órgãos transplantados	Indução de tolerância ao transplante do coração em ratos	G4.18	Prevenção da rejeição do transplante de ilhotas pancreáticas	Anticorpo humanizado Teplizumab
			Tratamento da rejeição aguda ao transplante renal	Anticorpo humanizado ChAglyCD3
GVHD	Prevenção da GVHD	145-2C11 ou 145-2C11 F(ab') ₂	Tratamento da GVHD aguda refratária a esteróides.	Anticorpo humanizado Vizilizumab

EAE, encefalomielite auto-imune experimental;GVHD, *Graft-Versus-Host disease*; TNP-KLH, *2,4,6-trinitrophenol conjugated keyhole limpet haemocyanin*. *Adaptado de (Chatenoud e Bluestone, 2007).

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 ζ (Figura 9). 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 presentes no CD3 e nas cadeias ζ , 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 suas funções efetoras, como a produção de citocinas, como por exemplo IL-2 e citotoxicidade celular.

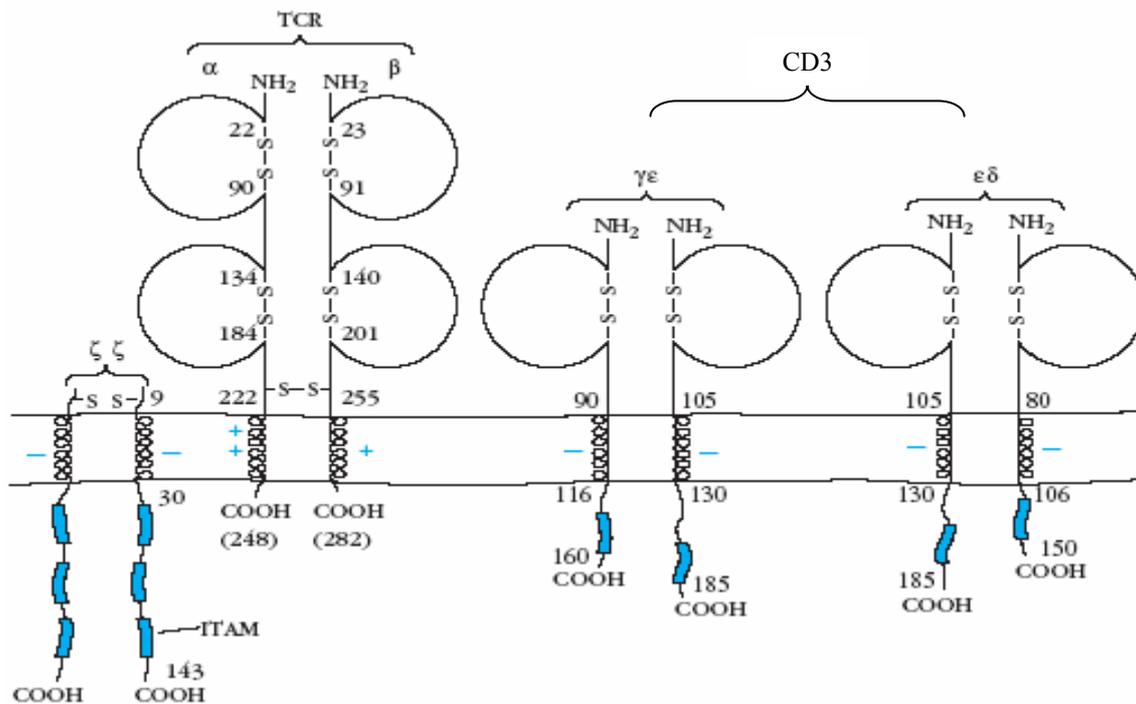


Figura 9. Diagrama esquemático do complexo receptor de celular T (TCR). Ele é constituído pelo TCR, cadeias ζ e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias ζ do CD3 apresentam uma seqüência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), que agirá no processo de transdução de sinal (Kindt *et al.*, 2002).

Ao se ligarem ao complexo CD3, os anticorpos específicos para CD3 mediarão 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 ζ, 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*, 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 10). De acordo com o modelo proposto, essa ligação promoveria um deslocamento molecular diferente do observado na correta estimulação do complexo TCR (Figura 10, 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 (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

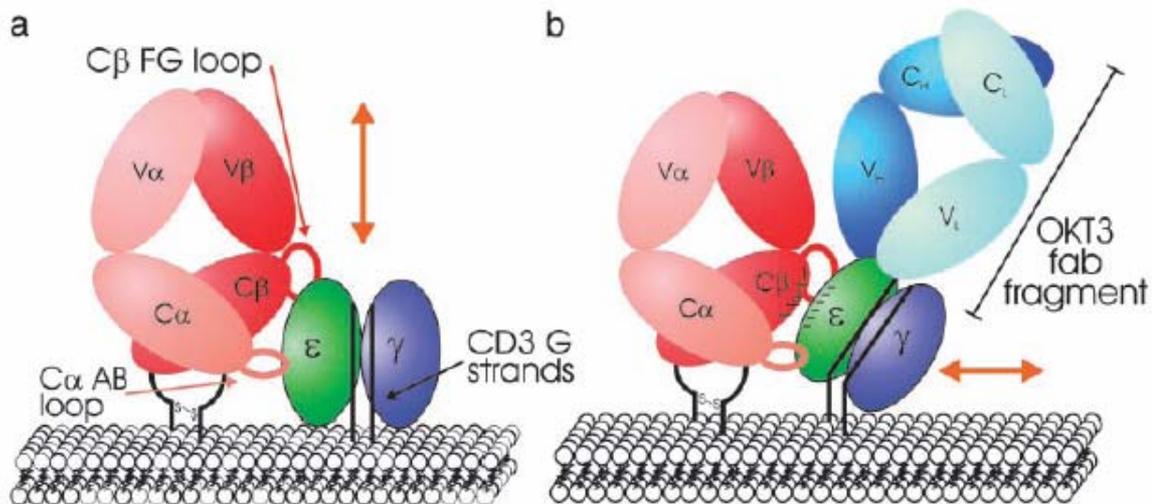


Figura 10. Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação do CD3 ao $\alpha\beta$ TCR. (a) Modelo de sinalização após a ligação de antígeno ao TCR, onde ocorre um deslocamento vertical do CD3 e assim desencadeando uma cascata de transdução de sinal. (b) Dinâmica de ligação do 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).

A sinalização diferencial gerada pelos anticorpos anti-CD3 junto ao complexo TCR é responsável pelos efeitos observados durante o tratamento com esse imunobiológico. Diversos mecanismos já foram descritos na literatura para explicar a sua forma de ação, entretanto, esse ainda é um assunto controverso. No caso do OKT3, ao se ligar ao CD3, ele pode mediar a depleção de células T dependente do sistema complemento ou uma citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Pode também, redirecionar a lise celular dependente de célula T após a ligação a uma célula alvo e a uma célula T citotóxica, simultaneamente (Figura 11) (Wong e Colvin, 1991). A indução de apoptose através de uma transdução de sinal direta (particularmente em células T ativadas) foi mostrada *in vitro* e pode operar *in vivo* (Carpenter *et al.*, 2000). Pode haver ainda uma depleção de células T por morte celular induzida por ativação (AICD, do inglês, *Activated Induced Cell Death*) ou pelo

desenvolvimento de um estado de irresponsividade ao estímulo chamado de anergia clonal (Smith *et al.*, 1997).

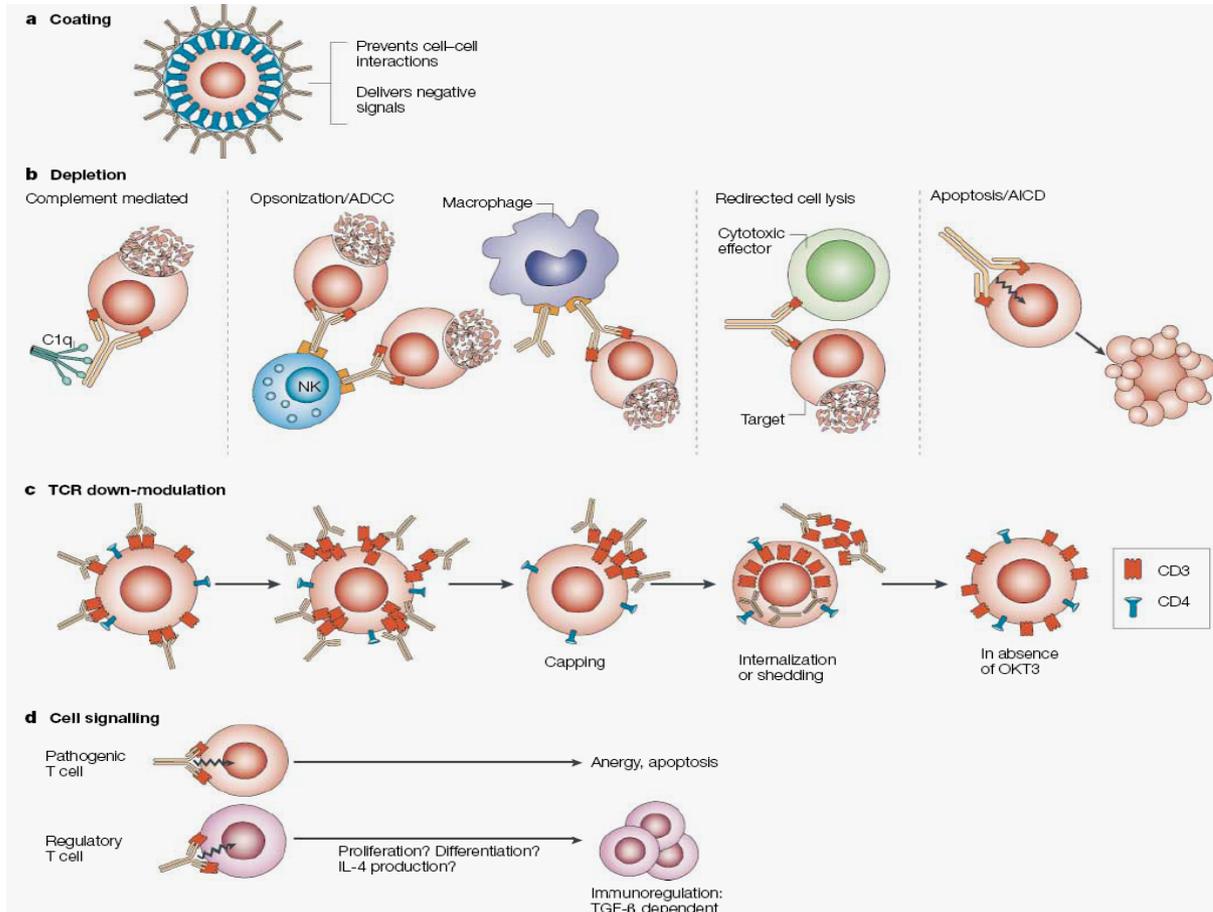


Figura 11. Modos de ação mediados por anticorpos anti-CD3. Anticorpos CD3 específicos agem por meio de quatro mecanismos não mutuamente exclusivos: Revestimento da célula (**a**, *cell coating*); Depleção das células (**b**, *cell depletion*); Internalização do TCR (**c**, *T-cell receptor (TCR) down-modulation*); e sinalização celular (**d**, *cell signalling*). ADCC – citotoxicidade celular dependente de anticorpo; AICD, Morte celular induzida por ativação; IL-4, interleucina-4; NK, *natural killer*; TGF- β , fator de crescimento transformante – β . Adaptada de (Chatenoud, 2003).

As células T não eliminadas fisicamente podem perder completamente a expressão da molécula CD3 e conseqüentemente do receptor de célula T ligado (TCR) (Figura 11) (Chatenoud *et al.*, 1982). Esse fenômeno é resultante da internalização do CD3 mediada pelo anticorpo, e do catabolismo ou da reciclagem do TCR-CD3 alvo. Isso não afeta a expressão de outros marcadores principais de células T. Desta forma, células negativas para o complexo TCR-CD3 mas positivas para CD4 e CD8 podem ser detectadas em pacientes tratados com anticorpos CD3 específicos (Chatenoud *et al.*, 1982). Essas células são “cegas” para antígenos e imunoincompetentes tanto *in vitro* como *in vivo*, conforme observado pela imunossupressão

generalizada que é alcançada por pacientes transplantados renais que receberam tratamento com OKT3 (Vigeral *et al.*, 1986).

Recentemente, alguns estudos têm mostrado que os anticorpos CD3 específicos são capazes de induzir o surgimento de um tipo muito peculiar de célula T. É relatado que o tratamento com anti-CD3 induz o surgimento de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Belghith *et al.*, 2003) e CD8⁺CD25⁺ (Bisikirska *et al.*, 2005) que suprimem respostas imunes. Atualmente, existem diversas evidências da importância de células T CD4⁺ expressando CD25 (cadeia α do receptor de interleucina 2, citocina com papel vital no início da resposta imune inflamatória) e também o fator de transcrição FoxP3 na manutenção da tolerância ao próprio e no controle de diversas respostas imunes (Roncarolo *et al.*, 2006; Shevach *et al.*, 2006).

Experimentos utilizando anticorpos anti-CD3 não ligantes à FcRs em camundongos diabéticos não obesos (NOD, do inglês, *Non-obese Diabetic*), um modelo clássico de diabetes autoimune, mostram um aumento no número de células Tregs adaptativas dependentes do fator de crescimento transformante β (TGF- β , do inglês, *Transforming Growth Factor- β*) (You *et al.*, 2007). O TGF- β é uma citocina que possui como principal ação inibir respostas imunes e inflamatórias, podendo assim, estar diretamente envolvida na indução de um contexto regulador. Nesse trabalho, foi realizado um experimento onde células T CD25⁻ foram transferidas para camundongos NOD imunocomprometidos para induzir diabetes. Após o seu desenvolvimento da doença, os camundongos foram tratados com o anticorpo anti-CD3, que levou a recuperação dos camundongos e o surgimento de células CD25⁺. Células T CD4⁺ isoladas dos camundongos recuperados apresentaram uma produção significativamente maior de TGF- β e interleucina-10 (IL-10, citocina predominantemente reguladora) quando comparados àqueles que não obtiveram sucesso no restabelecimento da glicemia (You *et al.*, 2007). Portanto, o desenvolvimento de células T regulatórias adaptativas após o tratamento com anticorpos anti-CD3 pode ser o mecanismo envolvido na indução da tolerância operacional observada em testes clínicos realizados com esse anticorpo. Um exemplo é o ensaio clínico de fase I/II com humanos portadores de diabetes autoimune. Observou-se que o tratamento com uma versão humanizada do OKT3 não ligante a FcR durante 14 dias consecutivos resulta em uma melhora dos parâmetros clínicos por até 2 anos, acompanhada pela redução da necessidade de insulina por esses pacientes quando comparados aos controles (Herold *et al.*, 2005). Esse é, portanto, mais um indício de que o desenvolvimento de Tregs após o tratamento com anticorpos anti-CD3 esteja envolvido com os efeitos em longo prazo alcançados com esse tratamento.

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 anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas (principalmente IgM e IgG) contra anticorpos de outro organismo promovendo uma rápida remoção e neutralização do OKT3 e, assim, reduzindo sua eficácia (Li *et al.*, 2005). Análises imunoquímicas mostram uma resposta restrita, consistindo de anticorpos específicos contra o isotipo do OKT3 (IgG2a) e contra determinantes idiotípicos (presentes no sítio de ligação ao antígeno) (Chatenoud *et al.*, 1986). A consequência prática dessa especificidade restrita é que os pacientes imunizados com o OKT3 tornam-se responsivos a uma segunda administração, bloqueando a sua ação e restringindo a sua administração além do período em que o transplante foi realizado.

O uso do OKT3 em associação com imunossuppressores convencionais tem sido a estratégia adotada para diminuir a resposta HAMA. A adição de corticosteróides e azatioprina reduz a frequência de sensibilização ao OKT3 de 95% para 40%. Já a adição de ciclosporina promove uma redução mais drástica da resposta HAMA, diminuindo sua frequência para 20%, e, na maioria dos casos, os anticorpos produzidos não afetam a eficácia do OKT3 porque surgem somente no final do tratamento com OKT3 (Hricik *et al.*, 1990).

Outra limitação do OKT3 é a sua mitogenicidade. Ensaio realizados *in vitro* mostram que esses anticorpos induzem a proliferação de células T e a produção de citocinas (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, produzidas por células T e não por macrófagos (Ferran *et al.*, 1994). Entretanto, essa capacidade mitogênica do OKT3 é dependente de macrófagos/monócitos e envolve a produção de IL-6 e IL-1 (citocinas pró-inflamatórias) por esse tipo celular (Chatenoud, 2003). Essa ativação da expressão de citocinas está correlacionada com a capacidade da porção Fc do anticorpo interagir com os receptores Fc presentes nos fagócitos e em células *natural killer*.

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, vômito, diarreia, insuficiência respiratória, meningite séptica e hipotensão (Sgro, 1995). Similarmente a liberação de citocinas, essa síndrome é auto-limitante e desaparece em torno do segundo ao terceiro dia de tratamento.

1.6 A ENGENHARIA DE ANTICORPOS

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 são menos imunogênicos em relação aos anticorpos murinos originais (Chatenoud, 2003). A humanização de anticorpos propõe que por meio de técnicas de biologia molecular possa se conferir um “aspecto humano” ao anticorpo, tornando-os similares aos anticorpos circulantes no soro de seres humanos e assim diminuindo a resposta imune montada contra essas moléculas.

Um dos primeiros métodos empregados para humanizar um anticorpo consiste na construção de seqüências gênicas codificadoras da região de ligação ao antígeno (Fv) do camundongo ligada a domínios constantes de imunoglobulinas humanas, com isso formando anticorpos quiméricos, nos quais o número de resíduos de aminoácidos murinos é significativamente menor (Figura 12). Contudo, o fato de possuírem resíduos murinos ainda os torna imunogênicos. Nos últimos anos, procura-se obter anticorpos humanizados com o mínimo de resíduos de aminoácidos murinos em toda seqüência do anticorpo. A partir de então foi proposta a técnica de transplante de CDR (*CDR grafting*) que consiste em transplantar os três CDRs da seqüência codificadora do anticorpo murino para um arcabouço (*framework*) de um anticorpo humano, por manipulação gênica (Figura 12) (Maranhão e Brigido, 2001).

Há diferentes estratégias para se humanizar um anticorpo. Os primeiros anticorpos propostos eram construídos baseados em seqüências humanas de cristais cujas estruturas eram conhecidas, permitindo a identificação de resíduos que poderiam contribuir para a ligação ao antígeno (Riechmann *et al.*, 1988). Outra estratégia é a do “melhor encaixe” (*best fit*), na qual a seqüência humana rearranjada mais similar ao anticorpo murino é utilizada como arcabouço para receber os CDRs murinos (Co e Queen, 1991). Escolhendo o arcabouço humano mais similar ao anticorpo murino original objetiva-se favorecer a manutenção de características estruturais importantes do arcabouço original, permitindo, dessa forma, uma correta orientação espacial dos CDRs. Outro método é utilizar, no lugar da seqüência similar rearranjada, uma seqüência germinal (seqüência presente em linfócitos B imaturos) mais próxima à do anticorpo murino (Tomlinson *et al.*, 1992). Essa abordagem é baseada no mesmo princípio da estratégia do “melhor encaixe”, mas somente seqüências germinais são acessadas em bancos de dados, o que facilita o encontro da seqüência mais similar (Caldas *et*

al., 2000). O atrativo no uso de seqüências germinais é que devido ao fato de elas não terem passado pelo processo de hipermutação somática, apresentam uma imunogenicidade potencialmente menor quando comparada às seqüências rearranjadas e hipermutadas (Caldas *et al.*, 2000).

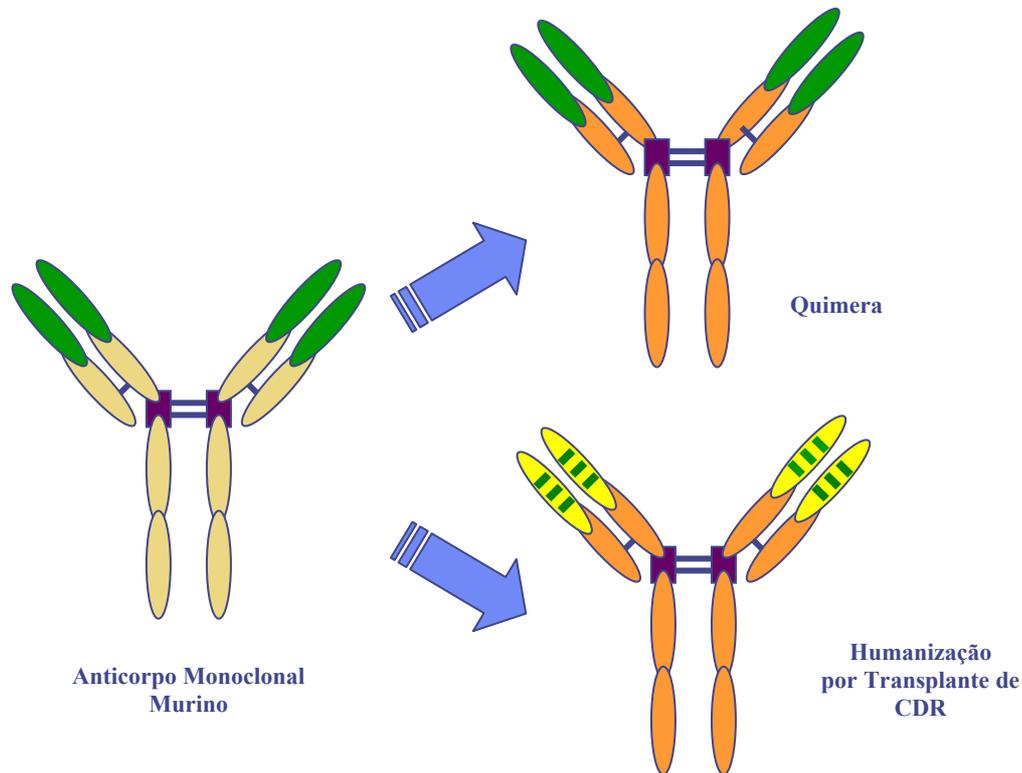


Figura 12. Representação esquemática das técnicas de humanização de anticorpos. Em verde e bege, o anticorpo monoclonal murino. A molécula quimera originada da fusão das cadeias variáveis leve e pesada murinas com os domínios constantes humanos (em laranja). E o anticorpo humanizado pelo transplante das CDR murinas (linhas verdes) transferidas para arcabouços variáveis humanos, em amarelo (Maranhão e Brigido, 2001).

Uma técnica de humanização diferenciada é *resurfacing*. Essa técnica envolve a substituição de resíduos expostos ao solvente, ou seja, acessíveis ao reconhecimento por anticorpos, por resíduos humanos, enquanto que os CDRs e os aminoácidos enterrados na estrutura permanecem iguais aos do anticorpo murino (Presta, 2006). Apesar de não possuírem resíduos murinos expostos ao solvente, anticorpos humanizados por essa técnica podem ser internalizados por macrófagos e apresentados à linfócitos via MHC do tipo II, podendo gerar uma maior imunogenicidade em relação aos anticorpos produzidos por transplante de CDR. Isso porque na apresentação, em um contexto de MHC, os resíduos murinos podem ser apresentados. Dessa forma, é interessante obter anticorpos com o menor número possível de resíduos murinos.

Com o desenvolvimento das técnicas de humanização, os anticorpos humanizados tornaram-se uma realidade de sucesso na clínica, sendo que dos 22 anticorpos monoclonais aprovados pelo FDA para uso terapêuticos 77% são humanizados, ou parcialmente humanizados (quiméricos). Além disso, mais de 56 anticorpos humanizados já estão em fase avançada de desenvolvimento e devem chegar ao mercado nos próximos anos (Reichert, 2004).

Além do desenvolvimento de técnicas mitigadoras da imunogenicidade de anticorpos murinos, a engenharia de anticorpos tem contribuído para a solução de outro entrave na utilização do OKT3, a sua mitogenicidade. Como essa característica está justamente relacionada à capacidade da região Fc interagir com FcRs, têm-se buscado alternativas que eliminem essa capacidade de ligação aos FcRs. Dessa forma, ensaios *in vitro* com F(ab')₂ CD3 específicos mostram uma ligação específica ao CD3 sem a indução da proliferação dos linfócitos (Woodle *et al.*, 1991). *In vivo*, observou-se que esses anticorpos não induziram a proliferação e não promoveram a liberação em larga escala de citocinas (Hirsch *et al.*, 1990). Esses resultados permitiram o desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos humanizados CD3 específicos manipulados para não se ligarem aos FcRs (Bolt *et al.*, 1993; Alegre *et al.*, 1994). Dados experimentais e clínicos indicam que anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR não sofreram nenhuma alteração na sua capacidade terapêutica (Friend *et al.*, 1999; Woodle *et al.*, 1999).

Curiosamente, apesar desses anticorpos não induzirem a liberação em larga escala de citocinas, eles promovem a transdução de sinais de ativação. Isso pode ser observado em camundongos tratados com F(ab')₂ CD3 específicos, nos quais há um aumento nos níveis de RNA mensageiro codificando várias citocinas (Chatenoud *et al.*, 1997) e em pacientes tratados com anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR foram detectados baixos níveis de citocinas (Friend *et al.*, 1999; Woodle *et al.*, 1999). Provavelmente essa ativação parcial deve ser essencial para os efeitos terapêuticos dos anticorpos anti-CD3 (Chatenoud *et al.*, 1997). Portanto, existe uma clara distinção entre o potencial mitogênico dos anticorpos anti-CD3, o qual parece não ser necessário para a eficácia terapêutica, e a capacidade de sinalização/ativação parcial, necessária para o efeito terapêutico (Chatenoud, 2003).

1.7 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ANTICORPOS

Uma das grandes limitações no emprego de anticorpos terapêuticos é o seu complexo processo de produção. As limitações encontram-se principalmente na baixa quantidade

produzida e no alto custo no processamento e purificação das proteínas, o que de certa forma dificulta o acesso ao medicamento por boa parte dos pacientes.

Um sistema de expressão que tem se mostrado eficiente para a produção de anticorpos e seus fragmentos é a expressão em leveduras. As leveduras já são utilizadas na síntese de diversas proteínas recombinantes para uso terapêutico, como por exemplo, a insulina, glucagon, antígeno de superfície da hepatite B, dentre outras (Gerngross, 2004). Esse sistema combina o rápido crescimento e a facilidade de manipulação genética dos procariotos com características típicas de sistemas eucarióticos, como a presença da maquinaria eucariótica de síntese de proteínas, a qual possibilita a produção de polipeptídeos que requerem modificações pós-traducionais, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Cereghino e Cregg, 2000). Além disso, as leveduras vêm sendo utilizadas para produzirem altas taxas de proteínas, incluindo proteínas de mamíferos, como por exemplo, foi relatada a produção de até 14,8 g/L de proteína em *Pichia pastoris* (Werten *et al.*, 1999).

Apesar da grande vantagem dos níveis expressos de proteína, as leveduras apresentam uma desvantagem. Elas são capazes de glicosilar proteínas, entretanto, de forma diferente da realizada por mamíferos. Contrariamente aos mamíferos, leveduras não são capazes de adicionar resíduos de fucose, galactose e ácido siálico e, ao mesmo tempo, são hábeis na adição de muitos resíduos de manose. Esse fato impacta negativamente na meia-vida das proteínas, uma vez que receptores para altos níveis de manose estão presentes em macrófagos e células endoteliais, acarretando uma rápida remoção da proteína da circulação (Mistry *et al.*, 1996).

Devido aos problemas enfrentados com a produção de glicoproteínas em leveduras, atualmente o estado da arte do processo de produção de mAbs emprega células de mamíferos devido a sua capacidade de promover um correto dobramento e processamento pós-traducional (Wurm, 2004). Dentre as células de mamíferos, a mais utilizada na produção em grande escala de proteínas recombinantes é a linhagem de células de ovário de *hamster* chinês (CHO). Essas células são epiteliais, têm a morfologia fibroblastóide e são aderentes ao plástico onde são cultivadas. Como vantagem essa linhagem possui: uma alta taxa expressão de proteínas quando comparada a outras células de mamíferos; a possibilidade de crescerem em suspensão em meios livres de soro quando se objetiva a produção em larga escala (Derouazi *et al.*, 2004); e, por fim, o fato de gerarem um produto fidedigno àquele produzido por células humanas, principalmente no que se refere à glicosilação. Essas últimas

características têm sido pontos críticos para aprovação por parte do FDA para uso clínico de proteínas recombinantes.

Desde a aprovação da primeira proteína terapêutica produzida em células de mamíferos em 1986 grandes melhorias foram alcançadas no sentido de se aumentar os níveis de expressão, embora os conceitos básicos não tenham mudado desde meados da década de 80. Em 1986 os melhores processos de cultivo geravam em torno de 50 mg/L de proteína, já em 2004, foram alcançados níveis de expressão de anticorpos em torno de 4,7 g/L (Wurm, 2004).

Diversos fatores estão envolvidos na otimização da expressão protéica em células de mamíferos. Um desses fatores são os vetores de expressão utilizados. Os vetores de expressão para geração de linhagens celulares recombinantes geralmente utilizam promotores fortes de origem viral ou celular, como por exemplo, o promotor de citomegalovírus (CMV) para dirigir a expressão do gene recombinante (Gopalkrishnan *et al.*, 1999). Na maioria dos casos, o gene de interesse é isolado como um DNA complementar (cDNA, do inglês, *complementary DNA*) sem íntrons. Entretanto, têm-se mostrado que em células eucarióticas o transporte eficiente para o citoplasma e a tradução do RNA mensageiro dependem do processo de *splicing* (Le Hir *et al.*, 2004). Dessa forma, busca-se adicionar íntrons nos vetores de expressão com o intuito de aumentar os níveis de expressão.

O procedimento de transfecção pode ser realizado ou utilizando-se um único vetor que contenha tanto o gene de interesse quanto uma marca seletiva ou utilizando-se vetores distintos para essas duas características. Quando presentes no mesmo vetor, eles podem ser expressos de forma policistrônica (Balland *et al.*, 1988). Um exemplo de construção que possibilita a expressão policistrônica é a utilização de sítios de entrada ribossomais internos (IRES, do inglês, *Internal Ribosome Entry Site*). Ao ser adicionado entre o gene de interesse e uma marca seletiva, o IRES possibilita a tradução dos dois genes, devido à geração de um sítio interno para entrada de ribossomos sem a necessidade de todo o aparato de iniciação da tradução presente em eucariotos (Figura 13). A adição de uma marca seletiva na transfecção é interessante quando se pretende selecionar um clone altamente produtor e estável. Esses são parâmetros essenciais para a produção em larga escala de proteínas recombinantes.

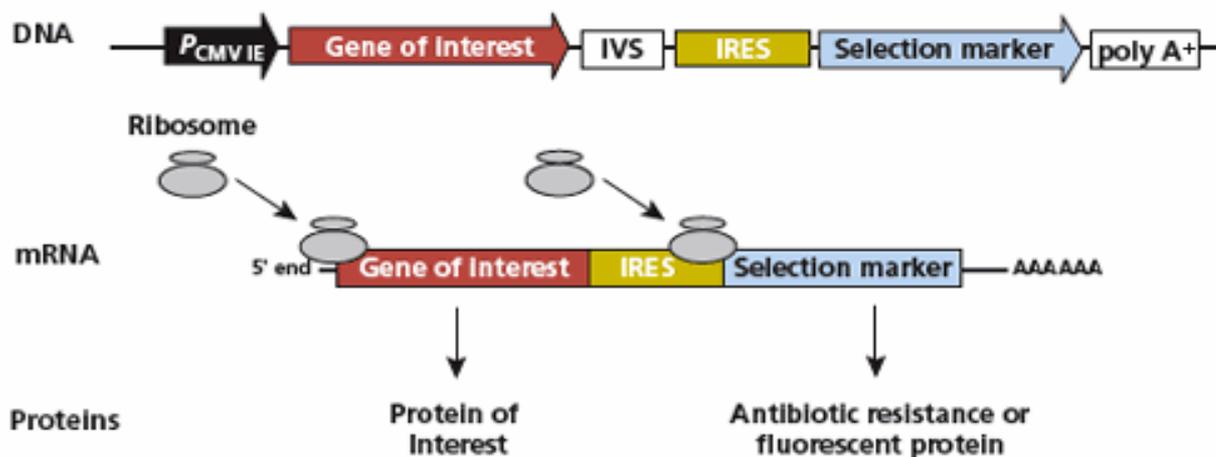


Figura 13. Mecanismo de ação do sítio de entrada ribossomal interno (IRES, do inglês, *Internal Ribosome Entry Site*) em um processo de tradução. Pcmvie: promotor. Gene of interest: gene de interesse. Selection marker: marca seletiva. IVS: íntron sintético. Poly A: sinal de poliadenilação (Clontech).

Após a transfecção, o transgene é transportado para o núcleo e integrado no genoma por recombinação não homóloga. O sítio de integração do transgene desempenha um papel importante na taxa de transcrição do gene recombinante. A integração em regiões de heterocromatina resulta em baixa expressão ou bloqueio da mesma, enquanto que a integração em regiões de eucromatina frequentemente permite a expressão do gene recombinante. Entretanto, a integração em região de eucromatina pode não ser suficiente para permitir uma expressão por longo tempo. Geralmente, a expressão do transgene é rapidamente silenciada, provavelmente devido à influência de regiões de cromatina condensada próximas ao sítio de integração ou ainda devido a efeitos epigenéticos como a acetilação e metilação de histonas e a metilação do DNA (Richards e Elgin, 2002; Mutskov e Felsenfeld, 2004).

O soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura em concentrações de 1 a 20%, é essencial para a propagação das células de mamíferos (Wurm, 2004). O soro bovino é uma fonte abundante de hormônios, fatores de crescimento e elementos que promovem o rápido crescimento celular. Além disso, a presença de grande quantidade de albumina garante proteção às células contra condições adversas como variações do pH e pressão osmótica (Butler, 2005). Contudo, a composição do soro é variável e indefinida, o que possibilita um crescimento e produção inconsistentes. O custo da adição de grandes quantidades de soro torna o processo excessivamente oneroso. E, por último, a presença de uma vasta quantidade de proteínas no soro fetal bovino prejudica o processo de purificação da proteína recombinante. Esse fator é especialmente impactante sobre a produção de mAbs recombinantes, uma vez que o soro possui grandes quantidades de anticorpos bovinos,

moléculas muito similares aos anticorpos produzidos, dificultando a purificação e encarecendo ainda mais o processo de produção.

Atualmente, os processos de produção de anticorpos em larga escala são executados em meios de cultivo sem soro fetal bovino. A composição dos meios de cultura modernos suporta um excelente desempenho da cultura de células na falta de peptídeos fornecidos pelo soro, fatores de crescimento e uma indefinida coleção de proteínas, lipídeos, carboidratos e pequenas moléculas (Wurm, 2004).

A forma de cultivo possui papel chave na taxa de expressão de proteínas recombinantes. Dois formatos principais vêm sendo empregados em culturas de células de mamíferos: a cultura de células aderidas e as culturas em suspensão, sendo essa a mais comum.

A cultura de células aderentes é uma técnica mais simples perto dos complexos processos de produção em suspensão existentes hoje, alcançando taxas de produção de proteínas em torno de 50 a 200 mg/L. A grande desvantagem desse processo é a impossibilidade de produção na escala de grama/litro devido à razão células/volume ser muito menor quando comparada a de um tanque otimizado (Wurm, 2004).

Atualmente a maioria dos processos otimizados de alta produção de proteínas envolve culturas em suspensão. Nesse cenário, as células CHO dominam a área de produção em massa de proteínas recombinantes devido à sua capacidade de crescimento em suspensão. Outras linhagens celulares que crescem bem em suspensão são as células de mieloma de camundongo NS0 (Barnes *et al.*, 2000), BHK (Bödecker *et al.*, 1994) e HEK-293 (Wurm e Bernard, 1999). A transição de células aderidas para o cultivo em suspensão representava um grande entrave na década de 80. Atualmente, meios de cultivo disponíveis comercialmente fazem dessa transição uma etapa muito mais simples. No entanto, esforços são necessários para seleção de diversas formulações de meio de cultura para garantir essa transição (Mather, 1998; Sinacore *et al.*, 2000).

1.8 A HUMANIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD3

A humanização do anticorpo anti-CD3 desenvolvida pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília foi realizada de acordo com a técnica de *CDR grafting* (Fonseca, 2000). 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 14).

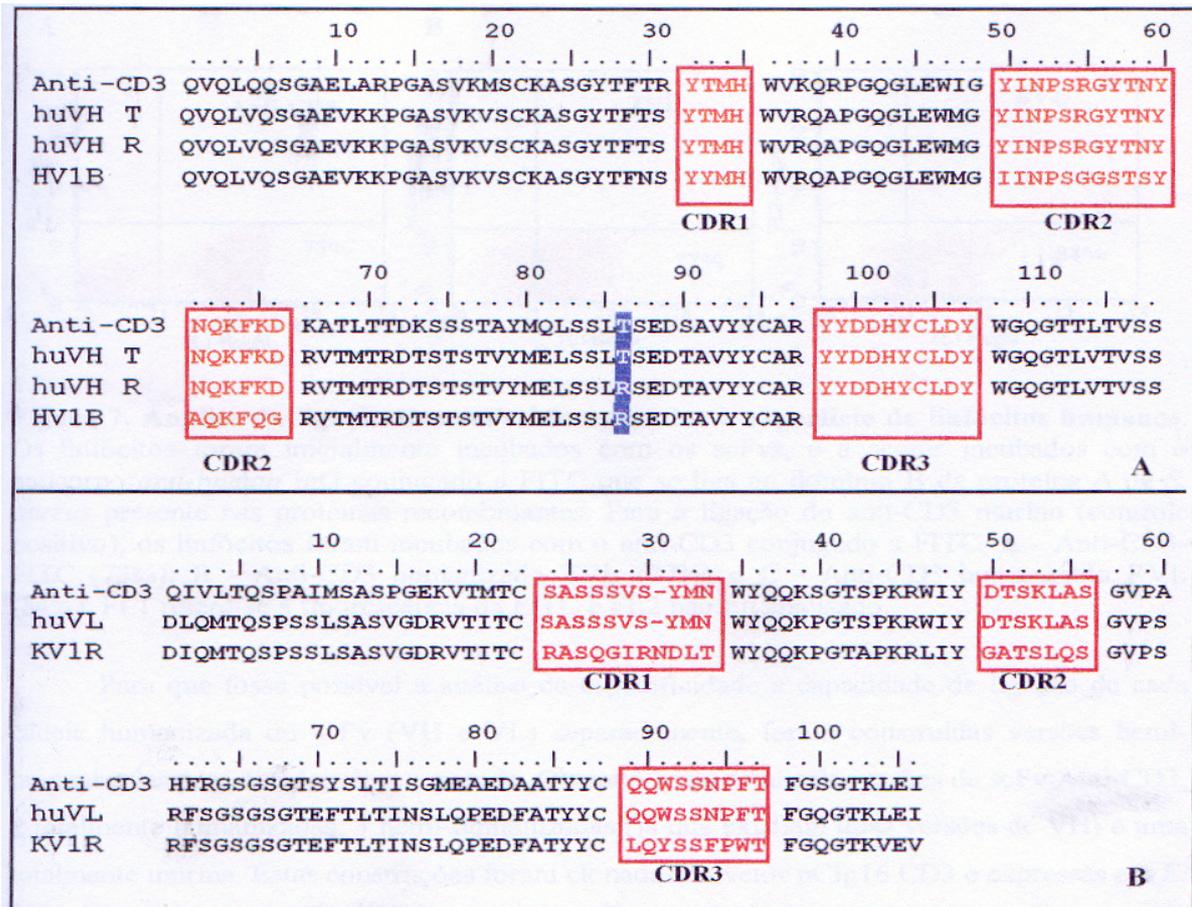


Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos anticorpos anti-CD3. Seqüência codificadora do OKT3 (anti-CD3), versões humanizadas do anti-CD3 para as cadeias pesada (huVH T e R) e leve (huVL) e seqüências humanas utilizadas como arcabouço para as CDRs do anti-CD3 (HV1B e KV1R). **A**-Cadeia 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 H1VB, tendo uma identidade de 71,4% com a VH do OKT3 (Fonseca, 2000).

Para análise do impacto estrutural do transplante das CDRs do OKT3 nessa seqüência germinal foram realizadas análises a partir da estrutura cristalográfica do anticorpo murino 1MRC depositada no banco de dados de proteína (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*). A similaridade desse anticorpo com a VH do OKT3 é de 82,20%. Nesse modelo, foram analisados resíduos descritos na literatura como importantes para a estrutura tridimensional. A partir dessa análise, o resíduo 86 (presente no arcabouço 3 [FR3, do inglês, *framework 3*]) da

cadeia variável pesada foi considerado estruturalmente importante, pois se situa na base dos CDRs 2 e 3. Essa análise possibilitou a criação de duas versões da cadeia variável pesada (Figura 14), uma com o resíduo murino treonina (hVH^{T86}) e outra com o resíduo humano arginina (hVH^{R86}) (Fonseca, 2000).

Já para a humanização da cadeia variável leve foi adotada uma estratégia um pouco diferente. Inicialmente 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.

Após essa pesquisa, foi feita uma análise estrutural do Fv do OKT3, onde foram determinadas possíveis interações eletrostáticas e de hidrogênio dentro do VL e entre o VL e o VH. Os resíduos-chave para a manutenção da estrutura foram utilizados para seleção de uma seqüência de anticorpo humano dentro dos grupos pré-selecionados na busca no banco de dados. Dentre as seqüências escolhidas, a KV1R possui uma maior quantidade desses resíduos considerados importantes, com 64,3% de identidade com o arcabouço murino. Logo, essa foi a seqüência escolhida para o transplante de CDR (Fonseca, 2000).

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

Em ensaios de ligação direta utilizando citometria de fluxo, observou-se que todas as versões possuem capacidade de ligação ao antígeno, exceto a versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado (Figura 15), sugerindo que a humanização do VL não foi bem sucedida. Além disso, foi possível visualizar que as versões hemi-humanizada com o hVH^{R86} e VL murino e a totalmente murina apresentam uma capacidade de ligação melhor que as outras versões, indicando que a manutenção do resíduo arginina na posição 86 da cadeia pesada favorece a manutenção do paratopo do anticorpo no processo de transplante da CDR.

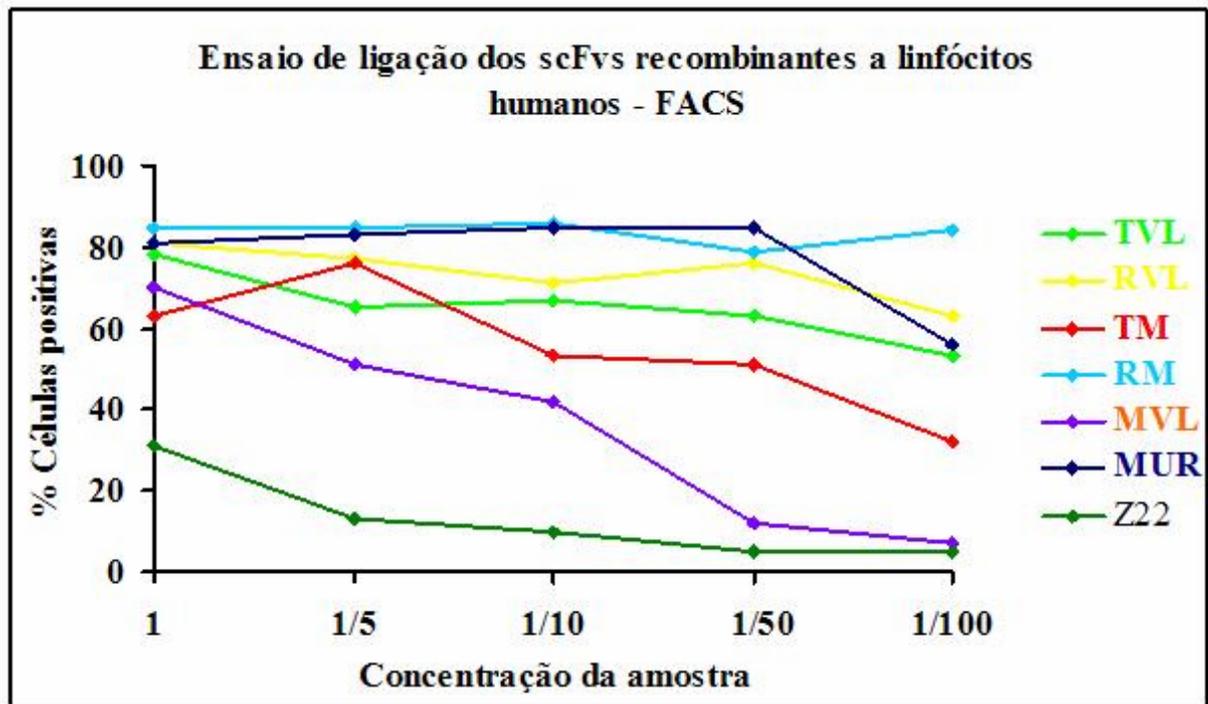


Figura 15. Análise de ligação direta dos scFvs recombinantes a linfócitos humanos. O gráfico mostra a porcentagem de células marcadas pelos scFvs recombinantes. TVL e RVL, versões humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86} , respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86} , respectivamente. MVL, versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado. MUR, versão murina. Z22, anticorpo anti-DNA na conformação Z utilizado como controle negativo (Costa, 2004).

Com o intuito de confirmar a especificidade da ligação à molécula CD3, foi proposto um ensaio de competição entre os scFvs recombinantes e o anticorpo Anti-CD3. Inicialmente, células mononucleares foram incubadas com as versões recombinantes e em seguida com o anticorpo Anti-CD3 conjugado a FITC. Constatou-se que as versões recombinantes conseguem provocar uma diminuição da mediana de intensidade de fluorescência dos linfócitos incubados quando comparados àqueles incubados somente com o Anti-CD3-FITC. Porém, somente as versões hemi-humanizada com o hVH^{R86} e VL murino e a totalmente murina foram capazes de deslocar eficientemente a ligação do Anti-CD3-FITC ao CD3 (Figura 16). Esses dados sugerem que a humanização da cadeia pesada hVH^{R86} foi bem sucedida em função da manutenção da capacidade de ligação. Em relação à cadeia leve, a versão hemi-humanizada com a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada apresentou um padrão de deslocamento semelhante ao controle negativo, indicando uma menor capacidade de ligação possivelmente devido à perda de afinidade dessa cadeia. Provavelmente, esta alteração resultou no deslocamento ineficiente da mediana de intensidade

de fluorescência observada com as versões totalmente humanizadas. A diferença drástica observada entre a versão hemi-humanizada com a cadeia pesada hVH^{R86} e a versão humanizada com a mesma cadeia corrobora a afirmação que a cadeia leve humanizada é responsável pela redução da capacidade de competição com o Anti-CD3-FITC (Costa, 2004).

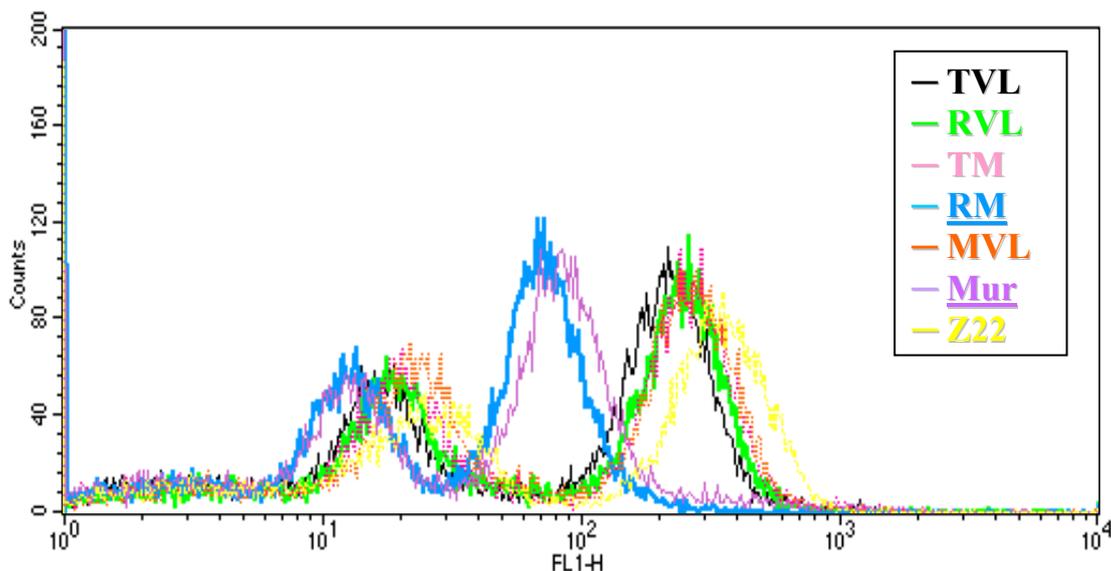


Figura 16. Análise do ensaio de competição dos scFvs recombinantes na diluição 1/5 com o anticorpo monoclonal anti-CD3-FITC pela ligação ao antígeno CD3 na superfície de linfócitos. Histograma de sobreposição. TVL e RVL, versões humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86}, respectivamente. TM e RM, versões hemi-humanizadas com os hVH^{T86} e hVH^{R86}, respectivamente. MVL, versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado. MUR, versão murina. Z22, anticorpo anti-DNA na conformação Z utilizado como controle negativo. 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 proposta 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 seqüência do anticorpo murino, visando à manutenção da especificidade de ligação característica do OKT3. A procura resultou no anticorpo humano CAB37836 (L6), sendo o escolhido para o procedimento de transplante de CDR (Figura 17).

Com essa nova proposta em mãos e com o intuito de verificar a eficácia desse novo processo de humanização, foi proposta a construção de versões recombinantes humanizadas com as cadeias variáveis pesadas hVH^{R86} e hVH^{T86} em conjunto com a nova cadeia leve (hVL). Apesar de experimentos anteriores indicarem que o processo de humanização da cadeia pesada hVH^{T86} levou a uma perda de afinidade dessa cadeia, foi proposta a utilização

dessa cadeia com a finalidade de apurar se o ambiente de interação inter-cadeia gerado pela cadeia leve humanizada poderia restabelecer a afinidade dessa cadeia.

O formato escolhido para a construção das versões recombinantes foi o de FvFc, pois este mimetiza melhor a ação do anticorpo inteiro, devido à sua natureza dimérica. Esse formato possui dois sítios de ligação ao antígeno, e também pela presença da porção Fc, responsável pelo recrutamento das funções efetoras do anticorpo e que garante uma maior estabilidade à molécula aumentando a sua meia-vida no plasma do paciente. Para a produção dessas versões recombinantes propusemos a utilização de células de mamíferos da linhagem CHO, por suas diversas vantagens já citadas anteriormente.

	10	20	30	40	50	60
mu CD3 VL	QIVLTQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVS--YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGV				
VL anti-CD3 nova	DLVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVS--YMNWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLAGIP					
CAB37836 (L6)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS--SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIP					
hu CD3 VL	DLQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVS--YMNWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGV					
KV1R	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRND-LTWYQQKPGTAPKRLIYGATSLQSGVP					
KV3I	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS--SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIP					
Vk A11 V-seg	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPLAPRLLIYDASSRATGIP					
	70	80	90	100		
mu CD3 VL	AHFRGSGSGTYSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI				
VL anti-CD3 nova	ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLE					
CAB37836 (L6)	ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWP					
hu CD3 VL	SRFSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEI					
KV1R	SRFSGSGSGTEFTLTINSLQPEDFATYYCLQYSSFPWTFGQGTKVEV					
KV3I	ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQR-SN-WP-----					
Vk A11 V-seg	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP					

Figura 17. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da cadeia leve (VL) dos anticorpos anti-CD3. São mostradas as seqüências do anticorpo monoclonal OKT3 (mu CD3 VL), da nova proposta de versão humanizada (VL anti-CD3 nova), da versão humanizada anterior (hu CD3 VL) e das seqüências humanas germinais encontradas em bancos de dados que apresentaram maior similaridade com a VL do anti-CD3 murino (L6, KV1R, KV3I e Vk A11 V-seg). As CDRs 1, 2 e 3 estão marcadas em vermelho e os resíduos diferentes entre a seqüência do VL proposto e VL murino estão em azul.

Objetivos

Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterização da atividade ligante e efetora de anticorpos humanizados Anti-CD3 na forma de um fragmento FvFc.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar em vetor de expressão para células de mamíferos as versões de FvFcs Anti-CD3 murina (mVHmVL) e duas humanizadas (hVH^{T86}hVL e hVH^{R86}hVL).
- Expressar as versões humanizadas recombinantes em células de ovário de *hamster* chinês (CHO).
- Estabelecer clones estáveis produtores da proteína recombinante.
- Padronizar procedimento para purificação de anticorpos recombinantes provenientes do sobrenadante de cultura de célula de mamíferos.
- Analisar, por meio de citometria de fluxo (FACS – *Fluorescence Activeted Cell Sorter*), a atividade de ligação das construções recombinantes ao antígeno CD3, inferindo, com base nesses resultados, suas especificidades.
- Verificar a atividade efetora das versões humanizadas a partir de ensaios de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Células

3.1.1.1 Linhagens Bacterianas

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

- **EPI 300 (Epicentre[®])** - F⁻ *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG trfA dhfr*.

- **DH 5α (Invitrogen[®])** – F⁻ /*endA1 hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 thi⁻¹ recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção dos fragmentos de anticorpos.

3.1.1.2 Linhagem de Células de Mamíferos

- **CHO-K1**- Linhagem celular derivada da subclonagem de uma célula de ovário de *hamster* Chinês (CHO) parental, iniciada pela biópsia de um ovário da fêmea adulta do *hamster* Chinês *Cricetulus griséus*. São células epiteliais, aderentes e necessitam de suplementação de soro fetal bovino e prolina ao meio de cultura. Número ATCC: CCL-61.

3.1.1.3 Linfócitos humanos

Os Linfócitos humanos utilizados na realização deste trabalho foram obtidos do sangue periférico de doador saudável, para o teste de ligação das proteínas recombinantes ao antígeno CD3.

3.1.2 Plasmídios Utilizados

- **pUC57 hVL** – 3,0 kb, VL humanizado do anti-CD3, Amp^R, rep (pMB1), múltiplos sítios de clonagem. O DNA do pUC57 é isolado da bactéria *E. coli* (*dam*⁺, *dcm*⁺) por cromatografia de troca iônica. Vetor utilizado pela empresa responsável pela síntese química da cadeia leve para sua clonagem.

- **pIg CD3** - 3,9 kb, VH-linker-VL anti-CD3, múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R. Utilizado para a construção dos fragmentos scFv das versões hVH^{T86} hVL e hVH^{R86} hVL.

- **pPIg FvFc mVH mVL** – 9,4 kb, VH(muCD3)-linker-VL(muCD3)- CH2CH3, fragmentos 5'e 3'do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, *his4* ORF, ori ColE1, Amp^R, Utilizado para obtenção do FvFc anti-CD3 murino.

-**pCIg hVH^{R86} mVL** - 4,1 kb, VH-linker-VL anti-CD3, múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R, operon *Lac*. Utilizado para obtenção da cadeia pesada humanizada hVH^{R86}(Fonseca, 2000).

-**pMAC PS CD18** – 5,8 kb, VH-linker-VL- CH2CH3, Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, peptídeo sinal de imunoglobulina, sinal de poliadenilação SV40polyA. Utilizado para obtenção dos domínios CH2 e CH3 para formação do fragmento Fc do FvFc.

- **pMIREs** – 6,2 kb, Amp^R, ori ColE1, múltiplos sítios de clonagem, promotor pCMV, peptídeo sinal de imunoglobulina, sítio de entrada ribossomal interno (IRES), NEO^R, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da β -lactamase (*bla*). Utilizado para clonagem dos FvFcs recombinantes e expressão em células de mamíferos.

pGFP/NEO – 11,2 kb, Possui promotor de timidina quinase (pTK), NEO^R, sítio múltiplo de clonagem, sinal de poliadenilação TkpA, promotor pRSV-LTR, sinal de poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da β -lactamase (*bla*). Utilizado em co-transfecções com o vetor pMAC PS CD18.

3.1.3 Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento

Os oligonucleotídeos foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 pmoles/ μ L. A tabela 3 mostra as seqüências de cada um dos oligonucleotídeos.

Tabela 3. Oligonucleotídeos sintéticos utilizados.

Oligo	Seqüência	Utilização
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Seqüenciamento do scFv presente no plasmídeo pCIg hVH ^{R86} mVL.
SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'	Seqüenciamento do scFv presente no plasmídeo pCIg hVH ^{R86} mVL.
M13 Universal	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	Seqüenciamento do scFv presente no plasmídeo pIg CD3.
M13 Reverso	5' CAGGAAACAGCTATGAAC 3'	Seqüenciamento do scFv presente no plasmídeo pIg CD3.
CMV 5'	5' GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA 3'	Seqüenciamento dos FvFcs clonados no plasmídeo pMIREs. Anela no promotor CMV.
Seq 5' linker	5' CTCTAGAGGTGGGGGCGGTTC 3'	Seqüenciamento dos VLs dos scFvs e FvFcs. Anela no <i>linker</i> flexível entre o VH e VL.
CH2 ₂₀₂₆ reverso	5' GGGGGAAGAGGAAGACTGAC 3'	Seqüenciamento do VH e VL clonados no plasmídeo pMIREs. Anela na região Fc do FvFc.
CH2 ₂₁₆₆ reverso	5' CGGCTTTGTCTTGGCATTAT 3'	Seqüenciamento do VH e VL clonados no plasmídeo pMIREs. Anela na região Fc .

3.1.4 Soluções estoques de Inibidores de Proteases

PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M

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

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

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

3.1.5 Meios de Cultura e soluções para bactérias

Meio LB (*Luria-Bertani*)

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
pH 7,0.	

Meio LB ágar

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

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína	3,0% (p/v)
Extrato de levedura	2,0% (p/v)
MOPS	1,0% (p/v)
pH 7,0.	

Meio SOB

Bacto-triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	0,06% (p/v)
KCl	0,002% (p/v)
pH 7,0.	

Meio SOC

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

Solução estoque de glicose 2 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2 M

$MgCl_2$	1 M
$MgSO_4$	1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Após dissolver os reagentes em água destilada, todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C por 15 minutos.

3.1.6 Meios de cultura e soluções para cultura de células de mamíferos**Meio Ham-F12 com L-glutamina a 2 mM (Invitrogen[®], n^o catálogo: 21700-075)**

Meio Base	1 pacote
$NaHCO_3$	1,176 g
dH_2O q.s.p	1 L
pH 7,4	

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

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

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

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

Meio de Congelamento de Células

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

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

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

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

Tripsina	2,5 g
EDTA	0,38 g
BSS.CMF qsp	1 L
pH 8,0	

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

pH 0,6 a 1,7.

Estocar de 2 a 8 °C.

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

pH 5,4 a 7,7.

Estocar de -5 a -20 °C.

Solução de Piruvato de Sódio 100 mM 100X (Invitrogen[®], n^o catálogo: 11360-070)**Soro Fetal Bovino** (Invitrogen[®], n^o catálogo: 10438-026)

Estocar de -5 a -20 °C.

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

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

Estocar de -5 a -20 °C.

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

Azul de Tripán

Corante Azul de Tripán	400 mg
PBS pH 7,2 q.s.p.	100 mL

Reagente de transfecção JetPEI™ (Polyplus Transfection, n^o de catálogo 101-01N)

Esse reagente de transfecção é um derivativo linear de uma polietilenimina. É um composto catiônico cuja formulação específica permite a transfecção de diversas linhagens de células de mamíferos.

3.1.7 Soluções e tampões de uso geral

Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

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

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

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

NaCl 1,5 M

Na₂HPO₄ 0,1 M

NaN₃ 0,02% (p/v)

Tampão PBS-T 1X, pH 7,4

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

3.1.8 Soluções e material para preparo de células competentes e transformação – bactéria

Solução de CaCl₂

CaCl₂ 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Solução de CaCl₂ + 10% de Glicerol (v/v)

CaCl₂ 50 mM

Glicerol 10%

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 50% (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

Cubetas de eletroporação (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad[®], n^o catálogo: 165-2086)

3.1.9 Soluções para extração de DNA plasmidial**Solução I**

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

Solução II

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

Solução III

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

RNase A

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

Clorofane

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

Clorofil

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

Acetato de sódio 3 M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

Acetato de amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

3.1.10 Tampões de Endonucleases de Restrição

Os Tampões de enzimas de restrição empregados foram aqueles comercializados pela New England Biolabs[®]:

NEB 1

Bis-Tris-propano-HCl pH 7,0	10 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	1 mM

NEB 2

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

NEB 3

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

NEB 4

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

3.1.11 Tampões de outras enzimas

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

Tris-HCL pH 7,6	660 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
BSA	2 mg/mL

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

Tris-HCl pH 9,0	500 mM
MgCl ₂	100 mM

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

Tris-HCl	250 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	5 mM
DTT	5 mM
PEG-8000	25% (p/v)
pH 7,6	

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

Tris-HCl pH 7,8	300 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	10 mM

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

Tampão de corrida TEB 10X

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

Tampão de corrida TAE 50X

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

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídeo 20.000X

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

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

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

Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE

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

Acrilamida 30% (29:1)

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

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris	36,34 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

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

Tris	12,11 g
dH ₂ O q.s.p.	200 mL

SDS 10%

SDS	10 g
dH ₂ O q.s.p.	100 mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

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

Gel Concentrador SDS-PAGE

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

Gel Separador SDS-PAGE

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

3.1.13 Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com *Comassie Brilliant Blue (R-250)*.

Solução Fixadora para Coloração com Comassie

Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solução Corante Comassie Brilliant Blue R-250

Comassie brilliant blue R-250	1% (p/v)
Etanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

Solução Descorante para Coloração com Comassie

Etanol	20% (v/v)
Ácido acético	5% (v/v)

Solução Preservadora para Coloração com Comassie

Ácido acético	5% (v/v)
---------------	----------

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

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

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

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

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

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado	5% (p/v)
Dissolvido em PBS-T 1X	

Solução Reveladora para ELISA

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

Solução Reveladora para Western e Dot blotting

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

Membrana de Nitrocelulose

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

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

(Nunc[®], Maxisorp e Midisorp, n° catálogo: 456537 e 467320, respectivamente)

3.1.15 Coluna de cromatografia de afinidade

HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE lifescience, n°. catálogo. 17-0402-01). Para purificação dos FvFcs.

3.1.16 Soluções para cromatografia de afinidade

Tampão de ligação HiTrap Protein A

Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0

Filtrado em membrana com poros de 0,45 µm

Tampão de Eluição HiTrap Protein A

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

Filtrados em membrana com poros de 0,45 µm

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

Concentradores Amicon® Bioseparations:

- Centricon YM-30 (n°. catálogo. 4209)
- Centriprep YM-30 (n°. catálogo 4307)
- Concentrador: Stirred Ultrafiltration Cell Millipore, Modelo 8400 (n°. catálogo. 5124)
- Membrana: Ultrafiltration Membrane. NMWL: 10.000 (n°. catálogo 13642)

3.1.18 Marcadores moleculares para DNA e proteína

1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen® n°. catálogo. 10787-026)

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

1 kb DNA Ladder (Invitrogen® n°. catálogo. 15615-016)

Fragmentos de DNA em pb: 201; 220; 298; 344; 396; 500; 517; 1.018; 1.636; 2.036; 3.054; 4.072; 5.090; 6.106; 7.126; 8.144; 9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.19 Kits comerciais

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

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

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

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

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

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

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

Kit BCA Ácido Bicincrônico - para quantificação de proteínas. Pierce® (n°. catálogo 23225)

Qubit Fluorometer - para quantificação de proteínas. Invitrogen (n° catálogo: Q32860)

3.1.20 Soluções e materiais para os experimentos com citometria de fluxo

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

Solução Salina 0,9%

NaCl	9 g
dH ₂ O q.s.p.	1 L

Tampão de lavagem para reação de FACS

Soro fetal bovino	2% (v/v)
Azida Sódica	0,02% (p/v)
Dissolvidos em PBS 1X	

Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 5 mM (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular Probes™ n° catálogo: C34554).

Tampão do citômetro de fluxo (FACSflow) Filtrar em papel de filtro

NaCl	162,4 g
KCl	5,6 g
KH ₂ PO ₄	5,2 g
Na ₂ HPO ₄	47,0 g (Anidro)
LiCl	8,6 g (dessecador)
EDTA-Na	7,2 g
Azida	4,0 g (0,02%)
dH ₂ O q.s.p.	20 L

Ficoll – Hypaque (d=1,077 g/L)

Ficoll PM= 400.000	64 g
Diatrizoato de Sódio	99 g
NaCl	0,7 g
dH ₂ O q.s.p.	1 L

A solução Ficoll-Hypaque pronta para uso pode ser obtida comercialmente (Ficoll-Paque Plus™, GE lifescience n° catálogo: 17-1440-02).

Heparina Sódica (Liquemine™, Roche®)

25.000 UI/5 mL

Placas de microtitulação de 96 poços com fundo em U não estéril**3.1.21 Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, Western Blot, Dot Blot e FACS.****Anti – IgG humana (H + L) feito em cabra (Pierce® n° catálogo: 31119)**

Concentração: 1,8 mg/mL

Titulação de uso: 1:1000 (ELISA)

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

(Sigma® n° catálogo: A9544)

Concentração: 1 mg/mL

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

IgG Humana (Sigma® n° catálogo: K9001)

Concentração: 1 mg/mL

Utilizado a 100 ou 120 ng/mL como padrão nos experimentos de ELISA.

Anti- CD3 humano feito em camundongo conjugado a R-PE (Dako®, n° catálogo: R810)

Concentração: 175 µg/mL

Clone: UCTH1

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti- CD3 humano feito em camundongo conjugado a FITC (Dako[®], n^o catálogo: F818)

Concentração: 100 µg/mL

Clone: UCTH1

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti – IgG de camundongo feito em cabra conjugado a FITC (Sigma[®], n^o catálogo: F8264)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:100 (FACS)

Anti – IgG humana feito em cabra conjugado a FITC (Sigma[®], n^o catálogo: F1641)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti – CD4 humano feito em camundongo conjugado a R-PE (BD Pharmigen[®], n^o catálogo: 555347)

Clone: RPA-T4

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti – CD8 humano feito em camundongo conjugado a R-PE (BD Pharmigen[®], n^o catálogo: 555367)

Clone: RPA-T8

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

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

Clone: OKT3

Titulação de uso: 1:50 e 1:500 (FACS)

Orthoclone OKT3[®], Anti- CD3 humano feito em camundongo (muronomab – CD3)
(Ortho biotech)

Concentração 1 mg/mL

Utilizado como controle positivo dos ensaios de ligação dos anticorpos recombinantes

Anti-IgG humana (Fc) feito em coelho (Pierce[®], n^o catálogo: 31142)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:50 (FACS)

Anti- IgG de coelho feito em cabra conjugado a FITC (Sigma[®], n^o catálogo: F1262)

Concentração: 1 mg/mL

Titulação de uso: 1:100 (FACS)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação de DNA plasmidial

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

- 1- Coletavam-se 3,0 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídio de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de duas centrifugações de 5 min a 5.000 rpm em microtubos de 1,5 mL, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.
- 2- Ressuspensava-se o sedimento em 200 µL de Solução I. Incubava-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3- Adicionavam-se 400 µL de Solução II e homogeneizava-se as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Adicionavam-se 300 µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 10 min.
- 5- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 6- Ao sobrenadante eram adicionados 5 µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37°C.
- 7- Adicionavam-se 300 µL de clorofane e, após forte homogeneização, centrifugava-se por 5 min a 5.000 g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 8- Adicionavam-se 300 µL de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 9- Adicionava-se 2,0 v de etanol absoluto gelado e incubava-se a -20°C por no mínimo 2 horas.
- 10- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 11- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 12- Secava-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.
- 13- O sedimento era ressuspensado em 50 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

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

- 1- Coletavam-se 200 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2- Ressuspendia-se o sedimento em 5 mL de Solução I sob forte agitação. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.
- 3- Adicionavam-se 10 mL 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 7,5 mL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 20 min.
- 5- Centrifugava-se a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- 6- O sobrenadante era filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante eram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente centrifugava-se a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.
- 7- Desprezava-se o sobrenadante e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento era ressuspendido em 500 µL de TE ao qual eram adicionados 10 µL de RNase A. Incubava-se por 1 hora a 37°C.
- 8- Adicionava-se 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 9- Repetia-se o passo anterior mais uma vez.
- 10- Adicionava-se 1v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 11- Adicionava-se 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% gelado e incubava-se por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 12- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 13- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 14- Após secagem o sedimento era ressuspendido em 200 µL de TE. E as amostras conservadas a -20°C.

3.2.2 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

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

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

A agarose era preparada de 0,7 a 1,0% em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). 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.

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 ao *Freeze-Squeeze*:

- 1- A banda do DNA cortada do gel era transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm[®]. Duas extremidades da bolsa eram juntas e seladas com o auxílio da parte cônica de um microtubo de 1,5 mL. A banda era inserida dentro da bolsa pela parte não selada.
- 2- A bolsa contendo o fragmento era então congelada a – 40°C.
- 3- Após o total congelamento, a porção plana da tampa de um microtubo de 1,5 mL era utilizada para macerar o fragmento até se liquefazer.
- 4- O líquido e o gel eram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore[®]).
- 5- O material era centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.
- 6- Após a centrifugação o material era precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. Procedia-se a uma incubação a -20°C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

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

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

- 1- Incubavam-se de 2 a 4 µg de dsDNA com 5 µL da fosfatase alcalina e tampão apropriado da enzima em 1X para um volume final de 50 µL por 1h a 37°C.
- 2- Inativava-se o sistema por 15 minutos a 65°C. A partir desse ponto, o sistema era utilizado em sistema de ligação para posterior transformação de células competentes *E. coli*.

3.2.6 Modificação no DNA plasmidial utilizando a enzima Mung Bean Nuclease.

Essa enzima possui a capacidade de retirar nucleotídeos na forma de DNA fita simples. No presente projeto essa enzima foi utilizada no vetor pMIREs com o FvFc murino inserido, após a utilização da enzima de restrição *Xma* I. Como essa enzima gera, após a clivagem do plasmídeo, 4 nucleotídeos desapareados nas extremidades do vetor, utilizava-se a Mung Bean nuclease para retirada desses nucleotídeos e alteração na fase de leitura da proteína de interesse.

- 1- Incubava-se 1 U da enzima por 1 µg de DNA e tampão apropriado da enzima em 1X para um volume final de 50 µL por 30 minutos a 30°C por 30 minutos.
- 2- Nos tempos 10 e 20 minutos se retirava 15 µL, adicionava-se a 85 µL de dH₂O e parava-se a reação desse montante retirado.
- 3- A reação era parada com a adição de 1v de clorofane e agitado vigorosamente. Após isso, o material era centrifugado a 5.000 x g por 5 minutos.
- 4- A fase aquosa era transferida a um novo tubo ao qual se adicionava 1v de clorofil e repetia-se o procedimento anterior.
- 5- Após a centrifugação o material era precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado.
- 6- Procedia-se a uma incubação a -20°C durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

3.2.7 Ligação de fragmentos de DNA

As concentrações de DNA (vetor: inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variavam de acordo com o experimento a ser realizado, sendo normalmente numa razão molar de 1:3 ou 1:5 e aplicando-se a fórmula:

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

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*.

3.2.8 Preparação de células competentes e transformação bacteriana

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

- 1- Inoculavam-se 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0,1 a 0,3.
- 2- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3- O sedimento era ressuscitado em 10 mL de solução de CaCl₂ 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 ressuscitado em 1 mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram aliquotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.
- 7- Incubava-se de 100 a 200 µL de célula competente com o plasmídio de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.

- 8- Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Adicionava-se imediatamente 1 mL 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 150 µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

3.2.8.2 Por eletroporação (adaptado de Maranhão, 2003).

- 1- Inoculava-se uma colônia isolada da célula de interesse em 10 mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.
- 2- Inoculava-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{600nm} 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 ressuspendido em 25 mL 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 ressuspendido em 25 mL de Glicerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.
- 6- O sedimento final era ressuspendido em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células eram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.
- 7- Para a transformação, o plasmídio, já em um tubo resfriado previamente, era adicionado à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioRad®) também já resfriadas.
- 8- A eletroporação era feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessa condições é de 4,0 a 5,0 milisegundos.
- 9- Imediatamente após o choque a cubeta era lavada com 3 mL de meio SOC e o meio era recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.

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

3.2.9 Seqüenciamento automático de DNA e análise de seqüências.

Após ter sido realizada uma análise de restrição, os plasmídios eram seqüenciados utilizando-se o seqüenciador automático MegaBACE 500Plus (Molecular Dynamics®). Eram utilizadas de 150 a 200 ng do vetor, 10 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing”.

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

3.2.10 Cultura de células de mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células eram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade.

3.2.10.1 Congelamento de células CHO – Criopreservação (Ruggiero, 2002).

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

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

- 3– As células eram centrifugadas a $130 \times g$ por 8 minutos.
- 4– O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspense no meio de cultura remanescente do tubo.
- 5– As células eram distribuídas em alíquotas de $500 \mu\text{L}$ em criotubos, onde eram adicionados $500 \mu\text{L}$ de meio de congelamento.
- 6– Os criotubos eram incubados a 4°C por 30 minutos, depois a -20°C por 30 minutos e depois a -80°C durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a esta temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

3.2.10.2 Descongelamento de células CHO (Ruggiero, 2002).

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

3.2.10.3 Tripsinização, passagem das células e formação de monocama celular (Ruggiero, 2002).

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

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

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

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

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

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

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

3.2.10.6 Transfecção de Células CHO utilizando o reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection, n° de catálogo 101-01N)

O reagente JetPEI é um polímero catiônico derivado de polietilenimina linear. Suas características inibem a formação de complexos de DNA. O complexo DNA/JetPEI possui a capacidade de se ligar a resíduos da superfície celular e adentrá-la por endocitose. Dentro do endossomo, o JetPEI se torna uma “esponja” de prótons, tamponando o pH. Esse mecanismo

permite o rompimento do endossomo e a liberação do complexo JetPEI/DNA no citoplasma, de onde será transportado para o núcleo.

- 1– Em placa de cultura de 6 poços eram semeadas cerca de 2×10^4 células por poço, adicionando-se em seguida 2 mL de meio acrescido de 10 % SFB e solução de antibiótico/antimicótico.
- 2– As células eram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência ideal de 50 a 60%.
- 3– No dia seguinte, em microtubos de 1,5 mL estéreis, as soluções eram preparadas da seguinte maneira: na solução A, para cada transfecção eram diluídos 3 µg do vetor em 100 µL de NaCl 150mM. Na solução B, para cada transfecção eram diluídos 6 µL de JetPEI em 100 µL de NaCl 150mM. As duas soluções eram agitadas rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.
- 4– A partir daí, era adicionada a solução B sobre a solução A (não misturar na ordem inversa), imediatamente a mistura é agitada rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.
- 5– Incubava-se a mistura à temperatura ambiente por 15 minutos.
- 6– Adicionava-se 200 µL da mistura por transfecção delicadamente gota a gota, fazendo movimentos em forma de cruz no poço.
- 7– Homogeneizar a placa mexendo-a gentilmente.
- 8– Após 24 horas o sobrenadante de cultura era coletado e verificado quanto a presença de proteínas recombinantes.

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

Como o vetor utilizado para expressão das proteínas recombinantes (pMIREs) apresenta o gene de resistência a geneticina (NEO^R), após o processo de transfecção o vetor possibilitou que fosse feita a seleção das células transfectadas e eliminação daquelas que não estavam produzindo as proteínas recombinantes.

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

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

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

3.2.10.8 Propagação das células transfectadas selecionadas para aumento da expressão.

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

- 1- O meio de cultura do poço era descartado.
- 2- Eram adicionados 500 μ L de tripsina ao poço.
- 3- Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células era acompanhado por visualização a olho nu.
- 4- A tripsina era neutralizada com cerca de 1 mL de meio acrescido de 10% SFB.
- 5- A suspensão celular era transferida para tubos falcon de 15 mL, e centrifugados a 130 \times g por 8 minutos.
- 6- O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso em 3 mL de meio Ham-F12 acrescido de SFB.
- 7- Transferia-se toda a população células para garrafas de 75 cm² contendo 10 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina na concentração já citada.
- 8- Quando as células chegavam novamente a uma confluência máxima as células eram então passadas para garrafas de 150 cm² contendo 30 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina. A partir de então, as células transfectadas eram mantidas nessas condições, trocando-se o meio a cada 48h nas mesmas condições e coletando-se o sobrenadante para acúmulo de quantidade suficiente para purificação dos anticorpos recombinantes e realização dos ensaios biológicos.

3.2.10.9 Seleção de clones estáveis produtores de anticorpos recombinantes

- 1– As células transfectadas e selecionadas com geneticina presentes nas garrafas de 150 cm² eram tripsinizadas, ressuspensas em 5 mL de meio e contadas na câmara de Neubauer.
- 2– Após a contagem semeava-se um volume correspondente à presença de 10, 1 e 0,1 célula por poço. O procedimento era realizado em placas de microtitulação de 96 poços com fundo chato. Aos poços onde se iriam semear as células eram adicionados 150 µL meio Ham-F12 acrescido de 10% de SFB e geneticina.
- 3– Repetiu-se esse procedimento 8 vezes de forma que ao final teríamos 8 poços para cada diluição celular.
- 4– A cada 48h era observado, em microscópio ótico, se havia a formação de colônias das células semeadas e o meio era trocado, mantendo as condições estabelecidas.
- 5– Dava-se preferência as colônias surgidas dos poços com a diluição de 0,1 célula ou se fosse visualizada claramente um única colônia nos poços com a diluição de 1 célula. Esse procedimento visa garantir que as células do poço escolhido sejam originárias de uma única célula, caracterizando um clone.
- 6– Selecionados os poços com as colônias nos parâmetros descritos, adicionava-se 50 µL de tripsina e incubava-se por 3 minutos.
- 7– Depois de decorrido esse tempo era procedido uma homogeneização do poço por pipetagem e o seu conteúdo era totalmente transferido para poços de placas de 6 poços contendo 2 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10 % de SFB e geneticina.
- 8– Após 48h observava-se a confluência do poço e trocava-se o meio. O procedimento era repetido até que a confluência chegasse à 90%.
- 9– Ao atingir 90% de confluência, as células eram tripsinizadas e passadas para uma garrafa de 25 cm².
- 10– Ao atingir 90% de confluência, o sobrenadante das garrafas era coletado para análise dos níveis de expressão de cada clone e adicionava-se meio Ham-F12 acrescido de 10 % de SFB e geneticina.
- 11– Mantinha-se a cultura nas condições anteriores por pelo menos duas semanas, sempre trocando o meio a cada 48h e coletando o sobrenadante para monitoramento da expressão. Quando a cultura chegava a uma confluência de 100%, procedia-se a uma tripsinização e eliminava-se um pouco das células.

12- Após as duas semanas, procedia-se a troca do meio, substituindo-o pelo meio Ham-F12 acrescido de 10% de SFB e antibiótico/antimicótico e sem geneticina.

13- Mantinha-se a cultura nas condições anteriores por pelo menos duas semanas, sempre trocando o meio a cada 48h e coletando o sobrenadante para monitoramento da expressão. Um clone estável deve manter seus níveis de expressão mesmo após a retirada do agente seletivo. Quando a cultura chegava a uma confluência de 100%, procedia-se a uma tripsinização e eliminava-se um pouco das células.

14- Após as duas semanas, procedia-se a troca do meio retornando a adição de geneticina.

15- Mantinha-se a cultura nas condições anteriores por pelo menos duas semanas, sempre trocando o meio a cada 48h e coletando o sobrenadante para monitoramento da expressão. Aqui objetiva-se visualizar se o clone não perdeu a resistência ao agente seletivo. O clone deve manter os níveis expressos com a volta da geneticina. Quando a cultura chegava a uma confluência de 100%, procedia-se a uma tripsinização e eliminava-se um pouco das células.

16- Com todos os resultados de monitoramento de expressão, era escolhido o clone com a expressão mais constante e em maiores níveis.

17- A garrafa do clone escolhido era tripsinizado e realizada passagem para garrafas de 150 cm² para obtenção de grande quantidade de proteína expressa.

3.2.10.10 Adaptação da cultura de célula a baixos níveis de Soro Fetal Bovino.

Com o intuito de melhorar a eficiência do processo de purificação dos anticorpos recombinantes e evitar a excessiva contaminação com proteínas presentes no soro fetal bovino, como, por exemplo, albumina e anticorpos bovinos, foi proposta a adaptação da cultura de células a baixos níveis de soro fetal bovino.

Utilizamos essa alternativa visto que a total retirada do soro da cultura de células propicia uma mudança no fenótipo das células CHO de células aderentes para não aderentes. Essa mudança de certa forma compromete o trabalho diante a infra-estrutura disponível. Para tal procedimento seriam necessárias garrafas especiais com agitadores e a utilização de meios de custo relativamente elevado.

1- Utilizava-se como partida as culturas de células transfectadas, já selecionadas com Geneticina ou cultura com os clones estáveis já estabelecidos, que estavam sendo mantidos em garrafas de 150 cm².

- 2- Era procedida a substituição do meio Ham-F12 com geneticina e 10% de SFB por meio acrescido de 5% de SFB.
- 3- A cada 48h era procedida a troca do meio nas mesmas condições e a coleta do sobrenadante.
- 4- Após atingir 96h horas da modificação da composição do meio, era observada a morfologia das células ao microscópio ótico com o intuito de visualizar a manutenção da forma elíptica apresentada por essa célula quando aderida. Estando aderida procedia-se a próxima etapa.
- 5- Era, então, realizada a substituição do meio Ham-F12 com geneticina e 5% de SFB por meio acrescido de 2,5% de SFB.
- 6- Em paralelo, eram monitorados os níveis de expressão de proteína recombinante em função das alterações no meio. Os níveis expressos com o vetor utilizado nesse trabalho permaneciam inalterados.
- 7 - Repetia-se os passos 3, 4, 5 e 6 até que os níveis de soro fetal bovino chegassem a 1,25% no meio utilizado.
- 8 - A partir de então, a cultura de células era mantida nessas condições, trocando o meio a cada 48h e coletando sobrenadante para acúmulo de anticorpos recombinantes e futura purificação.

3.2.11 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

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

- 1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com 150 μ L por poço com o anticorpo anti-IgG humana H+L feito em cabra, diluído em PBS 1X 1:1.000, durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 2- Lavava-se 3X com PBS - T 1X, 200 μ L por poço.
- 3- Bloqueava-se com 200 μ L por poço de solução de bloqueio, durante 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

4- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e adicionava-se o sobrenadante de cultura das células transfectadas ou os FvFcs purificados. Eram feitas diluições seriadas de fator comum 3 das proteínas em PBS, onde o volume final era de 100 μ L por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243. A mesma diluição era realizada para todas as amostras. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada na concentração especificada nos materiais (diluída na mesma solução/meio que as proteínas recombinantes). As reações eram feitas em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.

5- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e incubava-se com 150 μ L por poço do anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:5.000 por 2 horas a temperatura ambiente.

6- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e uma vez com tampão para fosfatase alcalina (APB).

7- Revelava-se com 100 μ L por poço de pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1 mg/mL dissolvido em APB. Incubava-se de 20 a 30 min. A partir daí a absorbância era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*®” modelo 450 a um comprimento de onda de 405 nm.

Os cálculos de concentração eram feitos baseados na curva padrão de IgG humana, sempre desconsiderando os poços brancos (com PBS 1X em todas as etapas).

3.2.12 Concentração do sobrenadante de cultura utilizando o sistema Amicon *Stirred Ultrafiltration Cell Millipore*®.

Para concentração era utilizada uma membrana de ultrafiltração NMWL: 10.000, a qual permite a passagem de proteínas com tamanho menor que 10 kDa e retém as proteínas com peso molecular superior a isso.

1– 300 mL de sobrenadante era adicionado ao aparato e submetido a pressão de 4 kgf/cm², utilizando nitrogênio gasoso, sob agitação. O sistema era mantido a 4°C para preservação da membrana.

2– O sistema era observado de forma a impedir que todo o sobrenadante passasse e secasse a membrana. Quando restava somente 10 mL de sobrenadante no sistema adicionava-se mais 200 mL de PBS 1X para diálise.

3– Ao atingir novamente 10 mL o sobrenadante concentrado era transferido para um tubo de 15 mL e acondicionado a 4°C. Pode-se adicionar um pouco (1 gota) de anti-espumante para facilitar a coleta do concentrado.

3.2.13 Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

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

- 1- Preparavam-se os microtubos de coleta da eluição adicionando 200 μ L de Tris-HCl 1M pH9,0 por mL de fração a ser coletado.
- 2- Era preparada a bomba peristáltica preenchendo-a de tampão de ligação. Retirava-se a tampa da parte superior da coluna e conectava-se a mangueira da bomba peristáltica a coluna cromatográfica gota a gota.
- 3- Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação mantendo uma taxa de passagem do tampão pela coluna em 1 mL/min.
- 4- Aplicava-se o sobrenadante de cultura filtrado e concentrado.
- 5- Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.
- 6- Eluia-se os FvFcs ligados com 8 volumes de tampão de eluição pH 3,5 coletando-se as amostras nos microtubos de coleta preparados com Tris-HCl.
- 7- Passavam-se 3 volumes de tampão de eluição a pH 2,0 para retirada das IgGs bovinas ligadas a resina e limpeza da coluna. O material também era coletado.
- 8- Lavava-se a coluna com mais 10 volumes de tampão de ligação.
- 9- Aplicava-se etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.

Imediatamente após o fim da coleta, 5 μ L de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 3.2.14 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas na coluna Centriprep ou Centricon YM-30 (Amicon[®]), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 30 kDa para diálise e concentração.

3.2.14 Análise de proteínas por *Dot Blotting* (adaptado de (Sambrook e Russel, 2001)).

- 1- Adicionavam-se de 5 μ L das frações obtidas durante o processo de purificação diretamente a uma membrana de nitrocelulose.

2- Com a membrana seca, contendo as proteínas ligadas, era procedido o bloqueio utilizando solução de bloqueio por 2h a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C. 3 - Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS – T 1X.

4- Incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:2.500 por 2 horas a temperatura ambiente.

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

6- Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

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

Após a purificação dos FvFcs procedia-se a análises em gel desnaturante de poliacrilamida.

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

2- Uma vez polimerizado o gel separador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços.

3- A partir daí, 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.

4- Uma vez polimerizado o gel, acoplava-o ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços eram lavados com tampão de corrida.

5- Imediatamente antes da aplicação das amostras (já preparadas com o tampão de amostra), procedia-se à fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.

6 – Procedia – se a aplicação das amostras e iniciava – se a corrida do gel a 20 mA por gel.

7- Após a corrida do gel, realizava-se os procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250) ou prata, especificados respectivamente no item 3.2.14 de métodos. E a realização de *Western Blotting*, onde o gel era submetido à transferência para membrana de nitrocelulose, especificada no item 3.2.15 de métodos.

3.2.16 Coloração do gel de SDS-PAGE

3.2.16.1 Com Comassie Brilliant Blue R-250.

- 1- Após a eletroforese o gel era colocado em solução fixadora por 30 min, sob agitação, a temperatura ambiente.
- 2- Descartava-se a solução anterior e incubava-se o gel com a solução de Comassie R-250 por no mínimo 2 horas ou durante a noite, sob agitação.
- 3- Aplicava-se a solução descorante em 4 etapas: 15 min, 45 min, 120 min, 120 min. Trocando-se a solução descorante a cada etapa.
- 4- O gel era guardado na solução preservadora.

3.2.16.2 Com prata

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

3.2.17 Análise de proteínas por *Western Blotting* (adaptado de (Sambrook e Russel, 2001)).

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

- 1- Conforme instruções do fabricante, fazia-se um "sanduíche" de papéis de filtro, previamente embebidos em tampão de transferência contendo, nessa ordem, 5 papéis de filtro, a membrana, o gel e mais 5 papéis de filtro.
- 2- O "sanduíche" era colocado entre os eletrodos de grafite e submetido a uma corrente elétrica de 0,8 mA/cm² de membrana por 1h 45 min.
- 3- Após este procedimento, a membrana, contendo as proteínas transferidas, era embebida em solução de bloqueio e incubada por 2 h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

- 4- Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBS-T 1X a temperatura ambiente.
- 5- Incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:2.500 por 2 horas a temperatura ambiente.
- 6- Após essa etapa a membrana era lavada 3X com PBS – T 1X e uma vez com APB.
- 7- Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

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

A separação de CMSP é feita por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque, que se baseia nas diferenças de densidade entre as células mononucleares e os outros elementos do sangue. Após a centrifugação, as CMSP e plaquetas, por serem menos densas que a solução de Ficoll ($d < 1,077 \text{ g/L}$), ficam localizadas acima da solução de Ficoll-Hypaque, enquanto as hemácias e as células polimorfonucleares (granulócitos), que têm maior densidade, ficam localizadas abaixo. O sangue obtido de doador normal deve render $1-2 \times 10^6$ células/mL. Aproximadamente 60 a 70% das células são linfócitos com viabilidade de 95%.

Todas as soluções e materiais que entraram em contato com as células estavam estéreis. Se a separação visava somente o ensaio de FACS a separação podia ser realizada fora do fluxo. De outra forma, todos os procedimentos eram realizados em ambiente estéril.

Para retirada de sangue de doador saudável utilizava-se heparina sódica para evitar a coagulação do sangue. Utilizava-se 100UI de heparina para cada mL de sangue coletado, previamente adicionados à seringa.

Todas as centrifugações devem ser realizadas em rotores swing.

- 1- Diluía-se o sangue heparinizado 1:2 com solução salina 0,9% estéril.
- 2- Adicionavam-se 9 mL dessa solução sobre um volume de 3mL de Ficoll – Hypaque utilizando uma pipeta pasteur, bem delicadamente e pelas bordas, de forma que o sangue formasse uma camada acima do Ficoll, a mistura do sangue com o Ficoll nessa etapa prejudica a separação das CMSP. Importante utilizar tubos transparentes para na próxima etapa facilitar a coleta das células.

- 3– Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 30 min a 19°C.
- 4– Após a centrifugação formava-se 3 fases, na interface da 1° (plasma) com a 2° (Ficoll) encontrava-se uma nuvem com as células mononucleares. Procedia-se a coleta dessa nuvem com uma pipeta pasteur transferindo-as para outro tubo de 50 mL.
- 5– Completava-se o volume do tubo com as células com solução salina 0,9% para diluir o Ficoll que é agressivo para as células
- 6– Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 10 min a 19°C.
- 7– Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o botão celular com 10 mL de solução salina 0,9% para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.
- 8- Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 10 min a 19°C.
- 9- Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o botão celular com 10 mL de solução salina 0,9% para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.
- 10- Centrifugava-se a 1100 rpm por 10 min a 19°C. A baixa rotação era para eliminar as plaquetas.
- 11- Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se as células em 3 mL de tampão de lavagem de FACS, para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.
- 12– Procedia-se a contagem das células na câmara de Neubauer.

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

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

- 1– Adicionava-se de 2 a 4 x 10⁵ CMSP por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.
- 2– Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4°C por 6 min.
- 3– Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

- 4– Ressuspendiam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.
- 5– Adicionavam-se 25 μL dos anticorpos diluídos em tampão de lavagem de FACS (de acordo com o tópico 3.1.22 de materiais) ou os FvFcs recombinantes.
- 6– Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.
- 7– Adicionavam-se 150 μL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.
- 8– Repetia-se os passos 3, 4 e 7.
- 9– Repetia-se os passos 5, 6, 7 e 8 quantas vezes mais ligações com anticorpos fossem necessárias.
- 10– Ressuspendiam-se as células em 400 μL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.
- 11– A leitura da reação no citômetro de fluxo era realizada preferencialmente no dia da reação para evitar a morte celular.

3.2.20 Leitura da reação de FACS no citômetro de fluxo

- 1– O citômetro de fluxo utilizado era o FACScalibur (BD bioscience[®]). O programa utilizado para aquisição e análise dos dados era o CELLQUEST.
- 2– As células eram adquiridas e selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade de maneira a analisar a população de linfócitos, e a seguir eram contadas de 5.000 a 10.000 células para cada amostra dentro da região de linfócitos.
- 3– Os dados eram obtidos a partir da análise dos histogramas ou gráficos de pontos fornecidos pelo programa. Os resultados eram expressos em percentagem de células positivas para cada proteína em estudo. O parâmetro considerado era a mediana de intensidade de fluorescência.

3.2.21 – Ensaio de proliferação de CMSP com CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)

Toda a reação era realizada evitando-se ao máximo a exposição a luz direta. A reação de proliferação de células mononucleares do sangue periférico era realizada em placas de 6 poços onde se adicionava 1×10^6 células por poço. Todas as centrifugações devem ser realizadas em rotores swing. Antes de realizar o experimento separar um pouco de células não marcadas para o controle negativo.

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

Por exemplo: Se era necessário 18×10^6 células para todos os poços, essa quantidade de células era diluída em 900 μ L de volume final de solução de CFSE, pois assim chegaria a concentração 2.10^7 células/mL.

Dessa forma, diluía-se 18.10^6 células em 450 μ L de PBS e acrescentava-se 450 μ L da solução de CFSE a 2,5 μ M em PBS (a concentração final de CFSE ficava 1,25 μ M).

2– Incubava-se as células com CFSE por 10 min a 37°C agitando-se ocasionalmente.

3– Interrompia-se a reação adicionando 5 volumes de meio RPMI 1640 suplementado acrescido de 10% de SFB gelado e incubar por 5 min no gelo.

4– Centrifugava-se as células a 1.800 rpm por 6 min a 4 °C

5- Descartava-se o sobrenadante e adicionava-se 3 mL de meio RPMI 1640 suplementado acrescido de 10% de SFB, gelado.

6– Repetia-se o procedimento 4 e 5 mais duas vezes para lavagem das células.

7– Ressuspedia-se as células em meio RPMI suplementado acrescido de 10% de SFB nas condições desejadas e adicionava-se 1×10^6 células por poço do experimento.

8– Adicionava-se 1 μ g do OKT3 a um dos poços (controle positivo)

9- Adicionava-se as versões recombinantes nos poços na mesma concentração do OKT3.

10- Incubava-se as células a 37°C por 5 dias (120 h)

11- Retirava-se as células adicionando 2v por poço de tampão de lavagem de FACS e transferindo para um tubo de 15mL

12– Centrifugava-se a 1.800 rpm por 10min a temp. ambiente.

13– Ressuspendia-se em 500 μ L de tampão de lavagem de FACS e submetia-se a aquisição no citômetro de fluxo.

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

4.1 Construção dos vetores contendo as seqüências codificadoras dos anticorpos recombinantes.

Com o objetivo de se avaliar a nova proposta de humanização da cadeia leve do anti-CD3 quanto à capacidade e à especificidade de ligação ao antígeno CD3, foi planejada a produção de duas versões humanizadas de anticorpos recombinantes no formato de fragmento FvFc. Ambas as versões eram formadas pela nova cadeia variável leve humanizada e por uma das duas cadeias variáveis pesadas humanizadas previamente pelo grupo, contendo o resíduo murino treonina ou humano arginina na posição 86. Análises estruturais realizadas anteriormente por Fonseca (2000) mostram que essa posição possui uma grande relevância estrutural para o arranjo das CDR2 e 3, portanto uma mudança de aminoácido nessa posição pode impactar significativamente a capacidade de ligação do anticorpo. Dessa forma, para avaliarmos a influência dessa posição no contexto da nova cadeia leve humanizada propusemos a produção dessas duas versões de anticorpos, denominadas respectivamente: FvFc hVH^{T86}hVL (FvFc T) e FvFc hVH^{R86}hVL (FvFc R).

Além das versões humanizadas, propusemos a produção de uma versão murina do anticorpo anti-CD3, no formato de FvFc. Esse fragmento de anticorpo possui as regiões variáveis originais do anticorpo murino utilizado como base para o processo de humanização e tem como função ser um controle mais fiel possível da molécula recombinante humanizada. Assim, ele irá determinar o comportamento de ligação e o desencadeamento das funções efetoras considerado o ideal para as versões humanizadas.

Com esses objetivos em mente, foram propostas duas estratégias iniciais realizadas concomitantemente: a formação das seqüências codificadoras dos anticorpos humanizados e clonagem em vetor de expressão para célula de mamíferos; e a clonagem da seqüência codificadora do anticorpo murino em vetor de expressão para célula de mamíferos. Essas etapas são fundamentais para o objetivo central do trabalho de caracterização da atividade ligante e da função efetoras das duas versões humanizadas do anticorpo anti-CD3.

4.1.1 Clonagem da seqüência codificadora do FvFc anti-CD3 murino em vetor de expressão para célula de mamíferos com marca seletiva.

Ao se planejar a produção heteróloga de uma proteína recombinante é importante considerar o vetor de expressão a ser utilizado. Os processos atuais de expressão heteróloga de proteínas almejam altas taxas de expressão e de forma estável ao longo do tempo. Esses fatores são importantes para a redução do custo da proteína expressa e, assim, viabilizar a sua comercialização. Nesse sentido, o desenho de vetores que possuem promotores e seqüências reguladoras que propiciem altas taxas de transcrição do gene alvo é de grande relevância para se alcançar altas taxas de expressão. Além disso, a inserção de marcas seletivas nos vetores utilizados é outro ponto importante, visto que essa estratégia possibilita a seleção de clones produtores de forma mais rápida e facilita o estabelecimento de clones estáveis.

Como já descrito na introdução, as células de mamíferos são consideradas atualmente as hospedeiras ideais para a expressão de anticorpos recombinantes, em especial, as células de ovário de *hamster* chinês (CHO). Dessa forma, propusemos a utilização dessa linhagem celular com o intuito de obter um produto expresso o mais similar possível ao feito por células humanas.

Com o sistema de expressão escolhido e com o objetivo de alcançar taxas de produção das proteínas recombinantes significativas e estáveis foi proposta a utilização do vetor de expressão para célula de mamíferos pMIREs. Esse vetor foi construído durante a minha iniciação científica e possui como característica um promotor de citomegalovírus (pCMV), promotor largamente utilizado para expressão de altos níveis de proteínas recombinantes. Apresenta também um sinal de poliadenilação eficiente do vírus 40 de macaco (SV40, do inglês, *Simian Virus 40*) e uma seqüência líder que quando traduzida origina um peptídeo sinal para direcionamento da proteína expressa para o aparato secretório da célula. Destaca-se, nesse vetor, a presença de um sítio de entrada ribossomal interna (IRES) interposto entre o final da região codificadora do anticorpo recombinante e o início da marca de resistência ao antibiótico G418, essa seqüência foi obtida do vetor comercial pLXIN (Clontech) (Figura 18). Essa construção permite a tradução pelo ribossomo da seqüência do anticorpo clonado e do gene de resistência a partir de um único transcrito na forma policistrônica, conforme mostrado na figura 13.

Uma característica interessante dessa construção é que a geração de um transcrito policistrônico, contendo a marca de resistência a G418, garante a seleção das células

produtoras da proteína de interesse. Isso se dá porque a célula só adquire resistência ao antibiótico G418 se estiver produzindo o transcrito que contém tanto a marca de resistência como o gene da proteína de interesse.

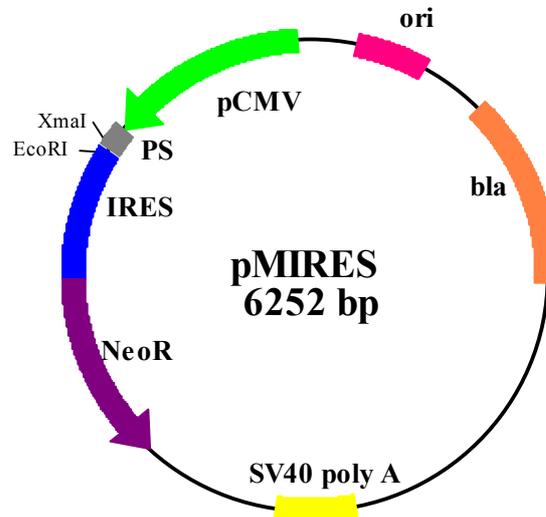


Figura 18. Representação esquemática do vetor pMIREs. Vetor utilizado para expressão das proteínas recombinantes em células de mamíferos. O sítio múltiplo de clonagem está sendo mostrado com os sítios de clivagem das endonucleases *Xma* I e *EcoR* I, os quais são utilizados para clonagem dos fragmentos de anticorpos. Siglas- *bla*: gene da enzima β -lactamase. *pCMV*: promotor de citomegalovírus. *SV40 poly A*: Sinal de poliadenilação. *PS*: Sequência líder codificadora do peptídeo sinal. *ori*: Origem de replicação. *IRES*: sítio de entrada ribossomal interno. *NeoR*: gene de resistência ao antibiótico G418.

Com o vetor de expressão estabelecido, direcionamos as estratégias de clonagem e a montagem das seqüências codificadoras dos anticorpos recombinantes para inseri-las nesse vetor e possibilitar a expressão em células de mamíferos.

Para a clonagem do fragmento gênico codificador do FvFc anti-CD3 murino no vetor pMIREs obtivemos a sua seqüência a partir daquela clonada no vetor pPIG CD3 FvFc mur, vetor previamente construído pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB para expressão de proteínas recombinantes em leveduras. Dessa forma, os vetores pPIG CD3 FvFc mur e pMIREs foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *EcoR* I proporcionando a liberação do FvFc mur do primeiro plasmídeo e a geração dos sítios para clonagem no vetor pMIREs (Figura 19). Após a clonagem, os clones obtidos foram analisados utilizando a enzima *Pst* I e o perfil originário estava de acordo com o esperado, dando indício que a clonagem foi bem sucedida, originando o vetor pMIREs FvFc Mur (Figura 19).

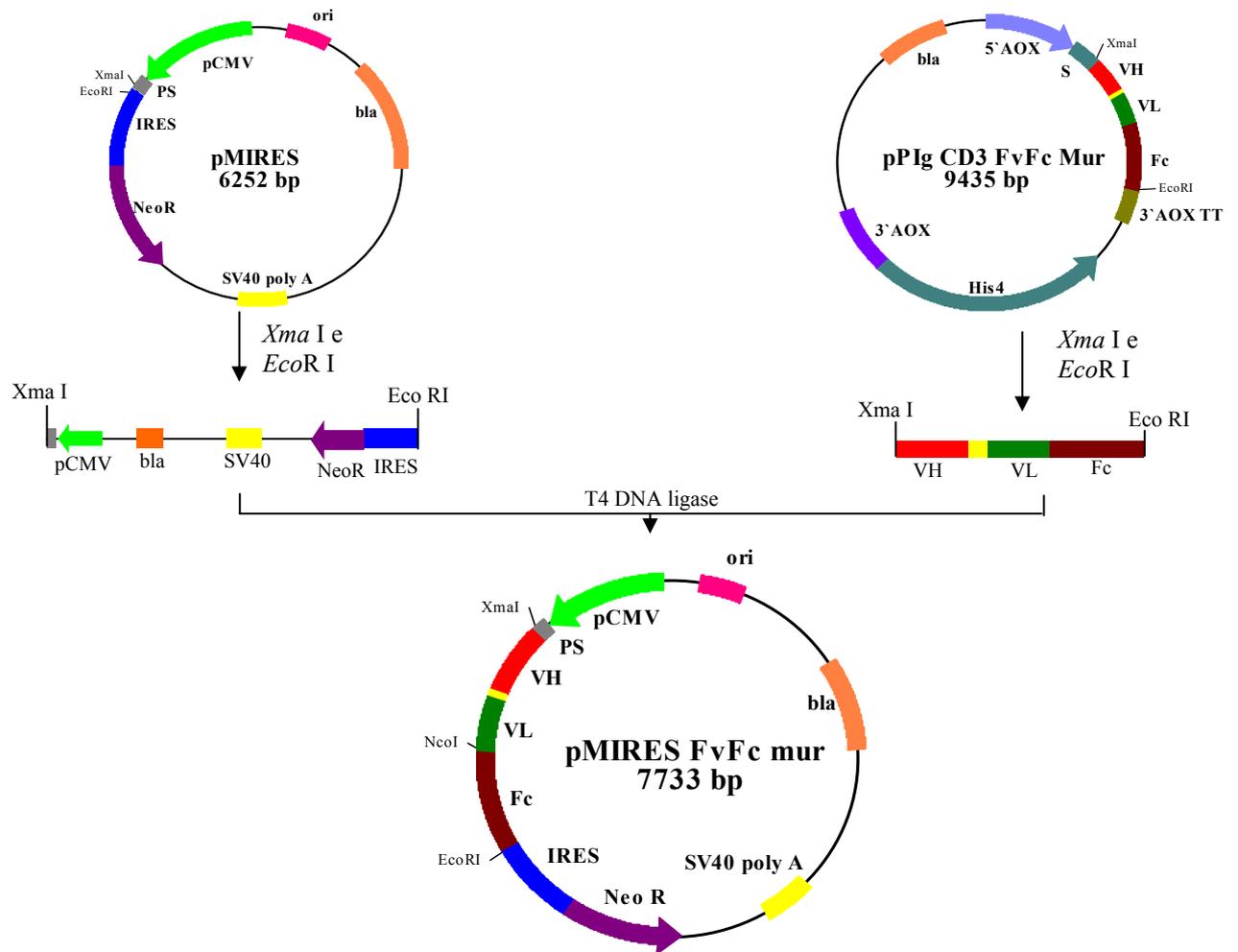


Figura 19. Estratégia de construção do vetor pMIREs FvFc mur. O fragmento gênico codificador do FvFc murino foi obtido pela digestão do plasmídeo pPIG CD3 FvFc mur com as enzimas *Xma* I e *Eco*R I, seqüência essa utilizada para ligação ao vetor pMIREs, digerido previamente com as mesmas enzimas. A ligação desses fragmentos deu origem ao vetor pMIREs FvFc Mur. Siglas - *bla*: gene da enzima β -lactamase. *pCMV* : promotor de citomegalovírus. *SV40 poly A*: Sinal de poliadenilação. *PS*: Seqüência líder codificadora do peptídeo sinal. *ori*: Origem de replicação. *IRES*: sítio de entrada ribossomal interno. *NeoR*: gene de resistência ao antibiótico G418. *5'AOX*: fragmento do promotor *AOX1*. *S*: sinal de secreção do fator α . *3'AOX TT*: fragmento *3'AOX1* de terminação da transcrição. *His4*: fase de leitura aberta do gene *HIS4*. *3'AOX*: fragmento *3'AOX1*.

A partir disso, o clone escolhido foi submetido ao seqüenciamento automático para verificação da existência de mutações. Ao se analisar as seqüências utilizando ferramentas de bioinformática (tópico 3.2.9) observou-se a ocorrência de algum tipo de mutação próximo ao início da seqüência codificadora do FvFc mur. Isso provocou uma mudança na fase de leitura em relação ao códon de iniciação (Figura 20) e o surgimento de um códon de terminação da tradução precoce, o que impossibilita a produção da proteína quando transfectada.

Com o intuito de verificar onde surgiu a mutação nessa seqüência, foi realizado o seqüenciamento do vetor doador da seqüência murina, pPIG CD3 FvFc mur, onde se observou o mesmo problema.

Diante da situação, foi proposta a correção da seqüência codificadora do FvFc mur por meio da deleção de 4 pares de base no início da sua seqüência para o restabelecimento da fase de leitura original. Dessa forma, realizaram-se digestões do vetor pMIRE5 FvFc mur com a enzima *Xma* I, que possui o sítio de restrição onde a mutação ocorreu, e um posterior tratamento com a nuclease Mung Bean. Essa nuclease é capaz de retirar nucleotídeos em formato de fita simples de DNA, justamente àqueles gerados pela digestão com a enzima *Xma* I. Esse tratamento possibilitaria o restabelecimento da fase de leitura original como pode ser observado na figura 20.

Tal procedimento foi realizado exaustivamente durante um ano, entretanto não foi possível solucionar o problema. O fato de a Mung Bean ser uma nuclease que reconhece nucleotídeos não pareados gera problemas durante a sua utilização como a degradação de *loops* despareados ou a perda de especificidade e degradação do DNA. Para minimizar esses efeitos as reações foram procedidas a 30°C, contudo, os clones obtidos com o tratamento perdiam fragmentos de até 400 pb, mostrando que a reação de nuclease era exacerbada. Diversas adaptações do protocolo proposto pelo fabricante da enzima foram tentadas sem sucesso.

Diante desse entrave, foi proposta a utilização anticorpo murino anti-CD3 (OKT3) como controle dos ensaios de ligação ao antígeno e dos ensaios de análise das funções efetoras dos anticorpos recombinantes. O OKT3 é utilizado no tratamento dos pacientes transplantados e foi gentilmente disponibilizado pelo grupo de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração (InCor – USP).

1 - BioEdit version 5.0.9 Restriction Mapping Utility
(c)1998, Tom Hall

FvFc mur seqüenciado
Translations: 3 2 1

```

N M L L G L K W V S L L F F I K V C I V P G Y G * R
E H A V G A E V G F F V V F Y Q G V H C A R V W L A
* T C C W G * S G F L C C F L S R C A L C P G M A S E
TGAACATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTG
ACTTGTACGACAACCCCGACTTCACCCAAAGAAACAACAAAAAATAGTTCCACACGTAACAC
GGGGGCTATGGCTAGCGA
GGGCGC
ATACCGATCGCT
Xma I

G P A A A V W G * T G K T W G L S E D V L Q G F W L H
R S S C S S L G L N W Q D L G P Q * R C P A R L L A T
V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y
GGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACA
CCAGGTCGACGTCGTCAGACCCCGACTTGACCGTTCTGGACCCCGGAGTCACTTCTACAGGACGTTCCGAAGACCGATGT

```

2 - BioEdit version 5.0.9 Restriction Mapping Utility
(c)1998, Tom Hall

FvFc mur proposto após tratamento com a enzima mung bean

Translations: 3

```

N M L L G L K W V S L L F F I K V C I V R M A S E V
TGAACATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGTGCATTGTG
ACTTGTACGACAACCCCGACTTCACCCAAAGAAACAACAAAAAATAGTTCCACACGTAACAC
CGTATGGCTAGCGAGGTC
GC
ATACCGATCGCTCCAG

Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F
CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAAGTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTT
GTCGACGTCGTCAGACCCCGACTTGACCGTTCTGGACCCCGGAGTCACTTCTACAGGACGTTCCGAAGACCGATGTGGAA

```

Figura 20. Seqüência codificadora do FvFc mur presente no vetor pMIREs FvFc mur. 1- Seqüenciamento do FvFc mur no vetor pMIREs evidenciando a mudança da 1^o (amarelo) para 3^o (azul) fase de leitura. Em vermelho o sítio da enzima de restrição *Xma* I escolhida como ponto de clivagem para posterior tratamento com a enzima Mung Bean. 2- Seqüência proposta para o FvFc mur após o tratamento com a nuclease Mung Bean que promoverá o restabelecimento da fase leitura original como é mostrado pela junção realçadas em duas cores e a cicatriz do tratamento com nuclease Mung Bean (vermelho).

4.1.2 Construção do vetor codificador do scFv anti-CD3 humanizado hVH^{T86}hVL.

A estratégia utilizada para clonagem das seqüências relativas aos anticorpos humanizados no vetor de expressão difere significativamente da observada para clonagem da versão murina. Enquanto a seqüência murina já estava previamente construída pelo grupo, as versões humanizadas deveriam ser montadas antes da sua clonagem no vetor de expressão para células de mamíferos. Com isso, para a construção das seqüências codificadoras correspondentes a esses FvFcs humanizados seria necessário a junção do fragmento gênico codificador do scFv correspondente amontante aos domínios gênicos que codificam o CH2CH3 de IgG1 humana (Figura 21).

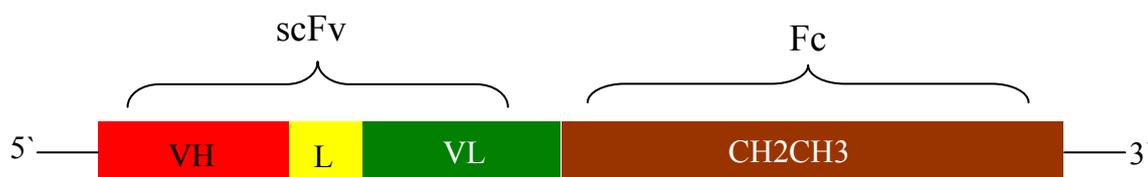


Figura 21. Representação esquemática do gene dos FvFcs construídos. O polipeptídeo resultante da expressão desses genes é constituído pelo fragmento scFv unido à porção Fc de IgG1 humana.

Dessa forma, precisava-se primeiramente formar as seqüências codificadoras dos scFvs dos respectivos anticorpos para a sua futura junção com a seqüência gênica da região Fc. Como passo inicial, partiu-se para a construção do scFv T. Optou-se por uma estratégia onde eram utilizados os plasmídios pIg FvFc hVH^{T86}mVL e o pUC hVL. O plasmídio pIg FvFc hVH^{T86}mVL foi obtido anteriormente nesse trabalho. Esse vetor contém o gene codificador da versão hemi-humanizada do FvFc anti-CD3 que consiste da cadeia pesada humanizada T e da cadeia leve murina, sendo então um doador da cadeia variável pesada humanizada T. Já o plasmídio pUC hVL, contém a seqüência codificadora da cadeia leve humanizada (Figura 22). Os dois plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xho* I onde no pIg FvFc hVH^{T86}mVL permaneceria somente o fragmento com a cadeia pesada humanizada e o linker, e no pUC hVL era liberada a cadeia leve (Figura 22). Os fragmentos obtidos após esse ensaio de restrição foram separados em gel de agarose 0,7% (p/v) e as bandas correspondentes ao vetor e a cadeia leve foram eluídas, purificadas e submetidas a sistemas de ligação.

Esses sistemas foram utilizados para transformar, pela técnica de choque térmico, células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α . Os clones transformantes foram escolhidos para preparação de DNA plasmidial em pequena escala e foram analisados quanto ao perfil de restrição com as endonucleases *Bgl* II e *Xho* I. Foram obtidos fragmentos de DNA com o perfil de migração eletroforética em torno de 300 pb e 3589 pb, de acordo com o esperado (Figura 23). Essa construção resultou na perda do fragmento FvFc original do vetor e na formação do fragmento scFv T. O vetor resultante dessa clonagem recebeu o nome de pIg CD3 scFv T (Figura 22).

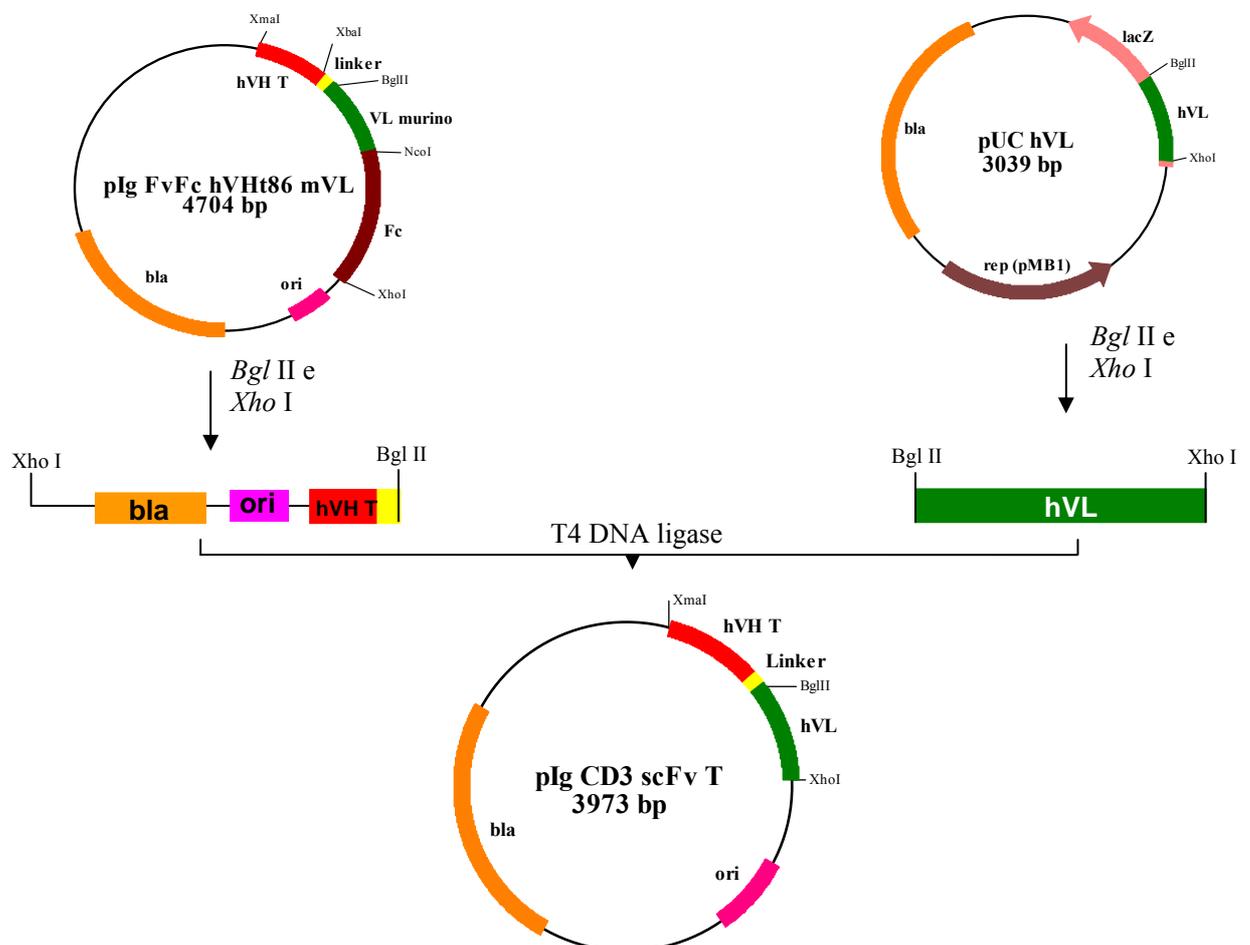


Figura 22. Estratégia para construção do vetor pIg CD3 scFv T. O fragmento gênico codificador do scFv T humanizado contendo a cadeia variável pesada hVH^{T86} e a cadeia leve humanizada hVL foi obtido pela digestão dos plasmídios pIg FvFc hVH^{T86}mVL e pUC hVL com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I para liberação do vetor com a cadeia variável pesada e da cadeia variável leve. Esses fragmentos por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*. Siglas- *bla*: gene da enzima β -lactamase. *lacZ*: gene da β -galactosidade. *rep* (*pMB1*): origem de replicação. *ori*: origem de replicação.

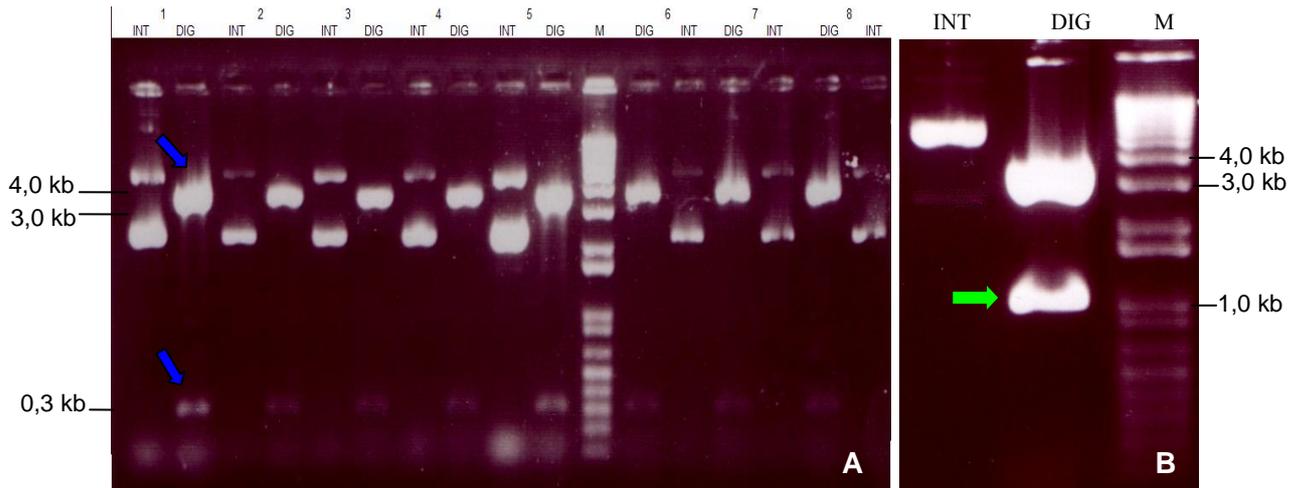


Figura 23. Confirmação da construção do vetor pIg CD3 scFv T. **A:** Perfil de restrição com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I da ligação entre o pIg hVH^{T86} e o hVL dando origem ao pIg CD3 scFv T. **B:** Perfil de restrição do vetor pIg FvFc hVH^{T86}mVL com as enzimas *Bgl* II e *Xho* I mostrando o fragmento contendo o VL murino e os domínios CH2CH3 retirados para a inserção do VL humanizado, indicada pela seta verde. Números em kilobases indicando as bandas do marcador. Setas azuis indicando os fragmentos esperados para o perfil correto. Clones de 1 a 8. INT: plasmídeo intacto; DIG: plasmídeo digerido pelas referidas enzimas; M: 1 kb Plus ladder Invitrogen[®].

4.1.3 Construção do vetor codificador do scFv anti – CD3 humanizado hVH^{R86}hVL.

Para a construção da seqüência codificadora do FvFc R adotou-se uma estratégia onde o passo inicial era a formação do fragmento gênico scFv R. Para tal foram utilizados os vetores pCIg Rm (Fonseca, 2000), no qual está contido o scFv hemi-humanizado com a cadeia variável pesada hVH^{R86} e a cadeia leve murina, e o vetor pIg CD3 scFv T, descrito no tópico anterior (Figura 24). Para obtenção do scFv R ambos os plasmídios foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xba* I, a partir da qual o vetor pCIg Rm liberou a cadeia pesada hVH^{R86} que foi utilizada para repor o VH do vetor pIg CD3 scFv T o que originou o vetor pIg CD3 R. (Figura 24).

Os sistemas eram transformados na forma descrita anteriormente e os plasmídios obtidos foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Ava* I para averiguar se o procedimento foi bem sucedido. O padrão de fragmentos apresentado foi de 351, 397 e 3174 pb, de acordo com o esperado. A partir da confirmação do perfil de restrição, doze clones obtidos foram submetidos ao seqüenciamento automático de DNA para verificação se a cadeia pesada hVH^{R86} realmente estava presente no vetor de forma íntegra. Como a cadeia

pesada hVH^{R86} difere daquela presente no vetor pIg CD3 scFv T em somente dois pares de base e não havia nenhuma enzima de restrição passível de ser utilizada para visualizar essa diferença, a única maneira de comprovarmos a presença da cadeia pesada hVH^{R86} era por seqüenciamento. O resultado dessa etapa foi analisado utilizando ferramentas de bioinformática (tópico 3.2.9) e comprovou-se que oitos dos doze clones submetidos ao seqüenciamento apresentavam a seqüência da cadeia pesada com arginina, dando origem ao vetor pIg CD3 scFv R (Figura 24).

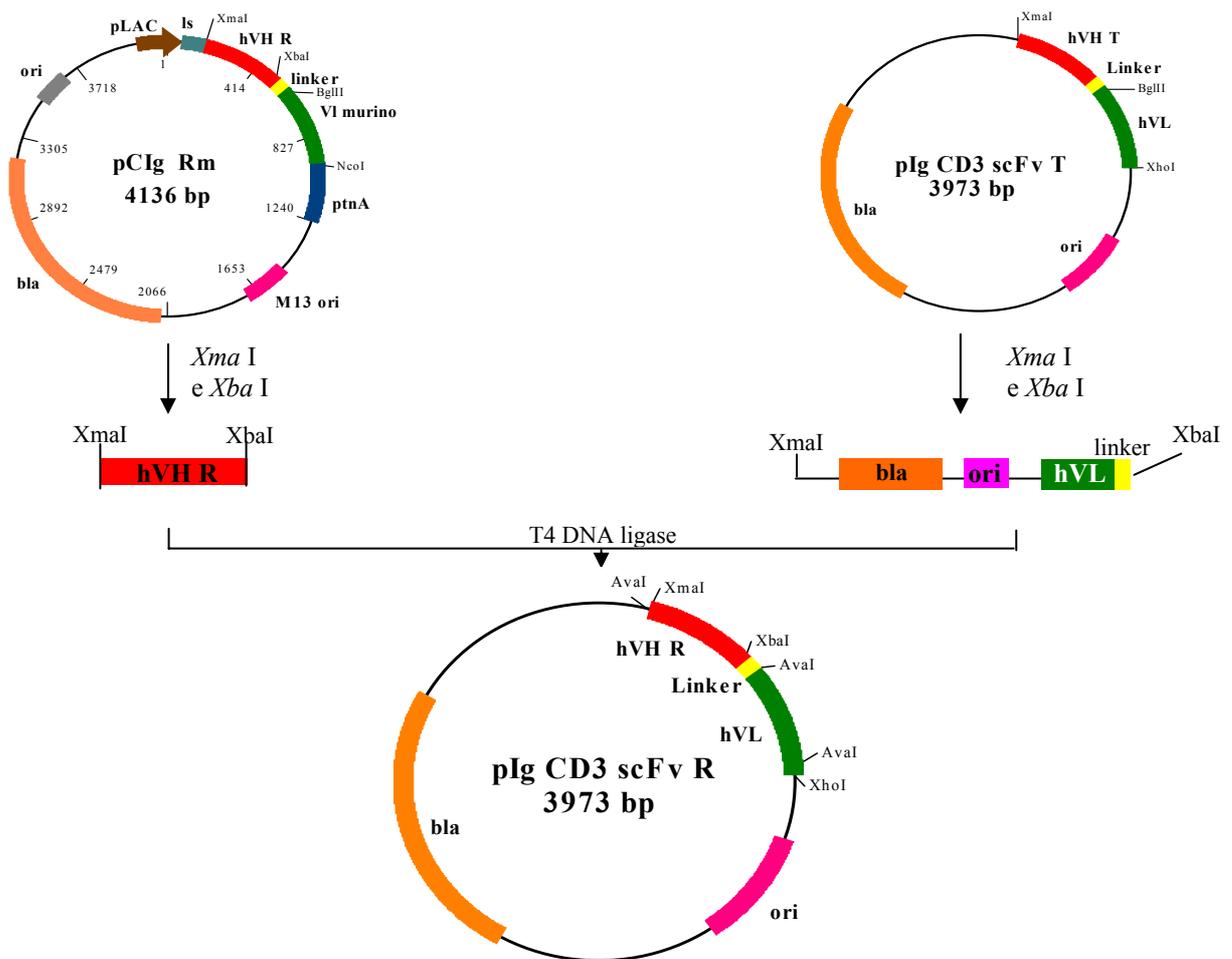


Figura 24. Estratégia para construção do vetor pIg CD3 scFv R. Para obtenção do vetor contendo o gene codificador do scFv R, composto pela cadeia variável pesada hVH^{R86} e a cadeia leve humanizada hVL, os plasmídios pCIg Rm e pIg CD3 scFv T foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xba* I para liberação do fragmento gênico codificador da cadeia variável pesada e do vetor, respectivamente. Esses por sua vez foram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase* dando origem ao vetor pIg CD3 scFv R. Siglas- *bla*: gene da enzima β -lactamase. *M13 ori*: origem de replicação de bacteriófago. *ori*: origem de replicação bacteriana. *pLAC*: promotor lac. *ls*: Seqüência líder.

4.1.4 Montagem das seqüências codificadoras dos FvFcs humanizados anti-CD3.

Com a construção das seqüências codificadoras das duas versões de scFvs humanizados anti-CD3 (R e T) realizada, partiu-se para a formação dos genes referentes as moléculas alvos desse trabalho, os FvFcs R e T. Como já descrito, o fragmento FvFc apresenta inúmeras vantagens sobre o scFv, pois mimetiza melhor a ação do anticorpo inteiro, devido a sua natureza dimérica, apresentando dois sítios de ligação ao antígeno e também pela presença da porção Fc que é responsável pelo recrutamento das funções efetoras do anticorpo além de garantir uma maior estabilidade da molécula.

Assim, o objetivo nesse momento era fusionar os fragmentos gênicos dos scFvs construídos a seqüência dos domínios CH₂CH₃ de uma IgG1 humana, formando assim o fragmento FvFc. Para tal foram utilizados os respectivos vetores com os scFvs humanizados (pIg CD3 scFv R e T) e o vetor pMAC PS CD18, este contendo a versão FvFc humanizada de um anticorpo contra a molécula CD18, previamente construído pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (Ruggiero, 2002), esse vetor sendo utilizado como doador da seqüência relativa à região Fc.

Os respectivos vetores foram então submetidos às enzimas de restrição *Xma* I e *Xho* I, liberando os scFvs humanizados do pIg CD3 scFv (T ou R) que foram utilizados para repor o scFv liberado pelo vetor pMAC PS (Figura 25). Após a ligação, transformação e preparação plasmidial os clones obtidos foram analisados quanto ao seu perfil de restrição utilizando a endonuclease *Bgl* II, onde foi mostrado o perfil esperado contendo fragmentos de 516, 753 e 4523 pb. Com isso, foram obtidos os fragmentos gênicos codificadores dos anticorpos recombinantes humanizados anti-CD3, no formato FvFc, dando origem aos plasmídios pMAC PS CD3 R e T (Figura 25).

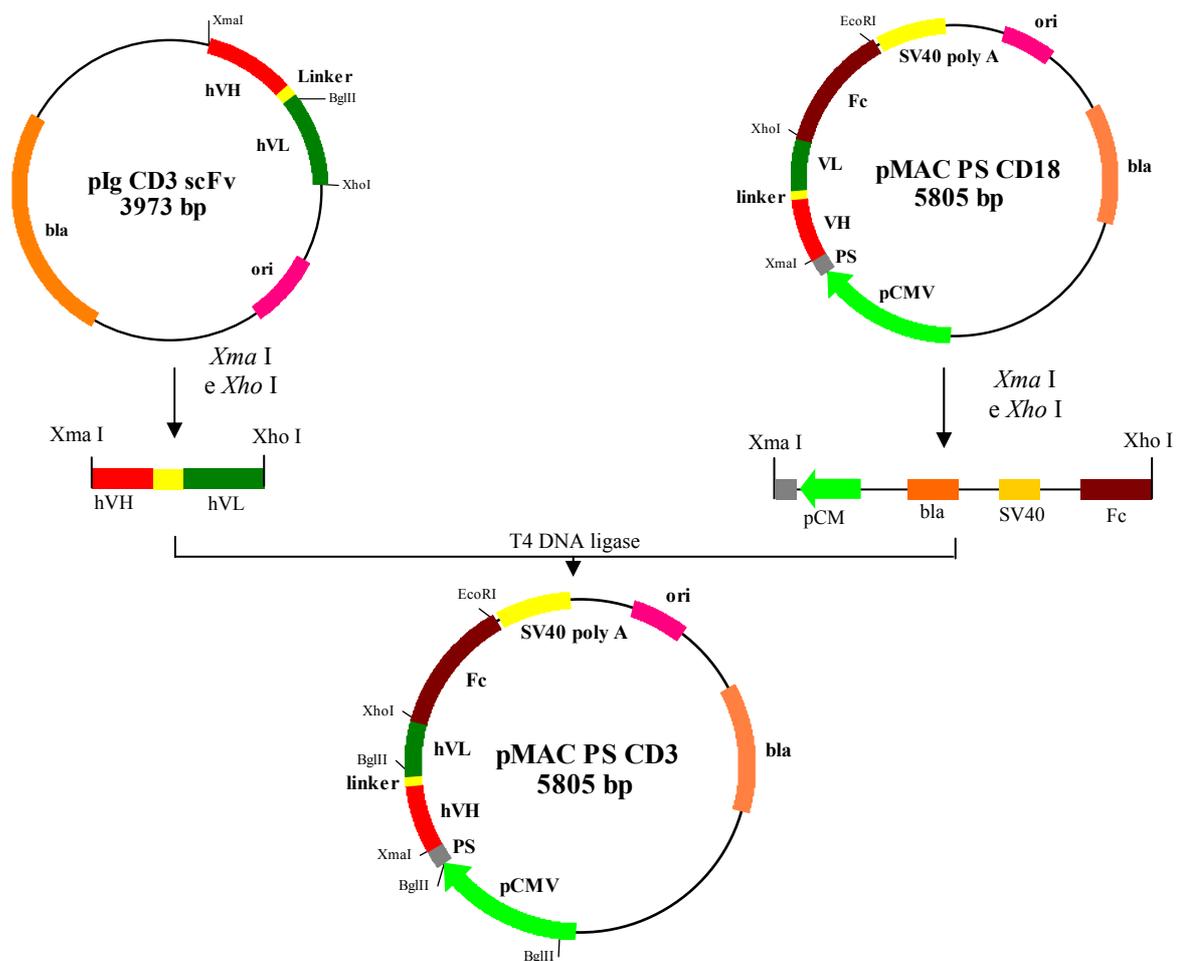


Figura 25. Estratégia para montagem das seqüências codificadoras dos FvFcs R e T. Os plasmídios pIg CD3 scFv T e R e o pMAC PS CD18 foram digeridos com as enzimas *Xma* I e *Xho* I para liberação dos fragmentos gênicos que codificam os scFvs humanizados anti-CD3 e do vetor pMAC contendo os domínios CH2 e CH3 de uma IgG1 humana. Esses por sua vez eram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA* ligase. Siglas- *bla*: gene da enzima β -lactamase. *pCMV* : promotor de citomegalovírus. *SV40 poly A*: Sinal de poliadenilação. *PS*: Seqüência líder codificadora do peptídeo sinal. *ori*: Origem de replicação

4.1.5 Clonagem das seqüências codificadoras dos anticorpos recombinantes humanizados no vetor pMIREs.

Com o vetor de expressão já estabelecido (tópico 4.1.1) partiu-se para a transferência das seqüências codificadoras dos anticorpos anti-CD3 humanizados T e R do vetor pMAC PS CD3 (T ou R) para o vetor de expressão pMIREs. Para tal, ambas as construções foram digeridas com as enzimas de restrição *Xma* I e *EcoR* I, o que promoveu a liberação dos fragmentos correspondentes aos FvFcs do anti-CD3 e tornou apto o pMIREs receber tais fragmentos (Figura 26). Após purificação, ligação, transformação e preparação plasmidial os clones obtidos foram analisados quanto ao seu perfil de restrição com as enzimas *Ava* I, onde

o perfil esperado de fragmentos era de 33, 325, 382, 2158 e 4749 pb; *Bgl* II, que gerou fragmentos de 513, 753 e 6614 pb; e por último com as enzimas *Xho* I e *Xba* I que gerou um padrão de 357, 2460 e 4863 pb. A figura 27 mostra o clone 21 do pMIREs com o FvFc T evidenciando o padrão observado nos clones positivos. Com isso, as seqüências contendo tanto o FvFc T e R foram submetidas ao seqüenciamento automático onde ficou comprovada a correta clonagem desses fragmentos e dando origem aos vetores pMIREs FvFc T e R (Figura 26), sendo capazes de dirigir a expressão dos anticorpos recombinantes em células de mamíferos.

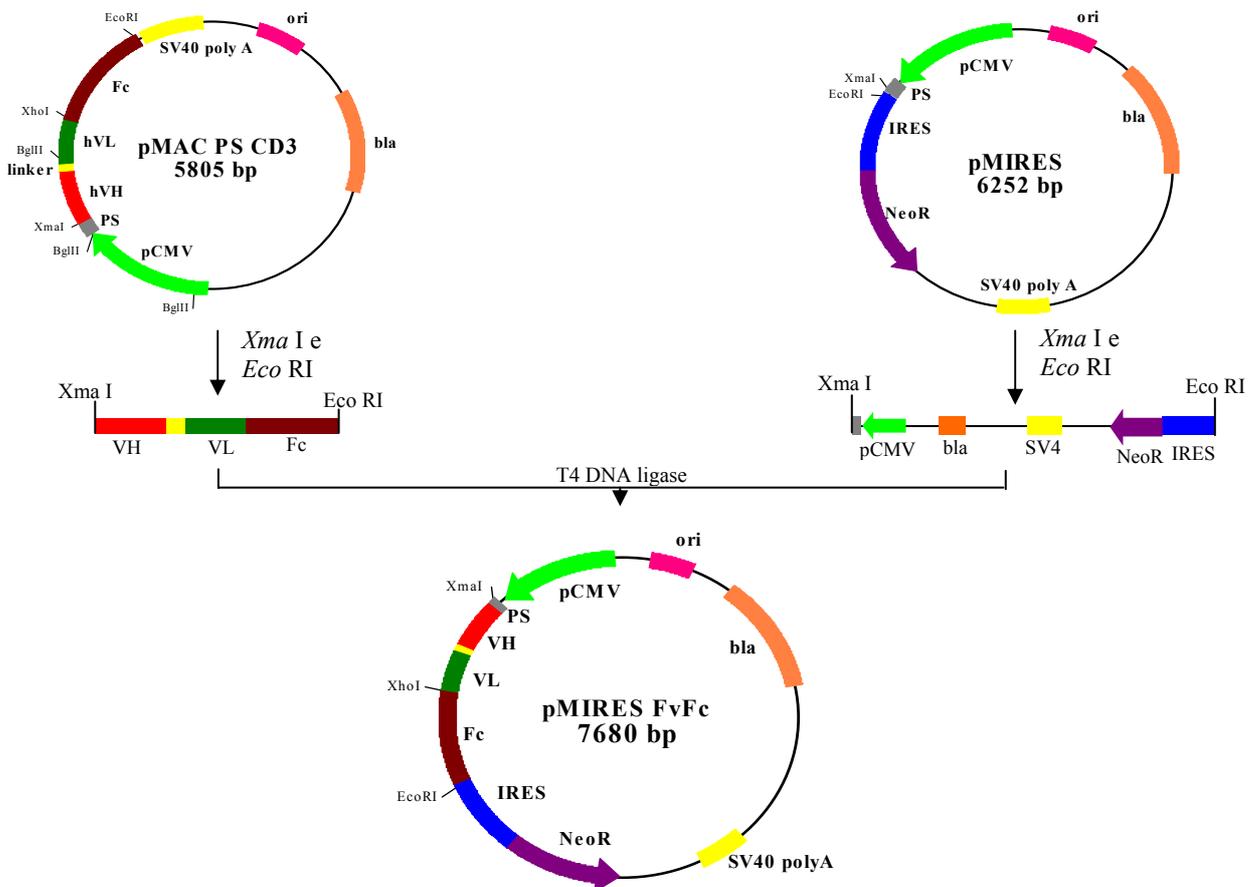


Figura 26. Representação esquemática da construção do plasmídeo pMIREs FvFc (R ou T). Os plasmídios pMAC PS CD3 e pMIREs foram digeridos com as endonucleases *Xma* I e *Eco* RI para liberação dos fragmentos gênicos que codificam os FvFcs humanizados anti-CD3 do vetor pMAC e tornar apto ao recebimento desses fragmentos o vetor pMIREs. Esses por sua vez eram ligados utilizando-se a enzima *T4 DNA ligase*. Siglas- *bla*: gene da enzima β -lactamase. *pCMV*: promotor de citomegalovírus. *SV40 poly A*: Sinal de poliadenilação. *PS*: Seqüência líder codificadora do peptídeo sinal. *ori*: Origem de replicação. *IRES*: sítio de entrada ribossomal interno. *NeoR*: gene de resistência ao antibiótico G418.

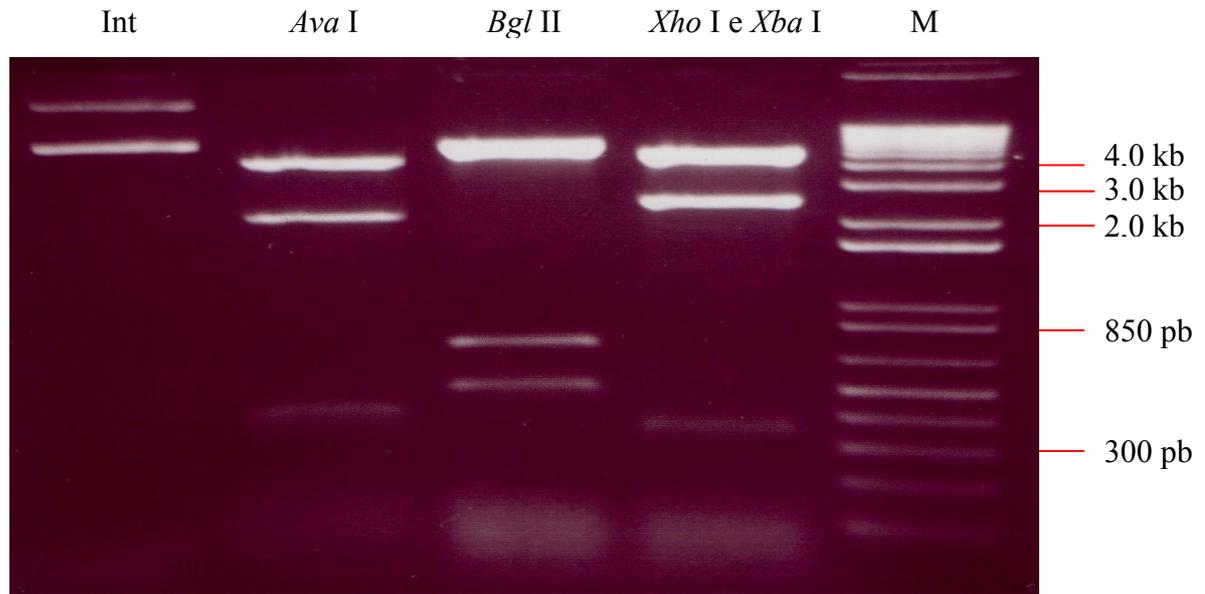


Figura 27. Análise de restrição do vetor pMIREs FvFc (R ou T). Foram utilizadas as enzimas *Ava I*, *Bgl II* e *Xho I/ Xba I*. O perfil esperado para cada uma dessas análises era 4749, 2158, 382, 325 e 33 pb; 6614, 753 e 513 pb; e por último 4863, 2460 e 357 pb ; respectivamente. Fragmentos obtidos a partir da digestão do clone 21 contendo o gene do FvFc T. Setas indicam o tamanho das bandas do marcador. Int: plasmídeo intacto; M: 1 kb plus ladder Invitrogen®.

4.2 Transfecção das células de ovário de *hamster* chinês (CHO) com os plasmídios pMIREs FvFc T e R.

Atualmente, no âmbito da produção heteróloga de proteínas recombinantes para fins farmacêuticos as células de mamífero se destacam. Cerca de 60 a 70% dessas proteínas já disponíveis no mercado são produzidas em células de mamíferos (Wurm, 2004). E dentro desse cenário a linhagem celular que tem se mostrado mais favorável para a produção de biofarmacêuticos é a CHO (Li, Menzel *et al.*, 2007). Dessa forma, propusemos a expressão das versões humanizadas dos anticorpos anti-CD3 utilizando essa linhagem.

Com os vetores pMIREs FvFc T e R , que codificam as duas versões humanizadas dos FvFcs anti-CD3, com as seqüências já analisadas e corretas partiu-se para a produção dessas proteínas recombinantes nas células CHO. Para tal foram realizadas transfecções (tópico 3.2.10.6). As transfecções foram realizadas em duplicatas. Além desses vetores, foi realizada também uma transfecção com o vetor de expressão pMAC PS CD18 (figura 25), contendo a versão FvFc humanizada de um anticorpo específico para a molécula CD18, previamente

construído pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (Ruggiero, 2002). Optou-se por transfectar esse vetor porque em trabalhos anteriores foi observada a expressão eficiente do anticorpo recombinante por esse vetor, sendo um controle positivo da transfecção. Nesse último caso, devido à ausência de marca seletiva no vetor pMAC, o que dificulta a seleção de transfectomas secretores da proteína, foi então realizada uma co-transfecção desse vetor com o vetor pGFP/NEO (Invitrogen®). Esse vetor possui o gene repórter que codifica a proteína fluorescente verde (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*) de *Aequorea victoria* e o gene Neo, que confere resistência ao antibiótico G418, dessa forma, essa co-transfecção possibilitaria a seleção estável dos transfectomas por meio de pressão seletiva.

Após 72h da transfecção, os sobrenadantes de cultura foram coletados para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para verificar a expressão das proteínas recombinantes e comparar as eficiências de transfecção dos vetores utilizados (Figura 28). O experimento de ELISA era desenvolvido de forma a quantificar a presença da porção Fc, comum a todas as construções. As proteínas foram quantificadas a partir de comparações com uma curva padrão realizada com IgG humana em concentrações conhecidas obtidas por meio de diluições seriadas (Figura 28). O ensaio era realizado em duplicata para cada poço transfectado e os resultados referente à mesma proteína recombinante agrupados, assim, para cada proteína foram agrupadas quatro medidas.

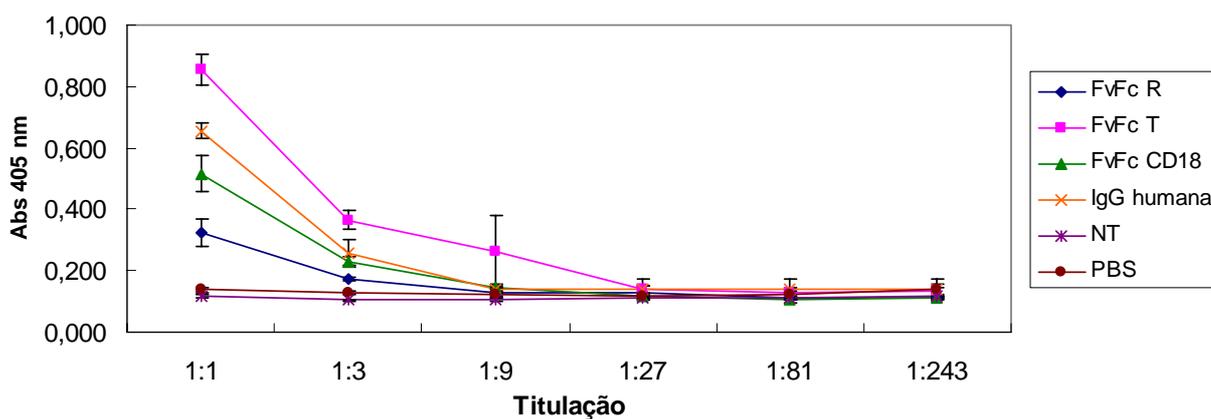


Figura 28. Produção dos FvFcs anti-CD3 e Anti-CD18 em células da linhagem CHO. Imunodeteccção da expressão de anticorpos recombinantes no sobrenadante de cultura coletado após 72h da transfecção. As barras de erros representam o desvio padrão de todas as quatro réplicas do experimento. FvFc R: FvFc anti-CD3 humanizado apresentando uma arginina na posição 86 da cadeia pesada; FvFc T FvFc anti-CD3 humanizado apresentando uma treonina na posição 86 da cadeia pesada; FvFc CD18: FvFc anti-CD18 humanizado; IgG humana: IgG humana em uma concentração inicial de 14 ng/mL; NT: sobrenadante de células não transfectadas; PBS: controle negativo.

Os resultados revelaram que ambos os plasmídios conseguem promover a expressão das proteínas recombinantes. Entretanto, a eficiência de transfecção era baixa diante dos níveis expressos. Essa baixa eficiência talvez seja devido ao fato de que no momento da transfecção as células estavam com uma confluência em torno de 90% enquanto que o recomendado pelo fabricante do reagente é uma confluência entre 50 a 60%. A partir dos dados da curva padrão com IgG humana a 14 ng/mL, pode-se inferir que a quantidade de proteína recombinante presente no sobrenadante de cultura era de 18,2; 11,0 e 6,9 ng/mL para as proteínas FvFc T, FvFc CD18 e FvFc R, respectivamente. É interessante observar que apesar de todas as transfecções terem sido realizadas com o mesmo vetor de expressão e em quantidades idênticas, a transfecção do vetor contendo a versão com treonina apresentou uma eficiência de transfecção três vezes maior que a versão com arginina. Esse resultado pode estar relacionado com as preparações plasmidiais obtidas dos vetores contendo as seqüências codificadoras dessas proteínas. O vetor contendo o FvFc T ao final da preparação apresentou uma concentração de 500 ng/ μ L enquanto que o plasmídio do FvFc R apresentou concentração de 2 μ g/ μ L, dessa forma o plasmídio do FvFc T estava mais diluído o que pode facilitar a sua homogeneização com o reagente de transfecção. A alta concentração do plasmídio do FvFc R pode induzir a formação de aglomerados de DNA de difícil homogeneização, assim disponibilizando menos plasmídios livres para transfecção e provavelmente, diminuindo a eficiência desse processo.

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

Com intuito de obtermos quantidades de proteínas suficientes para a realização dos ensaios biológicos, partiu-se para seleção das células transfectadas utilizando o antibiótico geneticina[®] (G418). A adição de agente seletivo promove a morte das células não transfectadas e permite a sobrevivência das células produtoras de proteína recombinante, visto que os plasmídios utilizados possuem a marca de resistência ao agente seletivo citado. Além disso, após a morte celular de todas as células não transfectadas, as células resistentes passam a ter a capacidade de se proliferar até atingir a confluência máxima do poço. Dessa forma, após a seleção, somente células expressando a proteína recombinante estariam presentes nos poços de cultura.

Durante a seleção das células transfectadas, os sobrenadantes das culturas foram coletados para acompanhamento dos níveis de proteínas recombinantes expressos por ELISA. Os resultados mostraram que nos tempos 72 h e 120 h houve uma pequena diminuição da

quantidade de proteína expressa (Figura 29). Essa etapa é um momento crucial para o estabelecimento das células resistentes ao antibiótico. Provavelmente, além de provocar a morte das células não transfectadas, as células que integraram no seu genoma poucas cópias do vetor utilizado na transfecção podem ter sido eliminadas, já que a quantidade expressa do gene resistência provavelmente era consideravelmente inferior àquelas células que internalizaram e integraram diversas cópias dos vetores contendo a marca de resistência. Nesse sentido, essa pequena queda de expressão provavelmente se deve a morte celular dessas células transfectadas com poucas cópias dos vetores que de certa forma estavam contribuindo para as quantidades de proteínas expressas. Outra hipótese é que essa variação seja um artefato intrínseco do experimento visto que a composição inconsistente do meio, devido à presença de soro fetal bovino, pode gerar variações dos níveis de produção das proteínas recombinantes.

A partir do tempo 120 h foi possível observar que as quantidades de proteínas expressas pelas células transfectadas com os vetores pMIRE5 FvFc T e R cresceram gradativamente, até chegar num patamar próximo a 130 ng/mL (Figura 29). Há uma relação direta entre o aumento da população de células transfectadas e a produção de proteínas recombinantes. O aumento da disponibilidade de espaço na placa de cultura e de nutrientes, devido à morte das células não transfectadas favorece o aumento da população das células transfectadas e conseqüentemente o aumento da síntese de proteínas recombinantes.

O crescimento mais rápido dos níveis de expressão observados na versão FvFc T pode ser resultante da maior eficiência da transfecção dessa versão. Portanto, a maior quantidade de células transfectadas no início do processo de seleção possibilitou um aumento da população transfectada mais rápido do que na versão FvFc R. Apesar de mais lento, os níveis de produção do FvFc R alcançou aqueles apresentados pelo FvFc T.

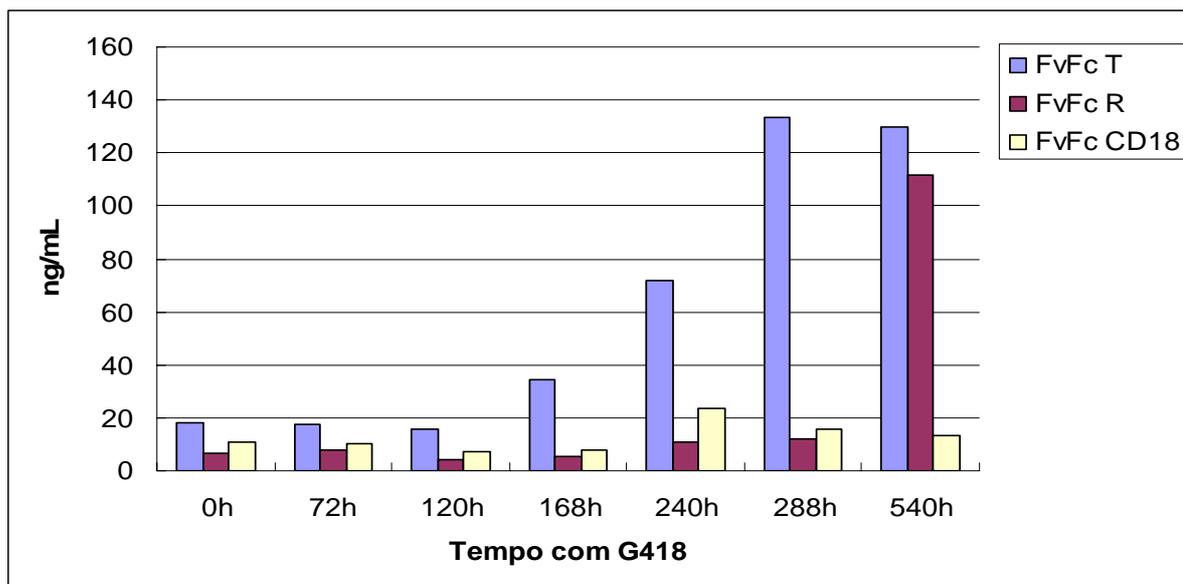


Figura 29. Níveis de produção dos anticorpos humanizados anti-CD3 e CD18 durante a seleção das células transfectadas com o antibiótico geneticina[®]. O sobrenadante de cultura foi coletado após 72h da transfecção e o meio reposto adicionado do referido antibiótico a cada 48h ou 72h. As células foram observadas quanto a sua morfologia para determinação da morte das células não transfectadas e o sobrenadante de cultura coletado para acompanhamento dos níveis de anticorpos produzidos. Os níveis de produção dos FvFcs foram determinados por ELISA.

Ao se analisar o sobrenadante de cultura das células co-transfectadas com os plasmídios pMAC PS CD18 e pGFP/NEO expressando o FvFc do anticorpo humanizado anti-CD18, observou-se que não houve um aumento significativo dos níveis expressos. Houve um discreto pico de expressão que cai após 240h. Esse comportamento peculiar dessas células transfectadas provavelmente se deve ao fato dos genes codificadores da resistência ao antibiótico e do anticorpo serem codificados em vetores diferentes. Durante a transfecção isso possibilita a integração dessas seqüências em regiões distintas do genoma da célula. Como a pressão seletiva recai sobre o gene de resistência a geneticina essa seqüência codificadora é mantida sobre altas taxas de transcrição para produzir a proteína que confere a resistência e manter a sobrevivência da célula. Entretanto, a possibilidade da seqüência codificadora do anticorpo ter se integrado em outra região e como não há pressão seletiva sobre ela faz com que a célula aos poucos vá silenciando a expressão do gene do anticorpo recombinante. Dados da literatura mostram que a expressão de transgenes é rapidamente silenciada provavelmente por influência da presença de cromatina condensada próxima ao sítio de integração ou devido a efeitos epigenéticos como metilação do DNA (Wurm, 2004).

Nesse momento a pergunta que se pode fazer é: se houve o silenciamento da expressão do FvFc anti-CD18 com o tempo porque as transfecções expressando as versões recombinantes humanizadas do anti-CD3 mantiveram o crescimento dos níveis de produção? Uma resposta a essa pergunta pode ter relação com o vetor de expressão utilizado. O vetor pMIREs utiliza um sítio de entrada ribossomal interno (IRES) interposto entre o gene codificador da cadeia codificadora do anticorpo recombinante e o gene de resistência a G418. Possibilitando, dessa forma, a produção dos dois genes de forma policistrônica (figura 13). Ou seja, como o gene de resistência a geneticina está no mesmo transcrito do gene do anticorpo, a célula só vai se torna resistente se produzir concomitantemente o anticorpo. Dessa forma a pressão seletiva do antibiótico é exercida nos dois genes, o que de certa forma minimiza o silenciamento, visto que, qualquer diminuição da taxa de transcrição dessas seqüências se refletirá na viabilidade celular.

Outro dado interessante é que apesar do IRES permitir o início da tradução da seqüência do gene de resistência no mesmo transcrito onde se encontra a seqüência do anticorpo, a eficiência desse processo é significativamente inferior àquele apresentado para o gene amontante ao IRES (no caso o anticorpo) (Kaufman *et al.*, 1991; Houdebine e Attal, 1999). Isso se deve ao fato que a iniciação da tradução via IRES não conta com diversos fatores em *trans* que contribuem para estabilização do ribossomo junto ao sítio de iniciação da tradução, assim, diminuindo a eficiência do processo (Vagner *et al.*, 2001). Dessa forma, podemos inferir que provavelmente há uma maior expressão dos genes dos anticorpos recombinantes em relação ao gene de resistência a G418.

Apesar desse aumento dos níveis de expressão nas versões recombinantes do anti-CD3, os níveis de produção ainda continuavam aquém do que precisávamos para realização dos ensaios de ligação ao antígeno. Uma hipótese para essa produção insuficiente seria que talvez as condições presentes nos poços das placas de cultura onde se encontravam as células eram saturantes, e assim possivelmente a passagem dessas células para garrafas com uma maior quantidade de meio de cultura, e conseqüentemente de nutrientes, poderia favorecer um aumento dos níveis expressos. Além disso, como a quantidade de proteína requerida para os ensaios posteriores era da ordem de µg era necessário o aumento da produção de sobrenadante de cultura contendo os anticorpos recombinantes.

4.4 Produção dos FvFcs recombinantes em garrafas de 75 e 150 cm².

Diante das baixas quantidades de proteínas produzidas nas placas de 6 poços utilizadas para transfecção em conjunto com os requisitos para realização dos ensaios biológicos, optou-se por transferir as culturas inicialmente para garrafas de 75 cm² e posteriormente para garrafas de 150 cm².

Nessa etapa, continuou-se a coletar os sobrenadantes a cada 48h e adicionar meio de cultura acrescido de geneticina. O resultado observado é que inicialmente todas as células transfectadas apresentaram um aumento dos níveis de produção (Figura 30). Esse aumento provavelmente se deveu a grande disponibilidade de espaço e nutrientes para as células proliferarem, dessa forma, a alta taxa de proliferação promoveu um ganho significativo na quantidade de proteínas expressas.

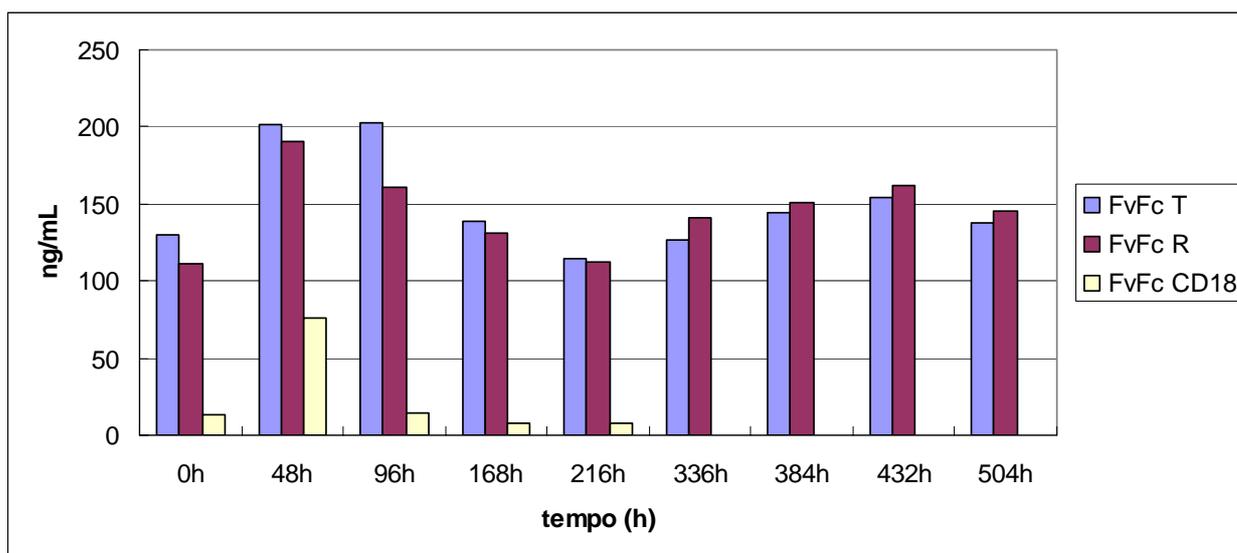


Figura 30. Níveis de expressão dos FvFcs recombinantes durante o cultivo em garrafas de 75cm² e 150 cm². O sobrenadante das células era coletado a cada 48h e o meio de cultura renovado sempre adicionado de 10% soro fetal bovino e 600 µg/mL de geneticina. Os níveis de produção dos FvFcs foram determinados por ELISA.

A expressão em garrafa atingiu, níveis de expressão em torno de 140 a 150 ng/mL. A variação observada entre os tempos analisados é natural visto que um dos fatores negativos da presença de soro fetal bovino na cultura é a sua inconsistência de composição o que leva a crescimentos e níveis de expressão irregulares (Wurm, 2004).

É interessante observar o comportamento apresentado pelas células expressão o FvFc anti-CD18, onde inicialmente houve uma reversão da queda de expressão evidenciada no

tópico anterior mas logo após 48h da transferência para a garrafa de cultura, os níveis de expressão voltaram a cair chegando a praticamente zero a partir de 216h. Esses dados vêm ao encontro da hipótese previamente citada, onde o fato da seqüência codificadora dos anticorpos estar presente em vetor distinto do da marca de resistência gera a possibilidade das seqüências dos anticorpos serem integradas em locais transcricionalmente inativos ou as deixam mais suscetíveis a um silenciamento da expressão por efeitos epigenéticos, por exemplo, e assim resultando na queda de expressão observada (Wurm, 2004).

Apesar dos níveis de expressão não terem aumentado significativamente ao adotar essa nova condição de expressão, os dados aqui apresentados são similares aos observados em dados da literatura para expressão de células aderidas utilizando vetores com o promotor pCMV (Li, Menzel *et al.*, 2007; Li, Zhang *et al.*, 2007). Nesses mesmos trabalhos foi mostrado que para obtenção de culturas altamente produtoras é necessário a seleção inúmeros clones para estabelecer uma cultura com níveis de produção de anticorpos acima de 1µg/mL. Além disso, foi também mostrado que a grande maioria das culturas geradas a partir de clones isolados apresentam níveis de produção similares ao encontrado no presente trabalho.

Diante desses resultados, optou-se por manter a cultura de células nessas condições com o intuito de gerar um acúmulo de sobrenadante suficiente para preparação das proteínas para as próximas etapas do trabalho.

4.5 Purificação e quantificação dos FvFcs T e R.

Com um volume de sobrenadante de cultura contendo uma quantidade de proteínas recombinantes considerada suficiente para realização dos ensaios de ligação ao antígeno, partiu-se para purificação dos anticorpos recombinantes.

Os sobrenadantes foram concentrados (tópico 3.2.12). Cerca de 400 mL de sobrenadante de cultura foram concentrados para aproximadamente 10 mL.

Os concentrados foram então submetidos à purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna Hitrap protein A HP 1mL (GE lifescience®). A proteína A é uma proteína produzida pela bactéria *Staphylococcus aureus* que possui uma alta capacidade de ligação à região Fc de IgGs de diferentes espécies. Essa coluna foi escolhida devido à proteína A apresentar uma alta afinidade por IgGs humanas (Os anticorpos humanizados possuem as mesmas características de ligação) e uma média/baixa afinidade por IgGs de origem bovina. Como o soro fetal bovino é rico em IgGs bovinas, a utilização da maioria dos processos de purificação geraria uma contaminação com essas moléculas visto a sua grande similaridade

com as IgGs humanas. Assim, devido a essa menor afinidade pretendia-se reduzir a contaminação com essas moléculas.

Outra estratégia adotada durante a purificação para redução da contaminação com IgGs bovinas foi a adoção de pHs distintos para eluição dos FvFcs humanizados. As IgGs bovinas possuem como característica um pH de eluição ideal da resina de proteína A em torno de 2,0 enquanto que as IgGs humanas são facilmente eluídas dessa resina em pHs variando entre 3,5 e 4,5. Dessa forma, procedia-se uma eluição com o tampão em pH 3,5 para minimizar a contaminação das versões humanizadas e depois se realizava a eluição com pH 2,0 para limpeza da coluna.

A purificação foi então realizada e as frações coletadas da coluna foram analisadas quanto à presença das proteínas de interesse por ensaios de *Dot Blot* (Figura 31). Pode-se observar que a purificação foi bem sucedida, não apresentando proteínas nas frações em que se realizava a ligação a resina (*flow through*) e apresentando os FvFcs humanizados a partir das frações de eluição 2 para a versão R e a partir da fração 3 eluída para a versão T. O pico de liberação da proteína da coluna estava presente na segunda fração após a detecção da liberação da proteína (Figura 31).

Com as frações onde se encontravam as proteínas de interesse determinadas, passou-se as frações para uma coluna Centriprep 30 (Amicon[®]), com membrana de poro de 30 kDa, para concentração e troca do tampão de eluição por PBS que propicia condições melhores de armazenamento para as proteínas.

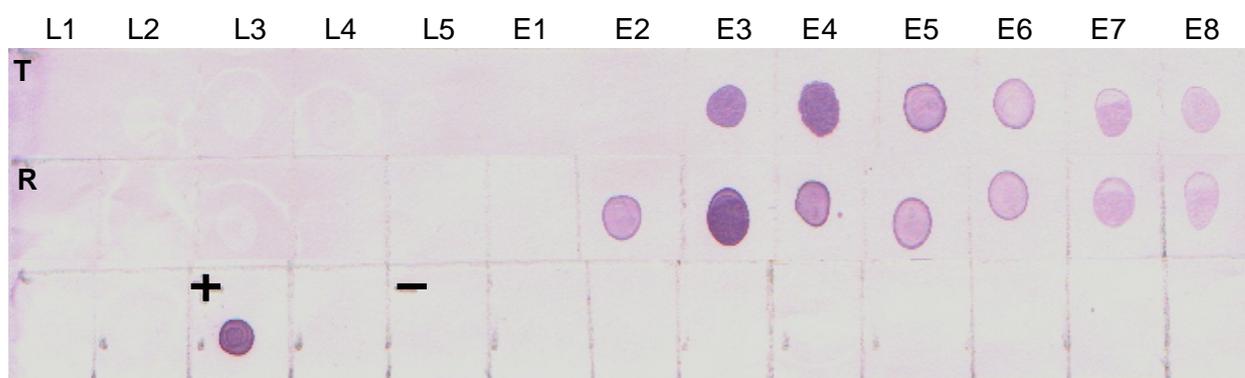


Figura 31. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação dos FvFcs humanizados. Os FvFcs foram purificados por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap protein A HP e as frações obtidas analisadas quanto à presença da proteína de interesse por *Dot Blot*. **T**: purificação da versão T. **R**: purificação da versão R. **+**: Controle positivo com 1 µg de IgG humana. **-**: controle negativo. **L**: frações de lavagem. **E**: Frações de eluição.

Para avaliar a pureza das amostras, elas foram submetidas à análise por SDS-PAGE, sendo o gel corado com *Comassie* (Figura 32), seguida de *Western Blot* a fim de confirmar a presença da proteína recombinante (Figura 33). O resultado observado no gel corado com *Comassie* evidencia um baixo grau de pureza das proteínas recombinantes, ainda apresentando contaminação principalmente com albumina bovina (banda em torno de 66 kDa), IgG bovina e outras proteínas presentes no soro fetal bovino. Essas contaminações se devem principalmente as grandes quantidades de albumina e IgG bovina no soro fetal bovino, que são da ordem de mg. Entretanto, é possível observar as bandas correspondentes a dos FvFcs (55 kDa) no gel corado em uma prevalência significativa.

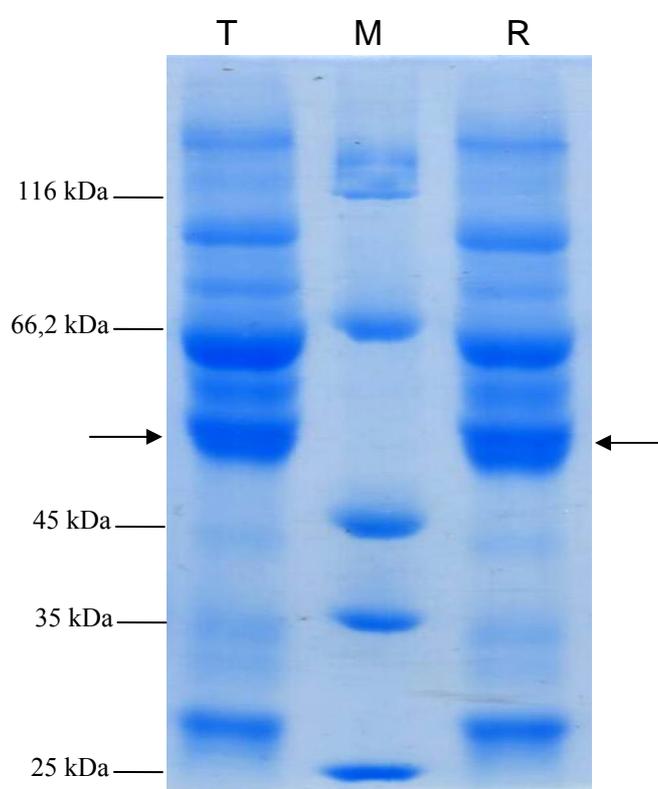


Figura 32. Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFcs humanizados. Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*. Setas indicando as bandas correspondentes aos FvFcs em torno de 55 kDa. T- FvFc humanizado anti-CD3 versão treonina. R - FvFc humanizado anti-CD3 versão arginina. M – Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®]).

O resultado do *Western Blot* confirma a presença dos FvFcs humanizados tanto na sua forma monomérica (55kDa), em poços com tampão redutor, como na forma dimérica, em tampão não redutor (Figura 33). A forma dimérica pode ser observada estranhamente em uma banda com tamanho acima de 250 kDa, isso pode ter acontecido por uma possível agregação das proteínas ou ainda devido a sua estrutura terciária, apresentada sob condições não redutoras, poder impactar a migração no gel SDS-PAGE quando comparada com o

polipeptídeo desnaturado. Em artigo recente foi mostrado que IgGs submetidas à migração em gel SDS-PAGE sob condições não redutoras apresentaram uma massa molecular aparente de 300 kDa, entretanto, quando submetidas a uma cromatografia analítica de gel filtração as IgGs se apresentaram em monômeros, não sendo observado agregados (Li, Menzel *et al.*, 2007).

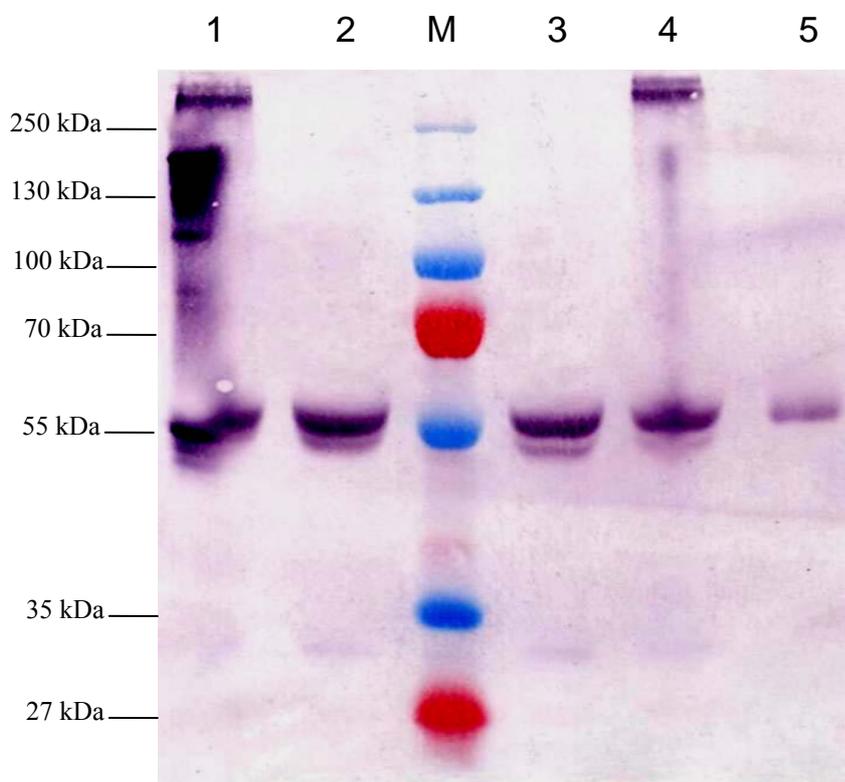


Figura 33. Análise dos FvFcs humanizados anti-CD3 purificados por Western Blot. Foi realizada uma eletroforese em gel SDS-PAGE 10% para separação das proteínas as quais foram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do ensaio. 1- FvFc humanizado anti-CD3 versão T não reduzido. 2 - FvFc humanizado anti-CD3 versão T reduzido. 3 - FvFc humanizado anti-CD3 versão R reduzido. 4 - FvFc humanizado anti-CD3 versão R não reduzido. 5 – 200 ng de IgG humana utilizada como controle positivo. M – Marcador Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas®), apresentando fragmentos de 250; 130; 100; 70; 55; 35 e 27 kDa.

Com as proteínas parcialmente purificadas, partiu-se para a sua quantificação a fim de realizar os ensaios de ligação ao antígeno. Dessa forma, a quantidade de proteína nas amostras foi determinada por uma análise conjunta dos géis de proteína, pela realização de um ELISA e pela análise de proteína total pelo kit BCA (Pierce®). As análises geraram uma estimativa em torno de 60 ng/ μ L para duas versões recombinantes. Nesse momento houve uma grande dificuldade nessa determinação devido à contaminação presente nas amostras purificadas. Dessa forma, adotou-se essa concentração para realização dos próximos ensaios.

4.6 Teste dos FvFcs humanizados anti-CD3 quanto à capacidade de ligação a superfície de linfócitos.

Os FvFcs humanizados R e T, foram testados quanto à manutenção da capacidade de ligação ao antígeno CD3 comparativamente ao anticorpo monoclonal original, o OKT3. Apesar dos resultados obtidos em trabalhos anteriores indicando que a humanização da cadeia pesada com treonina provocou uma perda de afinidade nessa versão quando comparada com a versão com arginina (Costa, 2004), não se sabe como essas cadeias pesadas vão se comportar no contexto da nova cadeia leve humanizada. Dessa forma, com o intuito de avaliar alguma alteração na afinidade devido à interação entre a cadeia leve e pesada, optou-se por utilizar as duas versões de cadeia pesada humanizadas, visto que, o ambiente de interação inter-cadeias gerado pela nova cadeia leve poderia favorecer a retomada da afinidade por parte da versão T.

As atividades de ligação dos FvFcs recombinantes a molécula CD3 expresso na superfície de linfócitos foi analisada por meio da técnica de citometria de fluxo ou também chamada de FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorting*. Essa técnica envolve uma reação de imunofluorescência prévia das células com anticorpos específicos conjugados com substâncias fluorogênicas, seguida da varredura de células individuais fluindo em meio líquido sendo ao mesmo tempo excitadas por feixes de luz. A quantificação da emissão de luz fluorescente permite, entre outras análises, a determinação de características antigênicas de células individuais (Shevac, 1996).

Nesse sentido, para realizar a reação células mononucleares de sangue periférico de doador saudável foram separadas (tópico 3.2.18). Após a separação as células foram incubadas com os anticorpos e submetidas ao citometro de fluxo. A partir daí, células não marcadas foram utilizadas para definir a população de linfócitos de acordo com seu tamanho e granulosidade (Figura 34). A população de linfócitos era determinada (R1) de forma a adquirir uma população homogênea de células em todas as análises.

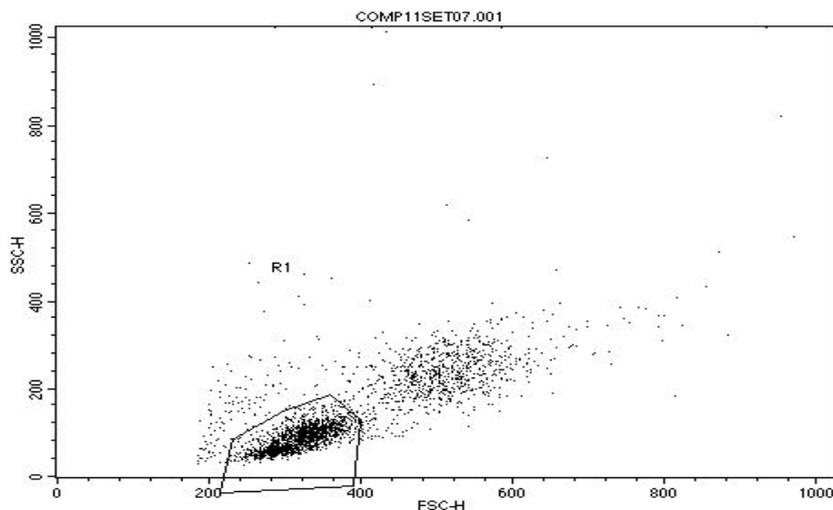


Figura 34. Análise de dispersão de leucócitos de sangue periférico de doador saudável. A área adquirida de linfócitos está delimitada (R1). FSC-H: dispersão frontal (*forward scattering*), que indica o tamanho das células; SSC-H: dispersão lateral (*side scattering*), que indica a granulosidade das células.

Para a visualização da ligação dos FvFcs recombinantes a superfícies de linfócitos realizava-se uma reação de imunofluorescência indireta. Inicialmente as células foram incubadas separadamente com as duas versões dos FvFcs humanizados e com o OKT3 como controle. Após duas lavagens com tampão de lavagem de FACS era adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado a FITC ou anti-IgG de camundongo conjugado a FITC no caso do OKT3.

Como o anticorpo anti-IgG humana possui a capacidade de reconhecer imunoglobulinas de superfície presentes em linfócitos B era necessário encontrar uma maneira de se retirar os dados referentes a essa ligação indesejada, visto que, isso poderia trazer falsos positivos as análises de ligação dos FvFcs humanizados, mostrando dados do anti-IgG humana ligado a linfócitos e não aos FvFcs recombinantes. Dessa forma, estipulou-se a marcação da população de linfócitos T com anticorpos contra antígenos largamente expressos na sua superfície, o CD4 e CD8. Os anticorpos contra essas moléculas eram marcados com um fluoróforo diferenciado, a ficoeritrina (PE), de forma a possibilitar a diferenciação das populações marcadas com anticorpos conjugados a FITC. Assim adotamos como procedimento selecionar além da população de linfócitos, como mostrado na figura 34, selecionar as células marcadas com anticorpos anti-CD4 e CD8, dessa forma garantindo que do total de células adquiridas somente os anticorpos ligados a linfócitos T seriam visualizados (Figura 35). Nessa figura é possível observar uma população marcada positivamente com o anticorpo anti-IgG humana-FITC, apresentando uma intensidade de fluorência de 10^2 , e

negativa para PE. Essas sendo os linfócitos B reconhecidos pela anti-IgG humana. Com isso, se selecionou a população positiva para PE que estava marcada com anticorpos anti-CD4 e CD8, dessa forma garantindo que as análises seriam feitas em torno da população de linfócitos T.

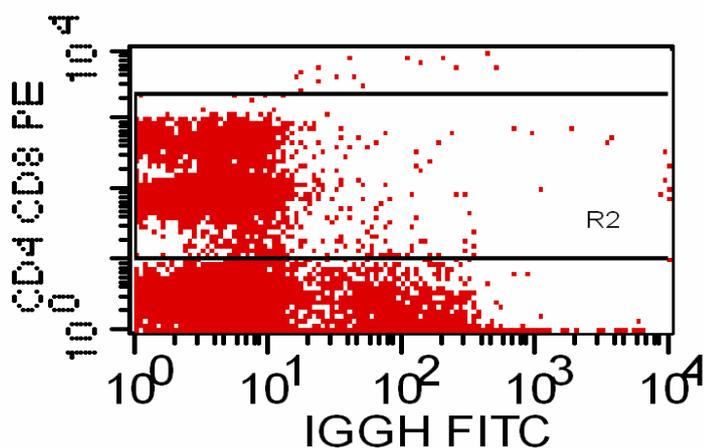


Figura 35. Tripla marcação de linfócitos com os anticorpos anti-IgG humana-FITC e com os anti-CD4 e anti-CD8 PE. Figura evidenciando a ligação do anti-IgG humana a superfície de linfócitos B, mostrando uma população positiva para FITC com intensidade de fluorescência em torno de 10². Para as análises eram selecionadas as células positivas para CD4 e CD8, como é mostrado no quadrado superior (R2).

A análise de ligação dos FvFcs recombinantes ao CD3 expresso na superfície de linfócitos T pode ser observada na figura 36. Os valores obtidos estão mostrados na forma de histogramas, onde a intensidade de fluorescência é quotada contra o número de células. O anticorpo OKT3 utilizado como controle das ligações se ligou a 92% dos linfócitos T. Já os FvFcs recombinantes nas versões T e R se ligaram a 85% e 88% dos linfócitos T, respectivamente (Figura 36).

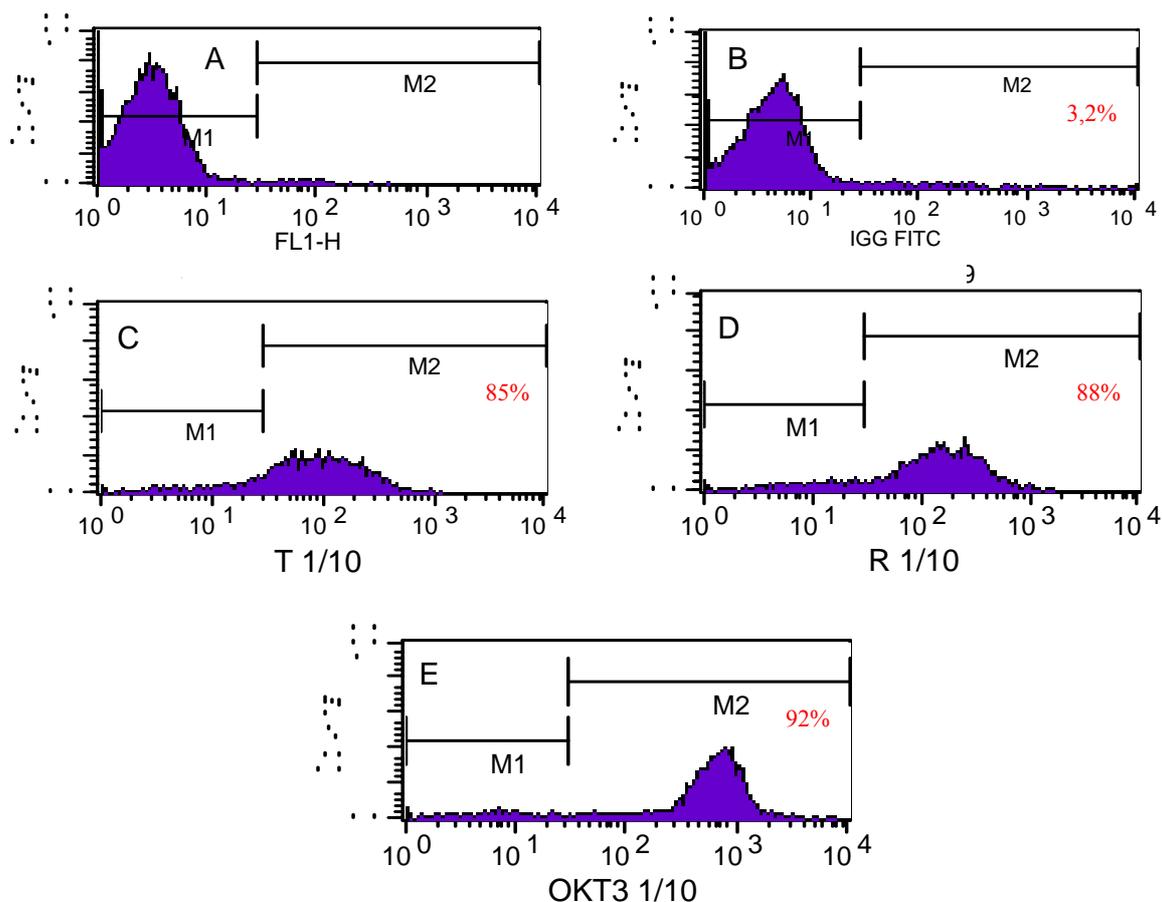


Figura 36. Análise de ligação dos FvFcs humanizados a linfócitos T humanos. Os linfócitos eram inicialmente incubados com os FvFcs ou com o anticorpo monoclonal OKT3, separadamente. A seguir eram incubados com o anticorpo anti-IgG humana-FITC ou anti-IgG de camundongo-FITC, respectivamente. **A:** Células não marcadas. **B:** Controle negativo, anti-IgG humana-FITC utilizado para verificar alguma inespecificidade. **C:** FvFc T apresentando ligação de (85%). **D:** FvFc R apresentando ligação de (88%). **E:** OKT3 apresentando ligação de (92%). Os gráficos são mostrados em intensidade de fluorescência *versus* número de células (counts).

Observa-se na figura que a estratégia de se selecionar só a população de linfócitos T por meio de marcação com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 foi bem sucedida, visto que, o anticorpo anti-IgG humana – FITC apresentou uma ligação inespecífica a somente 3% dos linfócitos selecionados, assim, os dados observados no experimento são realmente dos FvFcs humanizados ligados a linfócitos T. Nota-se que o anticorpo monoclonal OKT3 conseguiu marcar um número maior de linfócitos T quando comparados com as versões humanizadas e que a marcação com o OKT3 gerou uma população de células com uma intensidade de fluorescência relativamente maior que as células marcadas com os FvFcs humanizados. Esses dados indicam uma possível perda de afinidade das versões recombinantes em relação ao anticorpo murino. Entretanto, esses resultados não podem ser comparados diretamente.

Apesar de a molécula FvFc mimetizar um anticorpo inteiro, ela é relativamente menor o que expõe menos epitopos a ligação do anticorpo secundário. Além disso, o fato da detecção ser realizada com anticorpos distintos pode gerar dados diferenciados.

Todas as reações de imunofluorescência eram feitas utilizando-se 1µg de proteína e a partir de então realizando diluições seriadas gerando titulações de 1:10; 1:100; 1:1.000 e 1:10.000. Sendo que o OKT3 perde sua fluorescência na diluição de 1:10.000 enquanto que as versões humanizadas na diluição de 1:1.000. Essas diferenças de titulações podem ser devido ou a uma perda real de afinidade dos anticorpos humanizados ou, como discutido acima, ao sistema de detecção, ou ainda devido às preparações dos anticorpos humanizados não estarem totalmente puras podendo haver alguma interferência ao contrário do OKT3 que foi obtido de uma preparação de alta pureza apta a administração em pacientes. Outro fato impactante, citado anteriormente, que pode ter influenciado de forma desfavorável no experimento é a possível presença de proteínas em forma agregada nas amostras recombinantes. Essa presença reduz a quantidade de anticorpos recombinantes biologicamente ativos disponíveis o que prejudica a avaliação do experimento.

O ponto mais importante dessa análise foi a comprovação da ligação dos FvFcs humanizados a superfície de linfócitos T. Indicando que a humanização do anticorpo foi bem sucedida apesar do indício de uma perda de afinidade pelo antígeno. Na literatura já é descrito que uma pequena perda de afinidade em anticorpos humanizados é aceitável devido ao processo de humanização gerar diferenças conformacionais moderadas entre o anticorpo humanizado e murino (Carter *et al.*, 1992; Hsiao *et al.*, 1994).

4.7 Avaliação do potencial mitogênico dos FvFcs humanizados.

Um das características dos anticorpos anti-CD3 ligantes a FcR é sua capacidade de desencadear um processo de proliferação de linfócitos T via o reconhecimento por macrófagos/neutrófilos do anti-CD3 ligado a superfície do linfócito T. Esse reconhecimento desencadeia um processo de ativação dos macrófagos, induzindo-os a liberação de citocinas que irão agir diretamente sobre as células T provocando a sua proliferação.

Os FvFcs humanizados possuem como característica uma região Fc originária de uma IgG1 humana, dessa forma possuindo sítios de glicosilação importantes para o posterior reconhecimento pelos receptores Fc. Entretanto, não se sabe se o sistema de expressão, ao processar essas proteínas realizou a adição de açúcares essenciais à interação com os receptores Fc, como já falado na introdução. Portanto, com o intuito de caracterizar as

respostas efetoras desencadeadas pelos FvFcs humanizados, foi proposta a avaliação do potencial mitogênico dessas moléculas.

A capacidade mitogênica foi testada por ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico utilizando o fluorófilo *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE). O CFSE consiste de uma molécula contendo dois grupos acetatos e um grupo funcional succinimidyl ester. Nessa forma, ele é um composto permeável à membrana plasmática e não fluorescente. Após a difusão para o ambiente intracelular, esterases endógenas removem os grupos acetatos tornando a molécula altamente fluorescente e não permeável à membrana celular. Além disso, o succinimidyl ester reage com grupamentos amina livres de proteínas intracelulares, formando compostos fluorófilos-proteína. Proteínas que possuem uma baixa taxa de renovação, incluindo componentes do citoesqueleto, são ditas como responsáveis pela longa marcação conseguida com o CFSE (Lyons, 2000).

O monitoramento da proliferação com esse fluorófilo é possível porque a cada divisão celular a intensidade de fluorescência se divide por dois devido ao aumento da produção de proteínas e a divisão entre as duas células. Dessa forma, com o aumento da proliferação a intensidade de fluorescência irá diminuir até chegar a um patamar mínimo. Assim, a fluorescência máxima é observada em células não divididas e à medida que se dividem a fluorescência diminui.

A partir daí, incubou-se os FvFcs R e T com células mononucleares do sangue periférico marcadas com CFSE. Como controle positivo era utilizado o anticorpo monoclonal OKT3. Após o tempo de incubação determinado (tópico 3.2.21) as células eram preparadas e analisadas no citometro de fluxo.

Os resultados mostraram uma capacidade mitogênica bastante reduzida das versões humanizadas quando comparadas com o controle com o OKT3. OKT3 induziu a proliferação de 53% das células enquanto que os FvFcs humanizados R e T induziram 11% e 6%, respectivamente (Figura 37).

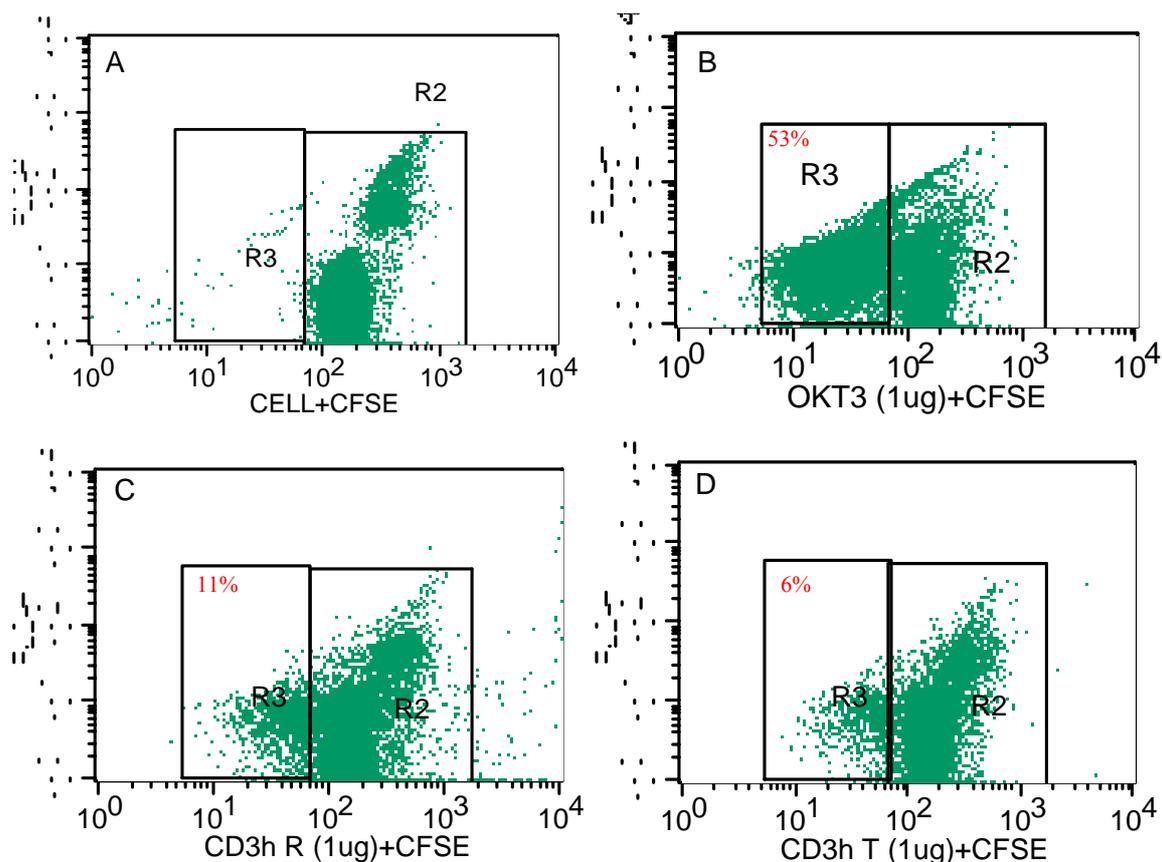


Figura 37. Análise do potencial mitogênico dos FvFcs humanizados T e R. Ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico marcadas com CFSE. As células marcadas eram incubadas com os anticorpos e após 120h era analisada a proliferação pela perda de fluorescência no citômetro de fluxo. **A:** Células marcadas com CFSE sem adição de anticorpo. **B:** Células marcadas incubadas com o OKT3 indicando proliferação de 53% das células, controle positivo. **C e D:** Células marcadas incubadas com as versões humanizadas R e T, respectivamente, indicando proliferações de 11% e 6%. Os gráficos estão quotados em intensidade de fluorescência emitida por CFSE *versus* intensidade de fluorescência emitida por PE (FL2, 575nm).

Esses dados fazem supor que as moléculas recombinantes, apesar de possuírem uma região Fc apropriada para ligação a receptores Fc, não induzem proliferação tão robusta quando comparadas àquela induzida pelo OKT3. Uma das razões para isso, seria a composição de açúcares adicionado a região Fc pelas células CHO, que pode ser diferente do observado no OKT3, resultando numa possível modificação do reconhecimento da região Fc por macrófagos e assim diminuindo a indução da proliferação. Outra possibilidade é a menor flexibilidade apresentada pela molécula FvFc, devido à proximidade da região Fc dos sítios de ligação ao antígeno. Isso pode reduzir a exposição da região Fc, dificultando o reconhecimento pelos receptores Fc em macrófagos.

Apesar dessas justificativas favoráveis, não se pode fugir da possibilidade que a menor proliferação observada nas versões humanizadas seja devido a uma perda de afinidade dessas

versões. Isso poderia acarretar em uma instabilidade da ligação, reduzindo a interação entre o macrófago e o linfócito. Essa afirmação ganha relevância quando observamos que a versão T, que apresentou níveis de ligação à superfície de linfócitos T menores que a versão R, também foi a que apresentou a menor indução da proliferação. Dando mais um indício que a perda de afinidade por essas moléculas pode ter sido maior do que se esperava.

Com isso em mente realizou-se um ensaio de bloqueio da ligação OKT3 pelos FvFcs recombinantes a fim de se estabelecer se o sítio de ligação entre os dois anticorpos era o mesmo e se a ligação das versões humanizadas é estável e forte o suficiente para impedir a ligação do OKT3.

4.8 Análise da especificidade dos FvFcs recombinantes pelo antígeno CD3.

Com o intuito de comprovar que a ligação dos FvFcs humanizados a superfície de linfócitos estava ocorrendo na molécula CD3, realizou-se um experimento de bloqueio. Onde se utilizavam os FvFcs humanizados para ligação ao CD3 com a finalidade de bloquear uma posterior ligação de outros anticorpos anti-CD3. Foram utilizados dois anticorpos anti-CD3, o OKT3, já utilizado nos experimentos anteriores, sendo ele o controle para bloqueio, visto ser a molécula base da humanização. E o anti-CD3 conjugado a PE do clone UCTH1, que reconhece um epítipo diferente na molécula CD3. Com esse último anticorpo pretendia-se visualizar alguma sobreposição dos epítipos reconhecidos pelos clones OKT3 e o UCTH1 e realizar uma comparação com esse anticorpo de clone distinto.

As células mononucleares eram inicialmente incubadas com os FvFcs humanizados, em seguida incubadas com o OKT3 ou o UCTH1-PE e, por último, com o anti-IgG de camundongo ou anti-IgG humana conjugados a FITC nos casos onde se utilizou o OKT3, para a detecção do OKT3 ou do FvFc respectivamente.

Na reação de bloqueio de ligação do UCTH1-PE observou-se uma diminuição da fluorescência quando comparada com a reação de ligação direta realizada por esse anticorpo (Figura 38), indicando uma sobreposição entre os epítipos reconhecidos pelas versões humanizadas e pelo clone UCTH1. Essa diminuição da fluorescência do anticorpo anti-CD3 conjugado indica que as versões humanizadas estão se ligando especificamente a molécula CD3 na superfície de linfócitos, impedindo a ligação do UCTH1-PE, levando a queda de fluorescência observada.

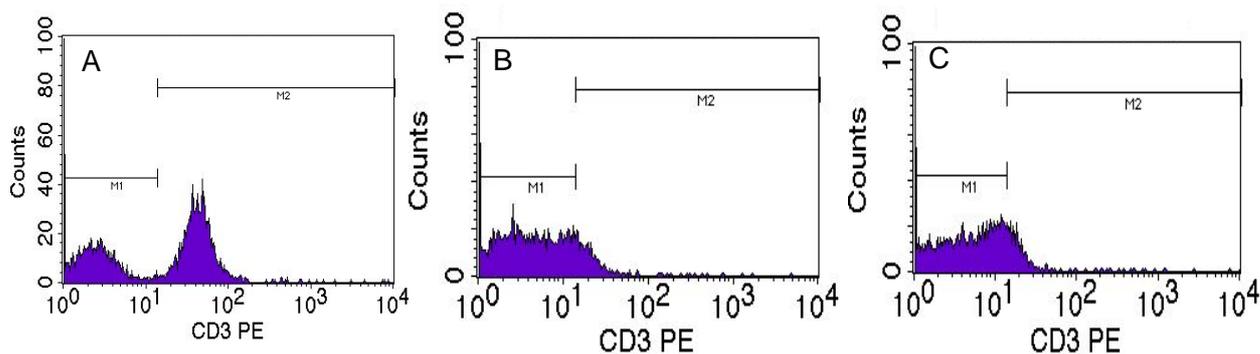


Figura 38. Bloqueio da ligação do anticorpo anti-CD3 UCTH1 a linfócitos humanos. As células eram inicialmente incubadas com os FvFcs R e T e em seguida com o anticorpo anti-CD3-PE clone UCTH1. **A:** Linfócitos incubados apenas com o anti-CD3-PE. **B:** Linfócitos incubados previamente com o FvFc humanizado R e **C:** Linfócitos incubados previamente com o FvFc humanizado T. CD3PE: Intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 575 nm (PE). Counts: número de células

O ensaio de bloqueio de ligação do OKT3 foi realizado incubando previamente as versões humanizadas com os linfócitos para em seguida realizar a incubação com o OKT3. Como o OKT3 não possui nenhum fluoróforo conjugado utilizou-se o anti-IgG de camundongo-FITC para visualizar o bloqueio de ligação e também o anti-IgG humana-FITC para visualizar se a possível maior afinidade do OKT3 era capaz de deslocar os FvFcs do sítio de ligação e assim diminuir sua fluorescência.

A figura 39 mostra que as versões humanizadas conseguiram diminuir pouco a intensidade de fluorescência da ligação do OKT3 como indica a figura utilizando o anti-IgG de camundongo-FITC (Figura 39, A). Além disso, o OKT3 teve a capacidade de deslocar a ligação dos FvFcs previamente ligados, soltando-os do sítio de ligação para ocupá-lo, como é mostrado pela figura utilizando o anti-IgG humana-FITC (Figura 39, B e C).

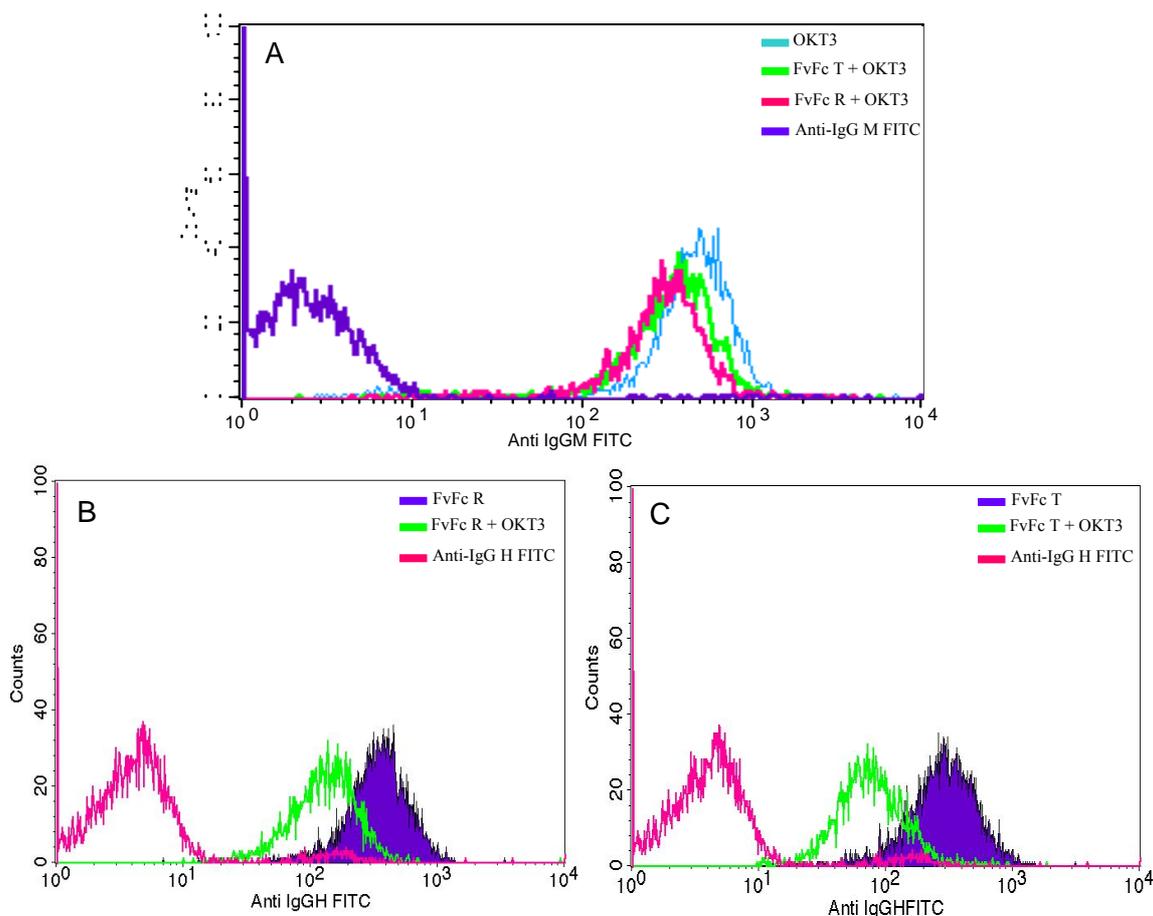


Figura 39. Bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3 a linfócitos humanos. Os linfócitos foram incubados inicialmente com os FvFcs humanizados T e R e posteriormente com o OKT3. **A:** Reação de bloqueio revelada com o anti-IgG de camundongo FITC a fim de visualizar o deslocamento de ligação do OKT3. **B e C:** Reação de bloqueio revelada com o anti-IgG humana FITC a fim de visualizar a retiradas dos FvFcs R e T pelo OKT3, respectivamente. Como controles são mostrados as ligações diretas do OKT3, FvFc R e FvFc T. Os dados são apresentados em intensidade de fluorescência em FITC contra o número de células. Anti- IgG M FITC: Anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. Anti – IgG H FITC: Anticorpo anti – IgG humana conjugado a FITC.

Esses dados indicam que o OKT3 compete pelo mesmo sítio dos FvFcs humanizados, visto o deslocamento da ligação desses provocada por aquele anticorpo. O fato de os FvFcs não terem conseguido diminuir significativamente a ligação do OKT3 dá a entender que a humanização levou a uma perda de afinidade desses anticorpos, apesar de reconhecerem o mesmo sítio de ligação. Dessa forma, sendo facilmente deslocados do sítio de ligação por uma molécula com afinidade maior, o OKT3. Outro dado que contribui para essa conclusão e os resultados apresentados no ensaio de proliferação por CFSE, mostrado no tópico anterior. A menor proliferação mostrada pelas versões humanizadas provavelmente foi resultado dessa

possível perda de afinidade. Ao observar que a versão R que conseguiu deslocar um pouco melhor a ligação do OKT3, também foi a que produziu uma proliferação maior entre as duas versões humanizadas da mais um indício que os resultados estão relacionados a possível maior afinidade dessa versão.

Apesar de todos esses dados, os resultados não puderam ser considerados conclusivos devido a dois fatores: o modo de quantificação das proteínas e o grau de pureza apresentado. Como a quantificação era feita por estimativa em relação à quantidade de proteína observada no *Western blot*, utilizando como parâmetro de comparação a IgG humana utilizada como controle nesse experimento, pode ter havido uma super estimativa da concentração e assim prejudicado os experimentos de FACS. Os ensaios de ELISA, realizados naquele momento indicavam uma concentração em torno de 20 ng/ μ L de proteína. Um valor julgado muito baixo diante do observado nos géis. Achou-se que teria ocorrido algum artefato no experimento que acusasse uma concentração tão baixa. Entretanto, ao analisar posteriormente a coloração com *Comassie* e observar uma grande quantidade de proteínas de diferentes massas moleculares pode-se inferir que a baixa quantidade de proteína mostrada no ELISA poderia se referir à abundância de proteínas solúveis na amostra sendo o restante apresentado na forma de agregados que não possuem atividade biológica.

Nesse sentido, com o intuito de esclarecer estas dúvidas, foi proposta a alteração no modo de produção da proteína recombinante, reduzindo-se a quantidade de soro fetal bovino presente no meio de cultura a fim de se diminuir a contaminação das amostras purificadas com as proteínas presentes no soro. Foi também proposto a utilização de um soro fetal especial, com baixas quantidades de IgGs bovinas a fim de evitar ao máximo a contaminação com IgGs do boi. Adotando essa estratégia pretendia-se obter um produto com alta pureza o que facilitaria o processo de quantificação e assim eliminando esse viés nos ensaios de ligação ao CD3.

4.9 Adaptação da cultura de células CHO a baixos níveis de soro fetal bovino, seleção de clones produtores estáveis e produção dos anticorpos humanizados utilizando SFB low IgG.

Diante dos problemas enfrentados no processo de purificação das proteínas recombinantes foi proposta a mudança nos parâmetros utilizados para produção dos FvFcs humanizados a fim de se minimizar a contaminação com proteínas presentes no soro fetal bovino.

Para isso adotaram-se duas estratégias: a diminuição da quantidade de soro presente no meio de cultura e a utilização do soro fetal especial com baixíssima quantidade de IgG bovina (SFB low IgG, Invitrogen®).

A utilização de soro fetal bovino em cultura de células aderentes é um protocolo largamente usado para garantir a aderência das células à placa de cultura, possibilitar o seu crescimento, fornecendo os fatores de crescimento, hormônios e outros fatores necessários para a sua proliferação. E por último, com o intuito de garantir altas taxas de expressão de proteínas.

Diversos dados da literatura indicam que a retirada de soro fetal bovino em culturas de células aderentes leva a uma redução da sua taxa de crescimento e uma diminuição significativa da produção de proteínas recombinantes. Em trabalho com a produção de anticorpos em células CHO, foi observado que o soro fetal bovino é necessário para produção do anticorpo e que não era possível detectar a produção em culturas onde o soro fetal era retirado (Berdoz *et al.*, 1999). Dessa forma, a diminuição da quantidade de soro fetal na cultura pode diminuir significativamente a produção do anticorpo recombinante.

Outro fato interessante é que o promotor CMV, um dos promotores mais comuns para expressão de proteínas recombinantes em células CHO (Li, Menzel *et al.*, 2007), e também o utilizado no presente trabalho, possui como característica ser responsivo a quantidade de soro fetal bovino presente na cultura, podendo assim, a redução de soro fetal bovino na cultura impactar negativamente a transcrição induzida por esse promotor (Brightwell *et al.*, 1997).

Com esses dados em mente, foi estipulado que a diminuição da quantidade de soro na cultura seria gradativa, acompanhando sempre os níveis de expressão da proteína recombinante. Esse procedimento seria realizado com as garrafas contendo as células transfectadas selecionadas com geneticina.

A redução da quantidade de soro fetal foi realizada reduzindo-se pela metade a sua quantidade até atingir o percentual de 1,25% (v/v) de SFB na cultura. A cada redução as

células eram incubadas no mínimo por 48h e chegando até a 672h com a concentração de 1,25%. O sobrenadante de cultura era sempre coletado a cada 48h e o meio renovado com a concentração de SFB em uso e geneticina.

Os resultados observados indicam que a produção se manteve estável apesar da redução da quantidade de soro fetal ocorrer na ordem de 10 vezes (Figura 40).

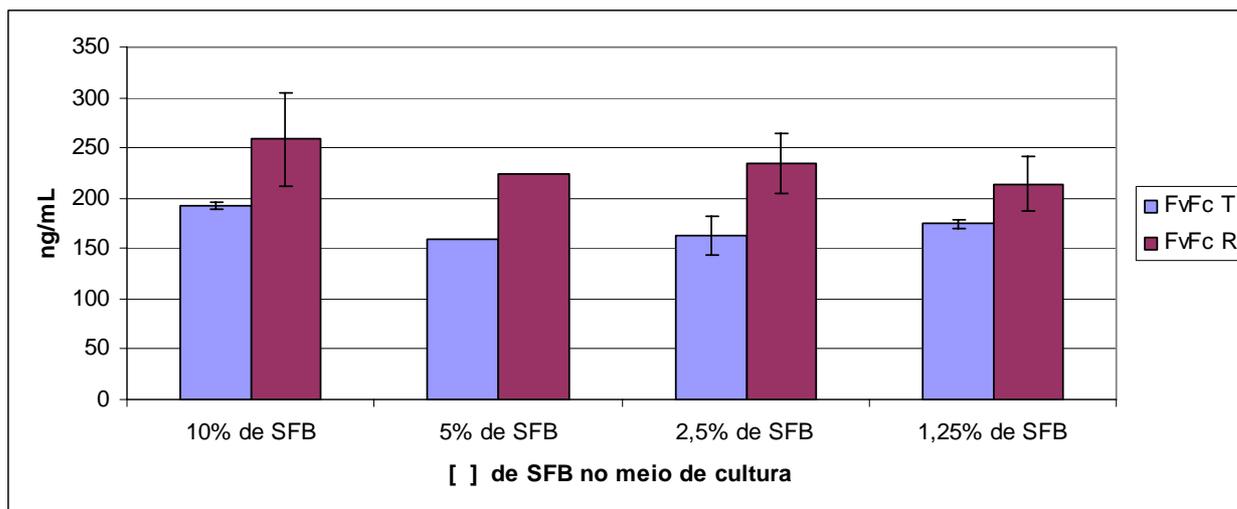


Figura 40. Níveis de produção dos anticorpos humanizados em diferentes concentrações de soro fetal bovino. Os sobrenadantes de cultura eram coletados a cada 48h e trocados pelo meio contendo a concentração de SFB em uso e geneticina. O dado referente à concentração de 5% de SFB não apresenta barra de erro devido ter havido uma única coleta de sobrenadante com essa concentração. Os níveis de produção dos FvFc's eram determinados por ELISA.

Esses dados diferem dos dados apresentados pela literatura, citados acima. Essa manutenção da produção com baixos níveis de SFB no meio pode ser um indício que as células necessitam somente de traços dos fatores presentes no soro, não sendo necessárias grandes quantidades para manutenção do crescimento e da produção de proteínas recombinantes. Entretanto, a verdadeira razão para manutenção dos níveis de expressão dos FvFc's humanizados pode estar justamente relacionada às peculiaridades já discutidas em relação ao vetor de expressão.

Em paralelo a essa adaptação realizou-se a seleção de clones estáveis para produção dos FvFc's humanizados utilizando o SFB com baixa concentração de IgG com o intuito de obtermos clones de alta produção para otimizar a utilização do SFB low IgG devido ao seu alto custo (tópico 3.2.10.9). Ao total foram selecionados 8 clones produtores do FvFc R e 6 do FvFc T. Esses clones foram incubados em garrafas de 25 cm² e submetidos à remoção da pressão seletiva por 360 horas para avaliar a estabilidade da expressão das proteínas

recombinantes. Após esse período as células eram desafiadas novamente com o antibiótico geneticina durante 192 h e acompanhado se os níveis de produção permaneciam estáveis.

Foi observada uma grande variação entre os clones, sendo que alguns diminuíram os níveis de expressão na ausência de antibióticos e outros mantiveram (Figura 41). Os clones que mostraram uma maior queda nos níveis de expressão foram o R5 e os T2 e T3, expressando os FvFcs R e T, respectivamente. Provavelmente nesses clones houve uma integração do gene codificador das proteínas em região de baixos níveis de transcrição e tão logo era retirada a pressão seletiva houve o silenciamento da expressão nesses clones.

É interessante observar que alguns clones sofreram uma queda de expressão após a volta do uso do antibiótico. É sabido que a tradução via o elemento IRES tem a sua expressão aumentada sob condições de estresse celular como a presença de um agente seletivo (Vagner *et al.*, 2001). Assim, a queda de produção observada nos clones R1, R2, R3 e R7 após o retorno da geneticina pode ser devido a um deslocamento da maquinaria da tradução em favor da tradução via IRES. As maiores taxas de expressão alcançadas sem o uso de antibióticos, indica que esses clones provavelmente apresentavam as seqüências do gene recombinante em regiões de altas taxas de transcrição, favorecendo a manutenção da produção.

Como parâmetro para definição de qual clone seria escolhido para a sua propagação e produção em maior escala dos FvFcs humanizados foi adotada a escolha do clone com maior produção com a menor variação entre as duas condições submetidas. Dentre esses escolhemos os clones R4 e T5 por terem se mostrado mais estáveis durante as manipulações.

Esses clones foram propagados, cultivados em meio acrescido de 1,25% de SFB low IgG e o sobrenadante de cultura coletado a cada 48 h até se alcançar níveis suficientes para purificação das proteínas de interesse a fim da realização dos ensaios de ligação a molécula CD3 na superfície de linfócitos.

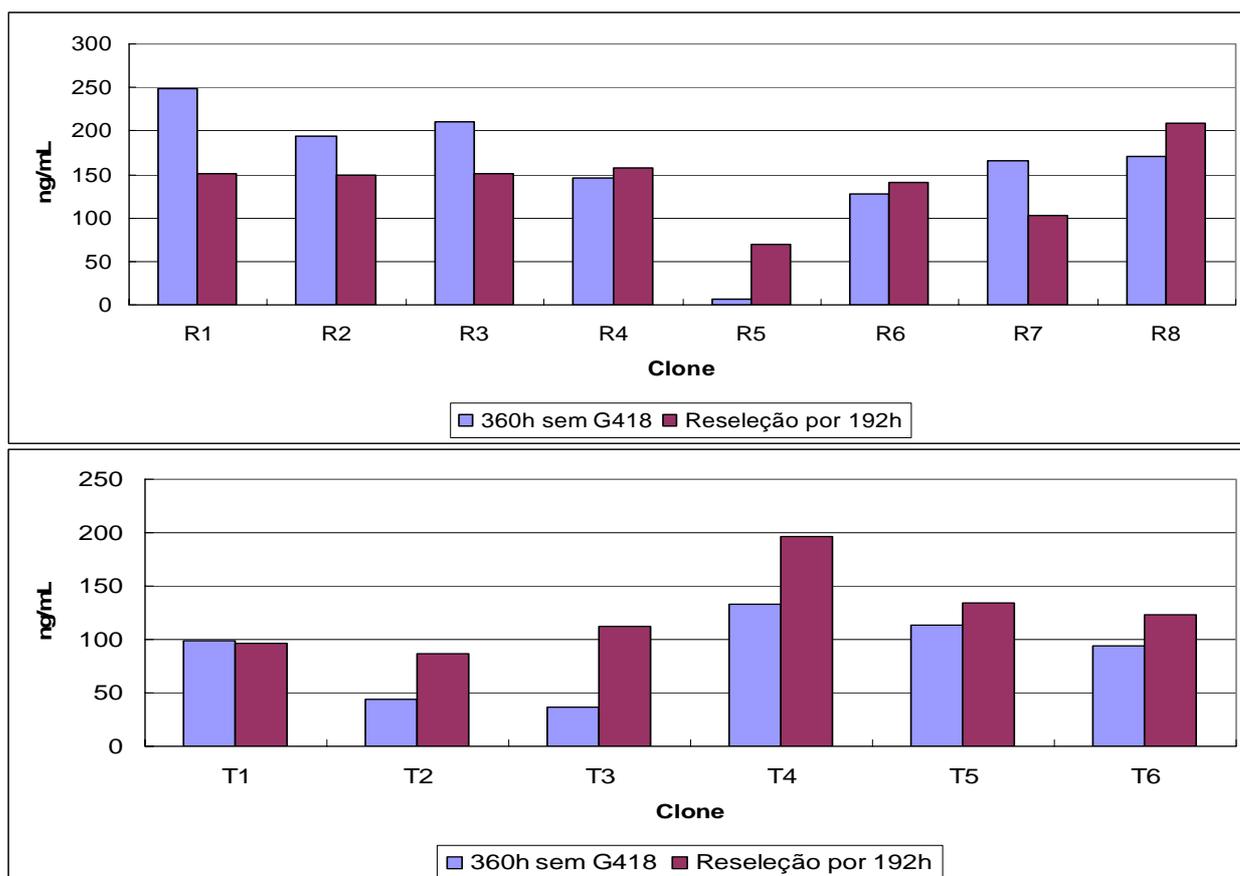


Figura 41. Seleção de clones estáveis produtores dos FvFcs R e T humanizados. Foram selecionados 8 clones produtores do FvFc R e 6 do FvFc T. Eles eram mantidos por 360h em meio de cultura sem a adição de geneticina (G418) e depois re-selecionados com a adição de G418 por 192h. Os níveis de produção foram monitorados por ELISA.

4.10 Purificação e quantificação dos FvFcs T e R produzidos pelos clones estáveis com meio contendo soro fetal bovino low IgG.

Com uma quantidade de sobrenadante de cultura considerada suficiente para obtenção de proteínas recombinantes purificadas suficientes para realização dos ensaios de ligação ao antígeno, partiu-se para a nova purificação por cromatografia de afinidade dos anticorpos recombinantes.

Com a purificação realizada as frações obtidas eram analisadas quanto à presença das proteínas de interesse por ensaios de *Dot Blot* (Figura 42). O resultado apresentado indica que a purificação foi bem sucedida e que as proteínas foram quase totalmente eluídas em uma única fração, como indica o manual do fabricante da coluna de cromatografia.

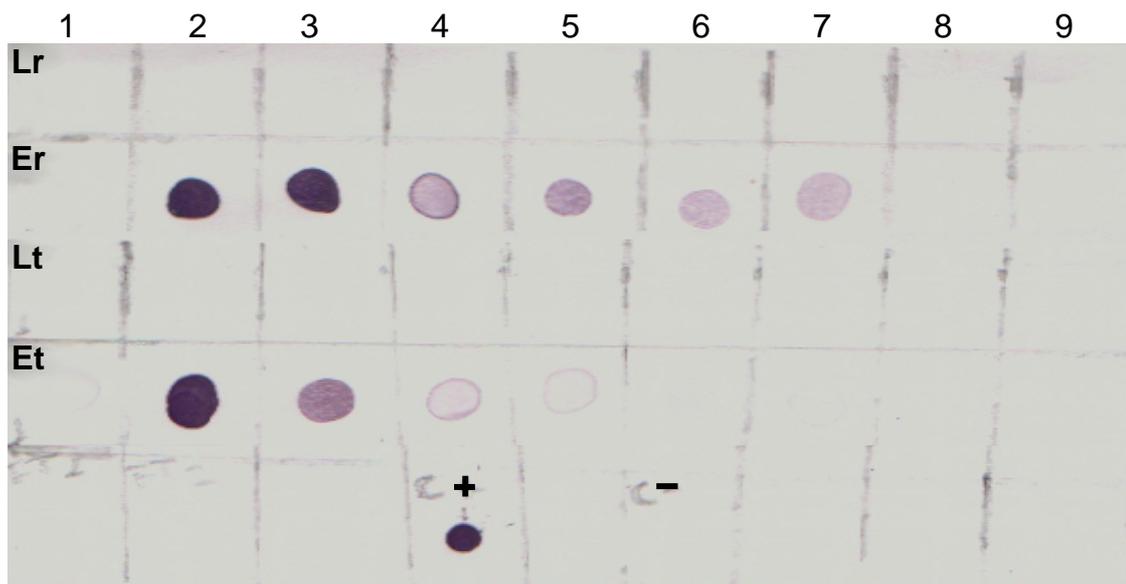


Figura 42. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação dos FvFcs humanizados produzidos por clones estáveis em meio com SFB low IgG. Os FvFcs eram purificados por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap protein A HP (GE lifescience[®]) e as frações obtidas analisadas quanto à presença da proteína de interesse por *Dot Blot*. **Lr:** Frações de lavagem da purificação da versão R. **Er:** Frações de eluição da purificação da versão R. **Lt:** Frações de lavagem da purificação da versão T. **Et:** Frações de eluição da purificação da versão T +: Controle positivo com 1 µg de IgG humana. -: controle negativo.

Para confirmar se a purificação tinha sido bem sucedida, as amostras purificadas eram novamente submetidas à análise por SDS-PAGE, sendo o gel corado com *Comassie* (Figura 43) e por *Western Blot* a fim de verificar a presença da proteína recombinante (Figura 44). O resultado observado no gel corado com *Comassie* mostra um alto grau de pureza das proteínas purificadas, não sendo possível a detecção de contaminantes. A banda referente aos FvFcs pode ser observada em torno de 55 kDa (Figura 43).

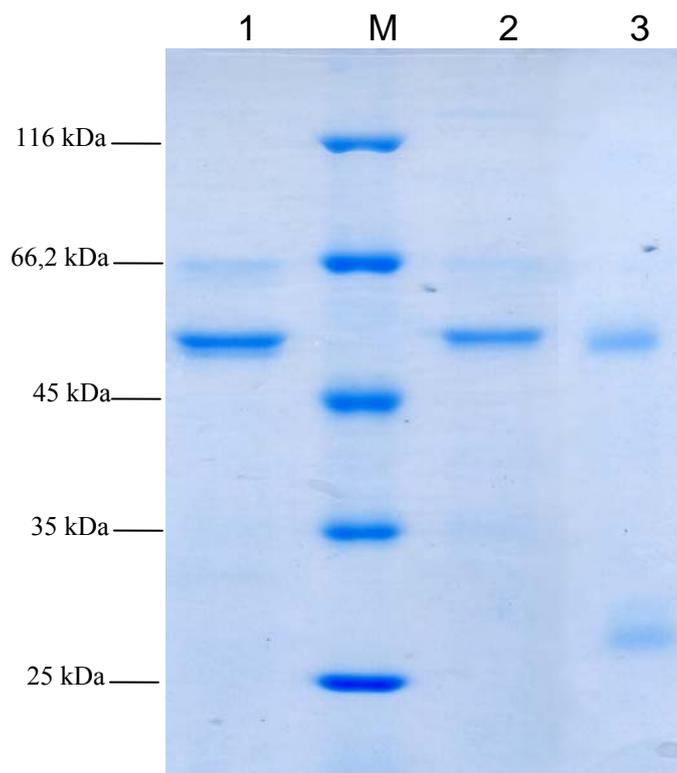


Figura 43. Análise da purificação por cromatografia de afinidade dos FvFcs humanizados produzidos em cultura com SFB low IgG. Eletroforese em gel SDS-PAGE 10% corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*. **1** - FvFc humanizado anti-CD3 versão arginina. **2** - FvFc humanizado anti-CD3 versão treonina. **3** - 500 ng de IgG humana. **M** - Marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas[®]).

O resultado do *Western Blot* confirma novamente a presença dos FvFcs humanizados tanto na sua forma monomérica (55kDa), em poços com tampão redutor, como na forma dimérica, com tampão não redutor (Figura 44). A forma dimérica pôde ser observada novamente como uma banda com tamanho acima de 250 kDa, o que abre a possibilidade de estar havendo agregação dos FvFcs purificados. Para solucionar essa questão é necessária a realização de uma cromatografia analítica por gel filtração que possibilitará o fracionamento das proteínas pelo seu tamanho molecular. Se durante o fracionamento surgir compostos de alta massa molecular estará comprovado a presença de agregação das proteínas.

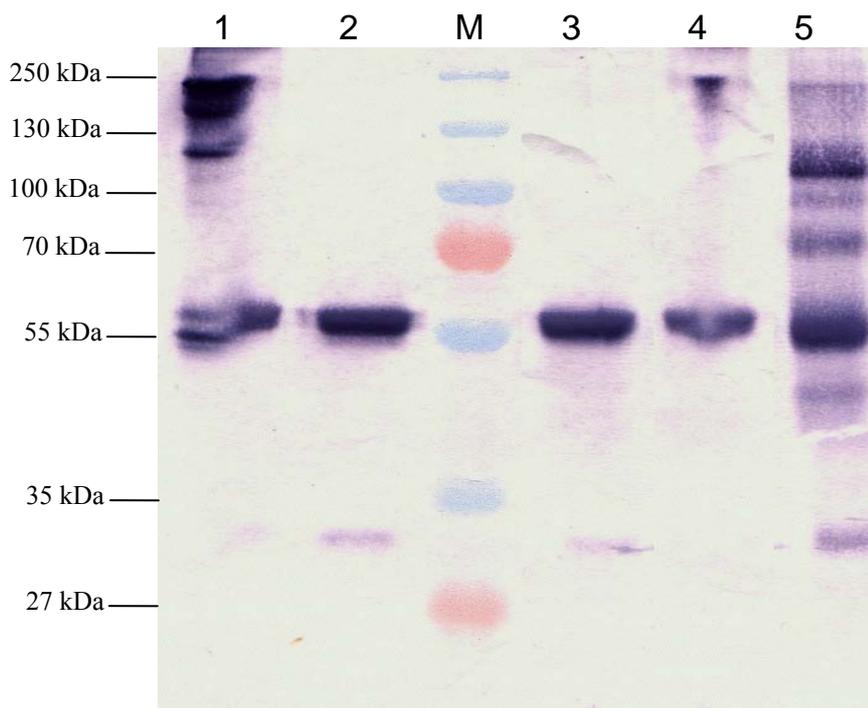


Figura 44. Análise dos FvFcs R e T produzidos em cultura com SFB low IgG por *Western Blot*. Era realizada uma eletroforese em gel SDS-PAGE 10% para separação das proteínas purificadas as quais eram posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do ensaio. 1- FvFc R não reduzido. 2 - FvFc R reduzido. 3 - FvFc T reduzido. 4 - FvFc T não reduzido. 5 – 1,2 µg de IgG humana utilizada como controle positivo. M – Marcador Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas®).

Com as proteínas purificadas, foi realizada a quantificação das amostras por ELISA, utilizando-se uma curva padrão de IgG humana de concentração sabidamente conhecida. O resultado obtido era 22 ng/µL para o FvFc T e 27 ng/µL para o FvFc R. Com esses resultados partiu-se para os ensaios de ligação a molécula CD3.

É interessante ressaltar que apesar dessa segunda purificação ter sido procedida a partir de um volume concentrado de 250 mL de sobrenadante de cultura, inferior aos 400 mL da primeira, o rendimento obtido foi bastante similar, apresentando aproximadamente 15 µg de proteína recombinante em 500 µL. Provavelmente, as condições apresentadas na cultura otimizada dos clones estáveis favoreceram o processo de purificação por apresentar uma quantidade significativamente menor de proteínas contaminantes.

4.11 Análise da especificidade dos FvFcs R e T produzidos em meio com SFB low IgG pelo antígeno CD3.

Com os anticorpos purificados apresentando altos níveis de pureza e quantificados, partiu-se para a realização das reações de imunofluorescência para o FACS com as quantidades corretas de proteínas. Dessa maneira, descartou-se a possibilidade da influência da quantidade de proteína e da sua contaminação na análise do experimento.

Nesse sentido, para realizar a reação, células mononucleares do sangue periférico de doador saudável foram novamente separadas (tópico 3.2.18) e submetidas ao citometro de fluxo para definição a população de linfócitos de acordo com seu tamanho e granulosidade (Figura 45).

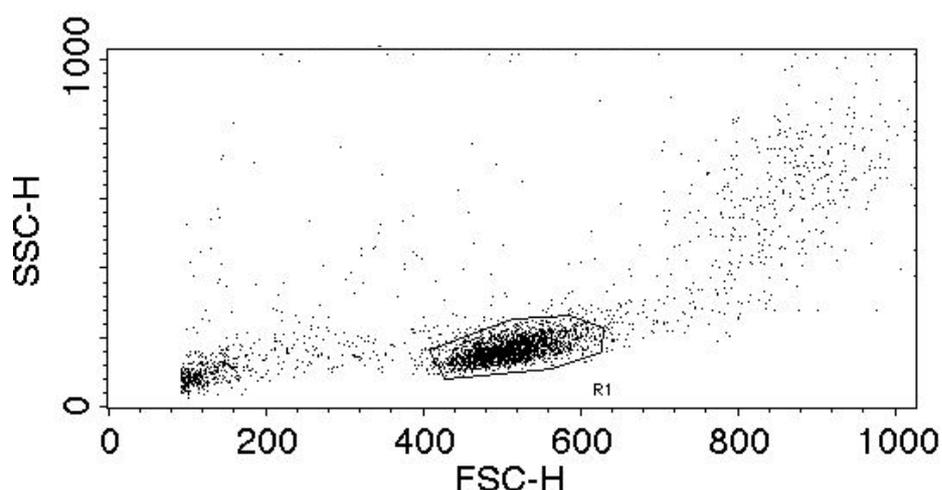


Figura 45. Análise de dispersão de leucócitos de sangue periférico de doador normal. A área adquirida de linfócitos está delimitada (R1). FSC-H: dispersão frontal (*forward scattering*), que indica o tamanho das células; SSC-H: dispersão lateral (*side scattering*), que indica a granulosidade das células.

Com o intuito de se verificar se houve realmente uma perda de afinidade das versões humanizadas pelo CD3 realizamos outro ensaio de bloqueio da ligação do OKT3 ao CD3. Nesse experimento utilizamos o anticorpo monoclonal OKT3 já conjugado a FITC, dessa forma eliminava-se um viés que era o sistema de detecção dos anticorpos utilizados no bloqueio. Assim, se os FvFcs conseguissem bloquear eficientemente a ligação do OKT3-FITC a superfície de linfócitos, seria observada uma diminuição da intensidade de fluorescência observada no experimento de FACS. Dessa forma a reação foi realizada incubando-se inicialmente as versões dos FvFcs R e T, em diluições seriadas iniciando com uma concentração de 3µg/poço, com os linfócitos, com o intuito de se bloquear a ligação, após a

incubação as células eram lavadas com o tampão de lavagem de FACS e incubadas com o OKT3-FITC em concentrações limitantes de intensidade de fluorescência. As células foram então lavadas novamente e submetidas ao citometro de fluxo. Como controle positivo da reação realizou-se o bloqueio utilizando OKT3 não conjugado, sendo a diminuição da intensidade de fluorescência alcançada por esse ensaio considerada a ideal.

Os resultados do experimento mostram que as versões humanizadas realmente não conseguem diminuir significativamente a intensidade de fluorescência da ligação do OKT3-FITC quando comparados com o bloqueio realizado pelo OKT3 não marcado (Figura 46). Nessa figura é possível visualizar três padrões de intensidade de fluorescência, o primeiro próximo ao eixo Y representando células não marcadas, indicando a queda máxima possível da intensidade de fluorescência. O segundo, mais intermediário, indicado pela seta verde, evidenciando a diminuição da intensidade de fluorescência alcançada pelo bloqueio utilizando o OKT3 não marcado. E o terceiro, indicado pela seta azul, mostrando a fluorescência máxima alcançada pelo OKT3 sem bloqueio (Figura 46). Apesar das varias diluições utilizadas, nem as mais altas concentrações dos FvFcs humanizados conseguiram alterar o padrão observado.

Ao analisar os dados relativos à mediana de intensidade de fluorescência (Tabela 4), fornecidos pelo programa Cell Quest, observa-se que 2 ng do OKT3 não marcado promovem uma diminuição da mediana de intensidade de fluorescência do OKT3-FITC em 49%, enquanto que as versões R e T para alcançarem esse mesmo percentual de diminuição requerem 300 ng e mais de 3 µg, respectivamente. Esse é mais um indício de que as versões humanizadas reconhecem o CD3 e que houve uma perda de afinidade por essas versões, dada a redução da capacidade de bloqueio do OKT3-FITC, em especial para a versão T, quando comparados com o OKT3 não marcado.

Tabela 4. Inibição da ligação do anticorpo OKT3-FITC a linfócitos humanos pelos FvFcs R e T e pelo OKT3 não conjugado.

Anticorpo	Mediana de intensidade de fluorescência de FITC	Porcentagem de Inibição	Quantidade de anticorpo
OKT3	24,14	82%	100 ng
FvFc R	71,69	49%	300 ng
FvFc T	109,41	21%	300 ng
OKT3-FITC	139,49	0%	-

Os dados apresentados pela versão com a arginina na posição 86 da cadeia pesada mostram um deslocamento da intensidade de fluorescência melhor que a versão com treonina. Assim, corroborando os experimentos prévios realizados pelo grupo indicando que essa cadeia pesada possui um poder de ligação similar ao observado pela cadeia pesada murina (Costa, 2004). Sendo o efeito de deslocamento da fluorescência provavelmente atribuído a ligação dessa cadeia.

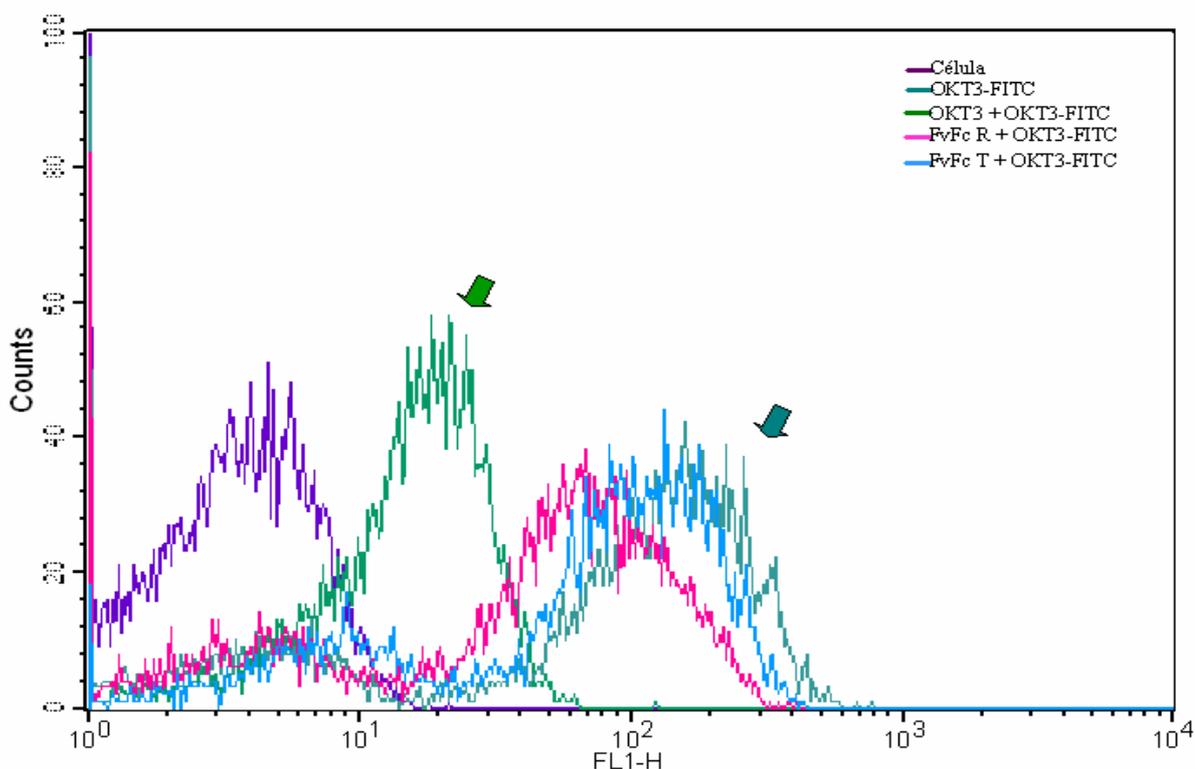


Figura 46. Ensaio de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal murino OKT3-FITC. Os linfócitos foram incubados inicialmente com os FvFcS humanizados T e R ou o OKT3 não conjugado e posteriormente com o OKT3-FITC. Seta azul indicando a fluorescência da reação do OKT3-FITC sem bloqueio. Seta verde indicando o deslocamento da intensidade de fluorescência provocada pelo bloqueio utilizando o OKT3 não marcado. FL1: Intensidade de fluorescência emitida por FITC (530 nm); Counts: número de células.

Apesar de esses dados serem bastante conclusivos, ainda existe o viés da qualidade das proteínas na amostra no sentido de poder estar havendo agregação. Como foi discutido na análise do ensaio de *Western blot*. Para solucionar essa questão, como já foi falado, será necessária a realização de uma cromatografia analítica de gel filtração e com o resultado obtido nesse experimento poderá se concluir se realmente a falha ao bloquear o OKT3 foi

devido à perda de afinidade pelas versões humanizadas ou pela baixa quantidade de proteínas biologicamente ativas.

Não se pode também descartar a hipótese que, apesar de esses anticorpos terem perdido relativamente sua afinidade pelo antígeno, eles ainda podem reter os efeitos biológicos alcançados pelo anticorpo murino. Para responder essa questão será necessária a realização de ensaios biológicos *in vitro*, como, por exemplo, uma reação linfocitária mista (MLR, do inglês, *Mixed Lymphocyte Reaction*). Nesse experimento pretende-se, em parte, reproduzir *in vitro* os efeitos imunossupressivos alcançados pelo OKT3 *in vivo* (Li *et al.*, 2005). O experimento consiste na utilização de células mononucleares de sangue periférico, obtidas de dois doadores normais, sendo as células obtidas de um doador denominadas de estimuladoras e as do outro de responsivas. A partir disso, as células estimuladoras são irradiadas com radiação de forma a torná-las irresponsivas. Após essa etapa, essas células são incubadas em conjunto com as células responsivas. Nesse momento é esperado que haja uma proliferação das células responsivas, sendo essa uma resposta similar à desenvolvida quando há a rejeição de um órgão transplantado. Quando se incuba o OKT3 em uma MLR, ele promove a inibição da proliferação das células responsivas por imunossupressão. Dessa forma, ensaios de MLR utilizando as versões humanizadas R e T podem nos revelar que, apesar da relativa perda de afinidade, elas ainda podem apresentar atividades imunossupressivas que possibilitem a avaliação do seu potencial para futuro uso clínico.

O presente trabalho vem dar mais alicerces a dados prévios obtidos pelo grupo. No trabalho realizado por Costa, 2004, foi possível observar que a cadeia pesada R em conjunto com a cadeia leve murina reteve a capacidade de bloqueio da ligação do OKT3 ao CD3, dessa forma indicando que a humanização pela técnica de “melhor encaixe” utilizada para a cadeia pesada foi bem sucedida. Enquanto que a humanização da cadeia leve utilizada naquele trabalho levou a uma perda da afinidade de ligação ao antígeno, mostrados pelos ensaios de bloqueio realizados na época, utilizando uma versão com a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada que não conseguiu bloquear eficientemente a ligação do OKT3 (Figura 16).

A estratégia utilizada naquele momento para humanização da cadeia leve foi baseada na escolha apenas de seqüências do arcabouço do OKT3 na busca e seleção do anticorpo humano mais similar, divergindo da estratégia de melhor encaixe onde se procura seqüências similares ao anticorpo inteiro. Essa estratégia diferenciada pode ter levado ao surgimento de diferenças estruturais entre a molécula humanizada e a murina que comprometeram a atividade ligante dessa molécula.

Nesse sentido, foi proposta a re-humanização da cadeia leve, dessa vez utilizando a técnica de “melhor encaixe” onde foi escolhida a seqüência germinal mais similar à seqüência da cadeia leve do OKT3 para doação do arcabouço onde seriam inseridos os CDRs murinos. Esperava-se com essa nova proposta que a perda de afinidade fosse solucionada, garantido a atividade biológica dos anticorpos.

A técnica de “melhor encaixe” utilizando como base seqüências germinais homólogas como doadoras de arcabouço, vem gerando resultados satisfatórios dentro do grupo de Imunologia molecular, tendo sido aplicada com sucesso na humanização da cadeia pesada R utilizada neste trabalho (Costa, 2004) e na humanização do anticorpo anti-CD18 (Caldas *et al.*, 2000; Caldas *et al.*, 2003).

Apesar desses dados favoráveis, os experimentos aqui apresentados mostraram que os anticorpos humanizados não conseguiram bloquear eficientemente a ligação do OKT3 provavelmente devido a uma perda de afinidade dessa versão e possivelmente estando novamente envolvida com humanização da cadeia leve.

Dados relacionados à análise estrutural da ligação do OKT3 ao CD3 por cristalografia de raio-x revelam que a interação entre o antígeno e o anticorpo é 69% garantida pelos resíduos presentes nas HCDRs 2 e 3 da cadeia pesada (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004). Daí a justificativa para as versões R e T humanizadas, apesar de não possuírem uma cadeia leve ideal, terem conseguido inibir discretamente a ligação do OKT3 ao CD3. Entretanto, apesar da cadeia pesada ser a maior responsável na interação com o antígeno não se pode descartar o papel da cadeia leve na estabilização da cadeia pesada e de suas regiões hipervariáveis na ligação ao antígeno. Sendo essa provavelmente, uma das causas da perda de afinidade da versão humanizada.

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 seqüência da cadeia leve murina com a da versão humanizada utilizada neste trabalho, foi observada 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 (Figura 47). Essa última substituição deve ter gerado grande impacto na estrutura do anticorpo visto a grande diferença nas características dos aminoácidos e devido o 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. Ao se comparar as seqüências de aminoácidos do VL murino e do VL humanizado observa-se a existência de 27 resíduos diferentes no arcabouço do VL humanizado, sendo um indício para algum problema estrutural dessa cadeia. Nesse sentido, foram realizadas análises estruturais da cadeia leve murina utilizando o programa Jmol baseado nos dados disponíveis do cristal de um Fab do OKT3 ligado ao CD3 depositado no PDB sob o código 1SY6 (Figura 48, A) (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004). Nesse trabalho foram observadas substituições não conservativas de aminoácidos que mantêm pontes de hidrogênio no *backbone* da proteína, não envolvendo pontes de hidrogênio das cadeias laterais dos aminoácidos devido às limitações dos programas de análise disponíveis.

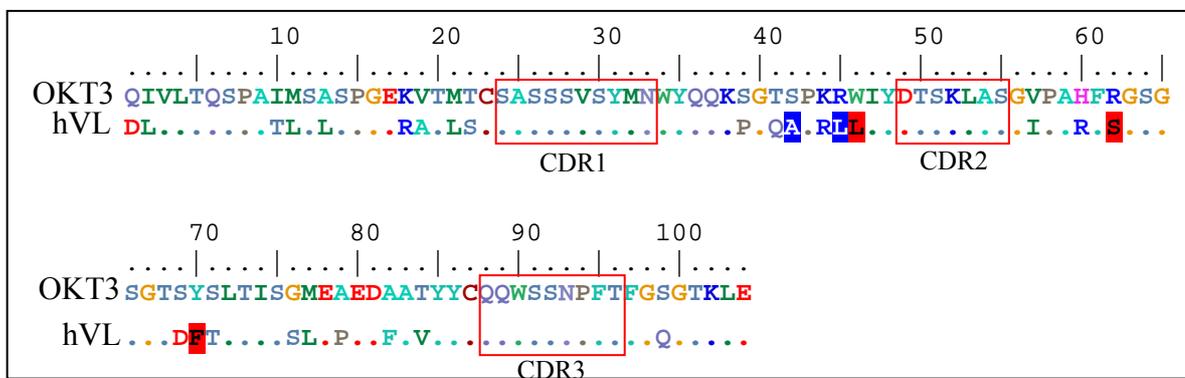


Figura 47. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da cadeia leve do OKT3 e da cadeia leve humanizada (hVL). Os resíduos idênticos ao do OKT3 são apresentados na seqüência humanizada como pontos. São destacadas em azul os resíduos 42 e 45 considerados importantes na interação com a cadeia pesada na versão murina e alterados na cadeia humanizada. Em vermelho, os aminoácidos substituídos na cadeia leve humanizada que são considerados relevantes para a manutenção da estrutura da cadeia na versão murina.

As análises revelaram que três substituições podem estar atuando na desestabilização da estrutura da cadeia leve (Figura 47). A primeira é a substituição do triptofano 46L por uma leucina na cadeia humanizada. O triptofano tem por característica ser um aminoácido com uma grande cadeia lateral aromática, sendo a maior cadeia lateral existente, além de apresentar uma polaridade significativa. Já a leucina é um aminoácido com uma cadeia lateral

pequena e apolar. Dessa forma o triptofano pode conferir uma maior rigidez à estrutura polipeptídica garantindo o seu arranjo espacial. Além disso, foi constatado por meio da análise do cristal que esse triptofano realiza uma ponte de hidrogênio com o triptofano 34L que está no final da LCDR1, sendo uma ponte possivelmente importante para a estabilização da LCDR1. Além dessa ponte, o triptofano 46L realiza outra ponte de hidrogênio com o resíduo Alanina 54L que está presente dentro da LCDR2 (Figura 48, B), atuando diretamente na estabilização dessa região. Dessa forma, o triptofano pode possuir papel importante na estabilização dessas duas regiões determinantes de complementariedade e a substituição pelo resíduo leucina pode ter desestabilizado essa estrutura e comprometido o reconhecimento do antígeno por essas duas regiões.

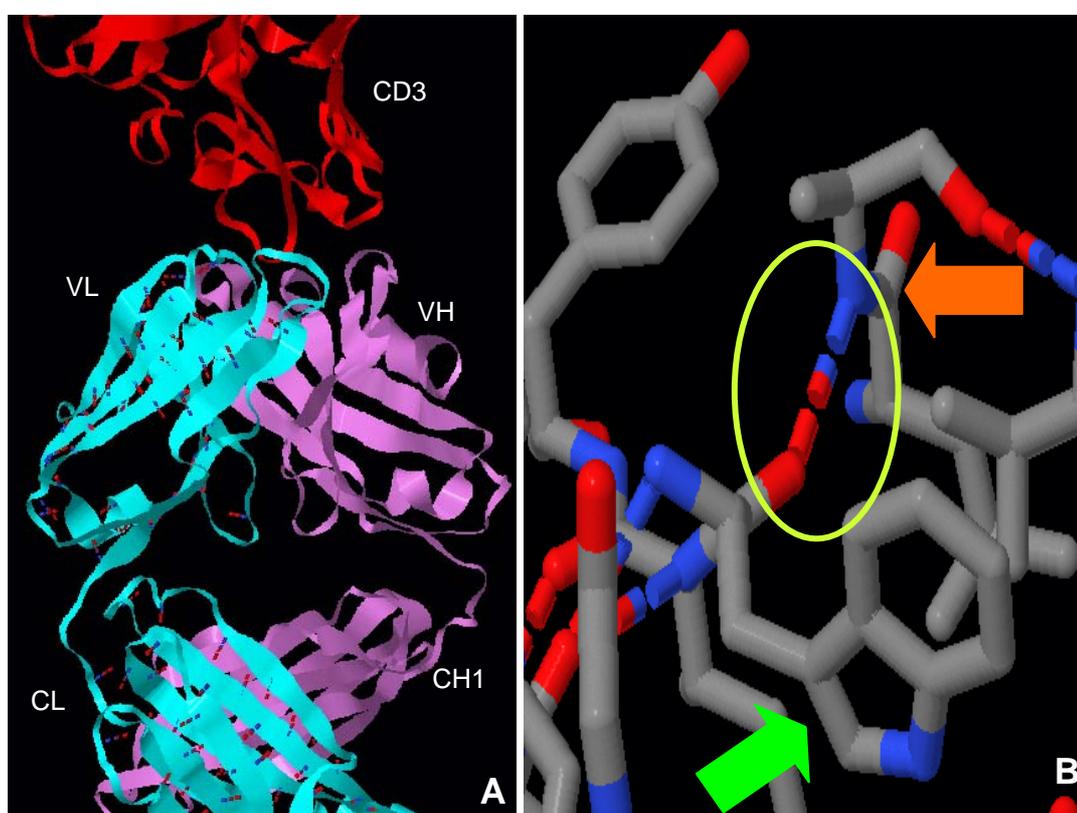


Figura 48. Análise estrutural da cadeia leve murina do anti-CD3 utilizando o programa Jmol. A: Estrutura mostrando a interação entre o OKT3 e o antígeno CD3. Em ciano está mostrada a cadeia leve, em violeta a cadeia pesada e em vermelho o antígeno CD3. **B:** Interação por ponte de hidrogênio entre os aminoácidos TRP 46 e ALA54 da cadeia leve. Circulo amarelo indicando a ponte de hidrogênio. Seta verde evidenciando a cadeia lateral do triptofano 46 e a seta laranja mostrando o aminoácido alanina 54.

A segunda substituição é a da arginina 62L por uma serina, sendo também uma substituição não conservativa. A arginina 62L faz ponte de hidrogênio com a treonina 73L podendo ser importante na estruturação da volta (*loop*) da LCDR2. Além disso, há relatos na

literatura que essa posição é importante para manutenção da estrutura do anticorpo (Vargas-Madrazo e Paz-Garcia, 2003).

Outra alteração importante é a da tirosina 70L por uma fenilalanina. Apesar de ser uma substituição conservativa, tendo, as duas, cadeias laterais aromáticas, a tirosina é significativamente mais polar que a fenilalanina devido à presença de um grupamento hidroxila que possibilita esse aminoácido realizar pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Ao se observar o cristal é possível observar que o grupamento hidroxila da cadeia lateral desse aminoácido está a 2,66 angstroms do resíduo valina 29L e a 3,83 angstroms do resíduo serina 30L, presentes dentro do LCDR1. Esse dado é um indicativo que a tirosina 70L pode atuar realizando uma interação eletrostática com esses aminoácidos e contribuir para estabilização da LCDR1. Além disso, o seu *backbone* realiza uma ponte de hidrogênio com a cisteína 23L que está no início da LCDR1, podendo, também, atuar na estabilização dessa região. Dessa forma, a alteração para fenilalanina pode alterar essas interações de forma a comprometer a estabilidade da LCDR1 e conseqüentemente a sua ligação ao antígeno.

Essas duas últimas substituições também estão presentes na proposta de humanização da cadeia leve feito no trabalho de Costa (2004), sendo então mais um indício para que esses resíduos estejam envolvidos em uma desestabilização do paratopo do anticorpo.

Com esses dados em mãos é possível propor alterações na cadeia leve humanizada com o intuito de se restabelecer a atividade ligante do anticorpo. Na literatura, há diversos relatos de anticorpos humanizados que perderam afinidade, e para se recuperar as propriedades originais de ligação ao antígeno, resíduos do arcabouço precisaram ser mantidos como murinos (Riechmann *et al.*, 1988; Holmes *et al.*, 1998).

Além disso, análises estruturais mais refinadas, como modelagem molecular, podem revelar se os resíduos citados, dentro do contexto da cadeia humanizada possuem o impacto citado e se há outros resíduos críticos para estrutura da cadeia leve.

Com essas barreiras ultrapassadas será possível chegar a uma seqüência humanizada consensual que consiga restabelecer a afinidade do anticorpo humanizado e tornando - o apto ao seu futuro uso clínico.

Conclusão e Perspectivas

Conclusão e Perspectivas

No presente trabalho foram padronizadas metodologias para expressão de anticorpos recombinantes em células de mamífero de forma estável e caracterizadas a atividade ligante e efetoras de duas versões de anticorpos humanizados anti-CD3 no formato de fragmento FvFc, que diferem apenas no resíduo 86 do VH, sendo arginina (R) ou treonina (T).

Os resultados aqui apresentados mostram que a expressão de anticorpos recombinantes, em células de mamíferos, utilizando o vetor de expressão pMIREs apresentou níveis de estabilidade satisfatórios ao longo do tempo quando comparados à expressão utilizando vetores sem a presença de marcas seletivas no mesmo transcrito. Ensaio com vetores monocistrônicos apresentaram um alto nível de silenciamento da expressão do transgene enquanto que o pMIREs, por gerar transcritos bicistrônicos por meio de um elemento IRES associando a expressão do anticorpo recombinante à marca seletiva, garantiu níveis estáveis de expressão durante mais de 90 dias.

Os resultados obtidos nos ensaios de ligação ao antígeno CD3 utilizando os FvFcs humanizados anti-CD3 leva-nos a concluir que eles foram capazes de se ligar à superfície de linfócitos T. Entretanto, em ensaios de bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal OKT3, foi mostrada uma perda de afinidade por essas versões o que comprometeu as suas estabilidades e afetou o bloqueio da ligação do OKT3. Além disso, foi mostrado que a versão R possui uma maior capacidade de ligação e bloqueio em relação à versão T, indicando que os trabalhos anteriores realizados pelo grupo estavam corretos e que a cadeia pesada com a arginina possui atividade ligante similar a da cadeia murina.

A principal causa da perda de afinidade pelas versões humanizadas provavelmente se deu novamente ao processo de humanização da cadeia leve, onde foram vistos alguns resíduos importantes para a manutenção do paratopo do anticorpo murino que no processo de humanização foram substituídos por aminoácidos não conservados.

As análises realizadas nesse trabalho permitem concluir que os anticorpos humanizados possuem características de ligação inferiores em relação à molécula base para humanização, o OKT3, o que pode inviabilizar o seu futuro uso clínico. Entretanto, os dados referentes à sua atividade biológica podem indicar um potencial terapêutico não observado nos ensaios de ligação ao antígeno.

Como perspectivas para esse trabalho, propomos ensaios biológicos *in vitro* com o intuito de visualizar se a perda de afinidade por esses anticorpos também é refletida no seu

potencial imunossupressor e análises estruturais mais apuradas da estrutura do anticorpo, tomando como base o cristal do OKT3, a fim de promover algumas substituições de resíduos chave buscando restabelecer a afinidade da versão humanizada àquela encontrada no anticorpo murino OKT3.

Com essas questões solucionadas em conjunto com dados experimentais será possível avaliar o potencial dessas moléculas recombinantes como futuros imunoterápicos.

Referências

Bibliográficas

Referências Bibliográficas

Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D 2008.

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

Alegre, M. L., Peterson, L. J., Xu, D., Sattar, H. A., Jeyarajah, D. R., Kowalkowski, K., *et al.* A non-activating "humanized" anti-CD3 monoclonal antibody retains immunosuppressive properties in vivo. Transplantation, v.57, n.11, Jun 15, p.1537-1543. 1994.

Andrade, E. V., Albuquerque, F. C., Moraes, L. M., Brigido, M. M. e Santos-Silva, M. A. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. J Biochem, v.128, n.6, Dec, p.891-895. 2000.

Andrade, E. V., Freitas, S. M., Ventura, M. M., Maranhao, A. Q. e Brigido, M. M. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. Biochim Biophys Acta, v.1726, n.3, Nov 30, p.293-301. 2005.

Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M. e Dwek, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol, v.25, p.21-50. 2007.

Balland, A., Faure, T., Carvallo, D., Cordier, P., Ulrich, P., Fournet, B., *et al.* Characterisation of two differently processed forms of human recombinant factor IX synthesised in CHO cells transformed with a polycistronic vector. Eur J Biochem, v.172, n.3, Mar 15, p.565-572. 1988.

Barnes, L. M., Bentley, C. M. e Dickson, A. J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. Cytotechnology, v.32, p.109-123. 2000.

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

Berdoz, J., Blanc, C. T., Reinhardt, M., Kraehenbuhl, J. P. e Corthesy, B. In vitro comparison of the antigen-binding and stability properties of the various molecular forms of IgA antibodies assembled and produced in CHO cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.6, Mar 16, p.3029-3034. 1999.

Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A. e Herold, K. C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. J Clin Invest, v.115, n.10, Oct, p.2904-2913. 2005.

- Blazar, B. R., Jenkins, M. K., Taylor, P. A., White, J., Panoskaltsis-Mortari, A., Korngold, R., *et al.* Anti-CD3 epsilon F(ab')₂ fragments inhibit T cell expansion in vivo during graft-versus-host disease or the primary immune response to nominal antigen. J Immunol, v.159, n.12, Dec 15, p.5821-5833. 1997.
- Bödecker, B. G. D., Newcomb, R., Yuan, P., Braufman, A. e Kelsey, W. Production of recombinant Factor VIII from perfusion cultures: I. Large Scale Fermentation. Em: Animal cell technology, products of today, prospects for tomorrow. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994. p.580-590
- Bolt, S., Routledge, E., Lloyd, I., Chatenoud, L., Pope, H., Gorman, S. D., *et al.* The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. Eur J Immunol, v.23, n.2, Feb, p.403-411. 1993.
- Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. . Scandinavian journal of clinical laboratory investigation, v.21, p.97. 1968.
- Brightwell, G., Poirier, V., Cole, E., Ivins, S. e Brown, K. W. Serum-dependent and cell cycle-dependent expression from a cytomegalovirus-based mammalian expression vector. Gene, v.194, n.1, Jul 18, p.115-123. 1997.
- Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl Microbiol Biotechnol, v.68, n.3, Aug, p.283-291. 2005.
- Caldas, C., Coelho, V., Kalil, J., Moro, A. M., Maranhao, A. Q. e Brigido, M. M. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. Mol Immunol, v.39, n.15, May, p.941-952. 2003.
- Caldas, C., Coelho, V. P., Rigden, D. J., Neschich, G., Moro, A. M. e Brigido, M. M. Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. Protein Eng, v.13, n.5, May, p.353-360. 2000.
- Carpenter, P. A., Tso, J. Y., Press, O. W., Yu, X. e Anasetti, C. Non-FcR-binding, humanized anti-CD3 antibody Hu291 induces apoptosis of human T cells more effectively than OKT3 and is immunosuppressive in vivo. Transplant Proc, v.32, n.7, Nov, p.1545-1546. 2000.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.10, May 15, p.4285-4289. 1992.
- Cereghino, J. L. e Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.1, Jan, p.45-66. 2000.
- Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nat Rev Immunol, v.3, n.2, Feb, p.123-132. 2003.
- Chatenoud, L., Baudrihaye, M. F., Chkoff, N., Kreis, H., Goldstein, G. e Bach, J. F. Restriction of the human in vivo immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. J Immunol, v.137, n.3, Aug 1, p.830-838. 1986.

- Chatenoud, L., Baudrihaye, M. F., Kreis, H., Goldstein, G., Schindler, J. e Bach, J. F. Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. Eur J Immunol, v.12, n.11, Nov, p.979-982. 1982.
- Chatenoud, L. e Bluestone, J. A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. Nat Rev Immunol, v.7, n.8, Aug, p.622-632. 2007.
- Chatenoud, L., Primo, J. e Bach, J. F. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. J Immunol, v.158, n.6, Mar 15, p.2947-2954. 1997.
- Co, M. S. e Queen, C. Humanized antibodies for therapy. Nature, v.351, n.6326, Jun 6, p.501-502. 1991.
- Cohen, I. R. Discrimination and dialogue in the immune system. Semin Immunol, v.12, n.3, Jun, p.215-219; discussion 257-344. 2000a.
- Cohen, I. R. Tending Adam's garden: envolving the cognitive immune self. London: Academic Press. 2000b
- Cohen, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. J Autoimmun, Sep 19. 2007.
- Costa, P. L. N. Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. Biochemistry, v.20, n.9, Apr 28, p.2361-2370. 1981.
- Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., *et al.* Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. Biotechnol Bioeng, v.87, n.4, Aug 20, p.537-545. 2004.
- Ebert, R. The inflammatory process. New York: Academic Press, v.1. 1965
- Ferran, C., Dautry, F., Merite, S., Sheehan, K., Schreiber, R., Grau, G., *et al.* Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo. J Clin Invest, v.93, n.5, May, p.2189-2196. 1994.
- Ferran, C., Sheehan, K., Dy, M., Schreiber, R., Merite, S., Landais, P., *et al.* Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient in vivo T cell activation. Eur J Immunol, v.20, n.3, Mar, p.509-515. 1990.
- Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunker, P. e Umana, P. The carbohydrate at Fcγ₃ Asn-162. An element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. J Biol Chem, v.281, n.8, Feb 24, p.5032-5036. 2006.

- Fonseca, A. S. D. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3 Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2000. 106 p.
- Friend, P. J., Hale, G., Chatenoud, L., Rebello, P., Bradley, J., Thiru, S., *et al.* Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. Transplantation, v.68, n.11, Dec 15, p.1632-1637. 1999.
- Gerngross, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotechnol, v.22, n.11, Nov, p.1409-1414. 2004.
- Gopalkrishnan, R. V., Christiansen, K. A., Goldstein, N. I., Depinho, R. A. e Fisher, P. B. Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. Nucleic Acids Res, v.27, n.24, Dec 15, p.4775-4782. 1999.
- Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Carlsbad: Ibis Biosciences 2007.
- Herold, K. C., Gitelman, S. E., Masharani, U., Hagopian, W., Bisikirska, B., Donaldson, D., *et al.* A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. Diabetes, v.54, n.6, Jun, p.1763-1769. 2005.
- Hirsch, R., Bluestone, J. A., Denenno, L. e Gress, R. E. Anti-CD3 F(ab')₂ fragments are immunosuppressive in vivo without evoking either the strong humoral response or morbidity associated with whole mAb. Transplantation, v.49, n.6, Jun, p.1117-1123. 1990.
- Holliger, P. e Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol, v.23, n.9, Sep, p.1126-1136. 2005.
- Holmes, M. A., Buss, T. N. e Foote, J. Conformational correction mechanisms aiding antigen recognition by a humanized antibody. J Exp Med, v.187, n.4, Feb 16, p.479-485. 1998.
- Houdebine, L. M. e Attal, J. Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. Transgenic Res, v.8, n.3, Jun, p.157-177. 1999.
- Hricik, D. E., Mayes, J. T. e Schulak, J. A. Inhibition of anti-OKT3 antibody generation by cyclosporine--results of a prospective randomized trial. Transplantation, v.50, n.2, Aug, p.237-240. 1990.
- Hsiao, K. C., Bajorath, J. e Harris, L. J. Humanization of 60.3, an anti-CD18 antibody; importance of the L2 loop. Protein Eng, v.7, n.6, Jun, p.815-822. 1994.
- Hughes, C., Wolos, J. A., Giannini, E. H. e Hirsch, R. 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. 1994.

- Hulett, M. D. e Hogarth, P. M. Molecular basis of Fc receptor function. Adv Immunol, v.57, p.1-127. 1994.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. e Shlomchik, M. Immunobiology. New York and London: Garland Publishing. 2001
- Kaufman, R. J., Davies, M. V., Wasley, L. C. e Michnick, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. Nucleic Acids Res, v.19, n.16, Aug 25, p.4485-4490. 1991.
- Kenanova, V., Olafsen, T., Crow, D. M., Sundaresan, G., Subbarayan, M., Carter, N. H., *et al.* Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. Cancer Res, v.65, n.2, Jan 15, p.622-631. 2005.
- Kim, S. J., Park, Y. e Hong, H. J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol Cells, v.20, n.1, Aug 31, p.17-29. 2005.
- Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Goldsby, R. A. Kuby Immunology: W.H. Freeman. 2002. 574 p.
- Kjer-Nielsen, L., Dunstone, M. A., Kostenko, L., Ely, L. K., Beddoe, T., Mifsud, N. A., *et al.* 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. 2004.
- Kohm, A. P., Williams, J. S., Bickford, A. L., McMahon, J. S., Chatenoud, L., Bach, J. F., *et al.* 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. 2005.
- Le Hir, H., Nott, A. e Moore, M. J. How Introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends in Biochemistry, p.215-220. 2004.
- Li, B., Wang, H., Dai, J., Ji, J., Qian, W., Zhang, D., *et al.* Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology, v.116, n.4, Dec, p.487-498. 2005.
- Li, J., Menzel, C., Meier, D., Zhang, C., Dubel, S. e Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. J Immunol Methods, v.318, n.1-2, Jan 10, p.113-124. 2007.
- Li, J., Zhang, C., Jostock, T. e Dubel, S. Analysis of IgG heavy chain to light chain ratio with mutant Encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site. Protein Eng Des Sel, v.20, n.10, Oct, p.491-496. 2007.

- Ludviksson, B. R., Ehrhardt, R. O. e Strober, W. TGF-beta production regulates the development of the 2,4,6-trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2-deficient mice. J Immunol, v.159, n.7, Oct 1, p.3622-3628. 1997.
- Lyons, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. J Immunol Methods, v.243, n.1-2, Sep 21, p.147-154. 2000.
- Maggon, K. Monoclonal antibody "gold rush". Curr Med Chem, v.14, n.18, p.1978-1987. 2007.
- Maranhão, A. Q. Transformação Bacteriana. Em: Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora UNB, 2003 p.212
- Maranhão, A. Q. e Brigido, M. M. Anticorpos Humanizados. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.IV. 2001.
- Mather, J. P. Laboratory scaleup of cell cultures (0.5-50 liters). Methods Cell Biol, v.57, p.219-227. 1998.
- Mistry, P. K., Wraight, E. P. e Cox, T. M. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. Lancet, v.348, n.9041, Dec 7, p.1555-1559. 1996.
- Mutskov, V. e Felsenfeld, G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. Embo J, v.23, n.1, Jan 14, p.138-149. 2004.
- Nimmerjahn, F. e Ravetch, J. V. Fcγ receptors: old friends and new family members. Immunity, v.24, n.1, Jan, p.19-28. 2006.
- Nimmerjahn, F. e Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. Nat Rev Immunol, v.8, n.1, Jan, p.34-47. 2008.
- Paul, W. E. Fundamental Immunology: Lippincott Williams & Wilkins. 2003. 2990 p.
- Plain, K. M., Chen, J., Merten, S., He, X. Y. e Hall, B. M. 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. 1999.
- Presta, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. Adv Drug Deliv Rev, v.58, n.5-6, Aug 7, p.640-656. 2006.
- Radaev, S. e Sun, P. D. Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. J Biol Chem, v.276, n.19, May 11, p.16478-16483. 2001.
- Reichert, J. P., A. Monoclonal antibodies market. Nature reviews, v.3, may. 2004.

- Richards, E. J. e Elgin, S. C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. Cell, v.108, n.4, Feb 22, p.489-500. 2002.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. e Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature, v.332, n.6162, Mar 24, p.323-327. 1988.
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. e Levings, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol Rev, v.212, Aug, p.28-50. 2006.
- Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. e Dwek, R. A. Glycosylation and the immune system. Science, v.291, n.5512, Mar 23, p.2370-2376. 2001.
- Ruggiero, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2002. 137 p.
- Sambrook, J. e Russel, D. W. Molecular Cloning - a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor. 2001
- Sgro, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. Toxicology, v.105, n.1, Dec 20, p.23-29. 1995.
- Shevac, E. M. Flow Cytometry. Em: Current protocols in immunology. New York: John Wiley & Sons, v.1, 1996
- Shevach, E. M., Dipaolo, R. A., Andersson, J., Zhao, D. M., Stephens, G. L. e Thornton, A. M. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. Immunol Rev, v.212, Aug, p.60-73. 2006.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., *et al.* Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem, v.277, n.30, Jul 26, p.26733-26740. 2002.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., *et al.* The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. J Biol Chem, v.278, n.5, Jan 31, p.3466-3473. 2003.
- Sinacore, M. S., Drapeau, D. e Adamson, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. Mol Biotechnol, v.15, n.3, Jul, p.249-257. 2000.
- Smith, J. A., Tang, Q. e Bluestone, J. A. 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. 1998.

- Smith, J. A., Tso, J. Y., Clark, M. R., Cole, M. S. e Bluestone, J. A. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. J Exp Med, v.185, n.8, Apr 21, p.1413-1422. 1997.
- Spector, D. L., R.D., G. e Leinwand, L. A. Cells: a laboratory manual. New York: CSHL press. 1998. 1.1-2.13 p.
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. e Winter, G. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. J Mol Biol, v.227, n.3, Oct 5, p.776-798. 1992.
- Utset, T. O., Auger, J. A., Peace, D., Zivin, R. A., Xu, D., Jolliffe, L., *et al*. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. J Rheumatol, v.29, n.9, Sep, p.1907-1913. 2002.
- Vagner, S., Galy, B. e Pyronnet, S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. EMBO Rep, v.2, n.10, Oct, p.893-898. 2001.
- Van Wauwe, J. P., De Mey, J. R. e Goossens, J. G. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. J Immunol, v.124, n.6, Jun, p.2708-2713. 1980.
- Vargas-Madrado, E. e Paz-Garcia, E. An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. J Mol Recognit, v.16, n.3, May-Jun, p.113-120. 2003.
- Vigeral, P., Chkoff, N., Chatenoud, L., Campos, H., Lacombe, M., Droz, D., *et al*. Prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney recipients. Utilization of OKT3 as the sole immunosuppressive agent. Transplantation, v.41, n.6, Jun, p.730-733. 1986.
- Werten, M. W. T., Van Den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H. e De Wolf, F. A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. Yeast, v.15, p.1087-1096. 1999.
- Wong, J. T. e Colvin, R. B. Selective reduction and proliferation of the CD4+ and CD8+ T cell subsets with bispecific monoclonal antibodies: evidence for inter-T cell-mediated cytotoxicity. Clin Immunol Immunopathol, v.58, n.2, Feb, p.236-250. 1991.
- Woodle, E. S., Thistlethwaite, J. R., Ghobrial, I. A., Jolliffe, L. K., Stuart, F. P. e Bluestone, J. A. OKT3 F(ab')₂ fragments--retention of the immunosuppressive properties of whole antibody with marked reduction in T cell activation and lymphokine release. Transplantation, v.52, n.2, Aug, p.354-360. 1991.
- Woodle, E. S., Xu, D., Zivin, R. A., Auger, J., Charette, J., O'laughlin, R., *et al*. Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. Transplantation, v.68, n.5, Sep 15, p.608-616. 1999.

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

Wurm, F. e Bernard, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. Curr Opin Biotechnol, v.10, n.2, Apr, p.156-159. 1999.

Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nat Biotechnol, v.22, n.11, Nov, p.1393-1398. 2004.

www.Dartmouth.Edu/~Celllab/Pix/Fab.Jpg.

You, S., Leforban, B., Garcia, C., Bach, J. F., Bluestone, J. A. e Chatenoud, L. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.15, Apr 10, p.6335-6340. 2007.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano

Pesquisador Responsável: Hernandez Moura Silva

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade de Brasília

Telefones para contato: (61) 3307-2423 _____ - (61) 8432-7477 _____ - (____) _____

Nome do voluntário: Hernandez Moura Silva

Idade: 24 anos R.G. 1451976 SSP-SE

Responsável legal (quando for o caso): _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar como doador de 150 mL de sangue periférico do projeto de pesquisa "Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano" de responsabilidade do pesquisador Hernandez Moura Silva.

Eu, HERNANDEZ MOURA SILVA, RG nº 1451976 SSP-SE declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Ou

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por _____, RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Brasília, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal
consentimento

Nome e assinatura do responsável por obter o

Testemunha

Testemunha