

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

*Humanização e Expressão de Fragmentos de
Anticorpos Anti-PLA₂ de Bothrops atrox*

Bárbara Maciel Sidou Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientador: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Brasília – DF
Fevereiro de 2008

Humanização e Expressão de Fragmentos de Anticorpos Anti-PLA₂ de *Bothrops atrox*

Bárbara Maciel Sidou Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientador: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

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

Brasília - DF

Fevereiro de 2008

Banca examinadora

Dr. Paulo Lee Ho – Instituto Butantan

Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes – UnB

Dr. Marcio José Poças Fonseca – UnB

Dr. Marcelo de Macedo Brígido – UnB

Dra. Andréa Queiroz Maranhão – UnB

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

Este trabalho é dedicado ao meu querido e saudoso avô Germano (*in memmorian*) que se alegrava e se emocionava a cada conquista por mim obtida. Amote para sempre.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por todas as realizações que eu tenho conquistado em minha vida e pelas pessoas maravilhosas que me cercam.

Aos meus queridos orientadores Marcelo e Andréa por terem me acolhido com tanto carinho ainda no início da graduação, por todos os ensinamentos científicos e não-científicos também! Pela confiança depositada e pela alegria e bom-humor mesmo nos problemas que pareciam sem solução (pelo menos para mim...). Por terem me ensinado a ser um pouco mais paciente e mais segura. Aos conselhos da Déia! Enfim, por tudo. Muito obrigada. Amo vocês!

À minha família, pequena no tamanho e enorme no amor. Aos meus pais, Dulcinéa e Willam, por terem dedicado suas vidas a me educar e por me proporcionarem ter chegado até aqui. Aos meus tios lindos, Danilo e Denise, segundos pais, por completarem a alegria da minha vida. E à minha avó Valda por me agüentar todo dia “filando bóia” em sua casa.

À Flavinha pelos primeiros ensinamentos (e broncas também) quando entrei no grupo, e principalmente pela linda amizade que construímos.

Ao Hernandez por ter me ensinado a fazer o primeiro gel de agarose... “Não mais” apesar de nunca concordar comigo você sabe que eu te adoro! Vou sentir muito a sua falta.

À minha companheira de todas as horas Maryani por tornar tudo mais divertido no laboratório e por me ensinar muito em relação à criação dos meus futuros filhos... brincadeira amiga.

Aos meus amigos de sempre Jesyk, Henrique e Pauliane por apesar de não entenderem direito o que eu faço acharem tudo lindo. E ao Cristiano por me acompanhar durante a maior parte do mestrado, aturando as chateações.

A todos os amigos do Lab 1. Luana, por caminhar lado a lado comigo já há tanto tempo, que continuemos nos ajudando sempre. Rafa, por toda a paciência com as dúvidas de *Pichia*. Carol, pelas discussões filosóficas, também vou sentir sua falta. Mariana e Alex (que não é do Lab 1 mas já faz parte também), pelas intermináveis partidas de War (Mari, eu ainda acho que você não devia ir embora...). Fê, por achar tudo engraçado e conseqüentemente tornar tudo engraçado (agora vai ter que me chamar pro casamento!). Víctor, meu filho que foi roubado pelo Rafa. Janaína, também gosto de você de graça viu?!

Isa, pelas conversas no café. A todos os demais, Léo, Paulo, Taíssa, Kelly, Izabel e Bia. E a todos os que já fizeram e sempre farão parte dessa família Gina, PatyLu, Carmela, Chrisinha, Pedro, Ceci, Gabi e Mauro. O que seriam das nossas vidas sem as reuniões de quinta-feira...

À professora Lídia Pepe pelas dicas na fermentação e pelo carinho, apesar das broncas de vez em quando. Aos demais professores do laboratório: Ildinete, Márcio, Élide, Sueli e Fernando por estarem sempre dispostos a ajudar nos questionamentos. Aos professores de outros laboratórios: Cynthia, Sônia Freitas e especialmente Fernando Fortes pelo auxílio nos experimentos de FPLC.

Aos demais colegas do laboratório, que continuam e já não estão mais lá, Camila, Túlio, Marciano, Thiago, Lorena, Davi, Tiago, Hugo, Saulo, Juliana, Guilherme, Andreisse, Vivis, Rose e Janice por também sempre se mostrarem dispostos a ajudar quando fosse preciso.

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

E ao meu lindo, Yuri, por ter segurado a barra agora na seleção do doutorado e por ter me feito esquecer completamente, pelo menos por 12 dias, que eu tinha uma tese para defender.

Muito obrigada a todos!

Sumário

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xv
Lista de Termos e Abreviaturas	xvi
Resumo	xix
Abstract	xxi
1 - Introdução	1
1.1 - Acidentes ofídicos no Brasil	1
1.1.1 - Os acidentes com o gênero <i>Bothrops</i>	2
1.2 - O veneno de <i>Bothrops atrox</i>	3
1.2.1 - A fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	4
1.3 - A soroterapia e a busca por novos tratamentos	5
1.4 – Imunoglobulinas	7
1.4.1 - Humanização de anticorpos	9
1.5 - Expressão heteróloga de anticorpos e fragmentos de anticorpos	11
1.5.1 - Expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i>	13
1.6 - A humanização do anticorpo anti-PLA₂ de <i>Bothrops atrox</i>	14
2 - Justificativa	17
3 - Objetivos	18
3.1 - Objetivo geral	18
3.2 - Objetivos específicos	18
4 - Materiais e Métodos	19
4.1 - Materiais	19
4.1.1 - Células	19
4.1.1.1 - Linhagens bacterianas	19
4.1.1.2 - Linhagens de <i>Pichia pastoris</i>	19

4.1.2 - Plasmídios utilizados	19
4.1.3 - Meios de cultura para bactérias	20
4.1.4 - Meios de cultura e soluções estoque para levedura	21
4.1.5 - Soluções estoque de inibidores de proteases	24
4.1.6 - Soluções e tampões de uso geral	24
4.1.7 - Soluções para preparo de células competentes – bactéria e levedura	25
4.1.8 - Soluções para extração de DNA plasmidial	26
4.1.9 - Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida	27
4.1.10 - Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com <i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250)	29
4.1.11 - Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, <i>Western</i> , <i>Colony</i> e <i>Dot blotting</i>)	29
4.1.12 - Oligonucleotídeos sintéticos específicos	31
4.1.13 - Resinas cromatográficas	32
4.1.14 - Soluções para cromatografias	32
4.1.15 - Materiais utilizados para concentração e quantificação de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas	33
4.1.16 - Marcadores de Massa Molecular (MM) para DNA e proteína	33
4.1.17 - Enzimas	34
4.1.18 - Anticorpos	34
4.1.19 - Kits comerciais	35
4.2 - Métodos	35
4.2.1 - Preparação de DNA plasmidial	35
4.2.1.1 - Em pequena escala (adaptado de Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	35
4.2.1.2 - Em larga escala (adaptado de Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	36
4.2.2 - Digestão do DNA com enzimas de restrição	37
4.2.3 - Análise de DNA em gel de agarose (segundo Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	37
4.2.4 - Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose	38
4.2.5 - Ligação de fragmentos de DNA	38
4.2.6 - Preparação de células competentes e transformação bacteriana	38
4.2.6.1 - Por choque térmico – CaCl ₂ (adaptado de Maranhão in Azevedo	

<i>et al.</i> , 2003)	38
4.2.6.2 - Por eletroporação (adaptado de Maranhão in Azevedo <i>et al.</i> , 2003)	39
4.2.7 - Amplificação das seqüências variáveis murinas – PCR	40
4.2.8 - Preparação de DNA para transformação de <i>P. pastoris</i>	41
4.2.9 - Transformação da levedura <i>P. pastoris</i> por eletroporação (adaptado de Cregg <i>et al.</i> , 1985)	41
4.2.10 - Análise dos transformantes de <i>P. pastoris</i> por <i>Colony blotting</i> ou <i>Western</i> de colônia	42
4.2.11 - Expressão das proteínas recombinante em <i>P. pastoris</i> – fermentação em frasco (adaptado do Manual do kit de Expressão em <i>Pichia pastoris</i> , Invitrogen®)	43
4.2.12 - Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com TCA (ácido tricloroacético)	44
4.2.13 - Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE (adaptado de Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	44
4.2.14 - Coloração do gel de SDS-PAGE	45
4.2.14.1 - Com <i>Comassie Brilliant Blue</i> R-250	45
4.2.14.2 - Com prata	45
4.2.15 - Análise de proteínas por <i>Western Blotting</i> (adaptado de Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	45
4.2.16 - Análise de proteínas por <i>Dot Blotting</i> (adaptado de Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	46
4.2.17 - Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade	46
4.2.17.1 - Com IgG Sepharose® – scFvs	46
4.2.17.2 - Com HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE Healthcare®) – FvFcs	47
4.2.18 - Purificação das proteínas recombinantes por Filtração em Gel	48
4.2.19 - Análise de agregação das proteínas recombinantes	48
4.2.20 - Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA	49
4.2.21 - ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	49
4.2.21.1 - ELISA – Ensaio de quantificação dos FvFcs recombinantes	50
4.2.21.2 - ELISA – Ensaio de ligação direta	50

4.2.21.3 - ELISA – Ensaio de inibição	51
5 - Resultados e Discussão	52
5.1 - Humanização por transplante de CDR	52
5.2 - Inserção dos sítios de restrição nas seqüências variáveis murinas	54
5.3 - Construção dos fragmentos de anticorpos scFvs e clonagem no vetor de expressão em <i>Pichia pastoris</i>	55
5.4 - Expressão dos scFvs em <i>Pichia pastoris</i>	56
5.4.1 - Transformação da <i>P. pastoris</i> e seleção dos clones recombinantes	57
5.4.2 - Produção dos scFvs recombinantes e cinética de indução	58
5.5 - Purificação dos scFvs recombinantes	61
5.5.1 - Cromatografia de afinidade – IgG Sepharose	61
5.5.2 - Filtração em gel	64
5.6 - Agregação de scFvs no sobrenadante da fermentação em <i>Pichia pastoris</i>	66
5.7 - Expressão do FvFc anti-PLA₂ humanizado em <i>Pichia pastoris</i>	70
5.7.1 - Construção do FvFc humanizado	70
5.7.2 - Transformação da <i>P. pastoris</i> e seleção dos clones recombinantes produtores de FvFc	71
5.7.3 - Expressão do FvFc humanizado	72
5.8 - Purificação dos FvFcs humanizados	73
5.9 - Degradação dos FvFcs humanizados	75
5.10 - Quantificação dos FvFcs humanizados	78
5.10.1 - Pelo kit BCA	78
5.10.2 - Por ELISA	79
5.11 - Detecção da afinidade dos FvFcs humanizados anti-PLA₂ <i>in vitro</i>	80
5.11.1 - Testes de Ligação	80
5.11.2 - Testes de Inibição	84
6 - Conclusões e Perspectivas	88
7 - Referências Bibliográficas	90

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil.	2
Figura 2. Foto de uma serpente da espécie <i>Bothrops atrox</i> e sua distribuição pelo território nacional.	3
Figura 3. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos N-terminais de PLA ₂ encontradas em venenos de algumas serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .	5
Figura 4. Representação esquemática de uma IgG.	8
Figura 5. Representação esquemática das técnicas de humanização de anticorpos.	10
Figura 6. Representação esquemática de alguns fragmentos de anticorpos.	12
Figura 7. Representação esquemática do vetor de expressão em <i>Pichia pastoris</i> pPIg LE scFv.	15
Figura 8. Alinhamentos do VH (a) e do VL (b) propostos com as seqüências humanas germinais mais similares as murinas.	53
Figura 9. Amplificações do VH e VL murinos para inserção dos sítios de restrição.	54
Figura 10. Representação esquemática das clonagens de transferência dos scFvs para o pPIg LE.	56
Figura 11. Imunodeteção de colônias produtoras de scFv recombinante.	58
Figura 12. Produção das proteínas recombinantes em células de <i>Pichia pastoris</i>	

em diferentes tempos de indução.	59
Figura 13. Produção em larga escala das proteínas recombinantes por células de <i>Pichia pastoris</i> .	60
Figura 14. Imunodeteccção dos scFv recombinantes durante a purificação em coluna IgG Sepharose.	62
Figura 15. Análise dos scFvs humanizados purificados.	63
Figura 16. Perfil cromatográfico da eluição de padrões de massa molecular em coluna Sepharose 12 (Gel Filtração).	64
Figura 17. Perfil cromatográfico dos fragmentos scFvs recombinantes produzidos em <i>P. pastoris</i> em FPLC.	65
Figura 18. Análise por <i>Dot Blotting</i> das frações que apresentaram picos durante a filtração em gel.	65
Figura 19. Análise da influência da adição de Arginina 0,4M no meio de cultura na produção dos scFvs recombinantes.	68
Figura 20. Análise da influência da adição de 0,02% de Tween 20 no meio de cultura na produção (a) e na agregação (b) dos scFvs recombinantes.	69
Figura 21. Representação esquemática da clonagem de transferência da porção CH2-CH3 para o pPIg LE.	70
Figura 22. Imunodeteccção de colônias produtoras de FvFc humanizado recombinante.	71
Figura 23. Análise da produção dos FvFcs humanizados em células de <i>Pichia pastoris</i> .	73

Figura 24. Imunodeteccção dos FvFcs humanizados durante a purificação em coluna de proteína A.	74
Figura 25. Análise dos FvFcs humanizados purificados.	75
Figura 26. Análise do padrão de degradação dos FvFcs humanizados no sobrenadante de <i>Pichia pastoris</i> .	77
Figura 27. Curva-padrão para o kit BCA.	78
Figura 28. Curva-padrão para quantificação por ELISA.	80
Figura 29. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado utilizando-se extrato bruto da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .	81
Figura 30. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado utilizando-se a PLA ₂ purificada.	82
Figura 31. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado purificado utilizando-se extrato bruto da peçonha de <i>Bothrops atrox</i> .	83
Figura 32. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado purificado utilizando-se a PLA ₂ purificada.	84
Figura 33. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados ao veneno total pelo anticorpo monoclonal.	85
Figura 34. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados a PLA ₂ purificada pelo anticorpo monoclonal.	86

Figura 35. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados purificados a PLA₂ purificada pelo anticorpo monoclonal.

87

Índice de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.	31
Tabela 2. Marcadores padrões utilizados para Gel Filtração*	33
Tabela 3. Anticorpos utilizados.	34
Tabela 4. Densidade ótica celular a 600nm das fermentações com arginina.	67

Lista de Termos e Abreviaturas

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

KCl	Cloreto de Potássio.
kDa	Quilodalton.
kV	Quilovolts.
L	Litro.
M	Molar.
µg	Microgramas.
µl	Microlitros.
µF	Microfaraday.
µm	Micrômetro.
µM	Micromolar.
mA	Miliamper.
mAb	Anticorpo monoclonal.
mg	Miligrama.
MgCl₂	Cloreto de Magnésio.
MgSO₄	Sulfato de Magnésio.
min	Minuto.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
MM	Massa molecular.
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro.
NaCl	Cloreto de Sódio.
NaOH	Hidróxido de Sódio.
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazole.</i>
ng	Nanograma.
nm	Nanômetros.
OD₆₀₀	Densidade ótica a 600nm.
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3.
Ori	Origem de replicação.
Ω	ohm
pb	Pares de base.
PBS	Tampão Fosfato - Salina.

PCR	Reação em cadeia da polimerase.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PLA₂	Fosfolipase A ₂ .
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonato.
p/v	Peso/Volume.
q.s.p.	Quantidade suficiente para.
RNA	Ácido ribonucléico.
RNase	Ribonuclease.
Rpm	Rotações por minuto.
scFv	Fragmento variável de anticorpo cadeia única (<i>Single chain Fragment Variable</i>).
SDS	Sódio Dodecil Sulfato.
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante (com SDS).
spA	Proteína A.
TEMED	N,N,N',N' - tetrametil etilenodimetilamina.
Tet^R	Gene de resistência a tetraciclina.
Tris-Base	Tris(hidroximetil)aminometano.
τ	Tempo de choque.
v	Volume.
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo.
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo.
v/v	Volume/Volume.
UV	Ultravioleta.
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i> .
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosideo.

Resumo

Atualmente no Brasil ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos anuais, sendo 90% deles causados por serpentes do gênero *Bothrops*. A soroterapia ainda é o tratamento mais comum para acidentes com animais peçonhentos, apesar da toxicidade gerada pela utilização de anticorpos eqüinos. Esse tratamento pode induzir inflamação, falência renal e até choque anafilático. Entretanto atualmente vários estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de minimizar esses efeitos colaterais, incluindo o desenvolvimento de anticorpos mais específicos e menos imunogênicos, que poderiam substituir ou até mesmo atuar em conjunto com a soroterapia convencional.

A fosfolipase A₂ (PLA₂) é o principal antígeno encontrado no veneno da serpente *Bothrops atrox* e é o responsável pela miotoxicidade, inflamação e necrose. Anticorpos monoclonais (mAbs) contra esse antígeno foram produzidos em camundongos e se mostraram capazes de neutralizar eficientemente a atividade miotóxica dessa PLA₂ (Kanashiro *et al.*, 2002). O objetivo desse trabalho foi então humanizar o anticorpo anti-PLA₂ A85/9-4 produzido por Kanashiro e colaboradores (2002), visando o seu uso clínico no tratamento de envenenamentos com essa serpente.

Inicialmente os genes codificadores das cadeias variáveis leve e pesada do mAb foram seqüenciadas a partir da clonagem do cDNA de imunoglobulina vindo do hibridoma. Para humanizar esse anticorpo as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) murinas foram transferidas para arcabouços humanos germinais escolhidos em bancos de dados devido a sua alta similaridade com as seqüências murinas. A porção variável (Fv) humanizada proposta tem apenas 16 resíduos de aminoácidos não-humanos na cadeia leve e 9 na cadeia pesada. As seqüências codificadoras das porções variáveis foram sintetizadas e clonadas na forma de scFv (fragmento variável de cadeia única) em vetor de expressão em *Pichia pastoris*. Entretanto, durante a expressão do scFv verificou-se a formação de agregados no sobrenadante de cultura, dificultando sua purificação e comprometendo o rendimento. Para diminuir essa agregação as porções variáveis do anti-PLA₂ foram então clonadas e expressas na forma de FvFc o que tornou possível a purificação e a realização dos testes de afinidade do anticorpo humanizado. O fragmento FvFc recombinante se

mostrou capaz de reconhecer tanto o extrato bruto da peçonha quanto a fosfolipase purificada, além de ter sua ligação inibida pela presença do mAb original.

Os testes *in vitro* sugerem que os FvFcs humanizados possam apresentar desempenho similar ao mAb em futuros testes de neutralização *in vivo*.

Abstract

Nowadays in Brazil there are about 20000 snake accidents annually and 90% of them are with the *Bothrops* species. The serotherapy is the commonest treatment to animal poison accidents, despite of the toxicity triggered by equine antibody utilization. This conduct can induce inflammation, kidney failure and anaphylactic shock. Nowadays several studies have been developed to minimize these collateral effects included the developing of more especific and less immunogenic antibodies that could be used to substitute the conventional serotherapy or in association with this treatment.

The Phospholipase A₂ (PLA₂) is the principal antigen found in the *Bothrops atrox* venom and causes miotoxicity, inflammation and necrosis. Monoclonal antibodies (mAbs) against this antigen were produced in mice and were able to neutralize the miotoxic activity of PLA₂ efficiently (Kanashiro *et al.*, 2002). The objective of this work was to develop a humanized form of the antibody anti-PLA₂ A85/9-4 produced by Kanashiro *et al* (2002), aiming its clinical use for snake poisoning treatment.

Initially the light and heavy chains of the mAb were determined by cloning Ig cDNA from mAb's hybridoma. To humanize this antibody, the light and heavy chain's CDRs of the murine mAb were transferred to a human framework, chose on the database of human germline V genes because their high similarity with the murine sequences. The proposed Fv has 16 non-human residues in the light chain and 9 in the heavy chain. The sequences of the variables regions were synthesized and initialy cloned as a scFv (single chain variable fragment) in expression vector for *Pichia pastoris* heterologous expressions. But during the expression this form induced agregation and couldn't be purified. To minimize this agregation the variable regions of the anti-PLA₂ were cloned as a FvFc fragment and in this form was possible the purification and tests of afinity of the humanized form. The recombinant FvFc antibody fragment was able to recognize the total venom and the purified PLA₂. And was inhibit by the original mAb.

The results of the *in vitro* tests suggest that the humanized FvFcs can be similar results of the original mAb in *in vivo* neutralization tests.

1 – Introdução

1.1 – Acidentes ofídicos no Brasil

Os acidentes com serpentes peçonhentas - acidentes ofídicos - são muito freqüentes no Brasil e demais países tropicais (Bochner & Struchiner, 2003). Vital Brazil foi o primeiro a discutir a epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil, no início do século XX. Segundo dados daquela época ocorriam anualmente cerca de 4.800 mortes anuais causadas por acidentes ofídicos, que se deviam principalmente à falta de conhecimento da população em relação à prevenção aos acidentes e ao tratamento pós-mordida (Brazil, 1911).

Até mais da metade do século XX todos os dados estatísticos e epidemiológicos sobre esses acidentes no Brasil eram baseados apenas nos “boletins de observação de envenenamentos por mordidas de serpentes”, os quais eram enviados voluntariamente pelos pacientes tratados com antivenenos no Instituto Butantan em São Paulo e no Instituto Vital Brazil no Rio de Janeiro (revisado por Bochner & Struchiner, 2003). Apenas em 1986 o Ministério da Saúde criou o “Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos”, que passou a organizar a produção e distribuição dos antivenenos e a catalogar esses acidentes (Brasil, 1987).

Atualmente, segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil ocorrem entre 19 e 22 mil acidentes ofídicos por ano (Brasil, 2001). Sendo que esse dado ainda é subestimado, pois corresponde apenas aos casos que chegam a serem notificados. Segundo o SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação, órgão também do Ministério da Saúde, esse número está crescendo: em 2001 foram 18.895 casos, contra 28.648 em 2005, o que representa um aumento de 51%, que se deve, principalmente, a expansão da zona urbana e conseqüente invasão do habitat das serpentes (Tatsch, 2006).

As vítimas mais freqüentes desses acidentes são homens entre 20 e 30 anos, em geral trabalhadores rurais, os quais muitas vezes não possuem equipamentos de proteção adequados, como luvas e botas (Silva *et al.*, 2003). Oitenta por cento das picadas ocorrem nos pés e pernas, 19% nas mãos e antebraços e 1% em diferentes localidades do corpo (Fundacentro, 2001).

1.1.1 – Os acidentes com o gênero *Bothrops*

De acordo com dados do Ministério da Saúde, dentre os casos de acidentes ofídicos 16,3% não possuem identificação da serpente (Medeiros *et al.*, 2000). Entretanto, dentre os casos em que a serpente é informada, o gênero *Bothrops* é o responsável por 90,5% das notificações. Portanto, são registrados anualmente 17.000 acidentes botrópicos com letalidade em torno de 0,6% dos casos tratados (Brasil, 2001) (Figura 1).

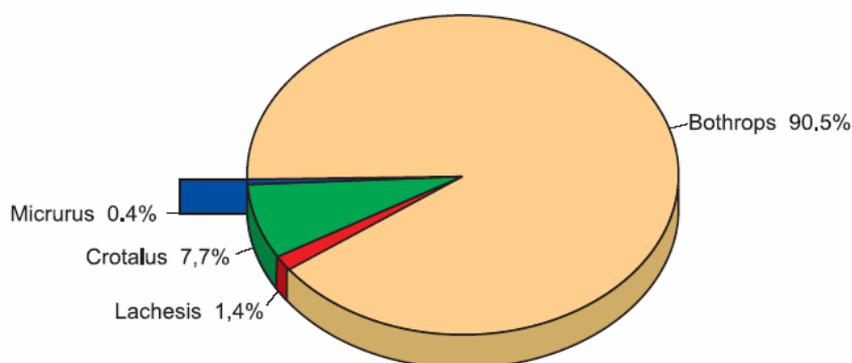


Figura 1. Distribuição dos acidentes ofídicos segundo o gênero da serpente peçonhenta no Brasil. *Bothrops* – jararacas, *Crotalus* – cascavéis, *Lachesis* – surucucus e *Micrurus* – corais. Dados do Ministério da Saúde. (adaptada de Brasil, 2001).

O quadro clínico característico dos acidentes botrópicos é caracterizado por dor, hemorragia e processo inflamatório agudo no local da mordida, incoagulabilidade sanguínea, gengivorragia, equimoses e hematúria. Esse quadro quando agravado pode levar à necrose e amputação do membro onde ocorreu a mordida e também à hemorragia intensa e insuficiência renal, responsáveis pela morte da vítima, quando ocorre (Medeiros *et al.*, 2000).

De acordo com os acidentes catalogados apesar de o veneno crotálico ser o que apresenta maior letalidade (por levar à insuficiência renal mais rapidamente) o veneno botrópico é o que leva ao maior número de necroses e amputações (Ribeiro & Jorge, 1997 e Pinho *et al.*, 2004).

1.2 – O veneno de *Bothrops atrox*

Dentre as espécies de serpentes do gênero *Bothrops* encontradas no Brasil está a *Bothrops atrox*. Sua localização geográfica abrange toda a região amazônica brasileira (Pardal *et al.*, 2004) (Figura 2).



Figura 2. Foto de uma serpente da espécie *Bothrops atrox* e sua distribuição pelo território nacional. A *B. atrox* é encontrada principalmente na região norte do Brasil e é popularmente conhecida como jararaca ou jararaca-do-norte (adaptada de Medeiros *et al.* 2000).

O veneno de *Bothrops atrox* é caracterizado por uma intensa atividade proteolítica oriunda de seus componentes, que abrange proteinases e fosfolipases (Guércio *et al.*, 2006). Essa característica já havia sido descrita desde o início do século XX por Vital Brazil por ser responsável pela intensa necrose observada nos casos de envenenamento por essa serpente, que na época era nomeada *Lachesis atrox* (Brazil, 1911).

Dentre os componentes do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* existem três tipos de enzimas as quais participam na fisiopatologia do envenenamento causado por essas serpentes, as serino-proteinases, as metalo-proteinases e as fosfolipases A₂. As serino-proteinases agem sobre o sistema de coagulação sanguínea e são responsáveis pela hemorragia, as metalo-proteinases Zn-dependentes (SVMPs) também produzem hemorragia e as fosfolipases A₂ (PLA₂) agem na membrana celular induzindo miotoxicidade (Tamarozzi *et al.*, 2006). As SVMPs e as PLA₂ são também potentes indutores da inflamação e necrose tecidual típica dos envenenamentos botrópicos (Arocha-Pinango *et al.*, 2000).

1.2.1 - A fosfolipase A₂ (PLA₂)

As PLA₂ encontradas nos venenos de serpentes são potentes miotoxinas que têm como função auxiliar na digestão da presa. Além do veneno de serpentes muitos outros venenos animais contêm miotoxinas, como os de abelhas e escorpiões (Lomonte *et al.*, 2003). Mais de 150 PLA₂ já foram caracterizadas em venenos animais (Valentin & Lambeau, 2000).

Nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops* as miotoxinas são quantitativamente os mais importantes componentes, o que caracteriza seu intenso poder necrosante. Várias delas vêm sendo isoladas e caracterizadas nas últimas décadas e todas pertencem ao grupo das fosfolipasas A₂ (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

Os efeitos da injeção intramuscular da PLA₂ botrópica são uma série de rápidos e drásticos eventos degenerativos iniciados em nível de membrana celular que culminam com a desorganização das miofibrilas, digestão dos miofilamentos, condensação da cromatina e, por fim, necrose do músculo esquelético (Zamunér *et al.*, 2004). Em casos severos esses efeitos locais podem levar a perda permanente de tecido e amputação (Rucavado & Lomonte, 1996).

As PLA₂ encontradas nos venenos botrópicos se dividem em dois grupos, um que apresenta o aminoácido lisina na posição 49 da proteína (K49-PLA₂) e outro que apresenta um ácido aspártico nessa posição (D49-PLA₂). Ambas são responsáveis pelo efeito necrosante, entretanto atuando por diferentes mecanismos (Kanashiro *et al.*, 2002 e Zuliani *et al.*, 2005) e todas apresentam similaridade significativa, com poucas variações de resíduos de aminoácidos entre as diferentes espécies, como pode ser observado na Figura 3.

As D49-PLA₂ são responsáveis por catalisar a hidrólise da ponte éster na região *sn-2* dos glicerofosfolípidos desestabilizando assim a membrana celular. As K49-PLA₂ não apresentam essa atividade, pois não apresentam o ácido aspártico 49, sítio de ligação ao cálcio, que é cofator dessa atividade catalítica (Lomonte *et al.*, 2003). O sítio catalítico das K49-PLA₂ é formado por uma combinação de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, sendo a própria lisina 49 um desses aminoácidos, próximos à região C-terminal da proteína que interagem eletrostaticamente e penetram na bicamada da membrana celular. Esses eventos levam a uma desestabilização da membrana e perda da permeabilidade seletiva a íons como o cálcio. Esse desbalanço iônico é um importante mediador da necrose muscular

observada cerca de 3 horas após a injeção do veneno (Lomonte *et al.*, 2003 e Gutiérrez & Lomonte, 2005).

K49-PLA ₂	<i>B. atrox</i>	P1	-	S	L	V	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	V	T	S	Y	G	A	Y	G		
	<i>B. asper</i>	A	-	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	A	Y	G		
	<i>B. atrox</i>	B	-	S	L	V	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	L	T	S	Y	G	V	Y	G		
		P1	-	C	N	C	G	V	L	G	R	G	K	P	K	D	A	T	N	E	C	C	Y	K	N	V	H	K		
		A	-	C	N	C	G	V	L	G	R	G	K	P	K	D	A	T	D	R	C	C	Y	-	-	V	H	K		
		B	-	C	N	C	G	V	G	S	R	H	K	P	K	D	D	T	D	R	C	C	Y	-	-	V	H	K		
		P1	-	C	C	Y	K	K	L																					
		A	-	C	C	Y	K	K	L																					
		B	-	C	C	Y																								
	D49-PLA ₂	<i>B. atrox</i>	P3	-	N	L	W	Q	F	G	K	M	I	N	E	E	M	G	K	F	A	F	L	N	Y	V	S	Y	G	
		<i>V. ammodytes</i>	C	-	N	L	F	Q	F	A	K	M	I	N	G	K	L	G	A	F	S	V	W	N	Y	I	S	Y	G	
		<i>B. jararacussu</i>	D	-	D	L	W	Q	F	G	Q	M	I	L	K	E	T	G	K	L	P	F	P	Y	Y	T	T	Y	G	
<i>B. jararaca</i>		E	-	D	L	W	Q	F	G	Q	M	M	N	D	V	M	R	E	Y	V	V	F	N	Y	L	Y	Y	G		
		P3	-	C	Y	C	G	W	G	G	G	G	Q	P	R	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C		
		C	-	C	Y	C	G	W	G	G	G	G	T	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C		
		D	-	C	Y	C	G	W	G	G	G	G	Q	P	K	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C		
		E	-	C	Y	C	G	W	G	G	I	G	K	P	R	D	A	T	D	R	C	C	F	V	H	D	C	C		
		P3	-	Y	G	R	V	T	G																					
		C	-	Y	G	R	V	R	G																					
		D	-	Y	G	K	L	T	N																					
		E	-	Y	G	K	V	T	G																					

Figura 3. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos N-terminais de PLA₂ encontradas em venenos de algumas serpentes do gênero *Bothrops*. P1, A e B – K49-PLA₂. P3, C, D e E – D49-PLA₂. P1: K49-PLA₂ de *B. atrox*; P3: D49-PLA₂ de *B. atrox*; A: miotoxina II de *B. asper*; B: PLA₂ de *B. atrox*; C: PLA₂ de *Vipera ammodytes meridionalis*; D: PLA₂ de *B. jararacussu*; e E: PLA₂ de *B. jararaca*. Resíduos não-idênticos entre as seqüências são mostrados destacados. Setas: resíduos presentes na posição 49 que diferenciam os dois tipos de PLA₂. (Adaptada de Kanashiro *et al.*, 2002).

1.3 – A soroterapia e a busca por novos tratamentos

Apesar do alto número de registros de acidentes ofídicos, que ocorre não só no Brasil, e de uma enorme quantidade de informações acerca da natureza dos venenos animais terem sido relatadas na literatura científica nas últimas décadas, não foram adicionadas novidades na terapia dos envenenamentos por toxinas animais. O único tratamento existente, desde as últimas décadas do século XIX, ainda é a soroterapia (Rucavado & Lomonte, 1996).

A soroterapia consiste em injetar no paciente um soro antiveneno composto por anticorpos, ou fragmentos de anticorpos policlonais produzidos principalmente em equínos (Rucavado & Lomonte, 1996). Entretanto, por esses antivenenos comerciais serem produzidos

contra uma mistura dos venenos de serpentes do mesmo gênero (Ex: soro botrópico, soro crotálico), eles normalmente não são capazes de neutralizar todas as atividades antigênicas dos venenos, podendo inclusive não ter nenhum tipo de neutralização dependendo da espécie (Zamunér *et al.*, 2004 e Silva *et al.*, 2007).

Foi observado, por exemplo, que a atividade mionecrosante do veneno de *Bothrops jararacussu* não apresenta neutralização pelo soro anti-botrópico comercial brasileiro produzido pelo Instituto Vital Brasil (Zamunér *et al.*, 2004). Esse soro anti-botrópico é feito com uma mistura de venenos do gênero *Bothrops*, sendo que nessa mistura não está o veneno de *B. atrox*, que apresenta 56% de neutralização da atividade mionecrosante por esse soro (Pardal *et al.*, 2004).

Mas o maior problema do tratamento soroterápico tradicional é que, por apresentar grande quantidade de substâncias heterólogas ao paciente, como os próprios anticorpos eqüinos, e devido à necessidade de se aplicar várias doses repetidas, esse tratamento pode gerar respostas imunológicas adversas (Tamarozzi *et al.*, 2006). A frequência relatada dessas respostas é muito variável, de 4,6% até 87,2%, e variam desde respostas leves como urticária, tremores, tosse, náuseas, dor abdominal, prurido e rubor facial, até respostas graves, mais raramente, semelhantes à reação anafilática ou anafilactóide, com arritmias cardíacas, hipotensão arterial, insuficiência renal e choque e/ou quadro obstrutivo das vias respiratórias (Brasil, 2001).

Devido as graves conseqüências que podem ser causadas pelos acidentes ofídicos e as reações causadas pelo tratamento soroterápico tradicional, vêm se aumentando as buscas por tratamentos alternativos mais efetivos, como por exemplo, o uso de inibidores naturais de origem animal e vegetal.

Dentre esses inibidores estão alguns polissacarídeos aniônicos como a heparina, que já demonstrou ser um inibidor da atividade catalítica da PLA₂ de *B. jararacussu* (Melo *et al.*, 1993) e de *B. asper* (Lomonte *et al.*, 1994); alguns polissacarídeos sulfatados como o fucoidan, que se mostrou capaz de neutralizar os efeitos citotóxico e miotóxico da PLA₂ de vários venenos crotálicos por se ligar à região C-terminal da proteína, citada anteriormente como responsável pela interação e desestabilização da membrana plasmática (Lomonte & Angulo, 2003); e alguns peptídeos inibitórios encontrados nas próprias serpentes, como o AnMIP isolado recentemente do plasma de *Atropoides nummifer* da América Central, que se

mostrou capaz de inibir não só a PLA₂ isolada da própria *A. nummifer* como também de *B. asper* (Quirós *et al.*, 2007).

Dentre esses novos tratamentos propostos está também o uso de anticorpos específicos para as enzimas responsáveis pelas ações fisiopatológicas do veneno (como a PLA₂) e menos imunogênicos ao paciente, como os anticorpos monoclonais (mAbs), anticorpos específicos produzidos por um único clone de células B. Essas imunoglobulinas vêm se mostrando tão eficazes na neutralização dos efeitos do envenenamento quanto os soros policlonais presentes nos antivenenos (Gutiérrez & Lomonte, 1995, Tamarozzi *et al.*, 2006), uma vez que se mostraram capazes de neutralizar alguns dos seus efeitos como a atividade miotóxica da própria PLA₂ em mais de 80%, em experimentos realizados em camundongos (Gutiérrez & Lomonte, 1995, Kanashiro *et al.*, 2002).

Sabendo disso, após a caracterização de dois tipos de PLA₂ do veneno de *B. atrox*, uma pertencente as K49-PLA₂ e outra as D49-PLA₂, Kanashiro e colaboradores, 2002, conseguiram produzir dois anticorpos monoclonais, 12DG6 e A85/9-4, desenvolvidos contra essas enzimas capazes de inibir a atividade miotóxica, porém não a edematogênica, quando as fosfolipases eram pré-incubadas com os mAbs e injetadas em camundongos.

1.4 – Imunoglobulinas

O que se busca ao se utilizar os soros de animais imunizados com peçonhas de serpentes para o tratamento de acidentes ofídicos é a obtenção de anticorpos que neutralizem a atividade desses venenos. Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas que têm a capacidade de se ligar a antígenos especificamente e recrutar sistemas efetores para eliminá-los. A classe mais comum e abundante de imunoglobulina é a IgG, sendo, inclusive, predominante entre os anticorpos de uso terapêutico (Kim *et al.*, 2005).

Cada IgG é formada por duas cadeias leves e por duas cadeias pesadas idênticas entre si. Cada cadeia leve é composta de um domínio variável (VL) e um constante (CL), e cada cadeia pesada é composta de um domínio variável (VH) e três constantes (CH1, CH2 e CH3). Dentro de cada VH e VL são encontradas três alças, chamadas regiões determinantes de complementaridade, as CDRs 1, 2 e 3, que juntas formam os sítios de ligação ao antígeno, o paratopo. Este corresponde a uma superfície complementar ao epítopo (região que é

reconhecida no antígeno) e define sua especificidade (Abbas *et al.*, 2000) (Figura 4). A localização das CDRs é bem definida e conservada podendo ser identificadas pela numeração dos resíduos de aminoácidos das seqüências de VH e VL segundo Kabat *et al.*, 1991.

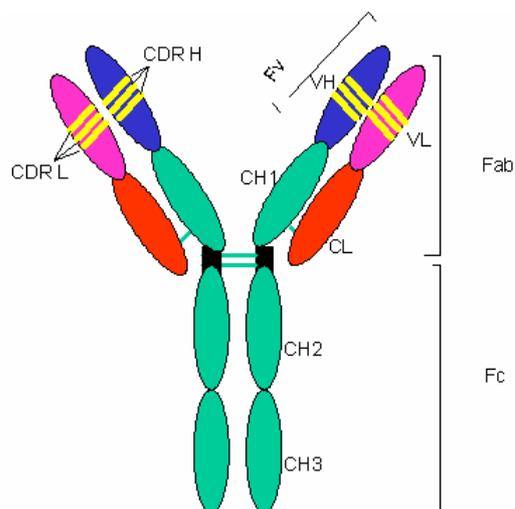


Figura 4. Representação esquemática de uma IgG. Em verde, domínios constantes da cadeia pesada. Em vermelho, domínios constantes da cadeia leve. Em azul, domínio variável da cadeia pesada (VH). Em rosa, domínio variável da cadeia leve (VL). Linhas amarelas, CDRs – regiões determinantes de complementaridade. Fv – fragmento variável, Fc – fragmento cristalizável e Fab – fragmento oriundo da digestão com papaína (adaptado de Maranhão & Brígido, 2001).

Desde o estabelecimento da técnica de produção de hibridomas para a obtenção de anticorpos monoclonais, em 1975, e da aprovação pela FDA – *Food and Drug Administration* - do primeiro mAb (o anti-CD3 OKT3 usado para redução de rejeição a transplantes) em 1986, a busca pelo uso de mAbs na terapia vem crescendo exponencialmente. Graças às inovações tecnológicas e ao desenvolvimento de anticorpos engenheirados para a terapia essa área representa uma das áreas de maior crescimento na indústria farmacêutica atual, com 19 deles já em uso clínico e mais de 150 em fases de teste, movimentando um mercado de mais de 30 bilhões de dólares anuais (Kim *et al.*, 2005).

Porém, apesar do uso de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos ter um grande potencial, esses tipo de tratamento possui uma duração limitada, pois como são de origem murina, ou seja, produzidos a partir de hibridomas vindos de esplenócitos de camundongos, os mAbs são imunogênicos, isto é, provocam uma resposta humoral no organismo do paciente, conhecida como a resposta HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*) (Isaacs *et al.*, 1992). Em

testes realizados foi verificado que a resposta HAMA ocorre em mais de 80% dos pacientes (Hwang & Foote, 2005). Como consequência dessa resposta os mAbs são rapidamente eliminados do corpo do paciente além de levar a uma resistência à terapia, que pode ocorrer por eliminação desses anticorpos ou sua neutralização (Tsurushita *et al.*, 2005).

Desde a década de 1980 vários estudos vêm sendo feitos com o objetivo de se reduzir a imunogenicidade dos mAbs. Esses estudos são baseados na tentativa de se humanizar esses anticorpos, ou seja, por meio de manipulações genéticas, trocar o máximo possível de resíduos murinos para resíduos humanos (Kashmiri *et al.*, 2005).

1.4.1 – Humanização de anticorpos

A humanização de anticorpos de interesse clínico visa à produção de anticorpos recombinantes derivados de anticorpos monoclonais murinos com uso potencial na clínica médica. Busca-se deste modo produzir biofármacos com imunogenicidade reduzida e com uma ação efetora melhor. A estratégia de trabalho envolve a substituição progressiva das seqüências murinas por seqüências homólogas humanas, visando obter moléculas com o maior número possível de resíduos humanos enquanto se preserva a atividade ligante (Morrison *et al.*, 1984).

Inicialmente os anticorpos humanizados consistiam em moléculas quiméricas, com as regiões constantes (responsáveis pelas atividades efetoras) de imunoglobulinas humanas fusionadas às regiões variáveis (responsáveis pela interação com o antígeno) dos anticorpos murinos produzidos pelo hibridoma (Morrison *et al.*, 1984) (Figura 5). Sendo os dois anticorpos recombinantes mais vendidos atualmente dois anticorpos quiméricos: o anti-TNF α Remicade[®], Centocor, e o anti-CD20 Rituximab[®], IDEC, que juntos movimentam um mercado de mais de 3 bilhões de dólares anuais (Walsh, 2005). Entretanto, apesar de serem menos imunogênicos que os anticorpos murinos, esses anticorpos quiméricos ainda provocam uma resposta em 40% dos pacientes conhecida como resposta HACA (*Human Anti-Chimeric Antibody*) (Hwang & Foote, 2005).

Atualmente, entretanto, trabalha-se com um nível ainda maior de humanização dos anticorpos por meio da técnica de *CDR-grafting*, ou humanização por transplante de CDR. A técnica de *CDR-grafting* consiste na transferência das CDRs, presentes nas cadeias variáveis

leve (VL) e pesada (VH), de um anticorpo murino para um arcabouço humano mais similar ao murino (Caldas *et al.*, 2000) (Figura 5).

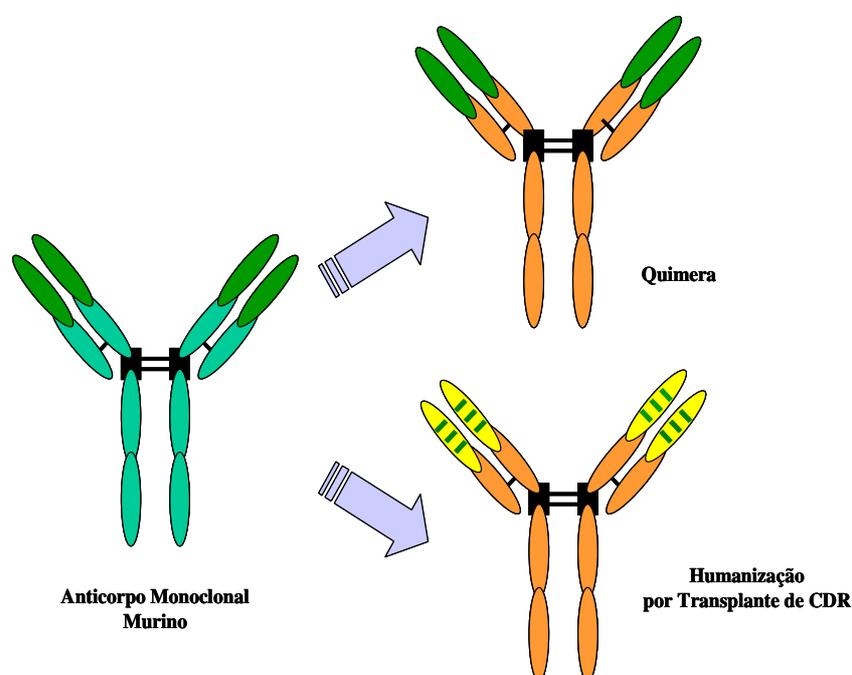


Figura 5. Representação esquemática das técnicas de humanização de anticorpos. Em verde, o anticorpo monoclonal murino. A molécula quimera originada da fusão das cadeias variáveis leve e pesada murinas com os domínios constantes humanos (em laranja). E o anticorpo humanizado pelo transplante das CDR murinas (linhas verdes) transferidas para arcabouços variáveis humanos, em amarelo (Maranhão & Brígido, 2001).

O primeiro anticorpo humanizado pela técnica de transplante de CDR foi aprovado para uso clínico em 1997 (o anti-IL2R Zenapax[®], PDL) e desde então várias humanizações vem sendo realizadas com muitos anticorpos humanizados em fase de testes clínicos e alguns já aprovados para uso na terapia (Kim *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que esses anticorpos humanizados permanecem mais tempo no organismo do paciente, demoram mais tempo a induzir uma resistência à terapia e provocam uma resposta, conhecida como resposta HAAA – *Human Anti-Humanized Antibody* – em apenas 9% dos pacientes (Hwang & Foote, 2005).

A humanização por transplante de CDR ainda é a técnica mais utilizada atualmente, entretanto é discutida a necessidade de se manter alguns resíduos de aminoácidos murinos nos arcabouços humanos, resíduos considerados importantes para a manutenção da estrutura das CDRs murinas transplantadas para os arcabouços humanos (Tsurushita *et al.*, 2005).

Entretanto, outras técnicas de humanização vêm sendo desenvolvidas, todas com o objetivo de reduzir ao mínimo possível o número de resíduos murinos no anticorpo humanizado.

Dentre essas técnicas podem ser citadas, por exemplo, a escolha dos arcabouços humanos germinais que receberão as CDRs murinas pela similaridade entre as estruturas tridimensionais das CDRs murinas e as CDRs humanas do anticorpo humano germinal escolhido, desenvolvida com sucesso para o anticorpo anti-lisozima D1.3., por Hwang e colaboradores, 2005. Ou a análise dos resíduos de aminoácidos cruciais para a ligação do anticorpo murino ao antígeno e transferência apenas desses resíduos para o anticorpo humano germinal, e não das CDRs inteiras, realizada com sucesso para um anticorpo que reconhece a glicoproteína associada a tumor TAG-72, por Kashmiri e colaboradores, 2005. Ou ainda a busca do melhor arcabouço humano fusionando as CDRs murinas a uma mistura de arcabouços germinais humanos e realizando um *shuffling* ou varredura daqueles que mantiveram a melhor afinidade de ligação ao antígeno, também realizada com sucesso para uma anticorpo anti-EphA2 (receptor de tirosina quinase humano super expresso em muitos cânceres), por Dall'Acqua e colaboradores, 2005.

1.5 – Expressão heteróloga de anticorpos e fragmentos de anticorpos

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e das técnicas de produção de proteínas heterólogas em microorganismos vem possibilitando vários avanços na produção de anticorpos (Maranhão & Brígido, 2001). Inicialmente os anticorpos aprovados para uso clínico eram anticorpos inteiros e produzidos em células de mamífero, entretanto, atualmente a produção de anticorpos de interesse clínico na forma de fragmentos vem aumentando, no intuito de facilitar sua produção em microorganismos (como a bactéria *Escherichia coli* e em leveduras como a *Pichia pastoris*) e aumentar a taxa de produção (Chapman *et al.*, 1999).

A expressão de um anticorpo de interesse na forma de fragmentos depende da função que se quer obter desse anticorpo. Caso seja necessária a função efetora do anticorpo na terapia é preciso se manter a região Fc (como o FvFc). O Fc é responsável pelas atividades efectoras dos anticorpos, ou seja, é a região que é reconhecida pelos demais componentes do sistema imune levando à respostas como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a citotoxicidade dependente do sistema complemento (CDC) (Abbas *et al.*, 2000).

Já em outros casos outros fragmentos que mantêm a ligação ao antígeno, mas não possuem o Fc (como o Fab e o scFv), podem ser usados, por exemplo, para diagnósticos, *delivery* de drogas, quando se busca apenas a formação de imunocomplexos, quando se deseja uma eliminação rápida desses fragmentos do organismo ou quando não se deseja as respostas efetoras oriundas da região Fc (revisado por Holliger & Hudson, 2005 e por Chowdhury & Wu, 2005) (Figura 6).

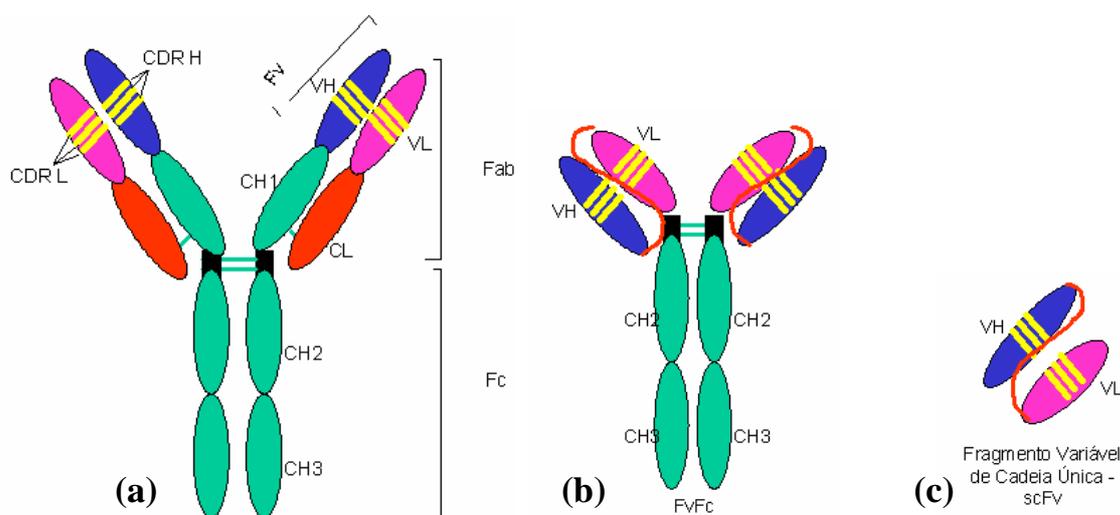


Figura 6. Representação esquemática de alguns fragmentos de anticorpos. Comparação entre uma IgG inteira (a) o fragmento FvFc, que apresenta a região Fc e duas porções variáveis (b), e o fragmento variável de cadeia única, scFv (c). Em verde, regiões constantes da cadeia pesada; em vermelho, regiões constantes da cadeia leve; em rosa, regiões variáveis da cadeia leve (VL); em azul, regiões variáveis da cadeia pesada. Linhas amarelas, CDRs – regiões determinantes de complementaridade. Linha vermelha – peptídeo conector. Fv – fragmento variável, Fc – fragmento cristalizável e Fab – fragmento oriundo da digestão com papaína (adaptado de Maranhão e Brígido, 2001).

Vários fragmentos de anticorpos, principalmente scFvs, já foram expressos em *E. coli*, entretanto, como na maioria das vezes esse fragmento fica retido no periplasma da bactéria a taxa de produção final do scFv purificado é baixa, em geral em torno de microgramas de proteína por litro de cultura, dificilmente ultrapassando 2 mg/L (Freyre *et al.*, 2000 e Damasceno *et al.*, 2004). Por isso, atualmente busca-se a produção desses fragmentos em outros microorganismos, como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Estas leveduras vêm demonstrando altos níveis de expressão de fragmentos como o scFv, chegando a atingir taxas de produção de gramas de proteína final purificada por litro de

cultura, como a expressão de 1,2 g/L de um scFv anti-antígeno carcinoembrionário realizada por Freyre e colaboradores, 2000, ou a expressão de 4 g/L de um scFv humanizado anti-A33 (glicoproteína expressa em câncer de cólon) conseguida por Damasceno e colaboradores, 2004.

1.5.1 – Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Durante as duas últimas décadas, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem se mostrado um modelo de sucesso de produção de proteínas heterólogas e é o sistema de expressão que tem se mostrado mais eficiente para a produção de fragmentos de anticorpos funcionais. Isso se deve à simplicidade das técnicas de manipulação genética dessa levedura, à sua capacidade de produção e secreção de altos níveis de proteínas heterólogas e a sua capacidade de realizar várias modificações pós-traducionais eucarióticas, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Cereghino & Cregg, 2000).

Em relação a outras leveduras utilizadas para a expressão de genes, como *Saccharomyces cerevisiae*, a *P. pastoris* tem a vantagem de não realizar a hiperglicosilação da proteína secretada, como acontece na primeira, fato que poderia tornar a proteína mais imunogênica em humanos e/ou interferir no enovelamento da mesma, tornando-a biologicamente inapta (Cregg, 1999). A expectativa de sua utilização para produção de biofármacos cresce com o desenvolvimento de linhagens modificadas para reproduzir padrões de glicosilação humanos (Li *et al.*, 2006).

Uma outra vantagem da utilização desse modelo de produção é a possibilidade de se utilizar metanol como indutor da expressão da proteína heteróloga. Isso se deve ao fato de que, por ser uma levedura metilotrófica, a *P. pastoris* pode usar o metanol como única fonte de carbono e energia reduzindo os custos da produção heteróloga. Para isso a enzima álcool oxidase (AOX), catalisadora da primeira reação de metabolização de metanol na presença de oxigênio, deve ser expressa em altos níveis, pois apresenta baixa afinidade por oxigênio. Isso faz com que a AOX possa representar 30% das proteínas totais celulares neste momento. E, portanto a utilização do promotor da AOX é um dos grandes responsáveis pelos altos níveis de produção das proteínas heterólogas (Cereghino & Cregg, 2000).

Além disso, diversas proteínas heterólogas, incluindo fragmentos de anticorpos têm sido expressos na forma extracelular com sucesso nessa levedura, chegando a atingir um nível de produção de 25 mg/L em culturas em frasco de 1L (Shi *et al.*, 2003) e até mesmo 1,2 e 4 g/L em bioreatores, como citado anteriormente (Freyre *et al.*, 2000 e Damasceno *et al.*, 2004). Essa produção extracelular ainda tem como vantagem facilitar os métodos de purificação.

Alguns fragmentos de anticorpos já foram produzidos extracelularmente em *Pichia pastoris* pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, como o scFv anti-CD18 (Caldas *et al.*, 2003), o scFv anti-CD3 (Costa, 2004) e o Fab anti-Z-DNA (Burtet, 2006). Todos utilizando vetores de expressão desenvolvidos e melhorados pelo grupo e expressos com rendimento de 2 a 100mg/L nas fermentações em frasco.

1.6 – A humanização do anticorpo anti-PLA₂ de *Bothrops atrox*

A técnica de humanização realizada no presente trabalho foi por meio de transplante de CDR (Figura 5). Os fragmentos VH e VL do anticorpo monoclonal murino produzido por Kanashiro e colaboradores (2002), foram isolados por RT PCR, usando o RNA total extraído do hibridoma como molde, para a produção do DNA complementar (cDNA). Esse cDNA foi então utilizado numa reação de PCR com iniciadores específicos para amplificação de VH e VL do mAb anti-PLA₂, descritos em Caldas, 1999. Os fragmentos VH e VL obtidos nessas PCRs foram posteriormente clonados em pGEM-T EASY, conforme instruções do fabricante (Promega), e seqüenciados pelo método do dideóxido utilizando o seqüenciador automático MegaBace (GE Healthcare[®]). Essa parte do trabalho foi realizada anteriormente ao início do mestrado.

Para a expressão dos fragmentos anti-PLA₂ murinos e humanizados foi utilizado o vetor de expressão extracelular em *P. pastoris* pPIg LE scFv (Figura 7), que no caso dos FvFcS teve a região da proteína A trocada pelo CH2-CH3 humano. Esse vetor é uma versão adaptada do vetor comercial pPIc 9 (Invitrogen[®]) que foi modificado inicialmente por Andrade e colaboradores (2000) acrescentando-se sítios de clonagens e a própria seqüência da proteína A, com o objetivo de torná-lo ideal para a expressão de scFvs recombinantes. O vetor construído por Andrade e colaboradores (2000), chamado de pPIg 16, foi novamente

melhorado por Luana Quilici, em seu projeto de PIBIC (2005), por meio da retirada de sítios de restrição indesejáveis e adição de um oligonucleotídeo sintético chamado Oligo E.

O Oligo E trata-se de um pequeno seguimento de DNA (5'-TCGAAAAAAGAGAGGCTGAAGCCGAGCTCGCCCGG-3') que foi inserido no plasmídeo entre a região final do peptídeo sinal e início do scFv. A inserção desse oligo teve como objetivo eliminar um sítio indesejado de *Xho* I, inserir um novo sítio de clonagem de *Sac* II e trocar o primeiro aminoácido existente após o sítio de clivagem da peptidase de uma lisina para um ácido glutâmico, por isso o nome Oligo E. A troca desse resíduo foi feita devido a observação de que nas seqüências de anticorpos depositadas em bancos de dados o ácido glutâmico é o aminoácido mais comumente encontrado nessa região dos anticorpos, e teve como objetivo aumentar a meia-vida do fragmento de anticorpo, melhorando assim a eficiência do sistema de expressão.

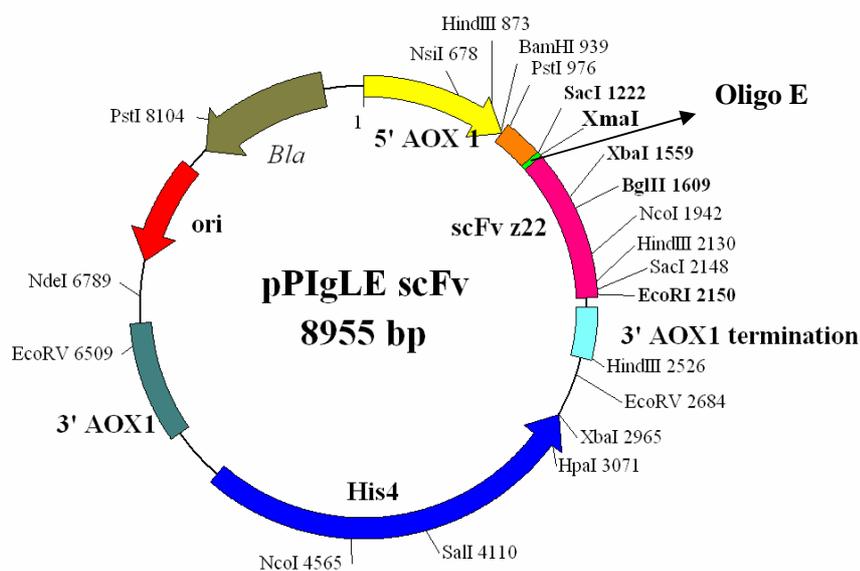


Figura 7. Representação esquemática do vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPIgLE scFv. Mostrando a região promotora e terminadora do gene AOX1, a origem de replicação bacteriana, a marca de seleção auxotrófica *His4*, o Oligo E, o peptídeo sinal para secreção (laranja) e o cassete de expressão com os sítios de clonagem (<http://www.unb.br/ib/cel/imol/material.html>).

Como pode ser observado na figura 7 o vetor final contém também as regiões promotoras e terminadoras do gene *AOX1* e a marca de seleção auxotrófica *HIS4*, que codifica a enzima histidinol desidrogenase, já que a linhagem escolhida para a expressão dos fragmentos anti-PLA₂ foi a GS115 que apresenta o fenótipo *his4*⁻. O que possibilita a seleção de clones transformados com o plasmídio utilizando-se meio de cultura sem histidina.

2 – Justificativa

Devido as graves conseqüências dos acidentes ofídicos e as reações causadas pelo tratamento soroterápico tradicional vêm se aumentando as buscas por tratamentos alternativos mais efetivos. Dentre esses novos tratamentos propostos está também o uso de anticorpos mais específicos às enzimas responsáveis pelas ações fisiopatológicas do veneno (como a PLA₂) e menos imunogênicos ao paciente, como os anticorpos monoclonais (mAbs).

Sabendo disso, após a caracterização de dois tipos de PLA₂ do veneno de *B. atrox* Kanashiro e colaboradores, 2002, do grupo do Professor Wilmar Dias da Silva, do Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), conseguiram produzir dois anticorpos monoclonais (12DG6 e A85/9-4) desenvolvidos contra a PLA₂ de *B. atrox* capazes de inibir a atividade miotóxica quando esta enzima foi pré-incubada com os mAbs e injetadas em camundongos.

Entretanto como o uso dos mAbs na terapia pode ser limitado pela resposta do paciente a esses anticorpos o grupo da UENF buscou uma associação ao grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília para a humanização deste anticorpo, visando humanizar um dos anticorpos monoclonais anti-PLA₂ de *Bothrops atrox* produzidos por Kanashiro e col. (2002). Sendo então o objetivo desse trabalho a proposição e montagem de versões humanizadas anti-PLA₂, além da expressão heteróloga desse anticorpo humanizado e a verificação da manutenção de sua atividade ligante a PLA₂.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo geral

Humanização do anticorpo A85/9-4 anti-PLA₂ de *Bothrops atrox* de origem murina produzido por Kanashiro e colaboradores, 2002, e sua expressão na forma de fragmentos de anticorpos.

3.2 – Objetivos específicos

- Proposição e síntese da versão humanizada do anti-PLA₂ a partir das seqüências das regiões variáveis pesada (VH) e leve (VL) do anticorpo murino;

- Clonagens dos anticorpos, murino e humanizado, em vetores de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*;

- Expressão desses anticorpos, na forma dos fragmentos scFv e FvFc, na levedura *Pichia pastoris*;

- Purificação dos fragmentos de anticorpos;

- Análise da atividade ligante desses fragmentos de anticorpos humanizados à PLA₂ de *Bothrops atrox*.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1 – Células

4.1.1.1 - Linhagens Bacterianas

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

- **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 anti-PLA₂.

4.1.1.2 - Linhagem de *Pichia pastoris*

- **GS 115 (Invitrogen[®])** → *his4*. Fenótipo: His⁻, Mut⁺

Esta linhagem de *P. pastoris* foi utilizada para a integração, no locus *HIS4* genômico, do plasmídio com o gene de interesse, para a expressão dos fragmentos de anticorpos anti-PLA₂ recombinantes sob controle do promotor *AOX1*.

4.1.2 - Plasmídios Utilizados

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

- **pIg 16 z22** – 4,8kb, VH-linker-VL-spA anti-zDNA (scFv conjugado à proteína A), múltiplos sítios de clonagem, ori ColE1, Amp^R. Utilizado para a construção dos fragmentos scFvs (Brígido *et al.*, 1993).

- **pPIg LE scFv** – 8,895kb, VH-linker-VL-spA (scFv conjugado à proteína A), fragmentos 5´ e 3´ do promotor *AOX1*, sinal de secreção do fator α , múltiplos sítios de clonagem, *HIS4* ORF, ori ColE1, Amp^R, derivado do pPIg16 (ver Introdução, tópico 1.6, Figura 7).

- **pPIg LE FvFc** – derivado do pPIg LE scFv pela substituição da seqüência da proteína A pela seqüência CH2-CH3 humana, entre os sítios *Xho* I e *EcoR* I.

4.1.3 - Meios de cultura 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)

Ajustar pH para 7,0.

Meio LB ágar

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

Meio SB (*Super Broth*)

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

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

MOPS 1,0% (p/v)

Ajustar pH para 7,0.

Meio SOB

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

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

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

Ajustar pH para 7,0.

Meio SOC

Meio SOB 98mL

Solução estoque de Mg^{2+} 2M 1mL

Solução estoque de glicose 2M 1mL

Solução estoque de glicose 2M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2M

$MgCl_2$ 1M

$MgSO_4$ 1M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

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

4.1.4 - Meios de cultura e soluções estoque para levedura

YP 10X - Solução estoque 10X de Extrato de levedura e Peptona de caseína

Extrato de levedura 10% (p/v)

Peptona de caseína 20% (p/v)

Esterilizada em autoclave por 20 minutos a 120°C e estocada a temperatura ambiente.

YNB (*Yeast Nitrogen Base*) - Solução estoque 10X

YNB* 3,4% (p/v)

Sulfato de amônio 10% (p/v)

Esterilizada por filtração. Estocada a 4 °C.

*(s/ aminoácidos e s/ sulfato de amônio).

Tampão Fosfato de Potássio 1M, pH6,0

K_2HPO_4 132mM

KH_2PO_4 686mM

Esterilizada em autoclave por 20 minutos a 120°C e estocada a temperatura ambiente.

Antiespumante

Antifoam A Emulsion. Sigma[®] Número de catálogo A5738

Biotina - Solução estoque 500X

Biotina 0,02% (p/v)

Esterilizada por filtração em membrana microbiológica com poros de 0,22 µm e estocada a 4°C.

Casaminoácidos – Solução estoque 10X

Casaminoácidos 20%

Esterilizada em autoclave por 20 minutos a 120°C e estocada a 4°C.

Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*)

Extrato de levedura 1,0% (p/v)

Peptona de caseína 2,0% (p/v)

Glicose 2,0% (p/v)

Eram feitas soluções estoques de glicose 20% e de extrato de levedura e peptona (10% e 20% respectivamente) que eram autoclavadas a 120°C por 20 minutos. No momento da utilização as soluções estoque eram misturadas para se obter as concentrações acima relacionadas com o volume apropriado de H₂O destilada autoclavada.

Meio MD (*Minimal Dextrose Medium*)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Glicose	2,0% (p/v)
Ágar bacteriológico	1,4% (p/v)

Eram feitas soluções estoques de YNB 13,4%, Biotina 500X, Glicose 20% e Ágar 2%, que eram autoclavadas por 20 minutos a 120°C. No momento da utilização as soluções eram misturadas para se obter as concentrações acima relacionadas.

Meio MM (*Minimal Methanol Medium*)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Metanol	0,5% (v/v)
Ágar bacteriológico	1,4% (p/v)

Eram feitas soluções estoques de YNB 13,4%, Biotina 500X e Ágar 2%, que eram autoclavadas por 20 minutos a 120°C. No momento da utilização as soluções eram misturadas para se obter as concentrações acima relacionadas.

Meio de Crescimento – BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)

YP 10X	10%
Tampão fosfato, pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)

Meio de Indução – BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*)

YP 10X	10%
Tampão fosfato, pH 6,0	100 mM
YNB	1,34% (p/v)
Biotina	4×10^{-5} % (p/v)
Casaminoácidos	2%
EDTA	5mM
Metanol	1% (v/v)

Para preparo dos meios BMGY e BMMY, eram preparadas as soluções estoques YP 10X (extrato de levedura e peptona de caseína) - autoclavada por 20 minutos a 120°C - e dos demais reagentes (YNB, Biotina, EDTA) esterilizados por filtração ou por autoclavagem (casaminoácidos, glicerol e tampão fosfato de potássio). No momento da utilização as soluções estoque eram misturadas para se obter as concentrações acima relacionadas com H₂O destilada autoclavada.

4.1.5 - Soluções estoque de inibidores de proteases**PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,2 M**

Dissolvido 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. Concentração de uso 1mM.

EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

Dissolvido em água em pH 8-9 estocado a 4°C por até 6 meses. É um inibidor de metaloproteases. Concentração de uso 5 mM.

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

Azida sódica	5% (p/v)
--------------	----------

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

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

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

NaCl 1,37M

KCl 27mM

Na₂HPO₄ 100mM

KH₂PO₄ 20mM

Tampão PBST 1X, pH 7,4

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

IPTG 0,1M

Solução estoque a 0,1M

Dissolvido em H₂O e estocado a 4°C ao abrigo da luz.

X-GAL

Solução estoque 20mg/ml

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

4.1.7 – Soluções para preparo de células competentes – bactéria e levedura

Solução de CaCl₂

CaCl₂ 50mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 10% (v/v)

Esterilizado por filtração ou autoclavagem e estocada a 4°C

Sorbitol

Solução 1M

Esterilizada por filtração ou autoclavagem e estocada a 4°C

4.1.8 - Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I

Tris-HCl pH 8,0 25mM

EDTA pH 8,0 10mM

Glicose 50mM

Solução II

NaOH 0,2M

SDS 1,0% (p/v)

Solução III

Acetato de potássio 3M

Ácido Acético 2M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

RNase A

RNase A Invitrogen, número de catálogo 12091-021.

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6 1v

Clorofórmio 1v

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

Clorofil

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

4.1.9 – Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

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

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídio 20.000X

Brometo de etídio 10mg/ml

Tampão de corrida para SDS-PAGE 5X

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

Tampão de amostra 2X para SDS-PAGE

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

Acrilamida 30% (29:1)

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

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris	36,34g
H ₂ O q.s.p.	200mL

pH ajustado para 8,8 com HCl.

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

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200mL

pH ajustado para 6,8 com HCl.

SDS 10%

SDS	10g
H ₂ O q.s.p.	100mL

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio 100mg/ml de água

Gel Concentrador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4% (p/v)
--	----------

Tris-HCl pH 6,8	125mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

Gel Separador SDS-PAGE

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	10 ou 12% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400mM
SDS	0,1% (p/v)
APS	0,1% (p/v)
TEMED	0,01% (p/v)

4.1.10 - 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)

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

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

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

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas

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

Solução de Bloqueio

Leite em pó desnatado Molico 5% (p/v)

Dissolvido em PBST 1X

Solução Reveladora para ELISA

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

Dissolvido em APB

Solução Reveladora para Western, Colony e Dot blotting

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

Veneno de *Bothrops atrox*

O veneno liofilizado foi ressuspenso em PBS 1X com azida sódica 0,02% na concentração final de 1mg/mL e estocado a 4°C.

PLA₂ de *B. atrox* purificada

Solução estoque a 430µg/mL. Estocada a 4°C.

Anticorpo monoclonal murino anti-PLA₂ de *B. atrox*

Solução estoque a 1mg/mL em PBS 1X com azida sódica 0,02%. Estocado a 4°C.

Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra Amersham Bioscience[®] (nº. cat. RPN 303E)

4.1.12 – Oligonucleotídeos sintéticos específicos**Tabela 1. Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.**

Oligo	Seqüência	Utilização
VHmur <i>Xma</i> I	5' GCC CGG GTG CAG CTG AAG CAG T 3'	Para amplificação da extremidade 5' da cadeia VH murina criando sítio de <i>Xma</i> I
VHmur <i>Xba</i> I	5' GCT CTA GAG GAG ACT GTG AGA GTG GT 3'	Para amplificação da extremidade 3' da cadeia VH murina criando sítio de <i>Xba</i> I
VLmur <i>Bgl</i> II	5' GCA GAT CTC GTG ATG ACC CAG TCT CCA 3'	Para amplificação da extremidade 5' da cadeia VL murina criando sítio de <i>Bgl</i> II
VLmur <i>Nco</i> I	5' CGC CCA TGG GCT TTG ATT TCC AGC TT 3'	Para amplificação da extremidade 3' da cadeia VL murina criando sítio de <i>Nco</i> I
AOX reverso	5' CCT GCA TCT CTC AGG CAA AT 3'	Para sequenciamento no vetor pPIg LE
pPIg direto	5' GGG ATT TCG ATG TTG CTG TT 3'	Para sequenciamento no vetor pPIg LE
5' Linker	5' CTC TAG AGG TGG GGG CGG TTC 3'	Para sequenciamento no vetor pPIg LE

4.1.13 - Resinas cromatográficas

- IgG Sepharose - preparada por Andrade e colaboradores (2000) conjugando-se a resina Sepharose (Invitrogen) com Imunoglobulina humana comercial. Para purificação dos scFvs conjugados a proteína A

- HiTrapTM Protein A HP 1mL (GE Healthcare, n°. cat. 17-0402-01). Para purificação dos FvFcs.

- Superose 12 (GE Healthcare, n°. cat. 17-0674-01). Para cromatografia por filtração em gel.

4.1.14 – Soluções para cromatografias

Tampão de Equilíbrio IgG-Sepharose

PBS 1X

Tampão de Eluição IgG-Sepharose

Ácido Acético 0,5M, pH 3,5

Tampão de Equilíbrio HiTrap Protein A

Fosfato de Sódio 20mM, pH7,0

Tampão de Eluição HiTrap Protein A

Ácido Cítrico 0,1M, pH3,0

Tampão para cromatografia por Gel Filtração

PBS 1X

Padrões para Gel Filtração

Tabela 2. Marcadores padrões utilizados para Gel Filtração*

Reagentes	Número do produto	Massa Molecular aproximada (kDa)
Blue Dextran	D 4772	2.000
Albumina de Soro Bovina (BSA)	A 8531	66
Anidrase Carbônica	A 7025	29
Citocromo C	A 6834	12,4

* Sigma[®] n°. cat. MW-GF-200.

4.1.15 – Materiais utilizados para concentração e quantificação de sobrenadantes de cultura e proteínas purificadas

- Concentradores Amicon[®] Bioseparations:
 - Centricon YM-10 (n°. cat. 4206)
 - Centriprep YM-10 (n°. cat. 4305), YM-30 (n°. cat. 4307) e YM-50(n°. cat. 4308)
 - Microcon YM-100 (n°. cat 42413)
- Concentrador: Stirred Ultrafiltration Cell Millipore, Modelo 8400 (n°. cat. 5124)
- Membrana: Ultrafiltration Membrane. NMWL: 10.000 (n°. cat. 13642)
- Kit BCA – Ácido Bicinrônico Pierce[®] (n°. cat. 23225)

4.1.16 – Marcadores para DNA e proteína

- 1Kb plus DNA Ladder – Invitrogen (n°. cat. 10787-026)
- Low Mass DNA Ladder – Para quantificação de DNA de baixa massa molecular - Invitrogen (n°. cat. 10068-013)
- High Mass DNA Ladder Para quantificação de DNA de alta massa molecular - Invitrogen (n°. cat. 10496-016)
- Bench Marker[™] Protein Ladder – Invitrogen (n°. cat. 10747-012)
- Bench Marker[™] Pre-Stained Protein Ladder – Invitrogen (n°. cat. 10748-010)
- Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder Plus – Fermentas (n°. cat. SM1811)
- Unstained Protein Molecular Weight Marker – Fermentas (n°. cat. SM0431)

4.1.17 - Enzimas

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

- T4 DNA Ligase – Invitrogen (n°. cat. 15224-017) e Promega (n°. cat. M 1801).

- Taq DNA Polimerase – CENBIOT.

4.1.18 – Anticorpos

Tabela 3. Anticorpos utilizados.

Nome	Produzido em:	Titulação Imunoblottings	Titulação ELISAS	Origem	Nº Catálogo
IgG Coelho	Coelho	1:1.000	1:2.500	Sigma [®]	I 8140
Anti-IgG Coelho (AP)*	Cabra	1:5.000	1:5.000	Sigma [®]	A 3687
Anti-Fc humano (AP)*	Coelho	1:2.500	1:5000	Pierce [®]	31142
Anti-IgG camundongo (AP)*	Cabra	1:5.000	1:5.000	Pierce [®]	31160
Anti-IgG Cabra (AP)*	Coelho	1:5.000	1:5.000	Pierce [®]	31300
Anti-PLA ₂ de <i>B. atrox</i>	Monoclonal	NA	variável	Kanashiro <i>et al.</i> , 2002	NA
IgG humana	Policlonal	NA	variável	Sigma [®]	K 9001
Anti-IgG humano H+L	Cabra	NA	1:500	Sigma [®]	A 8542

NA: Não se aplica.

* AP: Anticorpo conjugado a fosfatase alcalina.

4.1.19 – Kits comerciais

- pGEM-T EASY vector – Para clonagem dos fragmentos de PCR oriundos das ampliações feitas nas cadeias variáveis murinas (VH e VL) para inserção dos sítios de restrição (Promega, n°. cat. A 1360).
- QIAGEN Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação de DNA em escala intermediária (Qiagen, n°. cat. 12145).
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25 – Para preparação de DNA em larga escala (Qiagen, n°. cat. 12163).
- Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen, n°. cat. 28704).
- Qiaquick PCR purification kit 50 – Para purificação de DNA para sequenciamento (Qiagen, n°. cat. 28104).
- PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE Healthcare, n°. cat. 17-1150-01).
- Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore, n°. cat. 42600).
- Kit BCA – Ácido Bicíntrico (Pierce[®]) para quantificação de proteínas. (n°. cat. 23225).

4.2 – Métodos

4.2.1 – Preparação de DNA plasmidial

4.2.1.1 – Em pequena escala (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

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

- 2- Ressuspêndia-se o sedimento em 200µL de Solução I. Incubavam-se as amostras no gelo por 5 min.
- 3- Adicionavam-se 400µL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Adicionavam-se 300µL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 10 min.
- 4- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 5- Ao sobrenadante eram adicionados 5µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37°C.
- 6- Adicionava-se 1/2v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 10.000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 7- Adicionava-se 1/2v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 8- O DNA era então precipitado com 2,5v de etanol 100% por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 9- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 10- Adicionavam-se 200µL de etanol 70% e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 11- Após secagem o sedimento era ressuspêndido em 40µL de TE. E as amostras conservadas a 4°C.

4.2.1.2 – Em larga escala (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

- 1- Coletavam-se 200mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (100µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2- Ressuspêndia-se o sedimento em 5mL de Solução I. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.
- 3- Adicionavam-se 10mL 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 7,5mL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 20 min.
- 4- Centrifugava-se a 10.000 x g por 30 min a 4°C.

- 5- 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.
- 6- Desprezava-se o sobrenadante e, após a secagem, o sedimento era ressuscitado em 500µL de TE ao qual eram adicionados 10µL de RNase A. Incubava-se por 1 hora a 37°C.
- 7- Adicionava-se 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 10.000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 7- Adicionava-se 1v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 8- O DNA era então precipitado com 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 9- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 10- Adicionava-se 1mL de etanol 70% e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 11- Após secagem o sedimento era ressuscitado em 200µL de TE. E as amostras conservadas a 4°C.

4.2.2 – Digestão do DNA com enzimas de restrição.

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

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

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

4.2.4 – Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

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

4.2.5 – 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 1:2, 1:3 ou 1:5. 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*.

4.2.6 – Preparação de células competentes e transformação bacteriana

4.2.6.1 – Por choque térmico – CaCl₂ (adaptado de Maranhão in Azevedo *et al.*, 2003).

- 1- Inoculavam-se 500µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD_{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.
- 3- O sedimento era ressuscitado em 10mL 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 1mL de solução de CaCl₂ 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.

- 6- Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram aliqüotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.
- 7- Incubava-se de 100 a 200µL de célula competente com o DNA de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Adicionava-se imediatamente 1mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C.
- 10- Semeavam-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 100µg/mL. As placas eram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

4.2.6.2 – Por eletroporação (adaptado de Maranhão in Azevedo *et al.*, 2003).

- 1- Inoculava-se uma colônia isolada da célula de interesse em 10mL de meio SB contendo o antibiótico de interesse. Esse pré-inóculo era mantido a 37° sob agitação de 220 rpm por 16 horas.
- 2- Inoculava-se 1mL do pré-inóculo em 500mL de meio SB acrescido de 2,5mL da solução estoque de Glicose 2M e 2,5mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma OD_{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 ressuscitado em 25mL de Glicerol 10% estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de Glicerol 10% gelado.
- 4- Centrifugava-se a 3.000 x g por 20 min a 4°C, repetindo-se a etapa anterior.
- 5- O sedimento era ressuscitado em 25mL de Glicerol 10% estéril gelado e submetido a última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4°C.
- 6- O sedimento final era ressuscitado em 1 a 2mL de Glicerol 10% e as células eram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.

7- Para a transformação o DNA plasmidial, 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: 2,5kV, 25 μ F e 200 Ω , no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 milisegundos.

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

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

4.2.7 – Amplificação das seqüências variáveis murinas – PCR

As reações de PCR eram feitas da seguinte forma:

DNA molde (VH ou VL murinos)	100 η g
Primer 5'	25 μ M
Primer 3'	25 μ M
Tampão de reação da enzima 10X	1X
MgCl ₂	2mM
dNTPs	0,25 μ M de cada

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

- 1) 94°C 5 min
- 2) 25 ciclos: 57°C 1 min
 72°C 2 min
 94°C 30 seg
- 3) 72°C 10 min

4.2.8 - Preparação de DNA para transformação de *P. pastoris*

Aproximadamente 10 µg do plasmídeo foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *Sal* I. Essa enzima cliva o plasmídeo no gene *HIS4*, permitindo a integração do plasmídeo no locus do gene *his4* defectivo da levedura, após eficiente transformação.

A linearização dos plasmídios a serem transformados era confirmada por análise em gel de agarose. Após a confirmação o material era precipitado com acetato de sódio 0,3M e 2,5v de etanol 100% por no mínimo 2 horas a -20°C. Seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 45 min a 4°C, adição de 200µL de etanol 70% e nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sedimento era então ressuspendido em 10µL de H₂O miliQ estéril.

4.2.9 – Transformação da levedura *P. pastoris* por eletroporação (adaptado de Cregg *et al.*, 1985)

- 1- Inoculava-se uma colônia isolada da levedura *P. pastoris*, linhagem GS115, em 5 mL de meio YPD em um erlenmeyer de 125 mL. Incubava-se sob agitação a 30°C durante a noite.
- 2- Inoculava-se de 0,1 a 0,5mL desse pré-inóculo em 100mL de meio YPD em um erlenmeyer de 500 mL incubando-se nas mesmas condições anteriores durante a noite ou até que a cultura atingisse uma OD_{600nm} de 1,3 a 1,5.
- 3- As células eram então centrifugadas a 1.500 x *g* por 5 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.
- 4- Ressuspendia-se o sedimento em 100mL de H₂O destilada estéril gelada com forte movimentação.
- 5- Centrifugava-se novamente conforme o passo 3 e ressuspendia-se o sedimento em 50mL de H₂O destilada estéril gelada.
- 6- Centrifugava-se novamente nas mesmas condições e ressuspendia-se o sedimento em 10mL de Sorbitol 1M estéril gelado.
- 7- Centrifugava-se novamente nas mesmas condições e ressuspendia-se o sedimento em 0,8mL de Sorbitol 1M estéril gelado.
- 8- Misturava-se o DNA a ser transformado, previamente preparado conforme descrito em 4.2.8, com 80 a 100µL da célula preparada, e após uma incubação no gelo por 5 min

transferia-se o sistema de transformação para uma cubeta de eletroporação de 0,2cm, previamente resfriada.

9- A eletroporação era realizada no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad, nas seguintes condições: 1,5kV, 25 μ F e 400 Ω . O τ esperado nessas condições é de 10,0 milisegundos.

10- Adicionava-se imediatamente 1mL de Sorbitol 1M gelado e transferia-se as células para um tubo “eppendorf” de 1,5mL.

11- Semeava-se de 0,2 a 0,6mL do sistema de transformação em placas contendo meio MD, que eram incubadas em estufa a 30°C por 2 a 3 dias.

4.2.10 – Análise dos transformantes de *P. pastoris* por Colony blotting ou Western de colônia

1- Uma pequena porção de massa celular de alguns dos clones obtidos nas placas de transformação era repicada serialmente, com palitos estéreis, em duas placas de meio mínimo contendo metanol (MM) ou glicose (MD).

2- Incubava-se as placas a 30°C por 2 a 3 dias adicionando-se a cada 24 horas 500 μ L de metanol 100% na tampa das placas com meio MM.

3- Após esse tempo de indução montava-se um “sanduíche” sobre as placas MM da seguinte forma: membrana de nitrocelulose diretamente em contato com as colônias, 3 folhas de papel de filtro Watmann® 3 mm sobrepostas por várias camadas de papel toalha.

4- Colocava-se um peso sobre o “sanduíche” e o incubava a 30°C por 3 horas.

5- Passado o tempo de transferência, desmontava-se o sanduíche e a membrana era lavada com PBST 1X até a remoção completa do excesso de células.

6- Incubava-se a membrana com a solução de bloqueio por, no mínimo, 1 hora, sob agitação a 4°C.

7- Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.

8- Incubava-se a membrana com o anticorpo primário, diluído em PBS 1X, por 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.

9- Removia-se o anticorpo primário e lavava-se a membrana novamente 3X com PBST 1X.

10- Incubava-se a membrana com o anticorpo secundário (conjugado a fosfatase alcalina), diluído em PBS 1X, por mais 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.

11- Removia-se o anticorpo conjugado e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X e posteriormente 1X com 10mL de APB (tampão da fosfatase alcalina).

12- 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.

4.2.11 – Expressão das proteínas recombinantes em *P. pastoris* – fermentação em frasco (adaptado do Manual do kit de Expressão em *Pichia pastoris*, Invitrogen®)

1- Colônias que se mostravam positivas no *colony blotting* tinham suas réplicas correspondentes da placa MD inoculadas em 100 a 200mL de meio de crescimento BMGY num frasco erlenmeyer de 1L com aletas. Incubava-se sob agitação de 250 a 300 rpm e temperatura de 30°C durante 48 horas.

2- Coletavam-se as células por centrifugação a 1.500 x g por 5 min a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante.

3- Ressuspendiam-se as células em 100mL de H₂O destilada estéril a temperatura ambiente repetindo-se em seguida o mesmo procedimento de centrifugação.

4- Ressuspendiam-se as células em 100mL de meio de indução BMMY e incubava-se pelo tempo de crescimento desejado (24 a 96 horas) sob agitação de 250 a 300 rpm e temperatura de 20 a 30°C.

5- A cada 24 horas adicionava-se 1% de metanol para manter a indução. E, quando desejado, a cada 24 horas eram coletados 5mL da cultura para processamento do sobrenadante e análise da expressão da proteína recombinante.

6- Ao final do tempo desejado de indução centrifugavam-se as células várias vezes e o sobrenadante era filtrado com a membrana Millipore 0,45µm.

7- Concentrava-se o sobrenadante utilizando o sistema Amicon *Stirred Ultrafiltration Cell Millipore* com uma membrana de ultrafiltração (NMWL: 10.000).

8- Ao sobrenadante filtrado e concentrado eram adicionados os seguintes inibidores de protease: EDTA 0,6mg/mL e PMSF 100µg/mL.

4.2.12 – Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com TCA (ácido tricloroacético)

- 1- Coletava-se 1mL da amostra ao qual se acrescentavam 100µL de TCA 100%. Após homogeneização leve incubava-se em banho de água/gelo por 30 min.
- 2- Centrifugava-se a 10.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 3- Desprezava-se o sobrenadante e acrescentava-se 500µL de acetona 100% gelada.
- 4- Centrifugava-se a 10.000 rpm por 10 min a 4°C.
- 5- Desprezava-se o sobrenadante e repetia-se o procedimento de lavagem com acetona (passos 3 e 4) por mais duas vezes.
- 6- Após a última lavagem o sedimento era deixado secando exposto ao ar e após secagem ressuspensionado em tampão de amostra para SDS-PAGE.

4.2.13 – Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

Após a precipitação, as amostras de scFv e FvFc eram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida.

- 1- Inicialmente preparava-se o gel separador em concentração de 10 ou 12% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 2- Após a polimerização do gel separador, vertia-se o gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v), tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 3- Uma vez vertido o gel concentrador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços. E uma vez polimerizado o gel era acoplado ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços eram lavados com tampão de corrida.
- 4- Imediatamente antes da aplicação das amostras, procedia-se à fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.

5- Após a corrida do gel, de 50 a 80mA, o mesmo era submetido aos procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250) ou prata, especificados respectivamente no item 4.2.14 de métodos. Ou, caso o objetivo fosse a realização de *Western Blotting* o gel era submetido à transferência para membrana de nitrocelulose, especificada no item 4.2.15 de métodos.

4.2.14 – Coloração do gel de SDS-PAGE

4.2.14.1 – Com Comassie Brilhant 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, 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 em ácido acético 5%.

4.2.14.2 – Com prata

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

4.2.15 – Análise de proteínas por *Western Blotting* (adaptado de Sambrook *et al.*, 1989).

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, 6 papéis de filtro, a membrana, o gel e mais 6 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 40 min.
- 3- Após este procedimento, a membrana, contendo as proteínas transferidas, era embebida em solução de bloqueio e incubada por 1 h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
- 4- Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.
- 5- Incubava-se a membrana com o anticorpo primário, diluído em PBS 1X, por 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
- 6- Removia-se o anticorpo primário e lavava-se a membrana novamente 3X com PBST 1X.
- 7- Incubava-se a membrana com o anticorpo secundário (conjugado a fosfatase alcalina), diluído em PBS 1X, por mais 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
- 8- Removia-se o anticorpo conjugado e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X e posteriormente 1X com 10mL de APB (tampão da fosfatase alcalina).
- 9- 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.

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

Quando de interesse adicionavam-se de 5 a 10 µL dos extratos protéicos obtidos na fermentação ou nas purificações diretamente a uma membrana de nitrocelulose. Com a membrana seca, contendo as proteínas ligadas, era realizado o mesmo procedimento de bloqueio e revelação descrito para o experimento de *Western Blotting* (4.2.15).

4.2.17 – Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

4.2.17.1 – Com IgG Sepharose[®] – scFvs

- 1- A coluna cromatográfica era montada com cerca de 5 mL de resina IgG Sepharose preparada anteriormente por Andrade e col. (2000).
- 2- Após a montagem lavava-se a coluna com 5 volumes de PBS 1X para a retirada do etanol 20% (v/v), no qual a resina estava estocada.
- 3- A mesma era então sensibilizada com 3 volumes de ácido acético 0,5M pH 3,5.
- 4- Lavava-se com mais 5 volumes de PBS 1X.
- 5- Incubava-se o sobrenadante previamente filtrado e concentrado.
- 6- Lavava-se a coluna com 10 volumes de PBS 1X.
- 7- Para a eluição das proteínas ligadas adicionavam-se 5 volumes de ácido acético 0,5M pH 3,5 coletando-se as amostras em microtubos do tipo *Eppendorf* de 1 em 1 mL.
- 8- As amostras eram imediatamente neutralizadas com 100 µL Tris-HCl 1,5M pH 11,0, previamente colocados em cada tubo de coleta, para neutralização do pH.
- 9- Lavava-se a coluna com mais 10 volumes de PBS 1X.
- 10- Aplicava-se etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.
- 11- Imediatamente após o fim da coleta, 5µL de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 4.2.16 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas na coluna Centricon YM-10 (Amicon[®]), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 10 kDa para diálise e concentração.

4.2.17.2 – Com HiTrap[™] Protein A HP 1mL (GE Healthcare[®]) – FvFcs

- 1- Acoplava-se a coluna cromatográfica em uma bomba peristáltica.
- 2- Após a montagem lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.
- 3- Aplicava-se o sobrenadante previamente filtrado e concentrado.
- 4- Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.
- 5- Para a eluição das proteínas ligadas adicionava-se 8 volumes de tampão de eluição coletando-se as amostras em microtubos do tipo *Eppendorf* de 1 em 1 mL.
- 6- As amostras eram imediatamente neutralizadas com 100 µL Tris-HCl 1,5M pH 11,0, previamente colocados em cada tubo de coleta, para neutralização do pH.
- 7- Lavava-se a coluna com mais 10 volumes de tampão de ligação.

8- Aplicava-se etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.

9- Imediatamente após o fim da coleta, 5µL de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 4.2.16 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas na coluna Centricon YM-30 (Amicon[®]), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 30 kDa para diálise e concentração.

4.2.18 – Purificação das proteínas recombinantes por Filtração em Gel

Para filtração em gel foi utilizada a resina Superose 12 (GE Healthcare[®]), aproximadamente 25mL previamente montada e acoplada ao aparelho de FPLC (LKB – UV – MII, Pharmacia[®]).

1- Lavava-se a coluna com 50mL de PBS 1X, filtrado e deaerado, num fluxo de 0,2mL/min.

2- Aplicavam-se os padrões: inicialmente 200 µL do marcador Blue Dextran e, logo após sua entrada na coluna, aplicava-se uma mistura dos outros padrões (BSA, Anidrase carbônica e Citocromo C).

3- Após a corrida com os marcadores aplicava-se novamente na coluna 200 µL do marcador Blue Dextran e 1 mL de sobrenadante previamente filtrado e concentrado conforme descrito anteriormente.

4- A coluna era lavada com PBS 1X enquanto as amostras eram coletadas, em microtubos do tipo *Eppendorf*, com aproximadamente 2mL por microtubo.

5- A coluna era lavada com 50 mL de PBS 1X e 100mL de água destilada filtrada e deareada, onde era estocada.

6- A densidade óptica de cada amostra eluída e coletada foi medida na faixa de 230-320 nm para análise da presença de proteínas. Aquelas em que foram detectadas a presença de proteínas eram analisadas por *Dot Blotting*, seguindo o protocolo do item 4.2.16 de métodos.

4.2.19 – Análise de agregação das proteínas recombinantes

Para testar a agregação das proteínas recombinantes as amostras eram centrifugadas em colunas Microcon YM-100, que exclui proteínas maiores que 100kDa. Caso o scFv ficasse

retido na membrana significava que estava agregado. Tanto a porção que passava na coluna, quanto a que ficava retida eram submetidas a precipitação com TCA, SDS-PAGE e *Western Blotting* (itens 4.2.12, 4.2.13 e 4.2.15 do tópico métodos).

4.2.20 – Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA

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

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

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

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

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

4.2.21 – ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Foram realizados ensaios do tipo ELISA de ligação direta, inibição e quantificação das proteínas recombinantes. Cada ensaio apresenta suas particularidades e estão descritos separadamente. Após cada lavagem as placas de microtitulação (Falcon) eram invertidas sobre uma pilha de papel toalha e batidas vigorosamente até a retirada completa das soluções presentes. Durante as incubações as placas permaneciam fechadas para evitar a evaporação das soluções e todos eram revelados com pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1mg/mL dissolvido em APB, 100µL por poço e a revelação era lida no leitor de ELISA “*Microplate Reader BioRad*[®]” modelo 450 a um comprimento de onda de 405nm. Os anticorpos utilizados estão detalhados na Tabela 3 do item 4.2.18.

4.2.21.1 – ELISA – Ensaio de quantificação dos FvFcs recombinantes

- 1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com o anticorpo feito em cabra anti-IgG humana H+L, diluído em PBS 1X 1:500, 100µL por poço, durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 2- Lavava-se 3X com PBST 1X, 150µL por poço.
- 3- Bloqueava-se com solução de bloqueio, 150µL por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
- 4- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com as amostras de interesse: sobrenadante de cultura ou FvFcs purificados. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada (diluída na mesma solução que as proteínas recombinantes). Tudo era feito em diluições seriadas e em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.
- 5- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina 1:5.000 por 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Lavava-se 3X com PBST 1X e 1X com tampão para fosfatase alcalina (APB).
- 7- Revelava-se e fazia-se os cálculos de concentração baseados na curva padrão de IgG humana, sempre desconsiderando os poços brancos (com PBS 1X em todas as etapas).

4.2.21.2 – ELISA – Ensaio de ligação direta

- 1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados ou com o veneno completo de *Bothrops atrox* (diluído em PBS 1X, 1µg por poço) ou com a PLA₂ purificada (diluída em PBS 1X, 100ng por poço), durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 2- Lavava-se 3X com PBST 1X, 150µL por poço.
- 3- Bloqueava-se com solução de bloqueio, 150µL por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
- 4- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com as amostras de interesse: sobrenadante de cultura ou FvFcs purificados. Como controle positivo utilizava-se o próprio anticorpo monoclonal anti-PLA₂ purificado (diluído na mesma solução que as proteínas recombinantes). Tudo era feito em diluições seriadas e em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.

5- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina 1:5.000 por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços do controle positivo eram incubados com o anticorpo anti-IgG camundongo conjugado a fosfatase alcalina.

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

7- Revelava-se e a ligação dos FvFcs recombinantes era comparada ao anticorpo monoclonal.

4.2.21.3 – ELISA – Ensaio de inibição

1- Os poços de interesse na placa eram sensibilizados ou com o veneno completo de *Bothrops atrox* (diluído em PBS 1X, 1µg por poço) ou com a PLA₂ purificada (diluída em PBS 1X, 100ng por poço), durante 2 horas a temperatura ambiente.

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

3- Bloqueava-se com solução de bloqueio, 150µL por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

4- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo monoclonal anti-PLA₂ em diluições seriadas, durante 1 hora a temperatura ambiente.

4- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com as amostras de interesse: sobrenadante de cultura ou FvFcs purificados. Tudo em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.

5- Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina 1:5.000 por 1 hora a temperatura ambiente.

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

7- Revelava-se e a inibição da ligação dos FvFcs recombinantes ao antígeno era comparada ao aumento da concentração do anticorpo monoclonal.

5 – Resultados e Discussão

5.1 – Humanização por transplante de CDR

A busca pelo melhoramento dos anticorpos monoclonais (mAbs) de uso terapêutico é hoje um dos grandes alvos do mercado de biofármacos mundial (Kashmiri *et al.*, 2005). O processo de humanização visa a redução do máximo possível de resíduos de aminoácidos murinos nesses anticorpos sem que para isso percam sua afinidade pelo antígeno (Morrison *et al.*, 1984).

Por isso, na tentativa de se obter um anticorpo com o mínimo de resíduos murinos a técnica de humanização utilizada nesse trabalho foi a de transplante dos CDRs murinos para arcabouços humanos em configuração germinal (Caldas *et al.*, 2000), para que se mantivesse todo o arcabouço das porções variáveis VH e VL humanos e apenas as CDRs murinas.

Para isso, inicialmente foi feito o sequenciamento dos genes que codificavam os domínios variáveis leve (VL) e pesado (VH) do mAb anti-PLA₂ isolado do hibridoma por PCR usando iniciadores específicos segundo Caldas, 1999. Verificou-se que o VH e VL desse anticorpo pertenciam as famílias de imunoglobulinas VH 36-60 e V κ 21-2, respectivamente. Essas seqüências do VH e do VL murinos foram submetidas a comparações com seqüências de imunoglobulinas germinais humanas depositadas nos bancos de dados, a fim de se obter aquelas cadeias humanas mais similares.

A partir dessas comparações foram escolhidos dois arcabouços humanos, um para o VH e outro para o VL, que eram mais similares às seqüências murinas. Os arcabouços humanos escolhidos pertencem as famílias VH4/JH6 para o VH e B3/J κ 4 para o VL, que apresentam 82,3% e 84,2% de identidade de seqüência com o arcabouço murino, respectivamente. Após análise de similaridade dos resíduos dos arcabouços descritos como mais importantes na manutenção da especificidade (Padlan, 1994) e observação de modelos tridimensionais decidiu-se manter todo o arcabouço humano germinal, sem qualquer alteração. As seqüências de VH e VL humanizadas propostas, contendo os arcabouços humanos mais similares e as CDRs murinas estão esquematizadas na Figura 8.

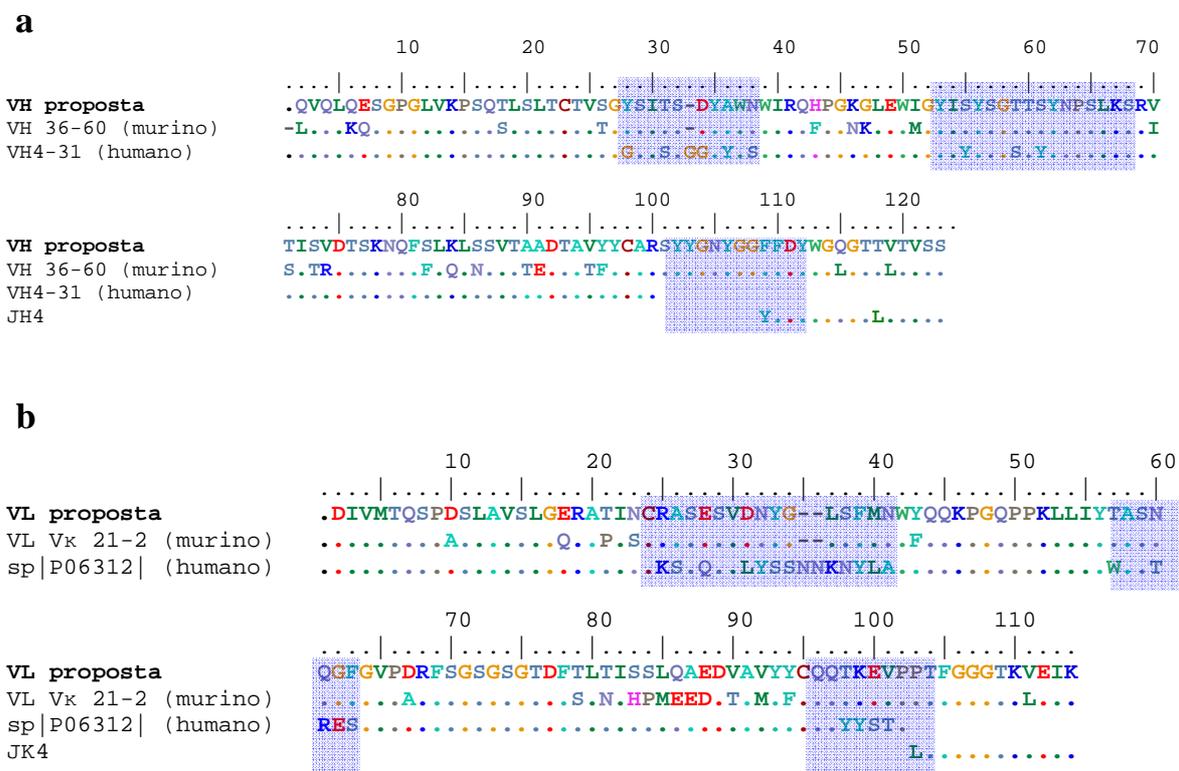


Figura 8. Alinhamentos do VH (a) e do VL (b) propostos com as seqüências humanas germinais mais similares as murinas. No alinhamento estão as seqüências humanizadas propostas, as seqüências murinas originárias do hibridoma, as seqüências humanas germinais mais similares e as regiões J humanas mais similares. Os pontos representam resíduos de aminoácidos idênticos e as CDRs, delimitadas de acordo com a numeração de Kabat *et al.*, 1991, estão ressaltadas com fundo azul.

As versões humanizadas propostas apresentam 23 resíduos não-humanos no VL e 9 no VH, o que corresponde a menos de 13% da seqüência total. Segundo Hwang e Foote, 2005, quanto menor a porcentagem de resíduos murinos nas seqüências humanizadas menores são as respostas contra o tratamento, portanto uma porcentagem tão baixa provavelmente levará a uma resposta negligível ou no mínimo tolerável, uma vez que alguns dos anticorpos humanizados já aprovados pela FDA para uso clínico apresentam mais de 10% de resíduos murinos em suas seqüências, como o anti-IL2 Zenapax[®] -PDL- usado no tratamento de rejeição a transplantes, que possui 12% de resíduos murinos (Kim *et al.*, 2005), e outros com porcentagem ainda maior como o anti-fator de crescimento vascular endotelial Avastin[®]-

Genentech – usado no tratamento de cânceres que possui 20% de resíduos murinos em sua seqüência (Presta *et al.*, 1997).

Os genes codificadores das versões de VH e VL humanizadas foram sintetizados quimicamente pela empresa GenScript (<http://genscript.com>) após as alterações para inserção dos sítios de restrição iniciais e finais e análises dos códons preferencialmente mais expressos. Nesses genes foram escolhidos os melhores códons para expressão tanto em *Pichia pastoris* quanto em *Cricetulus griseus* (Hamster chinês) para expressão na célula de mamífero CHO, já que segundo Hu e colaboradores (2006), o uso de códons preferenciais pode aumentar em até 5 vezes o nível de expressão de proteínas recombinantes. Os genes vieram inseridos no plasmídeo pUC 57.

5.2 – Inserção dos sítios de restrição nas seqüências variáveis murinas

Para que fosse possível realizar as manipulações com os genes codificadores do VH e VL murinos foi necessário o desenho de oligonucleotídeos específicos para a inserção dos sítios de restrição iniciais e finais nessas seqüências (item 4.1.12). Os sítios de restrição 5' e 3' são, nas seqüências de VH, *Xma* I e *Xba* I, e nas seqüências de VL, *Bgl* II e *Nco* I, respectivamente.

A amplificação do VH e VL murinos com esses iniciadores foi feita utilizando-se a técnica de PCR (item 4.2.7). O resultado dessa amplificação pode ser visto na Figura 9.

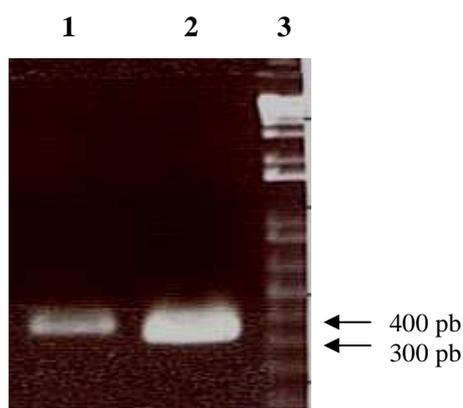


Figura 9. Amplificações do VH e VL murinos para inserção dos sítios de restrição. Gel de agarose 0,8% mostrando a amplificação por PCR das versões murinas do VH e do VL do anti-PLA₂. 1-VH, 2-VL e 3-Marcador de massa molecular *Ikb Plus DNA ladder* (Invitrogen®).

Após os testes de controles negativos, como com o uso de um só iniciador ou a realização da PCR sem o DNA molde, os fragmentos obtidos demonstrados acima foram extraídos e purificados do gel de agarose (item 4.2.4).

Esses fragmentos foram então inseridos no vetor comercial pGEM-T EASY (Promega), segundo instruções do fabricante, e seqüenciados novamente para confirmação da inserção dos sítios e para que se pudesse então iniciar as construções dos fragmentos de anticorpos anti-PLA₂.

5.3 – Construção dos fragmentos de anticorpos scFvs e clonagem no vetor de expressão em *Pichia pastoris*

Para se fazer a construção e expressão, tanto da versão humanizada quanto da murina, foi escolhido inicialmente o modelo de expressão de cadeia única, o scFv (fragmento variável de cadeia única) que apresenta um peptídeo conector flexível unindo o carboxi-terminal do VH com o amino-terminal do VL em um arranjo monocistrônico que mantém a especificidade de ligação ao antígeno (Maranhão e Brígido, 2001).

As vantagens de se usar o modelo scFv são a maior facilidade de manipulação gênica, alta capacidade de penetração nos tecidos quando comparado ao anticorpo inteiro e manutenção da capacidade de reconhecimento e ligação ao antígeno, podendo levar à formação de imunocomplexos e eliminação desses antígenos (Damasceno *et al.*, 2004). Características que se mostraram positivas para o tipo de atividade que se procura para os anticorpos antiveneno, que não buscam a função efetora dos anticorpos, especialmente para o anti-PLA₂, que necessita penetrar no tecido muscular que está sendo alvo de degradação por essa fosfolipase.

As manipulações para construção dos scFvs, murino e humanizado, foram feitas inicialmente no plasmídeo bacteriano pIg16 Z22 (Brígido *et al.*, 1993) por meio da substituição do VH e VL do anti-Z-DNA, presente no plasmídeo, pelas cadeias anti-PLA₂, tanto murinas quanto humanizadas. Após a montagem dos dois scFvs esses foram então transferidos para o vetor de expressão em *Pichia pastoris* pPIg LE que apresenta, além de outras coisas, a região de integração ao locus *HIS4* dessa levedura. Essas clonagens estão esquematizadas na Figura 10.

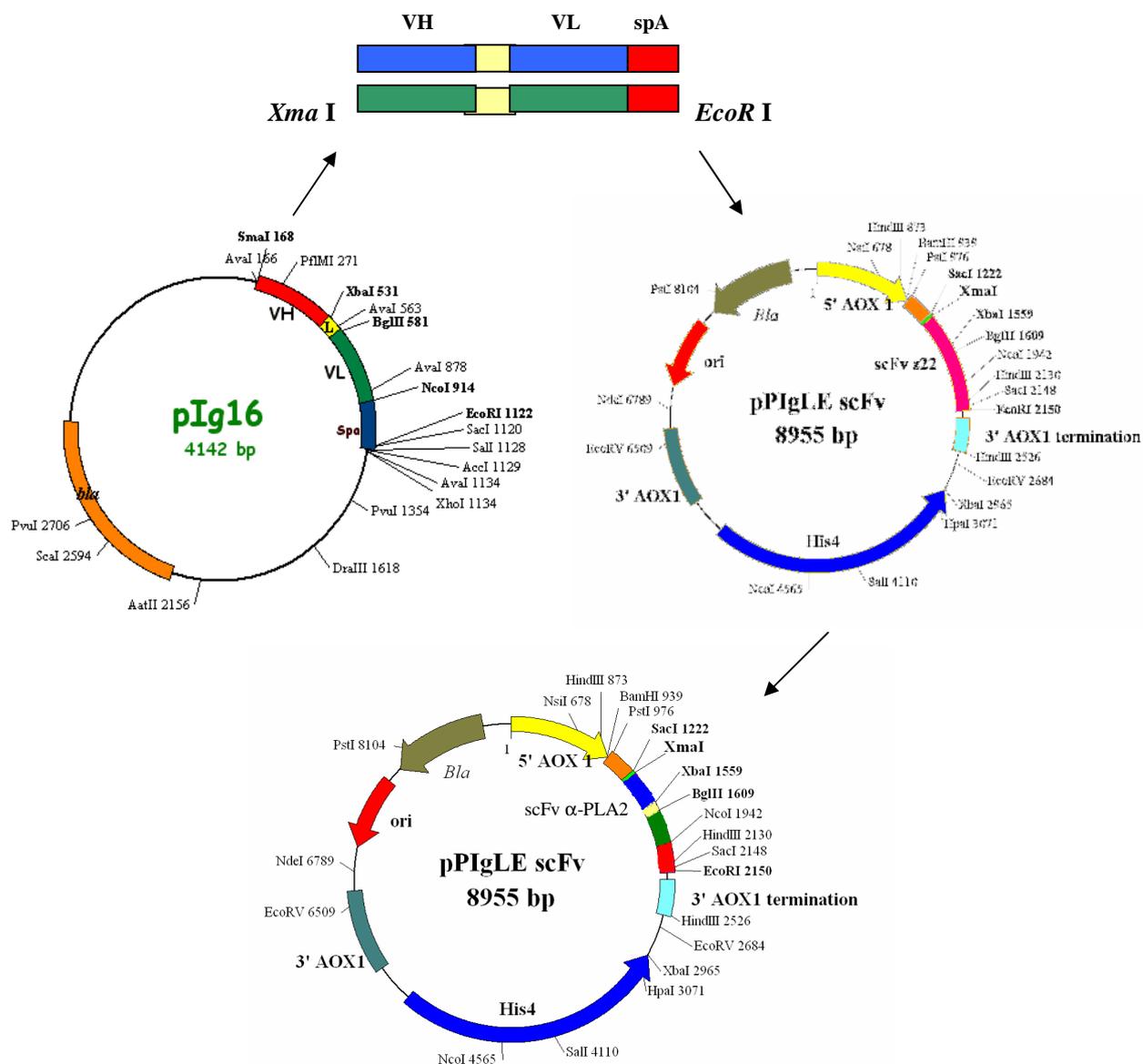


Figura 10. Representação esquemática das clonagens de transferência dos scFvs para o pPIg LE. Os scFvs murino (azul) e humanizado (verde) fusionados à proteína A - SpA (vermelho) foram transferidos do plasmídeo bacteriano pIg 16, utilizado para a construção desses scFvs, para o vetor de expressão em *P. pastoris* pPIg LE, resultando nos vetores finais contendo os scFvs anti-PLA2. *Xma* I e *EcoR* I sítios de clonagem dos scFvs fusionados a SpA

5.4 – Expressão dos scFvs em *Pichia pastoris*

5.4.1 – Transformação da *P. pastoris* e seleção dos clones recombinantes

Vários fragmentos de anticorpos, principalmente scFvs, já foram expressos em *E. coli*, entretanto, como na maioria das vezes esse fragmento fica retido no periplasma da bactéria o rendimento do scFv purificado é baixa, em geral em torno de microgramas de proteína por litro de cultura (Freyre *et al.*, 2000 e Damasceno *et al.*, 2004). Já a produção de scFvs em *Pichia pastoris* é bem mais elevada chegando a atingir taxas de produção de gramas de proteína final purificada por litro de cultura (Freyre *et al.*, 2000). Por isso foi escolhida essa levedura para a expressão dos scFvs recombinantes anti-PLA₂.

Após as finalizações das clonagens os plasmídios contendo os scFvs murino e humanizado foram preparados e foram realizadas as transformações em *P. pastoris* (itens 4.2.8 e 4.2.9). A linhagem escolhida foi a GS115 que é um mutante auxotrófico para a proteína HIS4 (*his4*) não sendo capaz de produzir a enzima histidinol desidrogenase, sendo dependente da adição de histidina para cultivo.

Para a transformação os plasmídeos obtidos foram linearizados com a enzima de restrição *Sal* I. O sítio de restrição desta enzima localiza-se dentro do gene *HIS4*, possibilitando a integração do vetor no *locus his4* por meio de recombinação homóloga restaurando o fenótipo His+. Este evento faz com que os clones transformantes expressem a enzima histidinol desidrogenase, o que restaura a capacidade destas leveduras de crescerem em meio deficiente em histidina (marca auxotrófica).

Após a eletroporação os transformantes foram semeados em placas com meio MD (meio mínimo com glicose) para selecionar somente aqueles que foram efetivamente transformados e se tornaram capacitados a crescerem em meio sem histidina. Posteriormente alguns clones foram repicados serialmente em duas placas, uma com meio MM (meio mínimo com metanol) e outra com meio MD, para indução da expressão do gene codificador da proteína recombinante nas placas MM. Dessa forma, foi feita a seleção das colônias positivas (que expressaram os scFvs) por meio de *Colony Blotting* (item 4.2.10). O resultado desta indução pode ser observado na Figura 11.

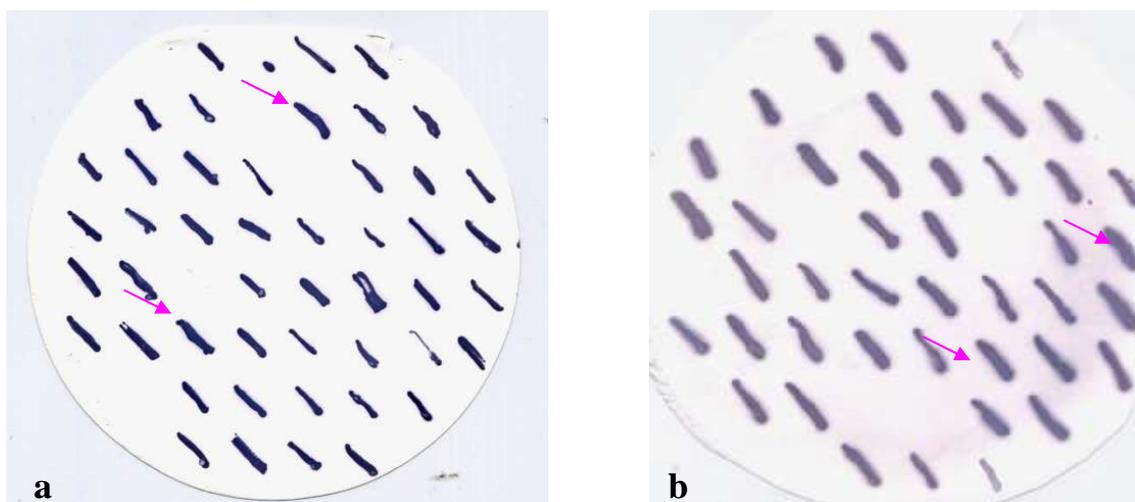


Figura 11. Imunodeteccção de colônias produtoras de scFv recombinante. Em (a) com o vetor contendo o scFv murino e em (b) com o scFv humanizado. As colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e reveladas usando IgG de coelho, que se liga a proteína A fusionada aos scFvs, e anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina. Os clones que estavam expressando a proteína recombinante aparecem revelados nas membranas. Setas: clones escolhidos para as fermentações.

5.4.2 – Produção dos scFvs recombinantes e cinética de indução

Dois clones de cada scFv, sinalizados na Figura 10, foram escolhidos para as fermentações em frasco. Cada clone escolhido foi crescido em 100mL de meio BMGY e depois de 48h de crescimento o meio era trocado para o meio de indução BMMY (item 4.2.11). Inicialmente foi realizado um experimento de cinética de indução da proteína recombinante, com um clone de cada scFv para determinação do melhor tempo de coleta do sobrenadante da cultura de *P. pastoris*.

Para identificar o melhor ponto da cinética de indução para a coleta dos sobrenadantes, isto é, o tempo com maior expressão dos scFvs, as amostras de sobrenadante coletadas tinham suas proteínas precipitadas com TCA 100% e ressuspensas em tampão de amostra. Em seguida as proteínas eram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisadas por *Western blotting* (itens 4.2.12 a 4.2.15). Para a detecção dos scFvs recombinantes utilizou-se IgG de coelho, que reconhece a proteína A conjugada aos scFvs, como anticorpo primário, anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina como secundário e a revelação foi feita com NBT/BCIP.

O tamanho esperado para scFvs conjugados a proteína A é de aproximadamente 35 kDa, entretanto a massa molecular aparente dos fragmentos observados para os scFvs anti-PLA₂ foi de aproximadamente 45 kDa, o que já foi observado para outros scFvs produzidos anteriormente pelo grupo, como o scFv anti-CD18 e o anti-Z-DNA. A expressão dos scFvs anti-PLA₂ nos diferentes tempos de indução está apresentada na Figura 12.

Além disso, foi detectada também uma maior quantidade de proteína recombinante nos tempos de 24 e 48 horas de indução, desta maneira, esses tempos foram escolhidos para a produção em maior escala (200 a 400mL) dos dois clones de cada scFv recombinante escolhidos anteriormente (Figura 13).

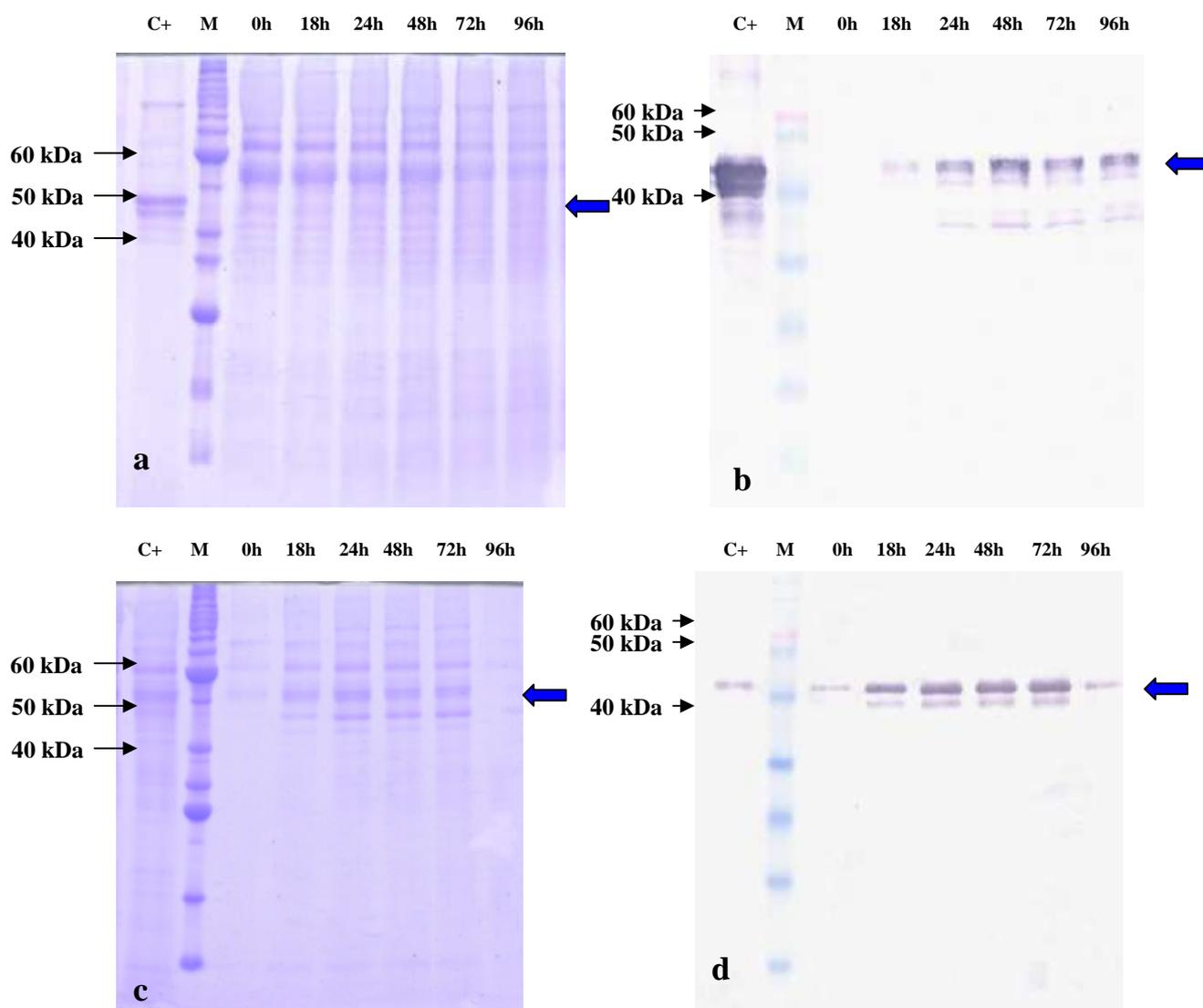


Figura 12. Produção das proteínas recombinantes em células de *Pichia pastoris* em diferentes tempos de indução. Os sobrenadantes de cultura dos tempos 0, 18, 24, 48 e 96 horas das fermentações dos scFvs foram analisados por SDS-PAGE 10% corados com *Comassie Brilliant Blue* (a e c) e *Western Blottings* revelados conforme descrito para o *Colony Blotting* (b e d). (a e b) Análises dos scFvs murinos. (c e d) Análises dos scFvs humanizados. C+: controle positivo - scFv anti-Z-DNA fermentação tempo 48h, M: marcador molecular (*Bench Marker™* para os *Comassies* e *Bench Marker™ Prestained* para os *Westerns* - Invitrogen®). Setas azuis: scFvs recombinantes com aproximadamente 45 kDa.

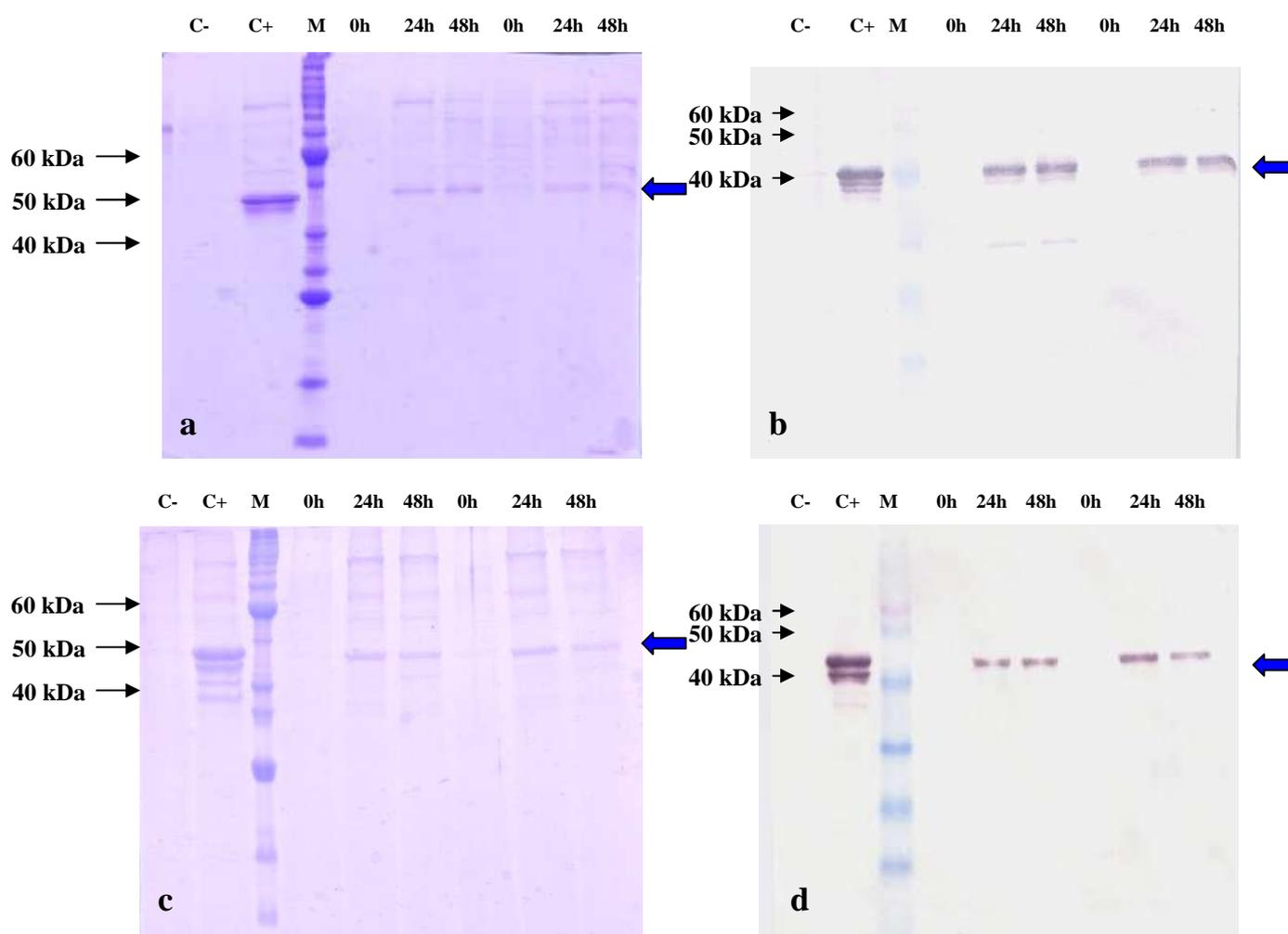


Figura 13. Produção em larga escala das proteínas recombinantes por células de *Pichia pastoris*. Os sobrenadantes de cultura dos tempos 0, 24 e 48 horas das fermentações em maior escala dos scFvs foram analisados por SDS-PAGE 10% corados com *Comassie Brilliant Blue* (a e c) e *Western Blottings* revelados conforme descrito para o *Colony Blotting* (b e d). (a e b) Análises dos scFvs murinos. (c e d) Análises dos scFvs humanizados. C-: controle negativo - proteína não relacionada. C+: controle positivo - scFv anti-Z-DNA fermentação tempo 48h, M: marcador molecular (*Bench Marker™* para os *Comassies* e *Bench Marker™* para os *Westerns* - Invitrogen®). Setas azuis: scFvs recombinantes com aproximadamente 45 kDa.

Prestained para os *Westerns* – Invitrogen®). Setas azuis: scFvs recombinantes com aproximadamente 45 kDa.

Não foi observada nenhuma atividade proteolítica sobre os scFvs anti-PLA₂ nesta etapa e uma pequena degradação no scFv anti-Z-DNA – C+, indicando que a associação dos inibidores de proteases utilizados, como EDTA e PMSF, aliados ao uso de casaminoácidos no meio de cultura de indução, resultou na minimização da degradação e conseqüente aumento do rendimento obtido, assim como observado por Shi e colaboradores (2003).

5.5 – Purificação dos scFvs recombinantes

5.5.1 – Cromatografia de afinidade – IgG Sepharose

A proteína A é um polipeptídeo que compõe a parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*. Contém vários domínios de ligação a IgG que continuam livres mesmo quando a proteína é imobilizada em uma resina (geralmente agarose) ou conjugada a outras proteínas (Vanamala *et al.*, 2003). Assim sendo, uma proteína recombinante conjugada a proteína A pode se ligar à pelo menos duas moléculas de IgG, o que facilita a detecção e purificação da proteína recombinante de interesse. No caso deste trabalho os scFvs murinos e humanizados anti-PLA₂ foram ligados a um só domínio da proteína A, o domínio B (Brígido *et al.*, 1993).

Após as fermentações em maior escala os sobrenadantes finais foram submetidos à filtração em membranas Millipore 0,45µm e concentração de 10 a 50 vezes. O concentrado final foi então purificado em cromatografia de afinidade em coluna contendo a resina IgG Sepharose. Essa coluna é uma resina caseira preparada anteriormente por Andrade e colaboradores (2000) que apresenta IgG humana conjugada a resina Sepharose e a purificação foi realizada conforme descrito no item 4.2.17.1. A presença da proteína recombinante nas frações coletadas era observada por *Dot Blotting*, onde 3 a 5µL de cada fração eram aplicados a membrana de nitrocelulose e revelados com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (item 4.2.16).

A análise das purificações dos scFvs por cromatografia de afinidade demonstrou que, apesar de se obter uma pequena porcentagem de proteína pura, grande parte dos scFvs recombinantes não se ligava a coluna cromatográfica, especialmente os scFvs murinos (Figura 14).

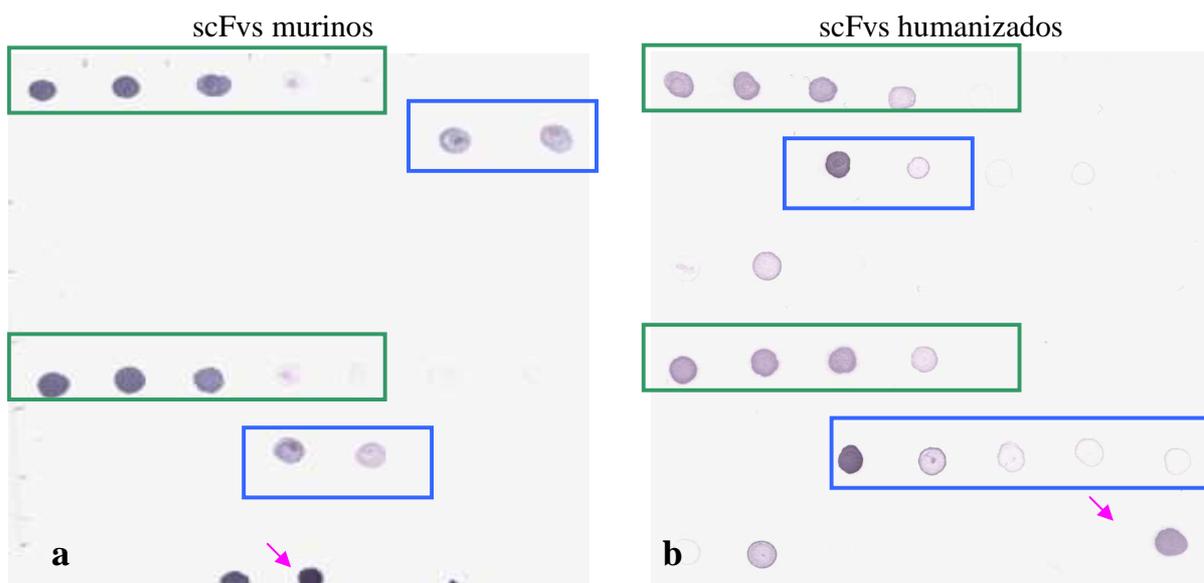


Figura 14. Imunodeteção dos scFv recombinantes durante a purificação em coluna IgG Sepharose. Três microlitros de cada fração coletada durante as purificações de cada uma das duas fermentações em larga escala foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença dos scFvs recombinantes foi detectada com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina. Em (a) scFvs murinos. Em (b) scFvs humanizados. Retângulos verdes: frações que não ficaram retidas na coluna. Retângulos azuis: frações eluídas da coluna que apresentam o scFv. Demais pontos: frações de lavagens. Setas: Controles positivos (scFv anti-Z-DNA).

As frações de eluição onde se detectou a presença dos scFvs pelo *Dot Blotting* foram concentradas em colunas - Centricon YM-10 (Millipore), com capacidade de exclusão de 10kDa, e tiveram seu tampão trocado para PBS 1X. Para se verificar a pureza das proteínas recombinantes purificadas uma fração do material concentrado e dialisado foi submetido a eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) e analisado por *Western blotting*. Essa análise possibilitou a detecção de um elevado grau de pureza dos scFvs humanizados purificados, porém uma baixa quantidade de proteína (Figura 15) e não foi

possível detectar os scFvs murinos, devido a baixa concentração de proteína (dado não mostrado).

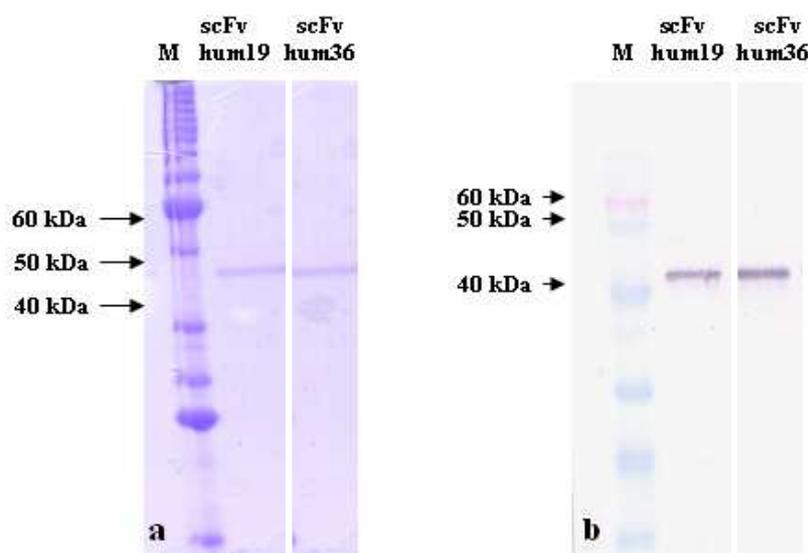


Figura 15. Análise dos scFvs humanizados purificados. As frações purificadas e dialisadas dos dois scFvs humanizados foram analisadas por SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (a) e *Western Blotting* revelado com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (b). M: marcador molecular (*Bench MarkerTM* para o *Coomassie* e *Bench MarkerTM Prestained* para o *Western* – Invitrogen[®]).

A partir desses dados verificou-se a necessidade de otimização dessa purificação, já que as quantidades de scFvs purificados obtidas não eram suficientes para realização dos testes de afinidade desses anticorpos pela fosfolipase A₂. Foram feitas então várias tentativas de se aumentar a eficiência da purificação, como alterações no pH dos tampões de lavagem (aumento do pH) e de eluição (aumento e diminuição do pH) durante a purificação, já que segundo Woo e colaboradores, 2006, mudanças no pH podem alterar a solubilidade das proteínas e conseqüentemente a eficiência da purificação. A temperatura de realização da purificação também foi diminuída de temperatura ambiente para 4°C, como feito por Andrade e colaboradores, 2000, na tentativa de se aumentar a estabilidade da proteína. E também o aumento da quantidade de resina utilizada. Entretanto nenhuma dessas alternativas se mostrou eficiente nessa otimização. Decidiu-se então buscar uma outra metodologia de purificação utilizando-se uma coluna de filtração em gel.

5.5.2 – Filtração em gel

Para a realização da cromatografia por filtração em gel foi utilizada a resina Superose 12 (GE Healthcare) acoplada ao aparelho de FPLC (LKB – UV – MII, Pharmacia®). Inicialmente eram aplicados os padrões de massa molecular Blue Dextran (2.000kDa), BSA (66kDa), Anidrase Carbônica (29kDa) e Citocromo C (12,4kDa) (item 4.2.18). O aparelho estava acoplado a um espectrofotômetro que detectava as absorvâncias das amostras numa densidade óptica de 250 a 300nm (Figura 16). Os picos das amostras padrão revelam a faixa de separação conseguida.

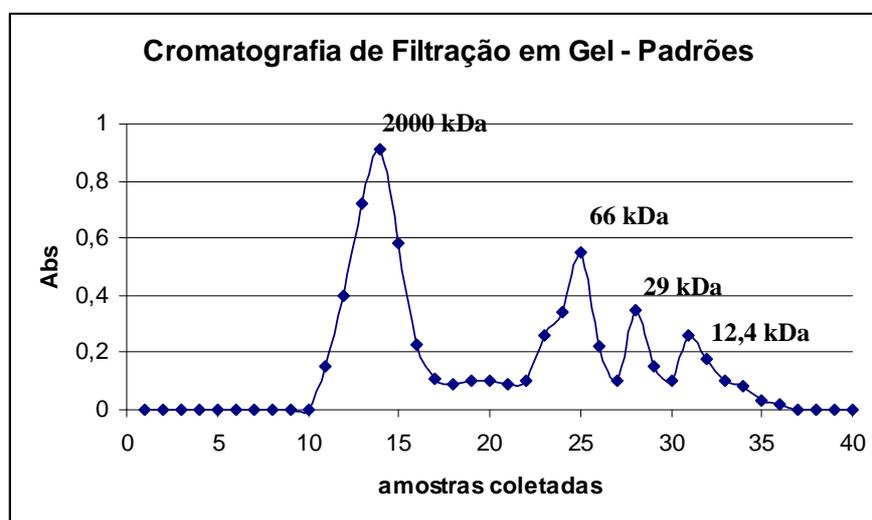


Figura 16. Perfil cromatográfico da eluição de padrões de massa molecular em coluna Sepharose 12 (Gel Filtração). Os picos correspondem a Blue Dextran (2.000kDa), BSA (66kDa), Anidrase Carbônica (29kDa) e Citocromo C (12,4kDa), respectivamente.

Após a passagem dos padrões era aplicado novamente o Blue Dextran seguido do sobrenadante de cultura dos scFvs recombinantes, filtrados e concentrados. Nesse experimento o pico de eluição dos scFvs era anterior ao pico de saída do Blue Dextran (Figura 17) o que também foi percebido na análise de *Dot Blotting* com as frações que formaram picos na cromatografia (Figura 18), sugerindo que o baixo rendimento nas diferentes tentativas de purificação desses scFvs se devia ao fato de que esses fragmentos estavam formando grandes agregados no sobrenadante de cultura. Supomos assim que essa agregação fazia com que os

scFvs fossem excluídos e passassem por fora de todas as colunas cromatográficas, tanto de afinidade quanto de filtração em gel, explicando os baixos rendimentos das purificações.

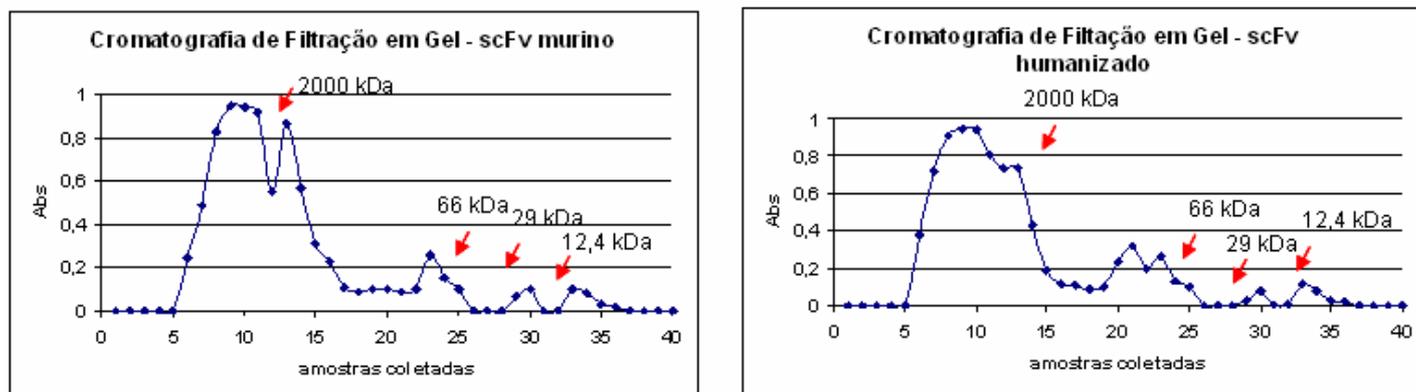


Figura 17. Perfil cromatográfico dos fragmentos scFvs recombinantes produzidos em *P. pastoris* em FPLC. 500 μ L do sobrenadante de cultura concentrado foram aplicados na coluna e a densidade ótica de cada amostra coletada, de 1 em 1 mL, era lida numa faixa de 250-300 η m. O primeiro grande pico observado corresponde aos scFvs agregados, seguidos do Blue Dextran e das demais proteínas presentes no sobrenadante de cultura.

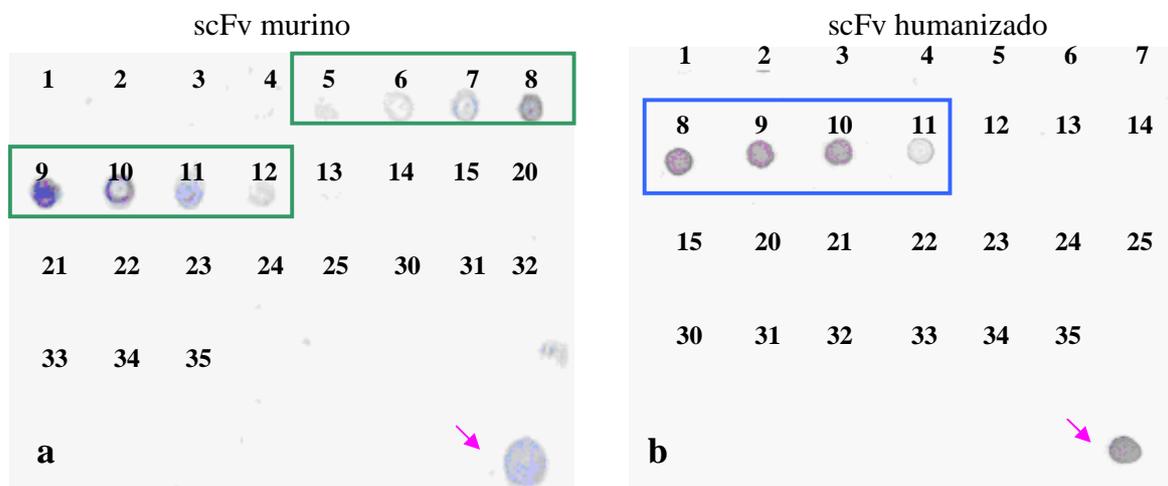


Figura 18. Análise por *Dot Blotting* das frações que apresentaram picos durante a filtração em gel. Cinco microlitros das frações 1 a 15, 20 a 25 e 30 a 35 de cada uma das cromatografias foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose e a presença dos scFvs recombinantes foi detectada com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugada a fosfatase alcalina. O scFv murino (a) foi detectado nas frações 5 a 12, destacadas em verde, e o scFv humanizado (b) nas frações 8 a 11, destacadas em azul. Setas: Controles positivos (scFv anti-Z-DNA).

5.6 – Agregação de scFvs no sobrenadante da fermentação em *Pichia pastoris*

A partir dos dados observados com a cromatografia de filtração em gel percebeu-se que estava ocorrendo a agregação das proteínas recombinantes no sobrenadante de cultura durante a fermentação em *Pichia pastoris*. Segundo Woo e colaboradores (2006) essa agregação está relacionada aos mesmos fatores que levam a agregação de algumas proteínas purificadas, como a insulina e o hormônio de crescimento. Esses fatores são a agitação, temperaturas elevadas, formação de espuma e presença de agentes caotrópicos. E durante a fermentação da levedura *Pichia pastoris* a agitação é elevada (250 a 280 rpm), a temperatura também é relativamente alta (28°C) e ocorre a formação de muita espuma devido a metabolização do metanol pela levedura, o que explica a agregação observada durante a indução da produção de proteínas recombinantes.

Os fatores que podem agravar essa agregação são, por exemplo, a hidrofobicidade da proteína e o seu tamanho, quanto menores as proteínas produzidas maiores suas chances de sofrer agregação. Devido provavelmente ao seu tamanho reduzido outras agregações de scFvs já foram observadas como descrito por Harrison e colaboradores (1998) e Woo e colaboradores (2006). No caso dos scFvs anti-PLA₂ deveu-se também provavelmente ao seu tamanho reduzido, já que por análises feitas com o programa ExPasy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) a partir das seqüências de aminoácidos dos scFvs esses apresentam pontos isoelétricos neutros, sendo 7,4 para o scFv murino e 6,8 para o scFv humanizado.

Várias alterações no meio de cultura e em algumas variáveis durante a fermentação já foram testadas para se reduzir a agregação das proteínas recombinantes durante a fermentação em *P. pastoris*. Dentre essas estão a diminuição da temperatura de fermentação durante a indução entre 15 a 20°C, diminuição do pH do meio de cultura de indução (Woo *et al.*, 2006), uso de antiespumantes (Harrison *et al.*, 1998) e adição de Arginina (Arakawa *et al.*, 2007) ou Tween no meio de cultura de indução (Woo *et al.*, 2006).

Dentre esses testes os que obtiveram melhores resultados foram aqueles que adicionaram Tween 20 ao meio de cultura ou às amostras purificadas, reduzindo-se a agregação durante a fermentação em *P. pastoris*, como demonstrado por Woo e colaboradores

(2006), que conseguiram reduzir a agregação de uma imunotoxina bivalente anti-células T humanas (usada no tratamento de leucemias de células T) de 64% para 5% na fermentação de *P. pastoris* em bioreator com o uso de 0,02% de Tween 20. Ou em proteínas já purificadas, como descrito por Chou e colaboradores (2005), que demonstraram que tanto o Tween 20 quanto o Tween 80 inibem a agregação da proteína recombinante albutropina, e Bam e colaboradores (1998) que demonstraram que o uso de Tween 20 aumenta a estabilidade do hormônio de crescimento humano recombinante purificado.

Sabendo disso as fermentações dos scFvs recombinantes anti-PLA₂ foram repetidas com a mudança de alguns fatores. A temperatura de indução foi reduzida de 28°C para 20°C, foi adicionado antiespumante a cada 24 horas e foram feitos testes com Arginina 0,4M e 0,02% de Tween 20. Esses testes demonstraram que a adição de Arginina impediu o crescimento da levedura, pois a densidade ótica da cultura não aumentou durante todo o processo de indução (Tabela 4), além de diminuir a expressão das proteínas recombinantes consideravelmente (Figura 19).

Tabela 4. Densidade ótica a 600nm das fermentações com arginina.

	scFv murino		scFv humanizado	
	sem arginina	com arginina	sem arginina	com arginina
0h de indução	10,47	10,72	11,02	10,48
24h de indução	19,53	11,20	21,87	11,00
48h de indução	27,50	10,68	31,52	10,56
72h de indução	38,33	10,43	40,25	11,02

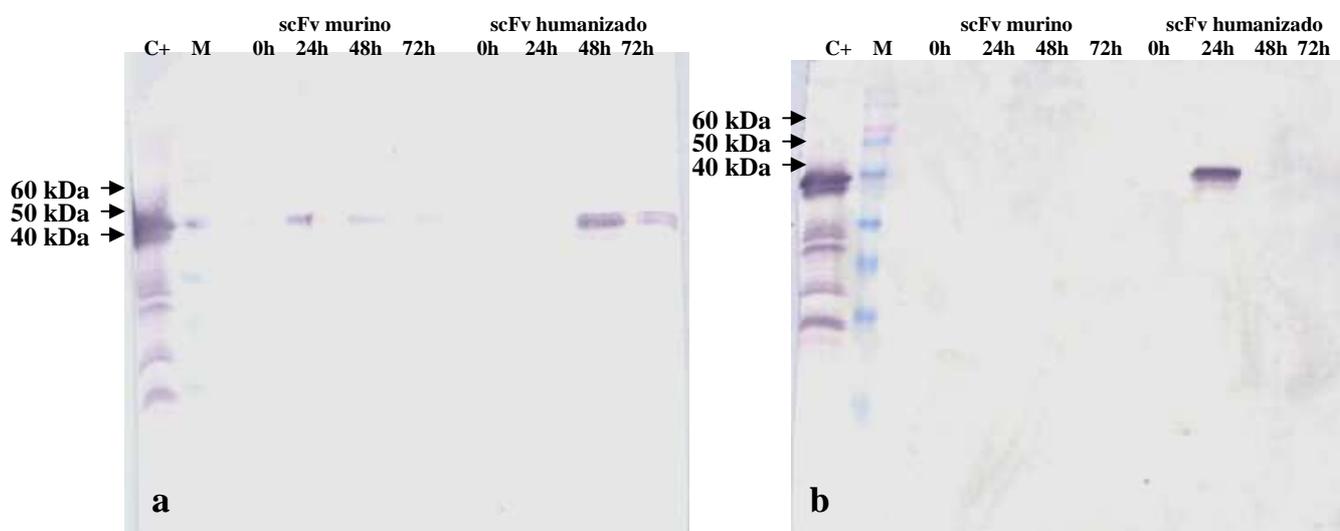


Figura 19. Análise da influência da adição de Arginina 0,4M no meio de cultura na produção dos scFvs recombinantes. Uma fração do sobrenadante de cultura das fermentações realizadas com adição de Arginina 0,4M foi precipitada com TCA 100%, submetida a eletroforese com gel desnaturante de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os *Westerns Blottings* foram revelados com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina. Em (a) fermentações sem adição de arginina demonstrando a expressão dos scFvs recombinantes e em (b) fermentações com adição de arginina, que inibiu a produção do scFv murino e reduziu a de scFv humanizado. M: marcador molecular *Bench MarkerTM Prestained* – Invitrogen®. C+: controle positivo - scFv anti-Z-DNA.

Já a adição de Tween 20 não alterou o crescimento da levedura durante o processo de indução, pois a concentração celular aumentou durante o período de indução assim como na fermentação sem adição de agentes surfactantes (dado não mostrado). Entretanto, foi observado que apesar de não haver alteração ou inibição da expressão dos scFvs recombinantes a adição de Tween 20 não reduziu significativamente a agregação dos scFvs, especialmente para o scFv murino (Figura 20). Para se fazer o teste da agregação uma fração dos sobrenadantes de cultura foi submetida a centrifugações em colunas Microcon YM-100 (Millipore), que possui a capacidade de exclusão de moléculas maiores que 100kDa. Sendo assim, caso os scFvs estivessem agregados ficariam retidos na coluna, caso não houvesse agregação passariam pela membrana.

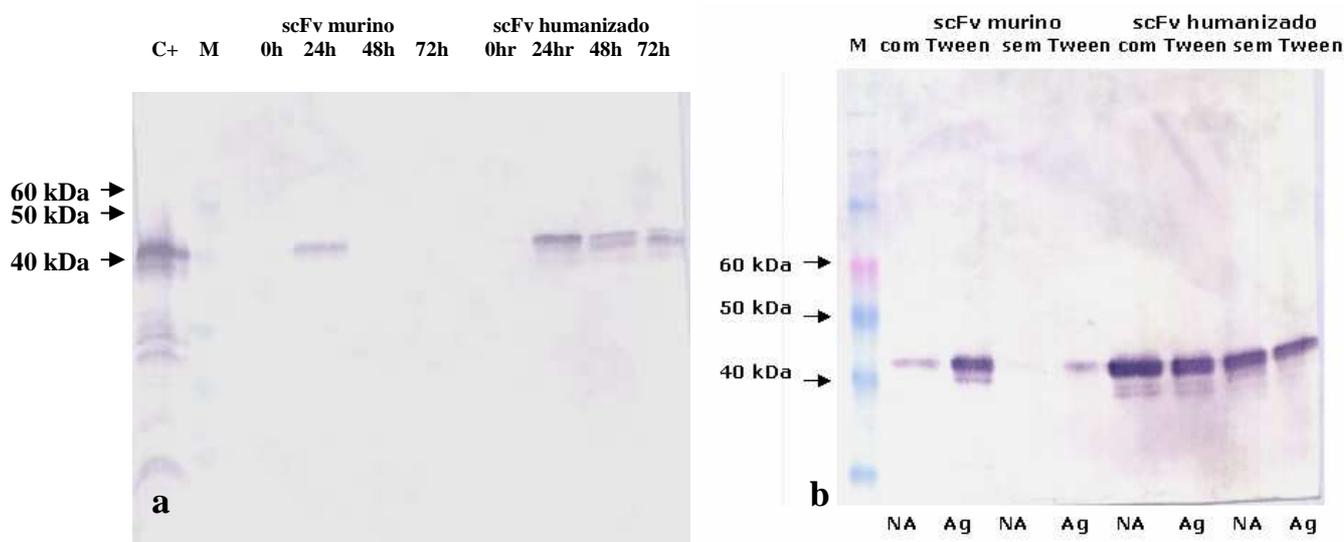


Figura 20. Análise da influência da adição de 0,02% de Tween 20 no meio de cultura na produção (a) e na agregação (b) dos scFvs recombinantes. Em (a), frações do sobrenadante de cultura das fermentações realizadas com adição de 0,02% de Tween 20, nos tempos indicados foram precipitadas com TCA 10%, submetida a eletroforese com gel desnaturante de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O *Western Blotting* foi revelado com IgG de coelho e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina. Demonstrando que a produção dos scFvs recombinantes não foi alterada. Em (b), um mililitro dos sobrenadantes era passado em colunas Microcon YM-100 (Millipore) para se verificar a agregação. Após o teste as amostras que ficaram retidas e que passaram na coluna foram precipitadas e o *Western Blotting* foi revelado como descrito anteriormente. M: marcador molecular *Bench Marker™ Prestained* – Invitrogen®. NA: frações não-agregadas. Ag: frações agregadas. M: marcador molecular *Bench Marker™ Prestained* – Invitrogen®. C+: controle positivo - scFv anti-Z-DNA.

Após esse teste os sobrenadantes finais das fermentações com Tween 20 foram filtrados e concentrados. O volume final concentrado foi passado na coluna Microcon-100 para retirada dos agregados e o filtrado foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando IgG Sepharose, como já descrito anteriormente. O resultado dessa purificação demonstrou que, apesar de se ter diminuído um pouco a agregação com o uso de Tween, a fração de proteínas puras ainda não era suficiente para realização dos testes de afinidade dos fragmentos de anticorpos anti-PLA₂ ao seu antígeno (dado não mostrado).

A partir de todos esses dados foi decidido alterar a forma do fragmento de anticorpo a ser produzido para o FvFc, que se trata de um dímero de uma porção variável ligada as porções constantes da cadeia pesada CH₂-CH₃ (ver tópico 1.5, Figura 5). Para que dessa

forma se aumentasse o tamanho da molécula o que reduz a sua agregação, como mencionado por Woo e colaboradores 2006.

5.7 – Expressão do FvFc anti-PLA₂ humanizado em *Pichia pastoris*

5.7.1 – Construção do FvFc humanizado

Para se alterar a forma do fragmento de anticorpo anti-PLA₂ produzido a porção constante da cadeia pesada CH2-CH3 foi transferida do vetor pPIg16 Z22FvFc para o pPIg LE scFv humanizado anti-PLA₂, substituindo a proteína A (Figura 21). Essa substituição não foi realizada para o scFv murino pois sua seqüência apresenta sítios internos para as duas enzimas de restrição utilizadas nessa transferência, *Xho* I e *EcoR* I. Além de vários outros sítios que dificultaram posteriores manipulações.

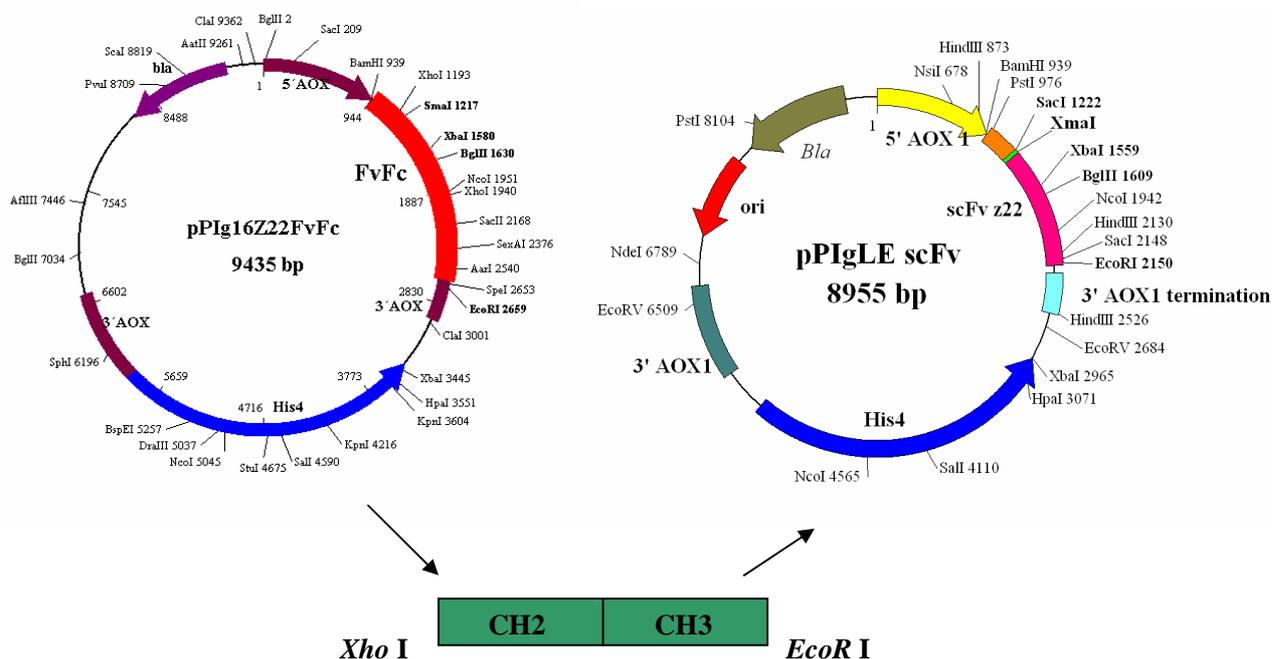


Figura 21. Representação esquemática da clonagem de transferência da porção CH2-CH3 para o pPIg LE. A porção constante da cadeia pesada CH2-CH3 foi transferida do plasmídeo pPIg 16 Z22 FvFc (Andrade *et al.*, 2000) para o vetor de expressão em *P. pastoris* pPIg LE que já continha o scFv humanizado anti-PLA₂, retirando deste a proteína A. *Xho* I e *EcoR* I sítios de clonagem utilizados para essa transferência de cadeias.

5.7.2 – Transformação da *P. pastoris* e seleção dos clones recombinantes produtores de FvFc

Conforme descrito para os scFvs, após a realização da construção do plasmídeo contendo o FvFc humanizado ele foi linearizado com a enzima de restrição *Sal* I e foi realizada a transformação em *P. pastoris*, conforme tópicos 4.2.8 e 4.2.9 de Métodos. A linhagem utilizada também foi a GS115 e a forma de selecionar os clones transformantes também foi pela capacidade de crescimento dessa levedura em meio sem histidina após a recombinação homóloga do plasmídeo.

Após a eletroporação os transformantes foram semeados em placas com meio MD (meio mínimo com glicose) para selecionar somente aqueles que foram efetivamente transformados e se tornaram capacitados a crescerem em meio sem histidina. Posteriormente alguns clones foram repicados serialmente em duas placas, uma com meio MM (meio mínimo com metanol) e outra com meio MD, para indução da expressão do gene codificador da proteína recombinante nas placas MM. Dessa forma, foi feita a seleção das colônias positivas (que expressaram os FvFcs) por meio de *Colony Blotting* (item 4.2.10). No caso do FvFc a revelação das membranas ocorre com o uso do anticorpo anti-Fc humano, que reconhece a região CH2-CH3, conjugado a fosfatase alcalina. O resultado desta indução pode ser observado na Figura 22.

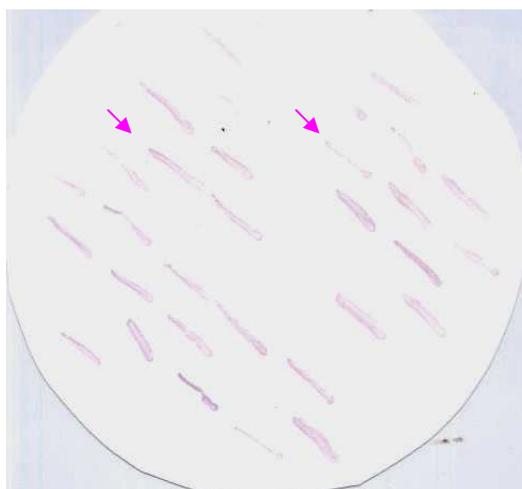


Figura 22. Imunodeteção de colônias produtoras de FvFc humanizado recombinante. As colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e reveladas usando e anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. Os clones que estavam expressando a proteína

recombinante aparecem revelados nas membranas. Setas: clones escolhidos para as fermentações em frasco.

5.7.3 – Expressão do FvFc humanizado

Após a análise dos clones que estavam expressando o FvFc anti-PLA₂ recombinante dois clones foram escolhidos para a realização das fermentações em frasco. Nesse caso a cinética de indução só foi feita até 48 horas. Cada clone escolhido foi crescido em 100mL de meio BMGY e depois de 48h de crescimento o meio era trocado para o meio de indução BMMY (item 4.2.11).

As amostras de sobrenadante foram coletadas nos tempos 0, 24 e 48h. Essas amostras tinham suas proteínas precipitadas com TCA 100% e eram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisadas por *Western blotting* (itens 4.2.12 a 4.2.15). Para a detecção dos FvFcs recombinantes utilizou-se um anticorpo anti-Fc humana conjugado à fosfatase alcalina e a revelação foi feita com NBT/BCIP.

Além disso, para se analisar se ainda estava ocorrendo agregação no sobrenadante de cultura, uma parcela das amostras de 48h foram filtradas em membranas Microcon YM-100 e analisadas em SDS-PAGE e *Western Blotting* tanto o que passou na coluna, quanto o que ficou retido.

Observou-se uma banda de aproximadamente 60 kDa, que corresponde ao tamanho esperado para o FvFc após a redução e separação do dímero. Observou-se também que as proteínas recombinantes não estavam mais se agregando no sobrenadante de cultura (Figura 23).

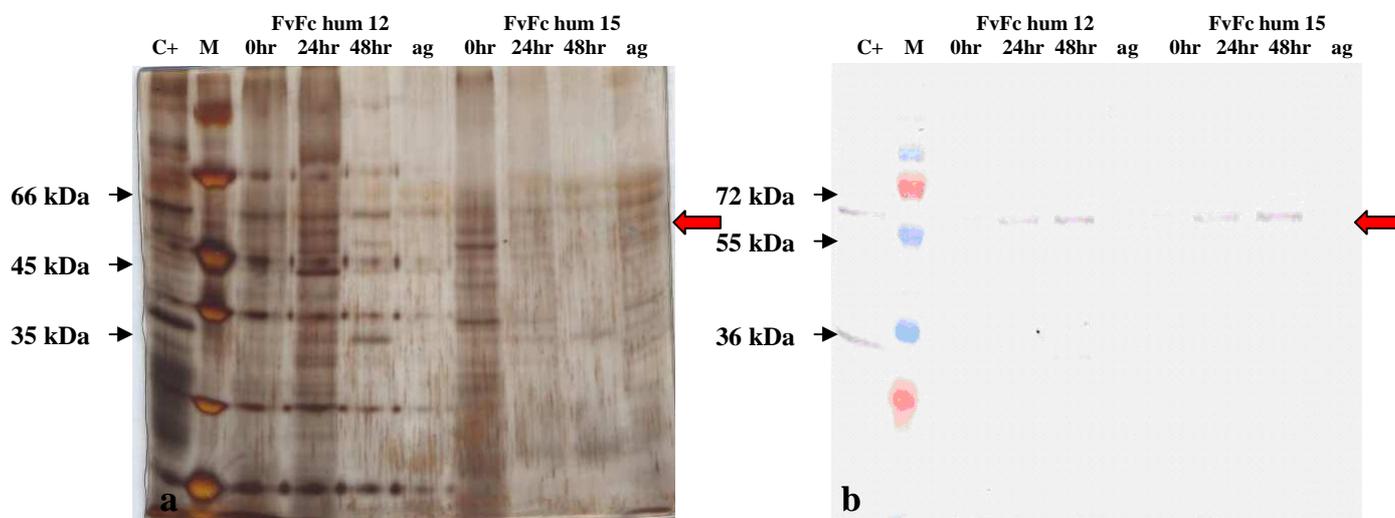


Figura 23. Análise da produção dos FvFcs humanizados em células de *Pichia pastoris*. Os sobrenadantes de cultura dos tempos 0, 24 e 48 horas das fermentações dos FvFcs humanizados foram analisados por SDS-PAGE 10% corados com prata (a) e *Western Blotting* revelado conforme descrito para o *Colony Blotting* (b). FvFc hum 12 e FvFc hum 15 – clones analisados. Ag: agregado. C+: controle positivo - FvFc anti-CD18, M: marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* para o SDS-PAGE e *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus* para o *Western* – Fermentas®). Setas vermelhas: FvFcs recombinantes com aproximadamente 60 kDa.

Após a verificação que os FvFcs não estavam mais agregando durante a fermentação os sobrenadantes finais de cultura foram filtrados e concentrados para posterior purificação dos FvFcs humanizados por cromatografia de afinidade.

5.8 – Purificação dos FvFcs humanizados

A purificação dos FvFcs humanizados anti-PLA₂ foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina comercial HiTrapTM Protein A HP 1mL (GE Healthcare®). Essa coluna apresenta a proteína A conjugada a sefarose.

A proteína A tem a capacidade de se ligar a um grande número de moléculas de superfície celular, além das imunoglobulinas, tais como receptores de Fc do tipo II (FcR-II), moléculas de adesão, receptor do fator de crescimento do endotélio vascular, receptor de célula T (TCR), antígenos HLA-AB entre outros. A maior parte dessas moléculas pertencem à superfamília gênica das Imunoglobulinas e por isso possuem domínios “Ig-like” (regiões

homólogas aos domínios constantes ou variáveis das imunoglobulinas), os quais tem afinidade pela proteína A (Vanamala *et al.*, 2003). Conseqüentemente, pode ser utilizada na purificação de fragmentos de anticorpos que contenham os domínios CH2-CH3 de Imunoglobulinas, como o FvFc, e por isso foi escolhida para essa purificação.

A coluna era acoplada a uma bomba peristáltica, e após lavagem e ativação, a amostra era aplicada na resina, que era novamente lavada antes de se fazer a eluição das proteínas que haviam ficado ligadas (item 4.2.17.2). As amostras eram coletadas de 0,5 em 0,5mL e a presença da proteína recombinante nas frações coletadas era observada por *Dot Blotting*, onde 3 a 5µL de cada fração eram aplicados a membrana de nitrocelulose e revelados com anti-Fc humana conjugado a fosfatase alcalina (item 4.3.16) (Figura 24).

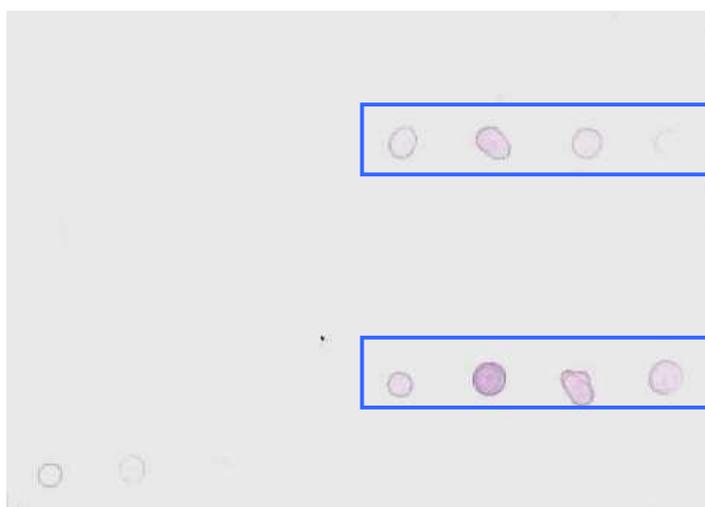


Figura 24. Imunodeteção dos FvFcs humanizados durante a purificação em coluna de proteína A. Três microlitros de cada fração coletada durante as purificações de cada uma das duas fermentações em larga escala foram aplicados em membrana de nitrocelulose e a presença dos FvFcs recombinantes foi detectada com anti-Fc humana conjugado a fosfatase alcalina. Retângulos azuis: frações eluídas da coluna que apresentam o FvFc. Demais pontos não destacados: frações do que não ficou retido na coluna e frações de lavagens.

Como se pode observar a purificação foi bem sucedida e toda a fração de FvFcs recombinantes se ligou a resina e foi eluída posteriormente. As frações de eluição nas quais se detectou a presença dos FvFcs no *Dot Blotting* foram concentradas em membranas - Centricon YM-10 (Millipore), com exclusão de 10kDa, e dialisadas para se trocar o tampão para PBS

1X. Para se verificar a pureza das proteínas recombinantes purificadas uma fração do material concentrado e dialisado foi submetido a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisado por *Western blotting*.

Essa análise possibilitou a detecção de um bom grau de pureza dos FvFc humanizados purificados, sendo que o FvFc humanizado 12 estava em baixa quantidade e foi melhor detectado posteriormente com os experimentos de quantificação explicados a seguir. Entretanto, foi percebido que estava ocorrendo degradação desses FvFc, pois além do fragmento de 60 kDa observava-se também um fragmento de aproximadamente 30 kDa, que também era revelado no *Western* e portanto continha a fração Fc (Figura 25).

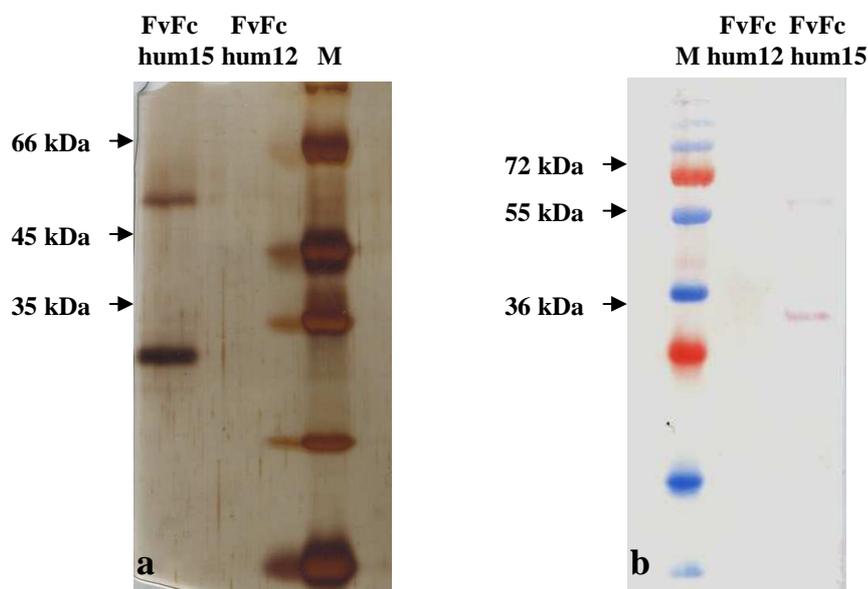


Figura 25. Análise dos FvFcs humanizados purificados. As frações purificadas e dialisadas dos dois FvFcs humanizados foram analisadas por SDS-PAGE 10% corado com prata (a) e *Western Blotting* revelado com anti-Fc humana conjugado a fosfatase alcalina (b). Fragmento de 60 kDa – FvFc desnaturado não degradado. Fragmento de 30 kDa – FvFc desnaturado degradado. M: marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* para o SDS-PAGE e *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus* para o *Western* – Fermentas®).

5.9 – Degradação dos FvFcs humanizados

A degradação de proteínas heterólogas expressas extracelularmente em *Pichia pastoris* ocorre em alguns casos, devido as proteases que a levedura secreta para o meio extracelular

durantes os processos de crescimento e indução (Cereghino & Cregg, 2000). Alternativas para diminuir essa degradação são o uso de inibidores de protease, como EDTA e PMSF, diminuição da temperatura de indução, adição de casaminoácidos, além do uso de linhagens defectivas na produção dessas enzimas (Shi *et al.*, 2003).

Todas essas alternativas foram usadas durante os procedimentos de produção dos fragmentos de anticorpos anti-PLA₂. Como foi mencionado anteriormente, para a produção dos scFvs essas alternativas foram bem sucedidas, entretanto para os FvFcs a degradação continuou ocorrendo. Essa degradação já foi observada em outros fragmentos de anticorpos do tipo FvFc produzidos pelo grupo, como o anti-CD18, entretanto não é observada em outros, como o anti-CD3 ou o anti-Z-DNA, por exemplo.

De acordo com o que foi observado nos géis de SDS-PAGE e nos *Westerns Blottings* percebeu-se que a degradação mantinha a porção Fc intacta, já que continuava a ser reconhecida pelo anticorpo anti-Fc. A partir dessa observação foi feita uma análise para se verificar se a degradação ocorria antes ou depois da ponte dissulfeto que une os dois monômeros (que consiste em uma porção variável unida à uma porção constante CH₂-CH₃) no dímero FvFc. Para isso, uma fração dos FvFcs humanizados purificados foi tratada com o agente desnaturante β-mercaptoetanol, que rompe a ponte dissulfeto separando o dímero FvFc, e outra parte não sofreu esse tratamento antes de ser analisada em gel SDS-PAGE e *Western Blotting*.

O resultado demonstrou que a degradação ocorre antes da ponte dissulfeto, ou seja, ainda na porção variável VL desse fragmento de anticorpo, pois quando não é feita a desnaturação com β-mercaptoetanol o fragmento correspondente ao dímero aparece com o tamanho esperado de 120kDa e o fragmento degradado aparece com tamanho de 60kDa, ou seja, correspondente a porção Fc dimerica. Além disso, também foi demonstrado que a degradação ocorre tanto se a proteína purificada, ou ainda no sobrenadante de cultura, for armazenada a 4°C quanto a -20°C (Figura 26).

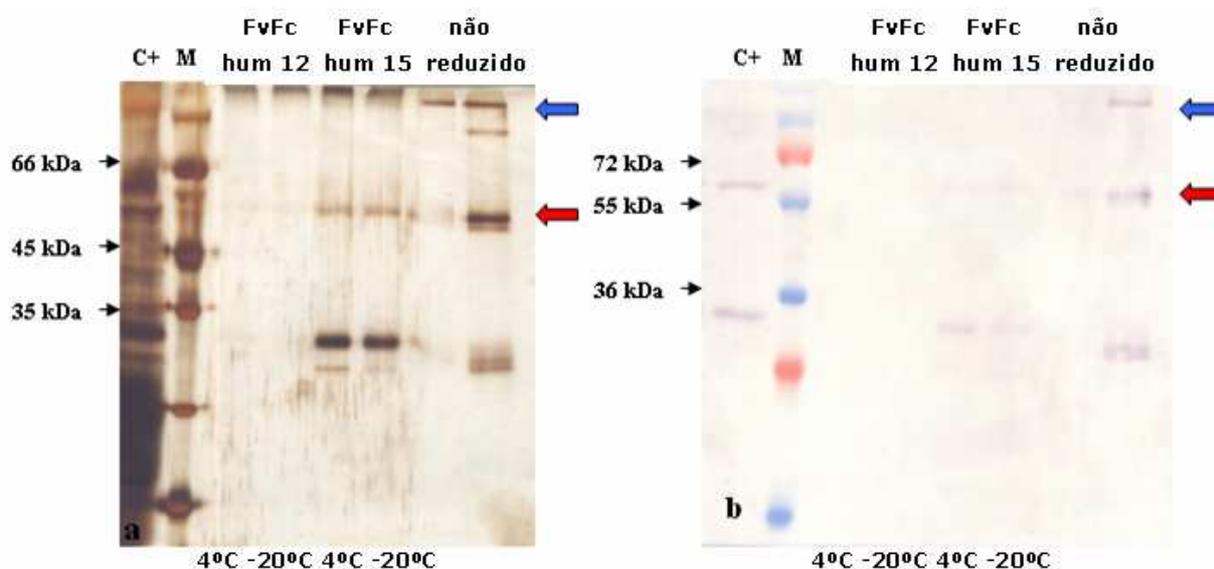


Figura 26. Análise do padrão de degradação dos FvFcs humanizados no sobrenadante de *Pichia pastoris*. A degradação dos FvFcs purificados foi analisada nas temperaturas 4°C e -20°C, e com as amostras reduzidas com β -mercaptoetanol ou não reduzidas, por SDS-PAGE corado com prata (a) e por *Western Blotting*, revelado como descrito anteriormente (b). Fragmento de 60 kDa – FvFc reduzido não degradado. Fragmento de 30 kDa – FvFc reduzido degradado. Setas azuis: FvFcs não-reduzidos. Setas vermelhas: fragmento degradado dos FvFcs não-reduzidos. C+: controle positivo - FvFc anti-CD18. M: marcador molecular (*Unstained Protein Molecular Weight Marker* para o SDS-PAGE e *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus* para o *Western* – Fermentas®).

A observação de que a degradação desses FvFcs ocorre provavelmente nas porções finais da cadeia variável leve (VL) desses fragmentos de anticorpos condiz com o que já havia sido observado anteriormente pelo grupo, já que apenas alguns fragmentos FvFc degradam e outros não, apesar de todos possuírem a mesma porção Fc. Após essa constatação foi feita uma análise de possíveis sítios de clivagem de proteases secretadas pela *Pichia pastoris*, como a KEX2, por exemplo. Entretanto não foram encontradas seqüências que se enquadram no padrão de sítios específicos para essas proteases, descrito na literatura (Bevan *et al.*, 1998, Cereghino & Cregg, 2000 e Shi *et al.*, 2003).

A degradação dos FvFcs humanizados ocorre mesmo sendo as fermentações realizadas com uso de casaminoácidos e de inibidores de proteases (EDTA) no meio de cultura de indução e a diminuição da temperatura de indução, alternativas citadas por Shi e colaboradores (2003) para redução da degradação de proteínas heterólogas no sobrenadante de *P. pastoris*.

Entretanto percebeu-se que logo após a fermentação o nível de degradação ainda era baixo, e como não havia agregação a quantidade de proteína recombinante obtida era suficiente para a realização dos testes de ligação *in vitro*. Foram então realizadas novas fermentações e purificações, conforme descrito anteriormente, e o material, tanto purificado quanto não purificado foi quantificado para realização dos testes *in vitro*.

5.10 – Quantificação dos FvFc's humanizados

5.10.1 – Pelo kit BCA

Para se quantificar os FvFc's humanizados anti-PLA₂ purificados foi utilizado o kit comercial BCA – Ácido Bicinrônico (Pierce®). Essa quantificação foi feita a partir de uma curva-padrão que usa a albumina bovina (BSA), em diferentes concentrações, como parâmetro (Figura 27). A quantificação era realizada conforme descrito no item 4.2.20 de Métodos.

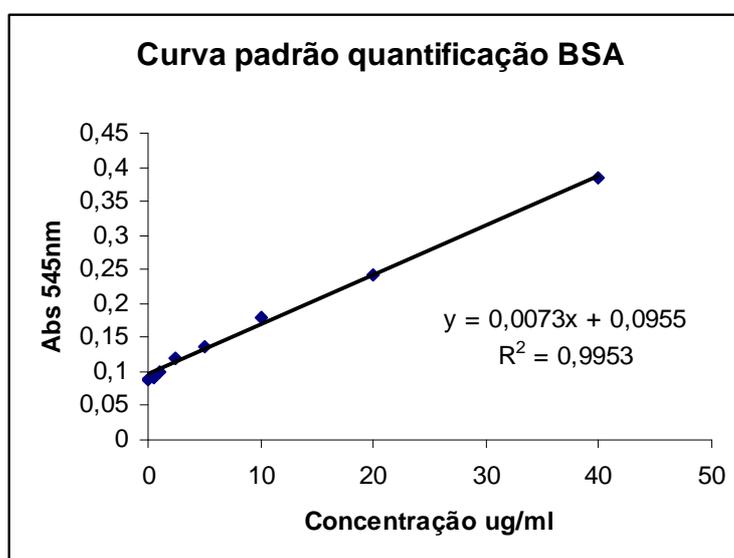


Figura 27. Curva-padrão para o kit BCA. O gráfico apresenta a linha tendência da quantificação do padrão de BSA utilizado. A partir desse gráfico foi obtida a equação da reta, que foi usada para estimar a concentração de FvFc purificado.

A partir da equação da reta obtida pela curva padrão acima foi calculado que a concentração dos FvFc's humanizados purificados eram de 4µg/mL para o FvFc humanizado

12 e 20 μ g/mL para o FvFc humanizado 15. Rendimento que nos permitiram realizar os testes *in vitro*.

5.10.2 – Por ELISA

Entretanto, para se quantificar os FvFcs humanizados no sobrenadante de cultura o método anterior não era eficaz, devido a presença de várias outras proteínas presentes no sobrenadante de cultura de *Pichia pastoris*. Por isso, para se realizar essa quantificação foi realizado um Ensaio de Ligação (ELISA).

Os poços de interesse das placas de microtitulação eram sensibilizados com um anticorpo anti-IgG humana H+L, que se liga a porção variável dos anticorpos. Portanto, ao se aplicar o sobrenadante de cultura, após as lavagens apenas os FvFcs presentes nesse sobrenadante permaneceriam ligados a placa. A revelação era feita utilizando-se o anticorpo anti-Fc humana, que se liga a região constante dos anticorpos, conjugado a fosfatase alcalina (item 4.2.21.1).

A quantificação dos FvFcs humanizados era feita a partir da obtenção de uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de IgG humana (Figura 28). A partir da equação da reta obtida pela curva padrão acima foi calculado que a concentração dos FvFcs humanizados presentes no sobrenadante de cultura eram de 5 μ g/mL para o FvFc humanizado 12 e 60 μ g/mL para o FvFc humanizado 15. Rendimento que nos permitiram realizar também com os sobrenadantes os testes *in vitro*.

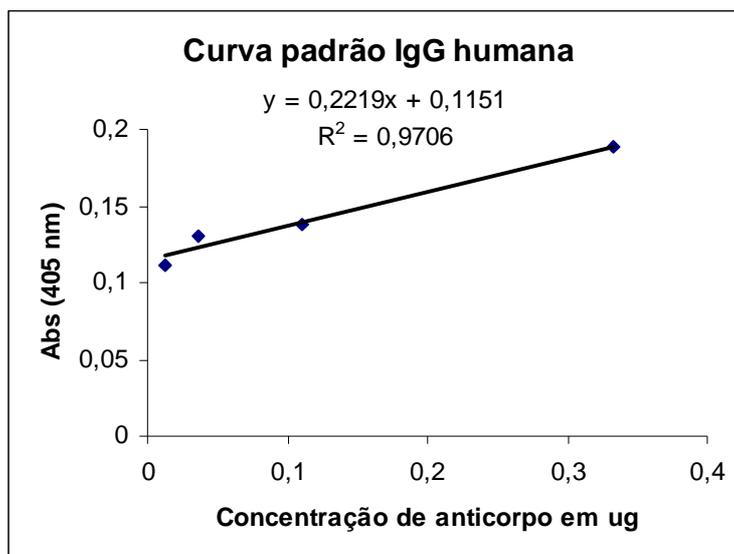


Figura 28. Curva-padrão para quantificação por ELISA. O gráfico apresenta a linha tendência da quantificação do padrão de IgG humana utilizado. A partir desse gráfico foi obtida a equação da reta, que foi usada para estimar a concentração de FvFc presente no sobrenadante de cultura de *Pichia pastoris*.

5.11 – Detecção da afinidade dos FvFcs humanizados anti-PLA₂ *in vitro*

5.11.1 – Testes de Ligação

Para validar a atividade ligante das formas humanizadas do anti-PLA₂ após as quantificações dos fragmentos FvFcs humanizados, purificados e presentes no sobrenadantes de cultura de *Pichia pastoris*, foram realizados os testes de ligação ao antígeno – ELISAS de ligação (item 4.2.21.2). Esses ensaios de ligação foram feitos tanto com o extrato bruto da peçonha de *Bothrops atrox* quanto com a PLA₂ purificada, e utilizando os FvFcs purificados ou o sobrenadante da cultura.

Como controle positivo desses ensaios foi utilizado o próprio anticorpo monoclonal anti-PLA₂ produzido por Kanashiro e colaboradores, 2002. E como controle negativo utilizava-se um FvFc não relacionado (anti-CD18). Quando o teste utilizava sobrenadante de cultura os controles também eram diluídos em meio de cultura. As placas de microtitulação eram sensibilizadas ou com o veneno total ou com a PLA₂ purificada e após a incubação os FvFcs eram revelados com anticorpo anti-Fc humana conjugado a fosfatase alcalina e o

anticorpo monoclonal murino revelado com anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. A leitura era feita a 405nm e os resultados obtidos a partir da média das duplicatas eram analisados em gráficos.

Os resultados desses testes demonstraram que o FvFc humanizado manteve sua capacidade de ligação ao antígeno, tanto quando presente no sobrenadante de cultura (Figuras 29 e 30) quanto após a purificação (Figuras 31 e 32).

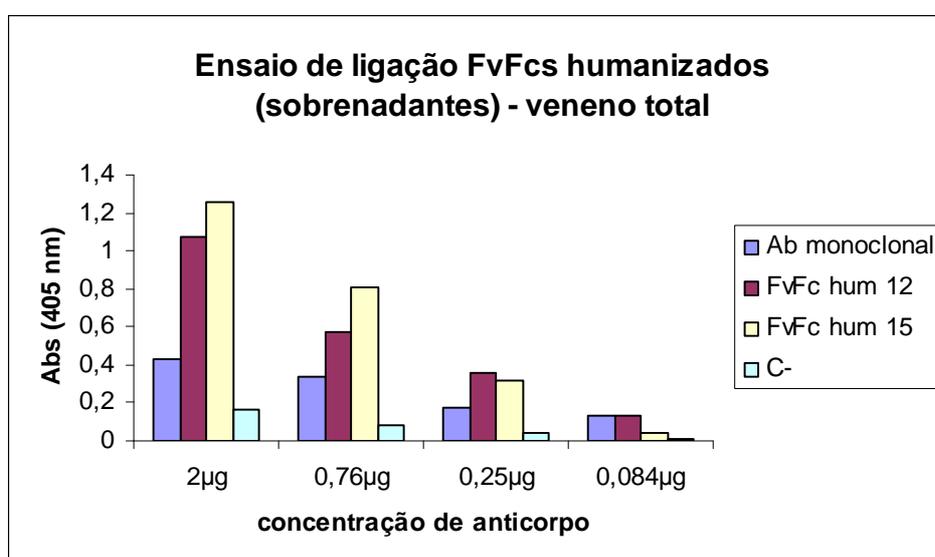


Figura 29. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado utilizando-se extrato bruto da peçonha de *Bothrops atrox*. A placa de microtitulação foi sensibilizada com veneno total (1µg/poço), bloqueada com solução de bloqueio e logo após foi incubado com o sobrenadante de cultura com os FvFcs quantificados por ELISA, em diferentes concentrações. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. No controle positivo (Ab monoclonal) o anticorpo utilizado para a revelação era o anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorvância medida a 405nm. C-: FvFc anti-CD18.

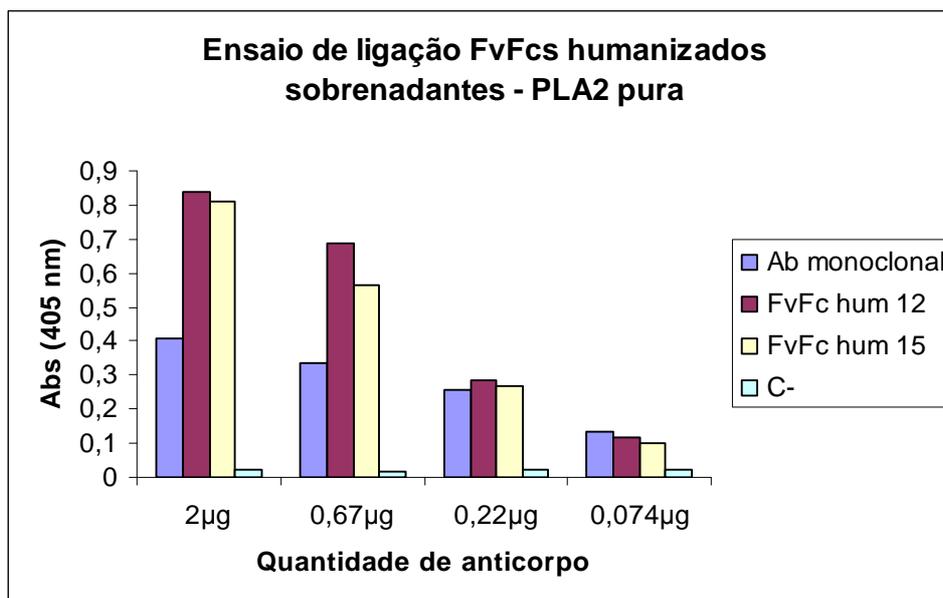


Figura 30. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado utilizando-se a PLA₂ purificada. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,1 µg/poço de PLA₂ purificada, bloqueada com solução de bloqueio e logo após foi incubado com o sobrenadante de cultura com os FvFcs quantificados por ELISA, em diferentes concentrações. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. No controle positivo (Ab monoclonal) o anticorpo utilizado para a revelação era o anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorbância medida a 405nm. C-: FvFc anti-CD18.

A manutenção da atividade biológica ligante dos dois clones de FvFc humanizado anti-PLA₂ condiz com o esperado, observando que em muitas situações na humanização de anticorpos murinos ocorre uma perda de afinidade do anticorpo humanizado pelo seu antígeno (Hwang *et al.*, 2005). Principalmente quando os resíduos críticos para manutenção da estrutura das CDRs presentes nos arcações humanos não são trocados por resíduos murinos (Kashimiri *et al.*, 2005). Entretanto o FvFc humanizado anti-PLA₂ produzido nesse trabalho manteve sua atividade ligante e apresenta menos de 10% de resíduos murinos nas versões humanizadas e todos localizados nas CDRs.

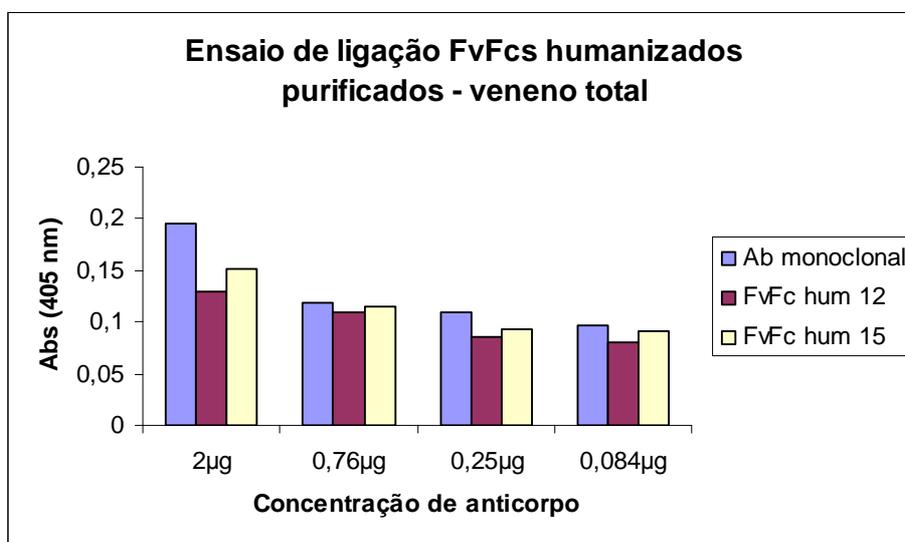


Figura 31. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado purificado utilizando-se extrato bruto da peçonha de *Bothrops atrox*. A placa de microtitulação foi sensibilizada com veneno total (1µg/poço), bloqueada com solução de bloqueio e logo após foi incubado com os FvFcs purificados quantificados com kit BCA, em diferentes concentrações. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. No controle positivo (Ab monoclonal) o anticorpo utilizado para a revelação era o anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorbância medida a 405nm.

Como se pode observar a ligação dos fragmentos FvFc ao antígeno aparenta ser maior quando este ainda não foi purificado, sendo maior inclusive do que a ligação do próprio anticorpo monoclonal murino, já após a purificação a ligação aparenta ser reduzida. Isso se deve provavelmente ao aumento da degradação da proteína devido ao tempo, já que os ensaios utilizando o sobrenadante eram feitos logo após a indução enquanto os ensaios com os purificados demoravam um pouco mais de tempo, aumentando a degradação e tornando a quantificação super estimada em relação a quantidade de proteína funcional.

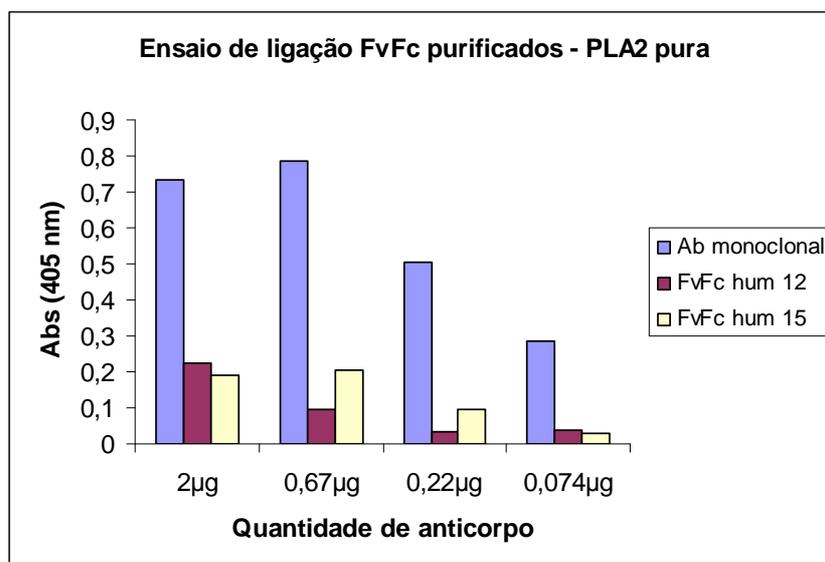


Figura 32. Teste da atividade biológica do FvFc humanizado purificado utilizando-se a PLA₂ purificada. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,1µg/poço de PLA₂ purificada, bloqueada com solução de bloqueio e incubada com os FvFcs purificados, em diferentes concentrações. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. No controle positivo (Ab monoclonal) o anticorpo utilizado para a revelação era o anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorbância medida a 405nm.

5.11.2 – Testes de Inibição

Para se verificar se os FvFcs humanizados estavam se ligando ao antígeno pelo mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal original foram feitos testes de inibição ou competição (item 4.2.21.3). Para isso as placas eram sensibilizadas com o veneno completo de *Bothrops atrox* ou com a PLA₂ purificada e após o bloqueio o anticorpo monoclonal era incubado em concentrações variando de 0 a 20µg por poço. Os FvFcs purificados ou o sobrenadante de cultura eram incubados sempre a 100µg por poço. E todos os testes eram feitos em duplicatas.

Após a incubação com os FvFcs a revelação era feita com anticorpo anti-Fc humana conjugado a fosfatase alcalina. A leitura era feita a 405nm e os resultados obtidos a partir da média das duplicatas eram analisados em gráficos.

Esses testes demonstraram que os FvFcs humanizados competem pela ligação ao antígeno com o anticorpo monoclonal original e que portanto, se ligam ao mesmo epitopo (Figuras 33, 34 e 35).

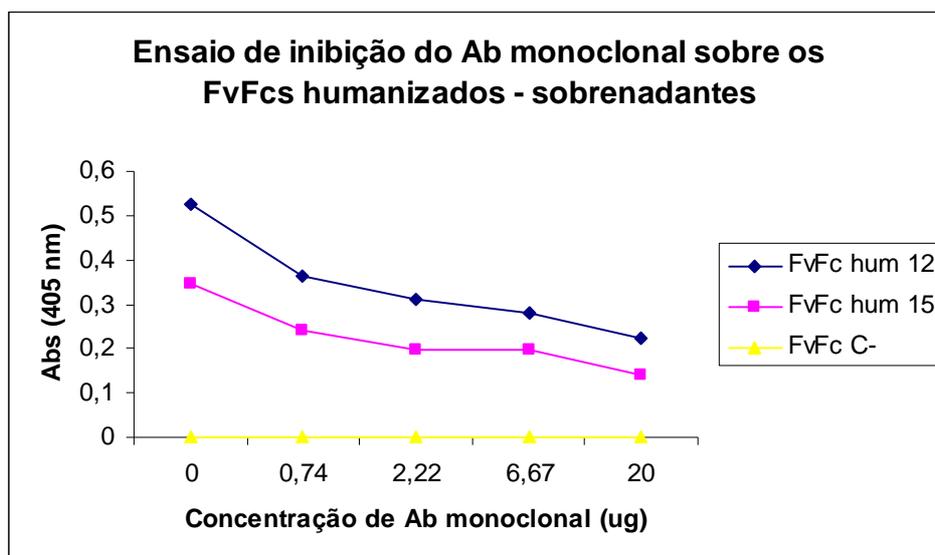


Figura 33. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados ao veneno total pelo anticorpo monoclonal. A placa de microtitulação foi sensibilizada com veneno total (10µg/poço), bloqueada com solução de bloqueio e logo após incubada com o anticorpo monoclonal em diferentes concentrações. O sobrenadante de cultura com os FvFcs quantificados por ELISA era incubado a 100µg/poço. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorbância medida a 405nm. C-: Controle negativo - FvFc anti-CD18.

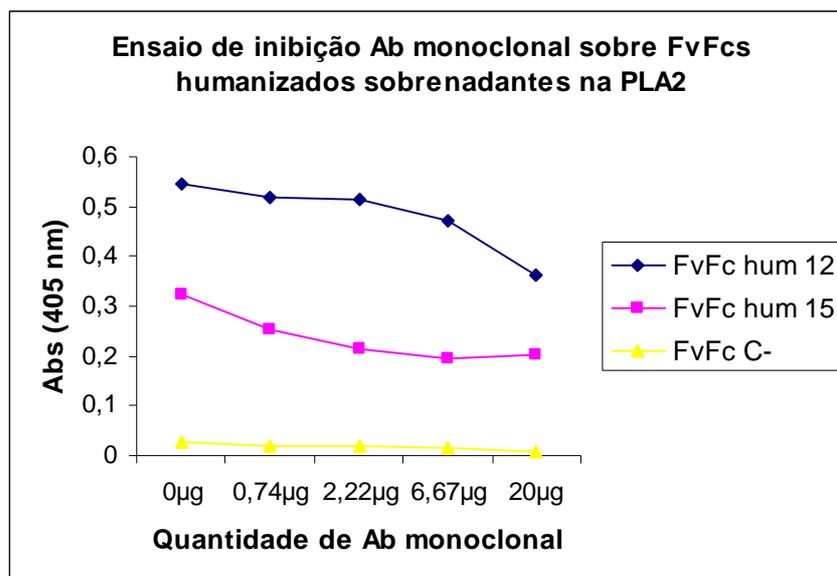


Figura 34. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados a PLA₂ purificada pelo anticorpo monoclonal. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,1µg/poço de PLA₂ pura, bloqueada com solução de bloqueio e logo após foi incubado com o anticorpo monoclonal em diferentes concentrações. O sobrenadante de cultura com os FvFc's quantificados por ELISA era incubado a 100µg/poço. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorbância medida a 405nm. C-: Controle negativo - FvFc anti-CD18.

Esses resultados demonstram que a humanização não alterou a capacidade de ligação dos anticorpos anti-PLA₂ ao seu antígeno. Além disso, é possível que o FvFc humanizado possa ser capaz de reconhecer também outras PLA₂ de outras serpentes do gênero *Bothrops*, devido ao alto grau de similaridade apresentada por algumas dessas fosfolipases descrito por Kanashiro e colaboradores (2002) e Gutiérrez & Lomonte (1995). Em uma etapa posterior, com auxílio de modelagem molecular, esse trabalho poderia focalizar, além de um aumento na afinidade, a ampliação da gama de especificidade tornando esse anticorpo eficiente também contra outros venenos.

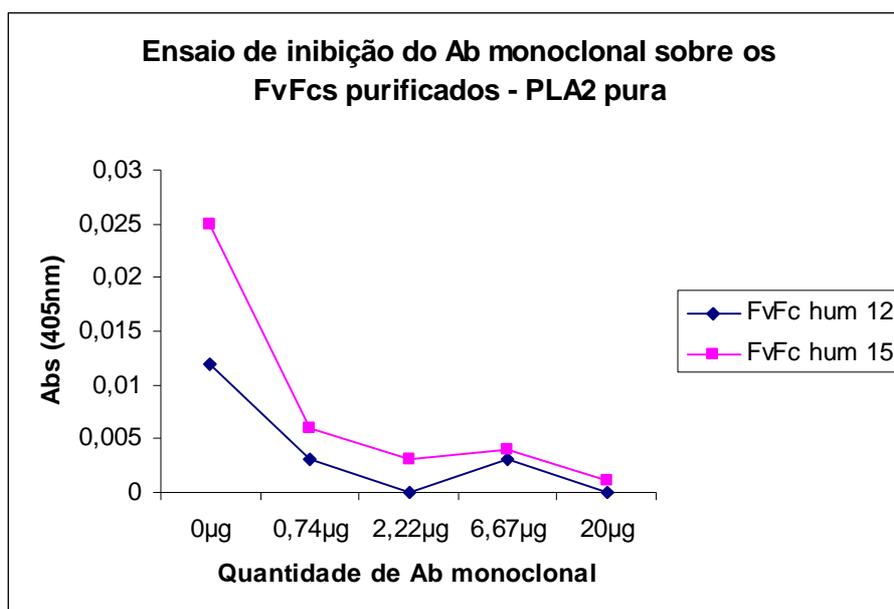


Figura 35. Imunoensaio enzimático (ELISA) de inibição da ligação dos fragmentos recombinantes FvFc humanizados purificados a PLA₂ purificada pelo anticorpo monoclonal. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 0,1µg/poço de PLA₂ purificada, bloqueada com solução de bloqueio e logo após incubado com o anticorpo monoclonal em diferentes concentrações. Os FvFc's purificados quantificados pelo kit BCA eram incubados a 100µg/poço. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Fc humano conjugado a fosfatase alcalina. A reação colorimétrica foi visualizada adicionando-se 1mg/mL de pNPP e a absorvância medida a 405nm.

6 – Conclusões e Perspectivas

O processo de humanização visa a redução do máximo possível de resíduos de aminoácidos murinos nesses anticorpos sem que para isso percam sua afinidade pelo antígeno (Morrison *et al.*, 1984). Nesse trabalho foi realizada a humanização do anticorpo anti-fosfolipase A₂ de *Bothros atrox* com o objetivo de se obter anticorpos mais específicos para o tratamento de acidentes ofídicos. A versão humanizada é formada por arcabouços humanos escolhidos em bancos de dados e as CDRs murinas do anticorpo monoclonal murino produzido por Kanashiro e colaboradores (2002), e apresenta 13% de resíduos murinos em sua seqüência.

Em diversas tentativas de humanização os anticorpos perdem a afinidade pelo seu antígeno (Hwang & Foote, 2005). Entretanto, como pode ser observado a partir dos resultados obtidos nesse trabalho os fragmentos FvFcs humanizados anti-fosfolipase A₂ produzidos mantiveram sua capacidade de ligação ao antígeno, tanto quando este está presente no extrato bruto da peçonha quanto na forma purificada e além disso, competem pela ligação a esse antígeno com o anticorpo monoclonal murino original, apesar de apresentarem o mínimo possível de resíduos murinos.

A expressão dos fragmentos de anticorpos em *Pichia pastoris* também demonstrou bons resultados, porém foi observada uma forte agregação do fragmento de menor tamanho (scFv). Entretanto o aumento do tamanho dos fragmentos de anticorpos de scFv para FvFc solucionou o problema de agregação que os scFvs apresentaram durante sua produção. Em relação à degradação dos fragmentos FvFcs o problema ainda não foi solucionado e como perspectiva é proposta uma melhor análise dos possíveis sítios de clivagem de proteases de *Pichia pastoris* e ajustes nas condições da fermentação da levedura a fim de diminuir essa degradação, como uso de coquetéis de inibidores de proteases e até mesmo o uso de outros sistemas de expressão como célula de mamífero.

As análises *in vitro* alcançaram os resultados esperados e os fragmentos FvFcs humanizados foram capazes de reconhecer e se ligar ao antígeno. A próxima etapa desse trabalho é então analisar a atividade efetora dos fragmentos humanizados com testes *in vivo*, que visam avaliar se os fragmentos humanizados mantiveram a capacidade de neutralização

da atividade da PLA₂ em camundongos. Além da análise de ligação a outras fosfolipases presentes no veneno de outras espécies do gênero *Bothrops*.

7 – Referências Bibliográficas

- ABBAS A, LICHTMAN A, POBER J. (2000). Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company 4 ed.
- ANDRADE, E.V., ALBUQUERQUE, F.C., MORAES, L.M.P., BRÍGIDO, M.M. (2000). Single-Chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *J. Biochem.* **128**: 891-895.
- ARAKAWA, T., TSUMOTO, K., NAGASE, K., EJIMA, D. (2007). The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography. *Protein Expression and Purification* **54**:110–116.
- AROCHA-PINANGO, C.L., MARVAL, E., GUERRERO, B. (2000). Lonomia genus caterpillar toxins: biochemical aspects - Review. *Biochimie* **82**(9-10): 937-42.
- AZEVEDO, M.O., FELIPE, M.S.S., BRÍGIDO, M.M, MARANHÃO, A.Q., DE SOUZA, M.T. (2003). Técnicas básicas em Biologia Molecular. Editora UnB.
- BAM, N.B., CLELAND, J.L., YANG, J., MANNING, M.C., CARPENTER, J.F., KELLEY, R.F., RANDOLPH, T.W. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *J Pharm Sci* **87**(12):1554-1559.
- BEVAN, A., BRENNER, C., FULLER, R.S. (1998). Quantitative assessment of enzyme specificity in vivo: P2 recognition by Kex2 protease defined in a genetic system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:10384–10389.
- BOCHNER, R. & STRUCHINER, C.J. (2003). Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, **19**(1):7-16.
- BRASIL. (1987). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. *Centro de Documentação do Ministério da Saúde*. Brasília.
- BRASIL, Ministério da Saúde. (2001). Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. 2ª Edição, *Fundação Nacional de Saúde*, Brasília.
- BRAZIL, V. (1911). A defesa contra o ophidismo. *Pocai and Weiss*, São Paulo.
- BRÍGIDO, M.M., POLYMENIS, M & STOLLAR, B.D. (1993). Role of mouse VH10 and VL gene segments in the binding of antibody to Z-DNA, analysed with recombinant single chain Fv molecules. *J. Immunology.* **150**:469-479.

- BURTET, R.T. (2006). Caracterização de um fragmento recombinante scFab anti Z-DNA produzido em *Pichia pastoris*. Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado.
- CALDAS, C.A. (1999). Construção de versões hemi-humanizadas da porção variável de um anticorpo anti-CD18 humano. Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado.
- CALDAS, C.A., COELHO V., KALIL J., MORO A.M., MARANHÃO A.M., BRÍGIDO M.M. (2003). Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Molecular Immunology*. **39**(15): 941-952.
- CALDAS, C.A., COELHO, V., RIDGEN, D.J., NESCHICH, G. MORO, A.M., BRÍGIDO, M.M. (2000). Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. *Protein Eng.* **13**(5):353-360.
- CEREGHINO, J.L. & CREGG, J.M. (2000). *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 45-66.
- CHAPMAN, A.P., ANTONIW, P., SPITALI, M., WEST, S., STEPHENS, S., KING, D.J. (1999). Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nature Biotechnology* **17**:780-783.
- CHOU, D.K., KRISHNAMURTHY, R., RANDOLPH, T.W., CARPENTER, J.F., MANNING, M.C. (2005). Effects of Tween 20 and Tween 80 on the stability of Albutropin during agitation. *J Pharm Sci.* **94**(6):1368-1381.
- CHOWDHURY, P.S. & WU, H. (2005). Tailor-made antibody therapeutics. *Methods* **36**:11–24.
- COSTA, P.L.N., (2004). Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. Brasília. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado.
- CREGG, J. M. (1999). Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Expression in *Pichia pastoris*. *Ed. Academic press.* 157-191.
- CREGG J.M., BARRINGER, K.J., HESSLER, A.Y., MADDEN, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformation. *Molecular and Cellular Biology* **5**:3376-3385.

- DALL'ACQUA, W.F., DAMSCHRODER, M.M., ZHANG, J., WOODS, R.M., WIDJAJA, L., YU, J., WU, H. (2005) Antibody humanization by framework shuffling. *Methods* **36**: 43–60.
- DAMASCENO, L.M., PLA, I., CHANG, H., COHEN, L., RITTER, G., OLD, L.J., BATT, C.A. (2004). An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **37**: 18–26.
- FREYRE, F.M., VÁZQUEZ, J.E., AYALA, M., CANAÁN-HADEN, L., BELL, H., RODRÍGUEZ, I., GONZÁLEZ, A., CINTADO, A., GAVILONDO, J.V. (2000). Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, **76**:157–163.
- FUNDACENTRO. (2001). Prevenção de acidentes com animais peçonhentos. Instituto Butantan. *Ministério do Trabalho e Emprego, Fundacentro*. São Paulo.
- GUÉRCIO, R.A.P., SHEVCHENKO, A., SHEVCHENKO, A., LÓPEZ-LOZANO, J.L., PABA1, J., SOUSA, M.V., RICART, C.A.O. (2006). Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Science* **4**:11.
- GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. (1995). Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* **33**: 1405-1424.
- HARRISON, J.S., GILL, A., HOARE, M. (1998). Stability of a single-chain Fv antibody fragment when exposed to a high shear environment combined with air-liquid interfaces. *Biotechnol Bioeng.* **59**(4):517-519.
- HOLLIGER, P. & HUDSON, P.J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* **23**(9):1126-1136.
- HU, S., LI, L., QIAO, J., GUO, Y., CHENG, L., LIU, J. (2006). Codon optimization, expression, and characterization of an internalizing anti-ErbB2 single-chain antibody in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **47**: 249–257.
- HWANG, W.Y.K. & FOOTE, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36** 3-10.
- HWANG, W.Y.K., ALMAGRO, J.C., BUSS, T.N., TAN, P., FOOTE, J. (2005). Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods* **36**: 35–42.

- ISAACS, I.D., CLARK, M.R., GREENWOOD, S.E., WALDMANN, H. (1992). Therapy with monoclonal antibodies – Asan *in vivo* model for the assessment of therapeutic potential. *The Journal of Immunology* **148**: 3062-3071.
- KABAT, E.A., WU, T.T., PERRY, H.M., GOTTESMANN, K.S., FOELLER, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, fifth ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- KANASHIRO, M.M., ESCOCARD, R.C.M., PETRETSKI, J.H., PRATES, M.V., ALVES, E.W., MACHADO, O.L.T., DA SILVA, W.D., KIPNIS, T.L. (2002). Biochemical and biological properties of phospholipases A2 from *Bothrops atrox* venom. *Biochemical Pharmacology* **64**: 1179-1186.
- KASHMIRI, S.V.S., PASCALIS, R.D., GONZALES, N.R., SCHLOM, J. (2005). SDR grafting - a new approach to antibody humanization. *Methods*, **36**: 25–34.
- KIM, S J., PARK, Y., HONG, H.J. (2005). Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. *Mol. Cells* **20**(1):17-29.
- LI, H., SETHEURAMAN, N., STADHEIM, T.A., ZHA, D., PRINZ, B., BALLEW, N., BOBROWICZ, P., CHOI, B.K., COOK, W.J., CUKAN, M., HOUSTOM-CUMMINGS, N.R., DAVIDSON, R., GONG, B., HAMILTON, S.R., HOOPEES, J.P., JIANG, Y., KIM, N., MANSFIELD, R., NETT, J.H., RIOS, S., STRAWBRIDGE, R., WILDT, S., GERNGROSS, T.U. (2006). Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* **24**:210-215.
- LOMONTE, B. & ANGULO, Y. (2003). Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A2. *Biochemical Pharmacology* **66**: 1993–2000.
- LOMONTE, B., ANGULO, Y., CALDERÓN, L. (2003). An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* **42**: 885–901.
- LOMONTE, B., TARKOWSKI, A., BAGGE, U., HANSON, L.A. (1994). Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem Pharmacol* **47**: 1509–18.

- Manual do Kit de Expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*. Invitrogen® .
Número do Catálogo: K1710-01, Versão 3.0.
- MARANHÃO, A.Q., BRÍGIDO, M.M. (2001). Anticorpos humanizados. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* **23**:38-43.
- MEDEIROS, C.R.DE., MÁLAQUE, C.M.S., WEN, F.H., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L.C., FRANCO, M.M. (2000). Acidentes por serpentes peçonhentas. Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios. Instituto Butantan. Ibama. São Paulo.
- MELO, P.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., SUAREZ-KURTZ, G. (1993). Antagonism of the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon* **31**: 285–91.
- MORRISON, S L., JOHNSON, M.J., HERZENBERG, L.A., OLI, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:6851-6855.
- PADLAN, E. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* **31**(3): 169-217.
- PARDAL, P.P.O., SOUZA, S.M., MONTEIRO, M.R.DEC.DAC., FAN, H.W., CARDOSO, J.L.C., FRANÇA, F.O.S., TOMY, S.C., SANO-MARTINS, I.S., SOUSA-E-SILVA, M.C.C.DE., COLOMBINI, M., KODERA, N.F., MOURA-DA-SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., VELARDE, D.T., KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., WARRELL, D.A. (2004). Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 28—42.
- PINHO, F.M.O., OLIVEIRA, E.S., FALEIROS, F. (2004). Snakebites in the state of Goiás, Brazil. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **50**(1):93-96.
- PRESTA, L.G., CHEN, H., O'CONNOR, S.J., CHISHOLM, V., MENG, Y.G., KRUMMEN, L., WINKLER, M., FERRARA, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research* **57**:4593-4599.
- QUIRÓS, S., ALAPE-GIRÓN, A., ANGULO, Y., LOMONTE, B. (2007). Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new α -type phospholipase A2

- myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **146**(1):60-68.
- RIBEIRO, L.A. & JORGE, M.T. (1997). Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30**(6): 475-480.
- RUCAVADO, A. & LOMONTE, B. (1996). Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. *Toxicon* **34**: 567-577.
- SAMBROOK R., FRITSCH E. MANIATIS T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- SHI, X., KARKUT, T., CHAMANKHAH, M., ALTING-MEES, M., HEMMINGSEN, S. M., HEGEDUS, D. (2003). Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **28**:321–330.
- SILVA, C.J.DA., JORGE, M.T., RIBEIRO, L.A. (2003). Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon* **41**: 251–255.
- SILVA, N.M.V.DA., ARRUDA, E.Z., MURAKAMI, Y.J.B., MORAES, R.A.M., EL-KIK, C.Z., TOMAZ, M.A., FERNANDES, F.F.A., OLIVEIRA, C.Z., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R., MELO, P.A. (2007). Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon* **50**:196–205.
- TAMAROZZI, M.B., SOARES, S.G., MARCUSSI, S., GIGLIO, J.R., BARBOSA, J.E. (2006). Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**: 1450–1457.
- TATSCH, C. (2006). Aumenta o registro de picadas de serpente no país. *Folha Online – Cotidiano*, Folha de São Paulo, setembro.
- TSURUSHITA, N., HINTON, P.R., KUMAR, S. (2005). Design of humanized antibodies: From anti-Tac to Zenapax. *Methods* **36**:69–83.
- VALENTIN, E. & LAMBEAU, G. (2000). What can venom phospholipases A2 tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A2? *Biochimie* **82**: 815–831.

- VANAMALA, S., SEETHARAM, S., YAMMANI, R., SEETHARAM, B. (2003). Human transcobalamin II receptor binds to *Staphylococcus aureus* protein A: implications as to its structure and function. *Arch Biochemistry and Biophysics* **411**:204-214.
- WALSH, G. (2005). Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *TRENDS in Biotechnology* **23**(11):553-558.
- WOO, J.H., LIU, Y.Y., NEVILLE JR., D.M. (2006). Minimization of aggregation of secreted bivalent anti-human T cell immunotoxin in *Pichia pastoris* bioreactor culture by optimizing culture conditions for protein secretion. *Journal of Biotechnology* **121**:75–85.
- ZAMUNÉR, S.R., CRUZ-HÖFLING, M.A.DA., CORRADO, A.P., HYSLOP, S., RODRIGUES-SIMIONI, L. (2004). Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian Bothrops venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* **44**: 259–271.
- ZULIANI, J.P., FERNANDES, C.M., ZAMUNÉR, S.R., GUTIÉRREZ, J.M., TEIXEIRA, C.F.P. (2005). Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* **45**: 335–346.