



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA MOLECULAR
PÓS – GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

*Construção in vitro de bibliotecas de cadeias
leves humanas para seleção de novos
anticorpos anti-CD3*

Maria Paula Carneiro de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Brasília- DF
2015

*Construção in vitro de bibliotecas de cadeias
leves humanas para seleção de novos
anticorpos anti-CD3*

Maria Paula Carneiro de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Dissertação apresentada ao
Departamento de Patologia Molecular
Do Instituto de ciências da saúde da
Universidade de Brasília como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Patologia Molecular

Brasília- DF
2015

Banca Examinadora:

Dr. Tatsuya Nagata- UnB (Titular- Membro interno)

Dra. Rosangela Vieira de Andrade –UCB (Titular- Membro externo)

Dr. Marcelo de Macedo Brígido- UnB (Presidente da comissão Examinadora- UnB)

Dr. Rafael Trindade Burtet – (Suplente)

Trabalho desenvolvido no
laboratório de Imunologia Molecular da
Universidade de Brasília, sob orientação do
Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido.

Dedico esta dissertação as minhas 3 mães: Maria de Fatima, Heloisa e Albina, que dedicaram suas vidas, com muito sacrifício para me proporcionar o bem mais valioso que posso ter, minha educação e meu caráter. Pelo seu enorme amor, carinho, dedicação ... o meu coração.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador e chefe Marcelo.

Obrigada por nunca desistir, sempre com um olhar amigo tentar entender minhas falhas e me orientando a buscar o meu melhor. Obrigada por todas as broncas mas também por toda confiança. Nesse tempo que estive aos seus cuidados amadureci tanto os meus conhecimentos científicos como a maneira de resolver situações adversas. A minha admiração por você é enorme, e a minha gratidão é infinita.

Agradecimentos Especiais

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida. Por me permitir passar por tantas provações e vence-las. Por sempre ser minha fonte de força para superar todos os obstáculos e conseguir seguir em frente sempre acreditando no melhor.

A minha saudosa mãe Maria de Fátima (*in memoriam*) que apesar de não estar presente de corpo físico sempre foi minha fonte de inspiração, e me guiou com seu espírito e sua luz durante todos os momentos da minha vida. Apesar da saudade que me mata a cada dia, cresci com seu exemplo de força e mulher guerreira, que trabalhava o dia inteiro e nos tempos livres criava uma maneira de acrescentar a renda da família. Posso não ter tido todos os bens materiais, mas ter a honra de ser sua filha, sempre foi e será meu maior tesouro. Meu amor por ela é eterno e jamais será esquecido.

A minha mãe Heloisa que cuidou de mim incentivando todos os meus sonhos, me deu colo quando o mundo era muito duro, secou minhas lágrimas, riu nos momentos de alegria e nunca me deixou sem seu apoio e amor incondicional. Obrigada por se doar tanto e me oferecer uma educação de qualidade, obrigada por acreditar na minha capacidade e valorizar os meus esforços. Obrigada por sempre estar ao meu lado, passar noites em claro e me amar tão profundamente. Obrigada por me acolher como filha e me aceitar como sua. Um exemplo de mulher batalhadora, íntegra e guerreira. Tenho um orgulho enorme e amo mais que tudo no mundo, minha mãe querida!

Existe uma pessoa que sempre me protegeu, que faz o melhor feijão do mundo!! E o doce de abobora... hum! Me ensinou a ser forte, trabalhar duro e não deixar ninguém me derrubar. Somos tão parecidas, tão turronas ... mas no final tudo acaba bem! Uma mulher de fibra, com tanto a ensinar ... vai virar semente. Meu exemplo. A vó mais linda do mundo!

Ao meu amado pai Paulo que me ajuda em todos os momentos quando grito por socorro e me ama incondicionalmente e meu avô Paulo que mesmo distantes me apoia. A minha amada tia Marlene, minha melhor amiga e confidente. Se alguma coisa dava errado, ou se eu aprontasse alguma coisa, era para o colo dela que corria. Fazer os planos, dividir as travessuras. A vida, de vez em quando dá umas reviravoltas, e cabe a nós encontrar a

fortaleza que existe dentro do nosso ser. Por mais difícil e impossível que seja uma situação ou momento que estamos passando, sempre existe uma saída e um lado positivo. Eu acredito que você vai conseguir.

E mesmo longe, com tantas responsabilidades, nunca deixamos de nos apoiar e nos amar. Durante o período do mestrado, mal conseguia vê-los, mas nos últimos meses de conclusão, cujo apoio foi crucial dos primos e tios entre eles: Adriana, Nina, Aline, Gisele, Paulo, Junior, Luis Fernando, Mariana e os tios e tias Vera, Ana, Altamir.

Quantas vezes pensei que não seria capaz, quantos obstáculos enfrentei durante esse período do mestrado... E vocês nunca deixaram de acreditar. Desde quando conheci vocês, minha vida mudou completamente. Nunca existiu um dia que vocês não estiveram ao meu lado. Aprendemos juntas, nos formamos juntas, seguimos caminhos separados... nos encontramos nos almoços, lanches e aniversário mas nunca deixamos de nos amar e nos apoiar, seja por um coração partido ou um caso perdido. Amizade são eternas quando o amor é verdadeiro e tenho a benção de ter minhas AMIUGAS – Denise, Roberta, Raquel, Vanessa, Bianca, Fátima e Carol! A minha amiga de toda a vida, somente 27 anos, Louise, que passou pela maior perda que tive, acompanhou todas as minhas fases e assim será até o fim das nossas vidas. Ao meu amigo super maduro e nem um pouco louco que canta músicas dos filmes da Disney comigo, que ri quando você cai no meio da aula porque também cai o tempo inteiro, que é perdidos demais, mas que tem um coração enorme, um amigo e professor para toda a vida... Thyago Carvalho.

Muitas vezes em nossas vidas, existem momentos tão marcantes que a simples presença de uma pessoa faz tudo ser melhor e fácil de entender. Você esteve ao meu lado nos meus primeiros momentos em Brasília, quando tinha deixado uma vida, amigos, família para trás em busca de uma vida melhor. Graças a você passei pelos meus melhores momentos, e também os meus piores, onde a sua presença sempre foi constante. Uma amiga, irmã e companheira como você, Ana Clarissa, é algo divino.

A minha irmã, de coração e de alma, Georgete Marcondes, por todo o apoio, por segurar tantas vezes a minha mão quando um precipício surgia a minha frente, pelas broncas enormes mas pelos enormes momentos de gargalhadas que me foi proporcionado. A sua loucura é linda, e junto com a minha nos tornamos fantásticas. Deus te colocou na minha vida, porque eu precisava de um anjo. Meu coração é seu amiga!!! `A minha Dolly

preferida. Palavra como “blógica” existe em seu vocabulário. Rimos muito juntas, principalmente quando íamos no supermercado comprar água. Ou seja, toda semana! Cuidado com a urso amiga! Te amo.

Aos meus amigos “Adultos “e “maduros “, só assim para descreve-los. Companheiros de diversão, viagem, jantares, karaokê, filmes e aeroportos... Alexandre, Diego e Fernando.

A minha prima Graziela (Bolha Alone), que com aqueles lindos olhos verdes, aquele sorriso encantador e aquele coração tão generoso, foi crucial nos últimos meses de conclusão. Sem você eu não teria conseguido. Obrigada por dividir seu quarto, sua casa e suas cachorras comigo! A melhor prima, amiga e companheira que existe. Minha família !! A minha amada Tia filó, que me fez engordar horrores devido a sua comida divina (“Olha o dedinho”). Crescer ao seu lado foi fantástico. Minha tia tão amada e tão querida.

A minha coisinha mais linda do mundo. Seu jeito tranquilo enlouquecia a todos, mas ao mesmo tempo era extremamente engraçado. O mundo podia cair que ela continuaria rindo. Pedia carona mas demorava séculos para arrumar suas coisas. Acabava me atrasando sempre. Esquecia sempre dos plurais, adorava falar “os anticorpo “, mas arrasou na sua defesa !!Uma grande pessoa, uma amiga fantástica e uma excelente pesquisadora, minha linda Tarcila.

“Ah Papa” E começava a falar em russo ... certeza que estava falando mal da galera, mas a gente finge que não era isso. Sempre agradável, atenciosa, carinhosa e com muita vontade de ensinar. Pratiquei meu inglês e fiz uma amizade extremamente valiosa. Uma pessoa incrível, que no momento de tristeza, te olha com aqueles olhos lindos e te consola. Sem ela, o que seria das notas fiscais e pagamentos do laboratório?! Nada! Galina, você é preciosa demais!

Aos colegas Mariany, Thompson, Juan, Nestor, Isabel, Kelly, Fernanda, Jennifer, Ronni, Maria José e Manuela ...obrigada por tantos momentos maravilhosos, tantas histórias divertidas e tantos ensinamentos importantes.

Toda vez que eu chegava na sala de lavagem, a frase “Dona Fátinhaaaaaa “ecoava no ar ... porque era tanto material para autoclave que eu sabia que primeiro vinha a bronca e depois o beijo. Obrigada pelo prazer de poder conviver com a senhora. E a dona Lindona, a dona Ivonildes, que estava sempre com um sorriso de bom dia estampado no rosto, com um ótimo humor, e com uma ótima mão para fazer café. Ambas são tesouros do laboratório,

todo mundo ama e cuida. Ai que saudades que já estou sentindo! À Ivone, muito obrigada pelos seus brigadeiros, cajuzinhos, beijinhos que faziam do meu dia mais doce e saboroso. Um exemplo de mulher saudável. Sempre com uma saladinha e um franguinho light. Fazia a gente engordar enquanto ela emagrecia... muito bonito né !?

Durante a semana e também nos fins de semana é impossível não lembrar dessa galera querida que sempre me ajudava e colocava um sorriso no meu rosto. Ao amigos do lab. 4, principalmente o Hugo, que me fazia companhia sempre nos fins de semana e me salvava quando precisava abrir aquela bendita centrífuga. A galera do lab. 0, Faby, Fernanda. Aos lindos do lab. 2 Adorooooooo! Aos vigias Noturnos e dos fins de semana, que me acompanhavam até o carro nas longas madrugadas que passava no laboratório fazendo experimento.

Aos amigos Túlio, Marciano e os outros colegas, Obrigada pelo prazer da sua companhia, pelos maravilhosos momentos de almoço, pela caminhada no sol quente e pela gargalhada da manhã.

Ao meu irmão, que me introduziu na vida acadêmica, que me incentivou, me deu muita bronca e muitas vezes me largou... mas sempre acreditou que eu podia mais do que achava. Largava tudo se fosse preciso. Maduro o suficiente para ser imparcial quando era necessário e me direcionar quando me sentia muito perdida. Presenciou todos os desafios e as provações que passei durante os últimos 6 anos... isso tudo ?! Não é necessário correr o mesmo sangue por nossas veias para o amor fraterno existir, pois no nosso caso, ele é forte e verdadeiro. Amo você meu irmão Rafael.

Aos amigos Rose e Dudu, Carlos Magno, Karina, Cardoso, Marluce, Aquiles, Claudio e Carla, Ricardo e Edí por todo o apoio e oração nos momentos mais tenebrosos.

A todos os amigos que não foram mencionados mas que moram no meu coração e estão na minha vida. Meu eterno amor e carinho para cada um de vocês.

Sumário

Índice de Figuras	xii
Lista de abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução	19
1.1 O sistema Imune	19
1.2 Anticorpos.....	20
1.3 Anticorpos monoclonais e seu uso clínico.....	26
1.4 Anticorpos monoclonais sintéticos.....	29
1.5 Anticorpos anti- CD3	34
1.6 Phage Display.....	38
1.7 Anticorpos recombinantes e o grupo de Imunologia Molecular.....	39
Objetivos.....	42
2.1 Objetivos Gerais.....	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
Estratégias	43
Materiais e Métodos.....	44
4.1 Materiais	44
4.1.1 Linhagens Bacterianas.....	44
4.1.2 Plasmídeos e Biblioteca Utilizada.....	44
4.1.3 Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.....	46
4.1.4 Meios de Cultura e soluções utilizados.....	47
4.1.5 Soluções e tampões de uso geral.....	48
4.1.6 Soluções e Material para preparo de células competentes e transformação bacteriana.....	48
4.1.7 Soluções e Materiais para extração de DNA plasmidial.....	49
4.1.8 Tampões de endonuclease de restrição	50
4.1.9 Tampões de Outras Enzimas.....	50

4.1.10 Soluções para Eletroforese em gel de Agarose.....	50
4.1.11 Marcador para DNA e Proteínas.....	51
4.1.12 Enzimas.....	52
4.1.13 Kits Comerciais.....	52
4.2 Métodos	53
4.2.1 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala.....	53
4.2.2 Preparação de DNA plasmidial de larga escala.....	53
4.2.3 Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição	55
4.2.4 Análise do DNA plasmidial em gel de agarose	55
4.2.5 Eluição dos fragmentos de DNA de gel de agarose.....	55
4.2.6 Reação de Desfosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP).....	56
4.2.7 Ligação de fragmentos de DNA.....	56
4.2.8 Preparação de Células competentes.....	57
4.2.8.1 Por choque térmico	57
4.2.8.2 Por Eletroporação	57
4.2.9 Amplificação das sequências variáveis humanas- PCR.....	58
Resultados e Discussão.....	62
5.1 Clonagem do inserto que codifica o scFv anti- CD3 do vetor pCIg Rm no pCIg 316 Z22.....	62
5.1.1 Construção do vetor pCIg 316 RM.....	62
5.1.2 Construção do Plasmídeo pCIgRmScFvRVL_G3.....	65
5.2 Amplificação da biblioteca de VL humanos a partir do pCOMB FAB.....	70
5.3 Ligação do produto da amplificação no vetor pGEM-T easy e análise dos clones por enzimas de restrição específicas quanto a sua variabilidade genética.....	76
Conclusão	79
Referências Bibliográficas	80

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura Molecular de uma Imunoglobulina	21
Figura 2. Diagrama Esquemático da ontogênese de uma molécula de IgG.....	23
Figura 3. Estrutura de uma molécula proteolítica de um anticorpo.....	24
Figura 4. Representação de uma molécula de imunoglobulina (IgG) em comparação com fragmentos gerados por técnica do DNA recombinante (Fv-Fc e scFv).....	26
Figura 5. Técnica do Hibridoma	28
Figura 6. Sítios de Ligação de anticorpos monoclonais disponíveis em transplante renais.....	29
Figura 7. Representação esquemática das técnicas de humanização de anticorpos....	30
Figura 8. Diagrama esquemático do complexo receptor de célula T (TCR).....	35
Figura 9. Modelo da sinalização da célula T mediante ligação do CD3 e do OKT3....	36
Figura 10. Vetor com fusão scFvRVL_Gene 3 sintetizado quimicamente e clonado no vetor pCIgRm.....	44
Figura 11. Vetor pCIgRM- anti-CD3.....	45
Figura 12. Fagomídeo pCIg316 Z22	46
Figura 13. Estratégia de clonagem	63
Figura 13. Gel de quantificação dos tamanhos das mini preparações dos clones D12; 4H12; G1; H12.....	69
Figura 14. Digestão dos plasmídeos pCIg 316 Z22 e pCIgRm com as enzimas <i>XmaI/NcoI</i> em comparação ao plasmídeo intacto.....	63
Figura 15. Estratégia de Clonagem do vetor pCIgRVL_G3.....	66
Figura 16. Gel de eletroforese do plasmídeo GS54231-8pBSK_fusão scFVRVL_gene 3.	67
Figura 17. Obtenção do fagomídeo pCIg RVL_G3.....	68
Figura 18. Clones da construção pCIgRVL_G3.....	69
Figura 19. Amplificação da biblioteca de anticorpos FAB humanizados pelo método de PCR.....	71

Figura 20. Sistemas 13 a 15 utilizados na amplificação da sequência codificadora VL à partir da biblioteca pCOMB FABs humanos	72
Figura 21. Sistemas de reação de PCR 16 a 18	73
Figura 22. Sistemas 19 a 21 utilizados na amplificação da sequência codificadora VL à partir da biblioteca pCOMB FABs humanos.....	74
Figura 23. Amplificação da biblioteca de anticorpos FAB humanizados pelo método de PCR.....	75
Figura 24. Análise da variabilidade genética dos clones obtidos.....	76
Figura 25. Análise por eletroforese da digestão com enzima <i>EcoRI</i> dos clones obtidos	78

Lista de Termos e Abreviaturas

Amp^R	Gene de resistência à ampicilina (β -lactamase).
°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.
C-terminal	Extremidade Carboxi- terminal
ColE1	Origem de replicação de <i>E. coli</i> .
Da	Dalton.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos.
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético.
Fab	Fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno.
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante).
Fv	Fragmento variável do anticorpo.
FvFc	Fragmento variável fusionado ao Fc.
g	Gramas.
h	Hora.
Ig	Imunoglobulina.
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo.
kb	Quilobase.
KCl	Cloreto de Potássio.
kDa	Quilodalton.
kV	Quilovolts.
L	Litro.
M	Molar.

µg	Microgramas.
µL	Microlitros.
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.
ng	Nanograma.
nm	Nanômetros.
OD₆₀₀	Densidade ótica a 600nm.
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3.
Ori	Origem de replicação.
Ω	ohm
pb	Pares de base.
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
pH	Potencial hidrogeniônico.
p/v	Peso/Volume.
RNA	Ácido ribonucléico.
RNase	Ribonuclease.
Rpm	Rotações por minuto.
scFv	Fragmento variável de anticorpo cadeia única (<i>Single chain Fragment</i>
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.
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- beta-D-galactopiranosideo.

Resumo

Nos últimos 20 anos, a utilização de anticorpos monoclonais para fins terapêuticos tem sido um grande aliado para o tratamento de diversas enfermidades. Anticorpos anti-CD3 são utilizados na prevenção de órgãos transplantados e apresenta potencial para tratar enfermidades autoimunes. Entretanto, a utilização desses anticorpos, apesar de eficientes geram uma resposta imunogênica, pois a maioria deles possui origem murina, quando administrado impossibilitando o uso frequente, como o OKT3. A humanização de anticorpos, que é realizada por meio de manipulações genicas, tem sido uma solução pratica para esse problema, atenuando a resposta imunogênica desencadeada pelo uso de anticorpos murinos. A partir de uma biblioteca de anticorpos humanos construída a partir da técnica de Phage Display é possível a construção de novos anticorpos humanos com maior eficiência de ligação resultando menos efeitos adversos, auxiliando na clínica dessas doenças e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. No presente estudo, a partir de uma construção sintética scFvRVL_gen3 contendo VH e VL humanizado e a sequência genica codificadora da proteína 3 (gene 3) foi possível construir um plasmídeo utilizando o vetor pCIgRM (plasmídeo anti- CD3 contendo VH e VL murino), resultando em 4 clones positivos para a construção pCIgRVL_G3. Para a amplificação dos genes VL da biblioteca de anticorpos humanos no vetor pCOMB 3X após o teste de 23 sistemas de reações distintas de PCR, foi estabelecido a otimização assim como as condições para que o mesmo acontecesse. O produto então foi clonado no vetor pGEM®T para o estudo da eficiência da reação de amplificação e diversidade da biblioteca. Os dados obtidos nesse estudo são ferramentas uteis para a clonagem das várias sequencias de VL amplificadas no vetor pCIgRVL_G3 substituindo o VL sintético pela biblioteca de VL humanos, e assim possibilitando passo à frente para a construção de um anticorpo monoclonal humano anti-CD3.

Abstract

Over the past 20 years, the use of monoclonal antibodies for therapeutic purposes has been a great ally for the treatment of various diseases. Anti-CD3 antibodies are used in the prevention of transplant organs and have the potential to treat autoimmune diseases. However, the use of these antibodies, although efficient generate an immune response because most of them have murine origin, when administered preventing the frequent use, such as OKT3. The humanization of antibodies, which is performed by means of gene manipulation, it has been a practical solution to this problem, reducing the immunogenic response elicited by the use of murine antibodies. From a human antibody library constructed from a phage display technique it is possible to build new human antibodies with the highest binding efficiency resulting in less adverse effects in helping these clinical diseases and improving the quality of life of patients. In this study, from a synthetic construct scFvRVL_gen3 containing humanized VH and VL gene and the coding sequence of the protein 3 (gene 3) was constructed using a plasmid vector pCIgRM (plasmid containing anti-CD3 murine VH and VL), resulting 4 positive clones for pCIgRVL_G3 construction. For amplification of VL of the human antibody gene library in vector pComb 3X after the 23 different test systems PCR reactions, thereby optimizing the conditions has been established for it to happen. The product was then cloned into the vector pGEM®T to study the efficiency of the amplification reaction and library diversity. The data obtained in this study are useful tools for cloning of various sequences of the amplified VL pCIgRVL_G3 VL vector by replacing the synthetic human VL library, thus allowing step forward for the construction of a human monoclonal anti-CD3 antibody.

I Introdução

1.1 O Sistema Imune

O conceito da imunologia evolui ao passar do tempo de acordo com o avanço do conhecimento das interações e relações dos microrganismos, proteínas, epítopos sendo eles próprios ou não, que desenvolve a ativação de um complexo de reações que incluem de células de defesa até reações químicas que envolvem o sistema imune. Hoje, podemos definir Imunidade como uma reação a substâncias estranhas ou ainda substâncias reconhecidas como não pertencentes àquele organismo (*non-Self*). (Litman, 2005). Essa resposta pode acontecer por duas maneiras com características distintas: A resposta imune adquirida e a resposta imune inata ou natural.

A resposta imune Natural é a primeira linha de defesa contra microrganismos, nela estão envolvidos componentes bioquímicos e celulares existentes antes do contato com uma infecção e respondem rapidamente a infecção. Há diversos componentes envolvidos na imunidade natural como proteínas efetoras circulantes, citocinas, neutrófilos, macrófagos, defencinas, entre outros.

A Resposta Imunológica Adquirida envolve a Imunidade Celular e Humoral. A imunidade Celular está relacionada com a ativação de linfócitos T, onde antígenos desenvolvem-se no interior dos fagócitos ou outras células do hospedeiro impossibilitando a ação de anticorpos. Existem diferentes Linfócitos T com funções e mecanismos de ativação diferentes, que provocam a destruição dos antígenos no interior das células infectadas para eliminar as fontes de infecção. A imunidade humoral é mediada, essencialmente por todos os componentes não celulares do sistema imune, como os membros do sistema complemento e outros mediadores de inflamação, por exemplo, as chamadas citocinas, que regulam e coordenam muitas atividades celulares assim como os anticorpos. A imunidade humoral adquirida é basicamente mediada por proteínas plasmáticas do grupo das globulinas, chamadas de anticorpos(AC) que são produzidas pelos linfócitos B. Os anticorpos reconhecem os antígenos especificamente, neutralizando-os e marcando-os para a eliminação pelos vários mecanismos efetores (Marrack *et al*, 2004; Swain *SL*, 2003).

1.2 ANTICORPOS

Os Anticorpos são proteínas circulantes usadas para o reconhecimento de antígenos. Eles fazem parte da imunidade Adquirida e são mediadores da imunidade Humoral. Possui uma grande diversidade devido aos diversos segmentos gênicos que sofrem rearranjos durante a sua ontogênese para a formação de sequências que são capazes de expressar as duas cadeias que compõem as imunoglobulinas e são extremamente específicos no reconhecimento de antígenos e ligação de suas moléculas. Os anticorpos, estão ancorados a superfície dos linfócitos B como receptores de antígenos ou encontram-se solúveis no plasma, tecidos e locais de mucosa onde agem como vigilantes, que neutralizam e impedem a entrada e disseminação de patógenos por mecanismos efetores que os eliminam através da ativação de sistema efetores celulares e marcam os antígenos para serem destruídos pelas células do sistema imunológico Natural.

Os anticorpos (Ab) ou imunoglobulinas (IgM, IgD, IgA, e IgG) são glicoproteínas de elevada massa molecular em torno de 150 a 900 kDa, sendo compostos por dois tipos de cadeias polipeptídicas: uma, chamada de cadeia pesada (H) e outra chamada de cadeia leve (L) e capazes de se ligar especificamente a um determinado antígeno e ativar os sistemas efetores celulares, desencadeando uma resposta imune. (Janeway *et al.* 2001; Harris *et al.*, 1999). Cada cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, já ligadas às cadeias leves, são mantidas juntas covalentemente, também por pontes dissulfeto, formando o anticorpo. Tanto a cadeia leve quanto a cadeia pesada apresentam regiões amino-terminais variáveis denominadas domínios VL (variável leve) e VH (variável pesado) respectivamente, e de regiões carboxi -terminais constantes(C).

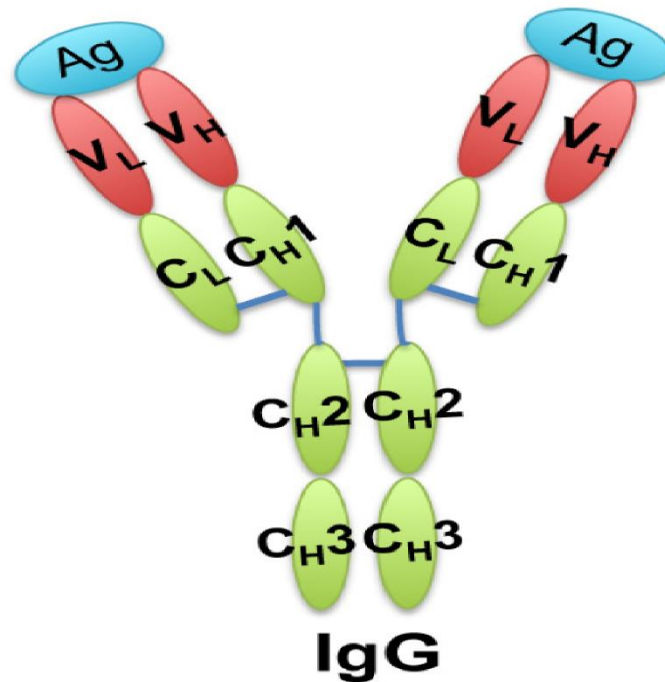


Figura 1: Estrutura Molecular de uma Imunoglobulina (IgG). A figura mostra uma molécula de imunoglobulina identificando suas cadeias leves e pesadas, as regiões constantes e variáveis. Na Porção amino-terminal das regiões variáveis leves e pesadas encontra-se o lugar onde ocorre a ligação com o antígeno (Ag) (Adaptado de Huan *et al*, 2013).

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

Dessa forma, uma molécula de imunoglobulina (Figura 1) é formada a partir de dois genes criados durante a fase antígeno-independente do desenvolvimento do linfócito B. Podem ser formadas cerca de 10^3 cadeias leves diferentes e por volta de 10^4 cadeias pesadas diferentes. Visto que cada uma é formada independente da outra, cerca de 10^7 tipos de imunoglobulinas podem ser criadas a partir da união das cadeias leve e pesada na célula. Cada célula B produz apenas um dos 10^7 tipos de anticorpos possíveis (revisado por Scott F. Gilbert, 2006).

Os genes que codificam as cadeias leve e pesada das imunoglobulinas são organizados em segmentos gênicos. Os genes da cadeia leve de mamíferos contêm os

segmentos V, J e C. O primeiro segmento gênico, V, codifica os primeiros 97 aminoácidos da região variável da cadeia leve. O segundo segmento, J, consiste de 4 ou 5 sequências de DNA possíveis que codifica os últimos 15-17 resíduos de aminoácidos da região variável. O terceiro segmento gênico, C, codifica a região constante da cadeia leve. Durante a diferenciação da célula B em plasmócito, a qual ocorre durante a sua maturação na medula óssea, um dos 300 segmentos V e um dos 5 segmentos J são combinados para formar a região variável do gene de anticorpo (Huston *et al*, 2001)

Na cadeia pesada os genes que codificam, possuem ainda mais segmentos que os da cadeia leve. Os genes da cadeia pesada são constituídos por um segmento V (200 sequências diferentes codificando os primeiros 97 resíduos de aminoácidos), um segmento D (10-15 sequências diferentes codificando mais 3-14 aminoácidos), e um segmento J (4 sequências para os últimos 15-17 aminoácidos da região variável). O próximo segmento, C, codifica a região constante. A porção variável da cadeia pesada é formada pela junção de um segmento V, um D e um J (Figura 2). Esta sequência variável VDJ, após o rearranjo, fica adjacente à primeira região constante dos genes de cadeia pesada.

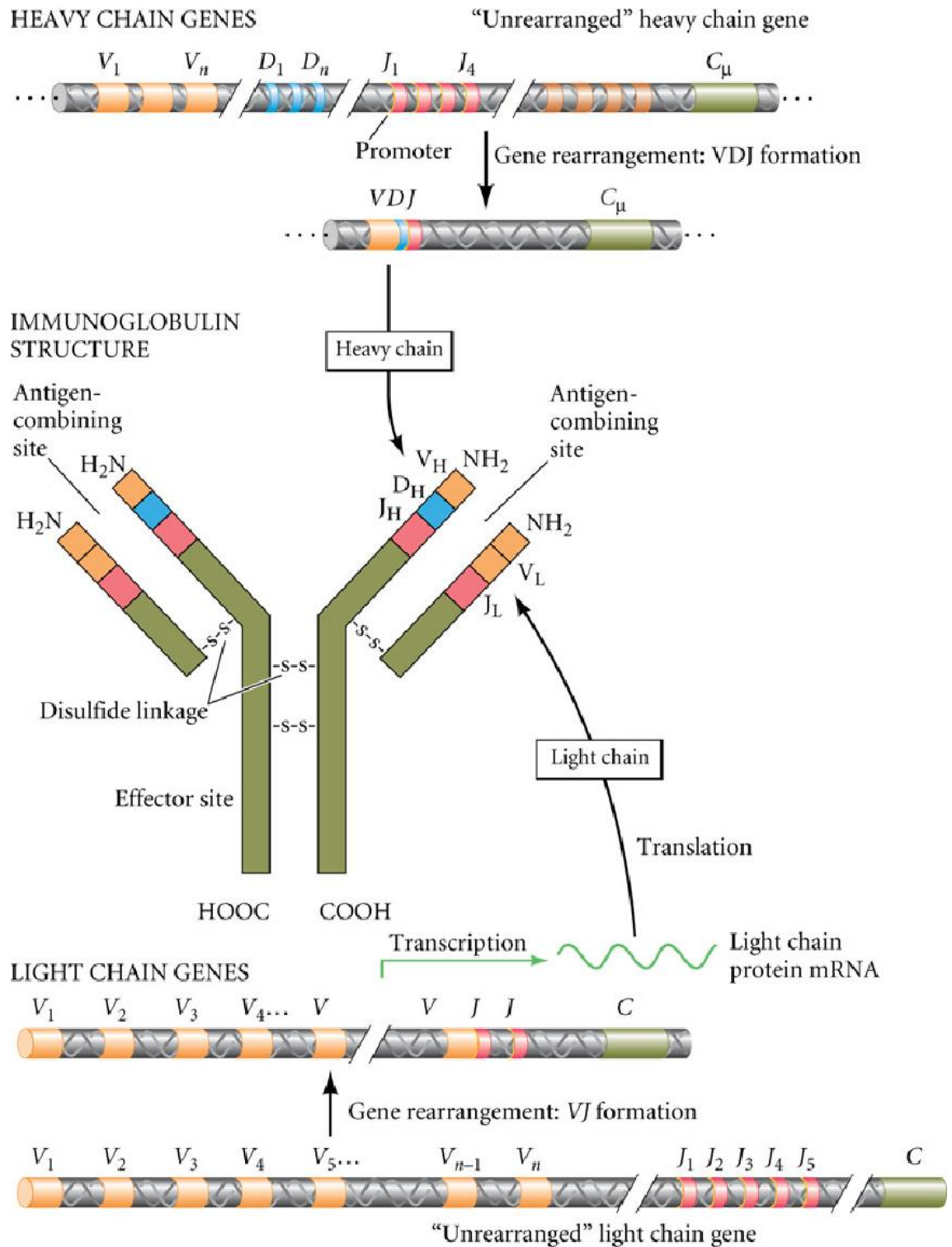


Figura 2. Diagrama esquemático da ontogênese de uma molécula de IgG. Rearranjo dos segmentos gênicos que resultam nos segmentos gênicos codificadores das cadeias leve e pesada. (Scott F. Gilbert, 2006).

Regiões importantes encontram-se nas cadeias leves e pesadas devido a ligação ao antígeno, são chamadas de região determinantes de complementariedade (CDR). Essas regiões são caracterizadas por serem ilhas hipervariáveis em um arcabouço relativamente conservado. É a estrutura tridimensional formada por essas regiões é que vai se complementar a estrutura do antígeno possibilitando a ligação antígeno-anticorpo. Ao todo são 3 CDRs em cada cadeia (CDR1, CDR2 e CDR3), sendo que dessas a CDR3 é a que possui a maior variabilidade e é classificada como a mais importante na determinação da especificidade pelo antígeno (Mahon *et al*, 2013).

As imunoglobulinas podem ser divididas em diversos fragmentos. Uma molécula de IgG ao ser clivada proteoliticamente por papaína na região da dobradiça gera duas moléculas constituídas da cadeia leve ligada ao fragmento VH-CH1 da cadeia pesada. (Mótoyán *et al*, 2013). Com a digestão controlada da papaína foram produzidos dois tipos de fragmento diferentes: Fc e Fab. (Figura 3).

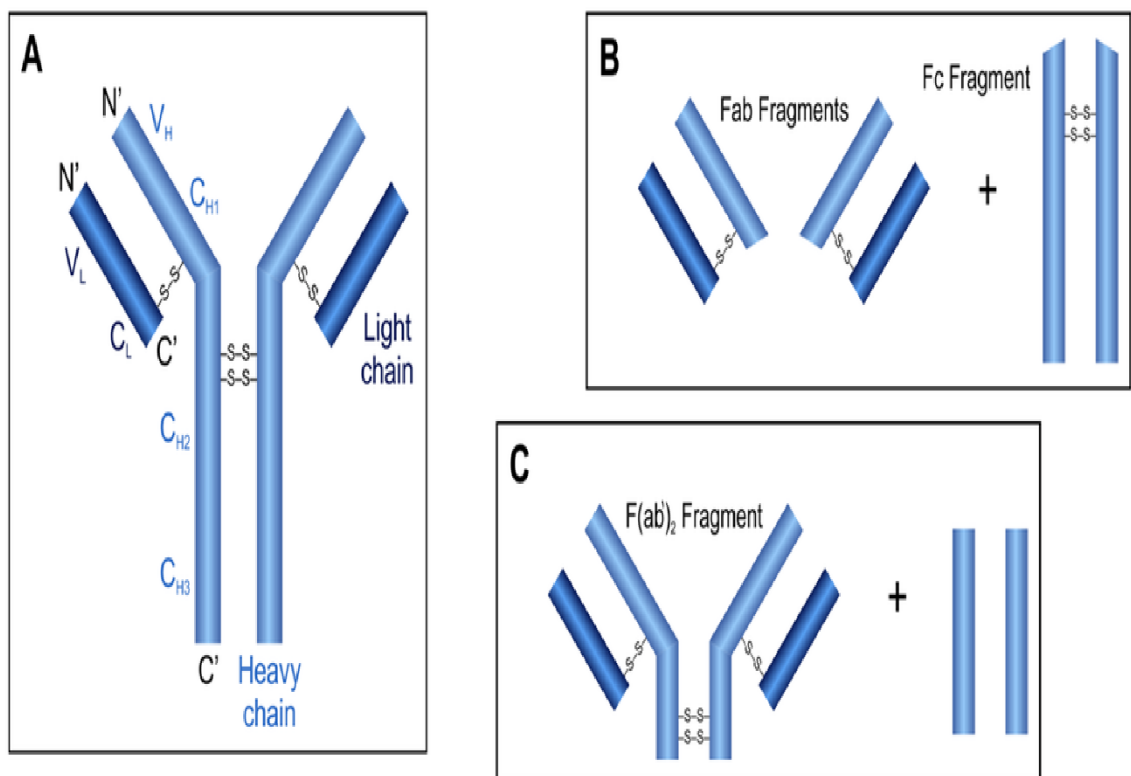


Figura 3: Estrutura de uma molécula Proteolítica de um anticorpo. Molécula de anticorpo (A) clivada com a enzima papaína separando a molécula de anticorpo em três partes, 2 Fab (local de ligação dos antígenos) e Fc (responsável por funções efetoras biológicas), com tamanhos aproximados (B) enquanto a clivagem com a enzima pepsina separando a molécula em duas porções- F(ab)₂ ligados por pontes dissulfeto e Fc (C). (Adaptada de Mótoyán *et al*, 2013)

As cadeias de imunoglobulina podem ser diferenciadas pelos seus isotipos (cadeia leve subdividida em k e l; cadeia pesada subdividida em a, d, e, g e m). Os isotipos da cadeia pesada diferenciam as imunoglobulinas respectivamente em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A classe mais comum e abundante, em humanos, dentre esses anticorpos é o IgG, sendo a mais observada e utilizada pesquisa para a terapia de doenças (Janeway *et al.* 2001).

A molécula de anticorpo é comparada a um Y. Quando utilizado essa comparação podemos identificar os braços como a porção Fab, responsável pela ligação ao antígeno e são constituídos pela cadeia variável leve (VL) e por parte da cadeia pesada (VH)- a porção variável e um dos domínios constantes. O Corpo do Y é a porção Fc – constituído por mais de duas regiões constantes das duas cadeias pesadas mantidas juntas por pontes dissulfeto. Conectando a porção Fabs e Fc existe porção peptídica contendo uma ou duas pontes dissulfeto intercadeias. Nessa região é possível a clivagem e desmembramento da molécula em suas partes funcionais Fab e Fc (Holliger e Hudson, 2005). A porção variável do anticorpo denomina-se Fv, e está localizada no amino terminal da molécula. No campo da Engenharia de anticorpos, essa porção é extremamente importante, principalmente quando a construção de uma biblioteca combinatoria de anticorpos são realizados a partir da construção de anticorpos recombinantes: Fab ou scFv (fragmento variável de cadeia única). Essas construções foram utilizadas pela primeira vez em 1988 e a sua estabilidade depende da natureza e força das interações Vh e VL e o tipo de *linker* utilizado (figura 4) (Reiter, 1996).

A construção scFv, ao qual consiste em um VH ligado por um linker polipeptídico flexível ao VL, é muito utilizado na pesquisa clínica devido a possibilidade de uma rápida remoção desses fragmentos da circulação sanguínea dos pacientes. Quando é desejável um período maior de atividade no soro do paciente, utiliza-se a expressão do anticorpo inteiro. Uma outra opção seria unir scFv a região FC formando o fragmento FvFc (Andrade *et al.*, 2000 e Reiter, 1996), que possui uma maior meia vida nos soros dos pacientes e recruta funções efetoras do sistema imune via FC, além da facilidade de manipulação gênica (Figura 4) (Kenanova *et al.*, 2005).

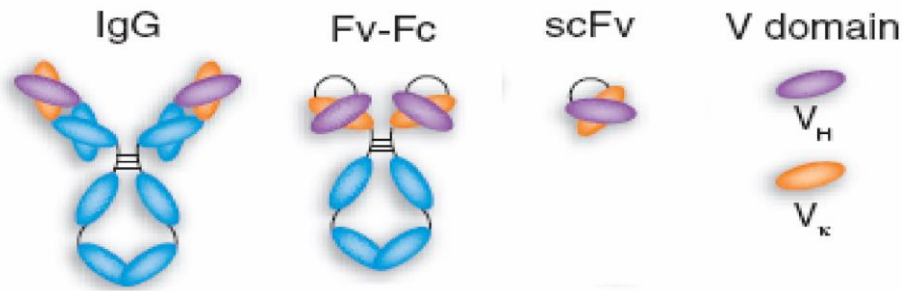


Figura 4. Representação de uma molécula de imunoglobulina (IgG) em comparação com fragmentos gerados por técnicas do DNA recombinante (Fv-Fc e scFv). Adaptada de (Holliger e Hudson, 2005).

Andrade e Colaboradores (2000) observam que fragmentos scFv e FcFv retêm a capacidade de se ligarem a antígenos, sendo a forma FcFv comparada ao Nível de ligação do anticorpo monoclonal (mAb) do qual se originou esse fato acontece devido a forma dimérica, que apresenta uma avidéz similar ao de uma molécula de anticorpo inteira.

Fragmentos de anticorpos podem ser usados na maioria de processos biológicos que envolvem anticorpos convencionais, fato esse justificado pois esses fragmentos possui uma capacidade de se dobrar corretamente em sistema de expressão eucarióticos, apresentando uma estabilidade conformacional e ainda preservarem a atividade específica de seu paratopo contra o antígeno quando comparado ao anticorpo inteiro (Andrade *et al*, 2005).

Nos últimos anos utilizando como base a imunidade humoral, a identificação de anticorpos como a chave molecular responsável pela sobrevivência *in vivo*, neutralização e eliminação de substancias estranhas objetivaram o entendimento e explorando sua especificidade molecular única (Dean *et al*, 2012)

1.3 Anticorpos monoclonais e seu uso clínico

Anticorpos monoclonais são os maiores modificadores de doença que revolucionaram o tratamento de severas condições imunopatológicas como doenças autoimunes e rejeição de transplantes (Kuhn *et al*, 2011). Nos últimos 20 anos vários anticorpos monoclonais (mAbs) variando entre murinos, quiméricos, humanizados e totalmente humanos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration-*

EUA). Devido a essa oportunidade de investimento e geração de bilhões de dólares em vendas, indústrias biotecnológicas e farmacêuticas geram um grande número de imunoglobulinas recombinantes que possuem uma especificidade característica e atuam em alvos específicos aumentando a eficiência do tratamento de várias enfermidades.

A base para o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais se dá pela técnica do hibridoma, que revolucionou a era da engenharia de anticorpos originando os mAbs murinos e tendo um impacto muito grande tanto na área da pesquisa como na prática clínica como terapia para muitas doenças autoimunes, transplantes e câncer. O método foi descrito por Georges Köhler e Cesar Milstein em 1975 (figura 5). Uma das grandes vantagens foi a capacidade de desenvolver uma linhagem celular imortalizada capaz de produzir uma fonte contínua do mesmo anticorpo para um antígeno em específico. (Miersch et al, 2012).

Clinicamente o poder da tecnologia do hibridoma é evidente a partir do aumento do número de terapias inicialmente derivadas de hibridoma de camundongos e aprovados para a aplicação clínica também porque essa tecnologia ainda continua a gerar valiosos conhecimentos terapêuticos.

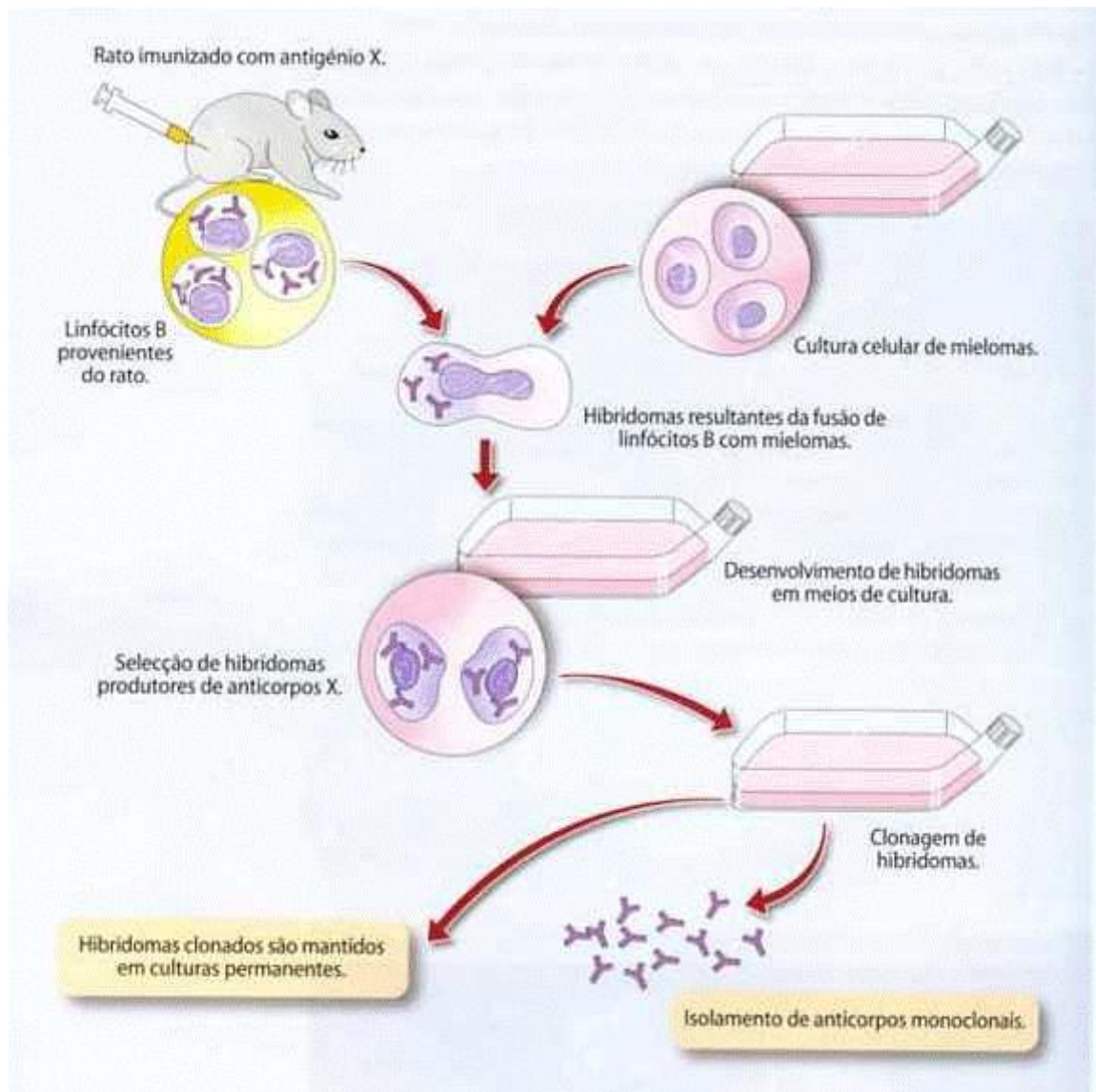


Figura 5: Técnica do hibridoma: A partir da imunização de um antígeno em um camundongo, células B provenientes da infecção são fusionadas a células de mieloma e imortalizadas, produzindo clones específicos de um único anticorpo uma vez selecionado. (www.biologicamentefalando.blog.com. Acesso em 31/12/2014)

A maior limitação do uso clínico que mAbs murinos possuem é a indução de uma resposta aos anticorpos murinos (**HAMA**- *human anti-mouse antibody*) que causa rápida neutralização dos anticorpos injetados reduzindo sua eficiência (Vaswani *et al*, 1988). Devido à dificuldade de gerar anticorpos monoclonais humanos para o uso clínico, com o uso da técnica do hibridoma, anticorpos quiméricos ou humanizados por engenharia genética começaram a ser desenhados tornando-se uma alternativa para esse problema (Getts *et al*, 2010).

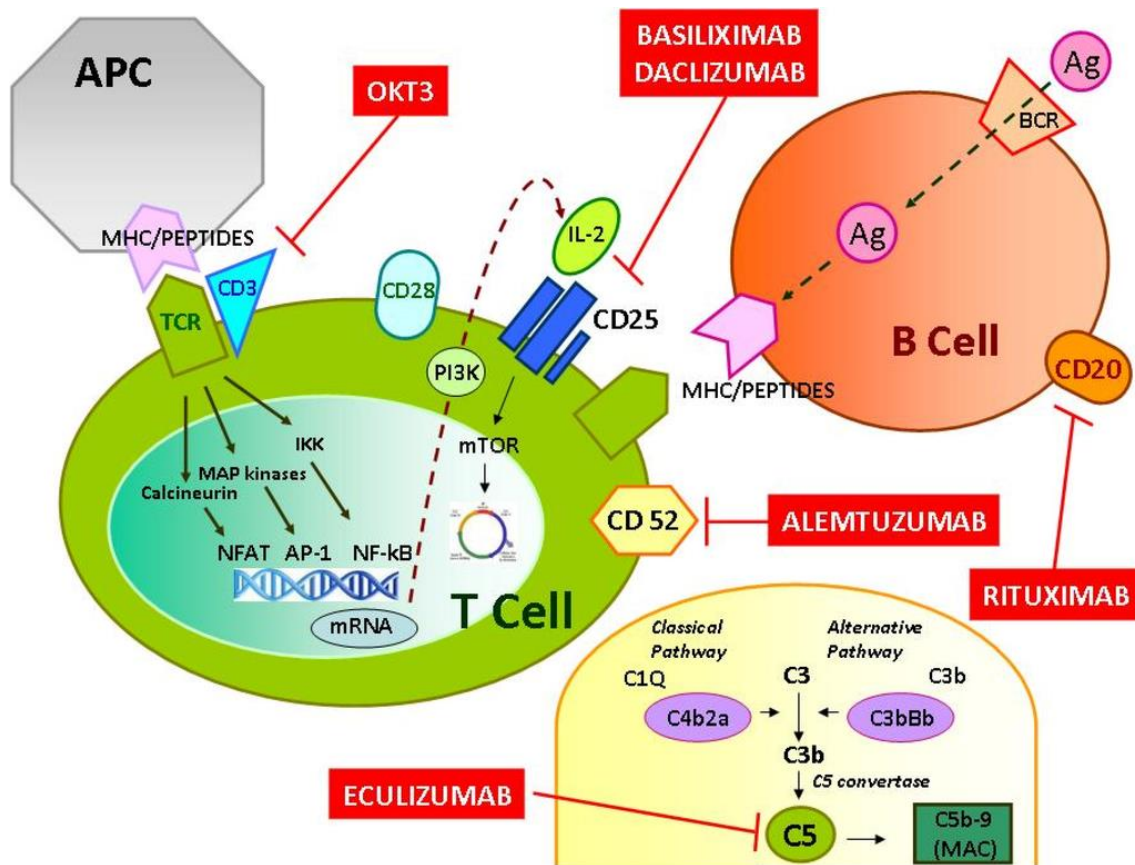


Figura 6: Sítios de Ligação de anticorpos monoclonais disponíveis em transplante renais. Os anticorpos utilizados contra seus respectivos alvos e suas vias de ativação que são interrompidas quando ligados pelo receptor TCR (receptor de célula T), BCR (receptor de célula B) ou receptor de Cascada de ativação C5. (Zaza *et al*, 2014)

1.4 Anticorpos monoclonais sintéticos

Inicialmente anticorpos terapêuticos eram análogos dos anticorpos murinos observando uma meia vida curta nos indivíduos, limitação de penetração nos tumores, e também causavam funções efetoras indesejadas. (Stern e Herman, 2005). Para solucionar essas dificuldades, tecnologia do hibridoma foi substituída por tecnologia do DNA recombinante, camundongos transgênicos e Phage display (Hudson e Souriau, 2003).

Para reduzir a imunogenicidade dos mAbs murinos, foram construídos novos anticorpos com diferentes alvos (Figura 6) como: Os mAbs quiméricos foram são compostos de regiões variáveis murinas fusionadas a regiões constantes humanas. Sequencias genicas humanas retiradas da cadeia leve κ e da cadeia pesada IgG1

resultam em anticorpos aproximadamente 65% humano reduzindo a imunogenicidade e aumentando a meia vida no soro. (Stern e Herman, 2005); Os mAbs humanizados são produzidos enxertando regiões murinas hipervariáveis em anticorpos humanos resultando em uma molécula 90 % de origem humana. Um viés desses anticorpos é que se ligam mais fracamente a antígenos quando comparados a anticorpos murinos resultando em um decaimento de afinidade (Carter et al, 1992; Presta et al, 1993). Técnicas como Shuffling de cadeia, randomização das CDRs e geração de biblioteca de anticorpos geram mutações nas CDRs mostrando um aumento da força de ligação aos antígenos (Chothia et al, 1989); mAbs humanos que utilizam camundongos transgênicos ou uma biblioteca de Phage display (Adams e Sidhu, 2014) e são produzidos por transferência dos genes da imunoglobulina humana no genoma murino, o camundongo é então é imunizado contra o antígeno desejado levando a produção de anticorpos monoclonais e permitindo a transformação *in vivo* de anticorpos murinos em anticorpos completamente humanos (Figura 7) (Chapman et al, 2009).

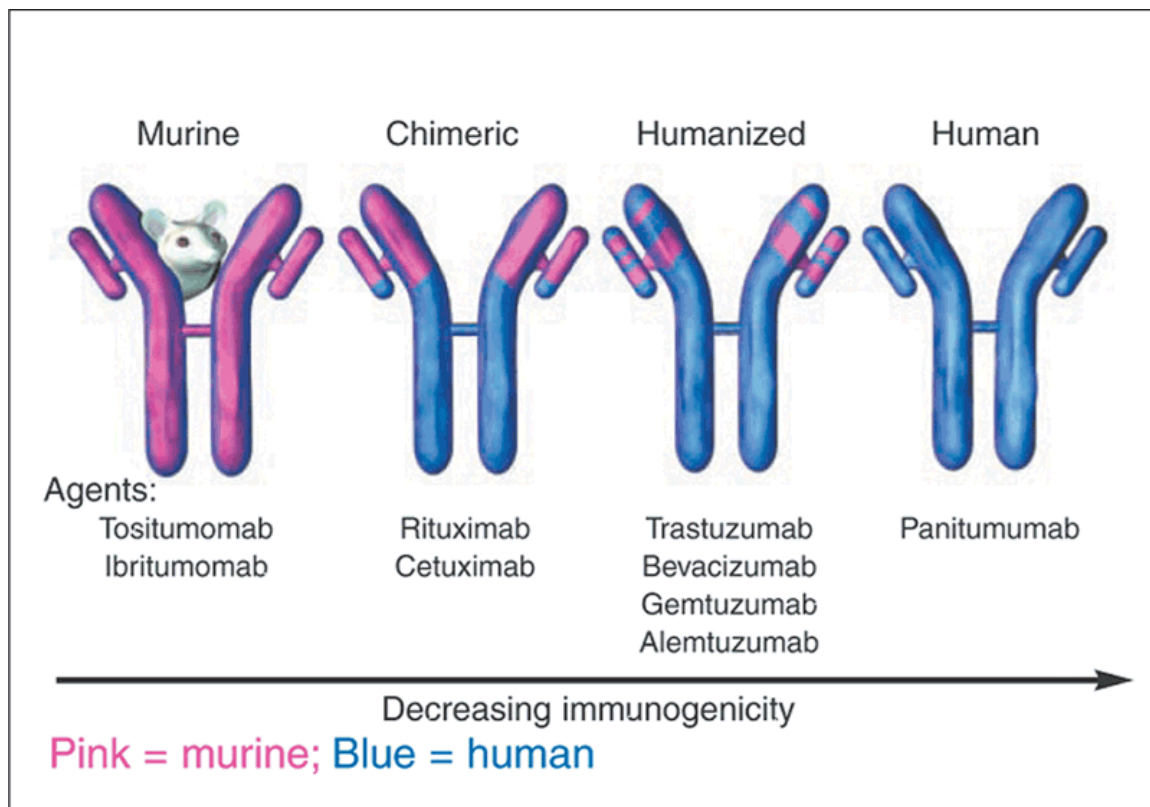


Figura 7: Representação Esquemática das técnicas de humanização de anticorpos. Respectivamente Em rosa, o anticorpo monoclonal murino. A molécula quimera originada da fusão das cadeias variáveis leve e pesada murinas com os domínios constantes humanos (Azul). Anticorpo humanizado pelo transplante das CDRs murinas (pontas rosas). Anticorpo monoclonal completamente humano (Azul). A seta abaixo da figura indica o potencial de imunogenicidade alto para mAb murino e decrescendo nos mAbs humanos. (Institute for Medical Education and Research – InC (IMER)).

Desde a aprovação do OKT3 (FDA), o primeiro mAb monoclonal murino, muitos outros (Quiméricos, humanizados e humanos) foram desenvolvidos, testados e aprovados para o tratamento de diversas doenças conforme observado na tabela 1.

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

Anticorpo	Empresa	Data de aprovação	Alvo Específico	Tipo	Doença Indicada
Abciximab (ReoPro)	Eli Lilly	1994	Liga-se ao receptor GPIIb/IIIa	Quimérico	Doenças cardiovasculares
Adalimumab (Humira)	Abbott Laboratories	2002	Liga-se a TNF- α	Humano	Várias doenças autoimunes
Alemtuzumab (Campath)	Genzyme	2001	Liga-se a CD52	Humanizado	A leucemia linfocítica crônica
Basiliximab (Simulect)	Novartis	1998	Subunidade alfa do IL-2R (CD25)	Quimérico	Rejeição de transplante
Belimumab (Benlysta)	GlaxoSmithKline	2011	Inibe o fator de ativação da célula B	Humano	Lupus Eritromatoso Sistêmico
Bevacizumab (Avastin)	Genentech/Roche	2004	anti-fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)	Humanizado	Câncer colorretal, degeneração macular relacionada a idade.

Brentuximab vedotin (Adcetris)		2011	Liga-se ao CD30	Quimérico	Linfoma anaplásico de grandes células do linfoma (ALCL) and Hodgkin
Canakinumab (Ilaris)	Novartis	2009	Liga-se ao IL- 1 β	Humano	Síndrome periódica associada ao Criopirina (CAPS)
Certolizumab pegol (Cimzia)	UCB (company)	2008	Liga-se a TNF- α	Humanizado	Doença de Crohn's
Cetuximab (Erbix)	Bristol-Myers Squibb/Eli Lilly/Merck KGaA	2004	Liga-se ao receptor de fator de crescimento epidermal	Quimérico	O câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço
Daclizumab (Zenapax)	Genentech/Roche	1997	Subunidade alfa do IL-2R	Humanizado	Rejeição de transplante
Denosumab (Prolia, Xgeva)	Amgen	2010	Inibidor ligante RANK	Humano	Osteoporose pós-menopausa
Eculizumab (Soliris)	Alexion Pharmaceuticals	2007	Sistema complemento (c5)	Humanizado	Hemoglobinúria paroxística noturna
Efalizumab (Raptiva)	Genentech/Merck Serono	2002	Liga-se a CD11a (LFA-1)	Humanizado	Psoríase
Gemtuzumab (Mylotarg)	Wyeth	2000	Liga-se a CD33	Humanizado	Leucemia mielóide aguda (com caliqueamicina)
Golimumab (Simponi)	Johnson & Johnson/Merck & Co, Inc.	2009	Liga-se a TNF- α	Humano	A artrite reumatóide, artrite psoriática e espondilite anquilosante

Ibritumomab tiuxetan (Zevalin)	Spectrum Pharmaceuticals, Inc.	2002	Liga-se a CD20	Murino	Linfoma <u>Non-Hodgkin</u> (com <u>yttrium-90 orindium-111</u>)
Infliximab (Remicade)	Janssen Biotech, Inc./Merck & Co	1998	Liga-se a TNF- α	Quimérico	Várias desordens autoimunes
Ipilimumab (MDX-101) (Yervoy)		2011	Bloqueador CTLA-4	Humano	<u>Melanoma</u>
Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3)	Janssen-Cilag	1986	Liga-se ao CD3	Murino	Rejeição de transplante
Natalizumab (Tysabri)	Biogen Idec/Élan	2006	Liga-se a integrina α -4	Humanizado	Esclerose Múltipla e doença de <u>Crohn's</u>
Ofatumumab (Arzerra)		2009	Liga-se ao CD20	Humano	leucemia linfocítica crônica
Omalizumab (Xolair)	Genentech/Novartis	2004	Liga-se ao IgE livre circulante (porção Fc específica)	Humanizado	asma relacionada a alergia principalmente
Palivizumab (Synagis)	MedImmune	1998	Liga-se ao VRS	Humanizado	Vírus Sincicial Respiratório
Panitumumab (Vectibix)	Amgen	2006	Fator de crescimento epidermal	Humano	Câncer colo-retal
Ranibizumab (Lucentis)	Genentech/Novartis	2006	Fator de crescimento endotelial vascular A	Humanizado	A degeneração macular

Rituximab (Rituxan, Mabthera)	Biogen Idec/Genentech	1997	Liga-se a CD20	Quimérico	Linfoma Non-Hodgkin
Tositumomab (Bexxar)	GlaxoSmithKline	2003	Liga-se a CD20	Murino	Linfoma Non-Hodgkin
Trastuzumab (Herceptin)	Genentech	1998	Liga-se a proteína HER2	Humanizado	Câncer de Mama
Ustekinumab (Stelara)	Centocor	2013	IL-12, IL-23	Humano	Artrite Psoriática, Plaque Psoríase
Vedolizumab (Entyvio)	Takeda	2014	Integrina $\alpha_4\beta_7$	Humanizado	Doença de Crohn, colite ulcerativa

(Adaptado de Santos *et al*, 2006 e Reichert, 2015).

1.5 Anticorpo Anti- CD3

O OKT3 foi o primeiro anticorpo monoclonal murino a ser usado para controle o processo de rejeição associado ao transplante de órgãos. Com o uso do medicamento, foi observado que seus efeitos colaterais estavam relacionados a seu potencial imunogênico e mitogênico, mostrando-se muito tóxico aos pacientes (Chatenoud, 2003). Esse mAb anti-CD3 vem sendo utilizado desde 1986 na prevenção da rejeição de órgãos transplantados e na utilização no tratamento da Diabetes Tipo 1 autoimune, psoríase e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Chatenoud, 2013). Além do OKT3 outros anticorpos anti-CD3 tem sido testados em modelos murinos para a prevenção da rejeição de transplante do coração, da GVHD aguda (*Chronic graft-versus- host disease*- Doença do exerto contra o hospedeiro), da encefalomielite autoimune experimental (EAE, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), para o tratamento da artrite induzida por colágeno, da doença inflamatória de Bowel,

doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerativa e doença de Crohn) e imunoterapia de câncer (Ahmed *et al*, 2013; Dépis *et al*, 2013).

A molécula alvo do OKT3, o CD3, faz parte de um complexo de fundamental importância para a resposta imune adaptativa, o complexo receptor de célula T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*). Esse complexo é formado pelo próprio TCR e pelas moléculas acessórias CD3 e cadeias ζ (Figura 8). O TCR é responsável pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados por moléculas chamadas complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*), presentes na superfície de todas as células humanas. Após o reconhecimento do antígeno pelo TCR, ocorre a fosforilação dos domínios ITAMs (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes no CD3 e nas cadeias ζ , sendo esse o ponto de partida para o desencadeamento de uma cascata de transdução de sinal que pode acarretar na ativação e proliferação dessas células, e, assim, desempenhar as funções efetoras, como a produção de citocinas, como por exemplo, IL-2 e citotoxicidade celular (Smith, 1988).

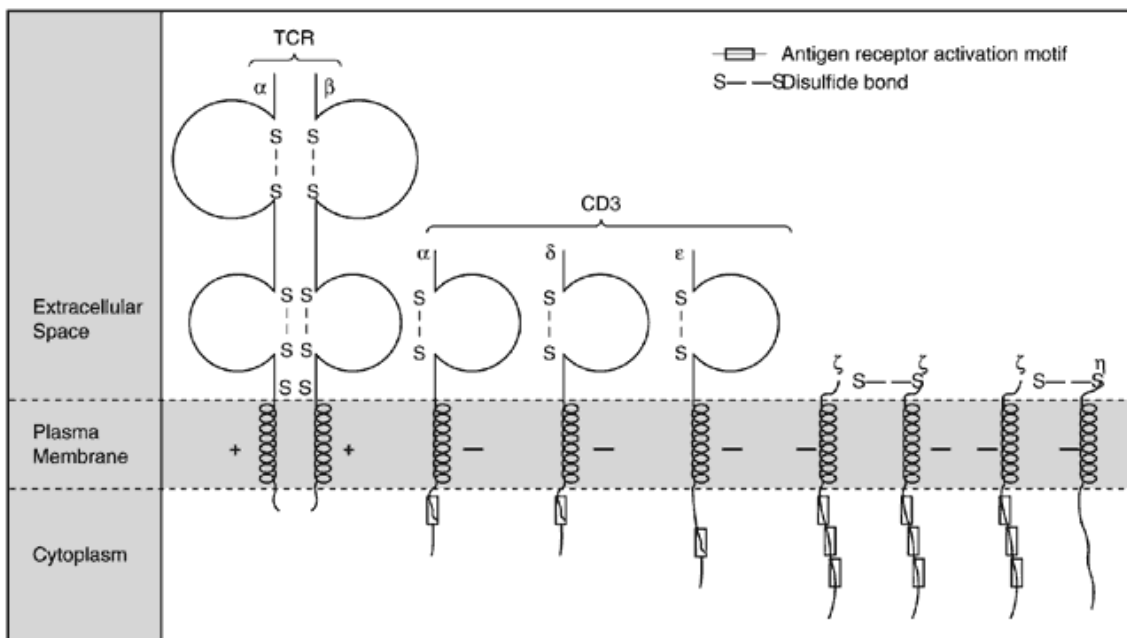


Figura 8. Diagrama esquemático do complexo receptor de celular T (TCR). Ele é constituído pelo TCR, cadeias ζ e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias ζ do CD3 apresentam uma seqüência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), o qual irá agir no processo de transdução de sinal (Kindt *et al.*, 2002). Ao se ligarem ao complexo CD3, os mesmos vão mediar uma cascata de transdução de sinal diferenciada daquela observada quando há o correto engajamento do complexo TCR (Chatenoud, 2003; Zaza *et al.*, 2014; Dépis *et al.*, 2013). Estudos realizados com anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR mostram que a sua ligação ao TCR provoca uma fosforilação parcial das cadeias ζ , do CD3 e de seus alvos subsequentes acarretando no bloqueio da expressão de IL-2 e de sua proliferação (Smith *et al.*, 1998). Diferentemente da ativação de células T por complexos MHC-antígeno, anticorpos anti-CD3 não ligantes a FcR não promovem o aumento de cálcio intracelular e não possibilitam a ativação de *ras*. Foi observado que a ligação do anti-CD3 permite a ativação preferencial da proteína quinase *fyn*, também pertencente à família *src*, mas não da quinase *lck*, levando a sinalização parcial que permite a inativação das células T (Adam *et al.* 2009).

A ligação do complexo CD3 pelos anticorpos específicos inicia uma cascata de transdução de sinal diferenciada daquela quando há o correto engajamento do complexo TCR. Estudos mostram que anticorpos anti-CD3 que não se ligam a FcR mostram que a ligação dessas moléculas ao TCR provoca uma fosforilação parcial do CD3 e de seus alvos acarretando no bloqueio da expressão da citocina IL-2 e também a sua proliferação e também não aumentam o cálcio intracelular. Segundo Kjer-Nielsen e colaboradores (2004) a ligação entre o OKT3 e a molécula CD3 (Figura 9) promove um deslocamento molecular diferente do observado na correta estimulação do complexo TCR (Figura 9 seta vermelha). Esse arranjo aumenta a possibilidade de uma mudança conformacional no complexo ligado podendo ser o início da sinalização mediado por anticorpos anti-CD33, da célula T. A sinalização diferencial gerada.

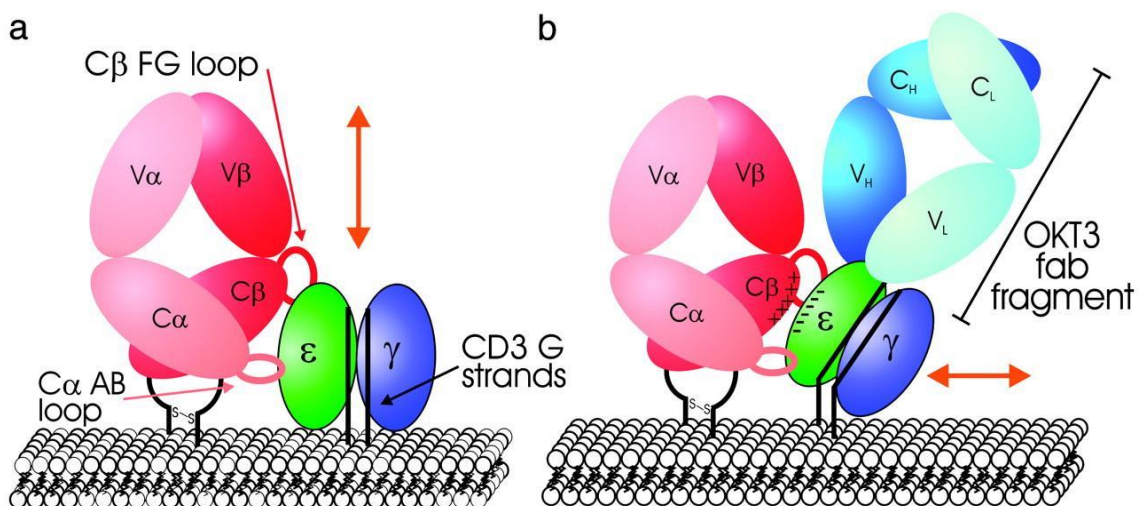


Figura 9: Modelo da sinalização da célula T mediante ligação do CD3 e do OKT3. (a) Modelo de sinalização após ligação do antígeno ao TCR onde ocorre um deslocamento vertical do CD3 e assim iniciando uma cascata de sinalização para a transdução do sinal. (b) Ligação do OKT3 ao CD3 indicando o deslocamento que ocorre, alterando assim o início da sinalização da célula T (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

O anticorpo monoclonal anti- CD3, possui algumas limitações como por exemplo a sinalização gerada pelo anticorpo anti-CD3 é responsável pelos efeitos adversos observados durante a utilização do mesmo no tratamento de doenças e no caso do OKT3, gera o desenvolvimento de uma resposta imunogênica, pelo paciente, denominada resposta a anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas (principalmente IgM e IgG) contra anticorpos murinos promovendo uma rápida remoção e neutralização do mAb e, assim, reduzindo sua eficácia (Li *et al*, 2005). Estudos *in vivo*, mostram que a mitogênicidade leva liberação de uma larga escala de citocinas, incluindo as pró-inflamatórias, como TNF produzidas por células T, mas também possui uma relação macrófago/ monócito dependente e envolve a produção da Il-6 e Il-1 β (Chatenoud, 2003). Efeitos adversos como febre, calafrios, náusea, vômito e dores de cabeça são comuns após a primeira dose do tratamento devido a tempestade de citocinas (liberação maciça de citocinas, como o TNF; IFN- γ ; IL-2) induzida pelo medicamento. Outra abordagem para diminuir os efeitos severos desses anticorpos seria uma terapia combinatória onde mAbs anti-CD3 associados a outras drogas como Corticoides ou mAbs anti-TNF. Ferran e colaboradores publicaram uma pesquisa em 1991 onde a associação desses anticorpos (mAb anti-CD3 e mAb anti-TNF) revertia alguns sintomas quando utilizado como pré- tratamento em animais. Com transplante renal em humanos, quando aplicada uma hora antes, a associação prevenia a reação severa após a primeira dose de tratamento com OKT3, sem causar nenhum impacto na eficácia do tratamento com o anticorpo (Charpentier *et al*; 1991; Carpenter *et al*, 2000)

O uso do anti- CD3 murino para tratamento em pacientes com transplante renal exerce efeitos imunossupressores importantes, uns mencionados anteriormente como a depleção de células T da circulação como resultado da marginalização e morte celular, enquanto outra fração é depletada nos tecidos e algumas células T transitórias persistem como CD3- TCR negativas (modulação antigênica) e são impossibilitadas de formar uma sinapse imunológica com células que apresentem peptídeos antigênicos. O resultado é que células T podem não mais serem acionadas por aloantígenos transplantados. Após 48 horas da administração do tratamento células T retornam ao estado inicial sendo necessário uma nova administração. O resultado é um efeito esperado quando usado para tratar pacientes com rejeição aguda renal e de coração (Hooks *et al*, 1991). A administração do mAb oralmente não provoca uma exposição da

droga sistêmica e portanto não generaliza a imunossupressão e os efeitos colaterais relacionados a liberação de citocinas (Cunha *et al*, 2012; Zaza *et al*, 2014)

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

Dépis e colaboradores (2012) criaram versões humanizadas dos anticorpos murinos anti-humanos CD3 ϵ e anticorpos monoclonais completamente humanos. Esses anticorpos tem uma construção similar na sua porção FC, mutações foram introduzidas no segundo domínio constante para reduzir a ligação FC γ R e a liberação de citocinas associadas com o mecanismo FC- dependente. A construção de anticorpos quiméricos pode ser realizada pela fusão de domínios variáveis de ligação a antígeno de roedores a região constante da imunoglobulina humana e normalmente tem uma maior afinidade de ligação e reduz a imunogenicidade comparado a camundongos, porém estudos mostram que esses anticorpos também podem causar uma reação forte quando aplicado em humanos (Li *et al*, 2005). Como anti- CD3 não pode ser administrado na clínica a uma dose terapêutica sem que uma tempestade de citocinas seja invocada, novas estratégias devem ser investigadas para que seus efeitos possam traduzir com sucesso as propriedades imunoregulatorias únicas dos anticorpos anti- CD3 na clínica.

1.6-Phage Display

A técnica de apresentação em fagos filamentosos, (ou Phage Display) é utilizada para identificar peptídeos ou anticorpos de alta afinidade para um alvo específico. (Miersch *et al*, 2012;). O pioneiro dessa técnica, George P. Smith, demonstrou a possibilidade de utilizar polipeptídios na superfície de fagos filamentosos e possibilidade de seleção de clones específicos, além de mostrar que anticorpos antígenos-específicos podem ser selecionados a partir de bibliotecas de células B murinas. (Heinis *et al*, 2011).

Em vários ciclos de seleção por afinidade, a biblioteca de fago é gradualmente enriquecida de ligantes de alta afinidade, e após vários ciclos de seleção são identificados por sequenciamento individual de clones de fagomídeos de um número limitado de clones. (Hoen *et al*, 2012). Com o avanço do sequenciamento de alto desempenho, é

possível utilizar milhões de insertos em paralelo, o que potencializa a eficácia do Phage quando utilizado junto a técnica de sequenciamento (Ravn *et al*, 2013)

Anticorpos vem sendo utilizados para gerar ligantes pelo Phage Display por ser uma molécula capaz de se ligar naturalmente a diversas estruturas, permitindo gerar e selecionar bibliotecas de fagos com grande variedade de ligantes de alta afinidade. Os fragmentos de anticorpos são apresentados na superfície dos fagos fusionados ao produto do gene 3. Depois de seu isolamento na seleção dos fagos, os fragmentos de anticorpo podem ser reconstruídos em seu tamanho original ou qualquer outro formato de anticorpo (Hoen *et al*, 2008) utilizando-se de expressão heteróloga em células de mamíferos.

Fragmentos de anticorpos na forma de scFv com sequência totalmente humana, podem ser isolados a partir de bibliotecas apresentadas em fagos onde os genes codificadores dos domínios VH e VL de um scFv ligante são trocados por um repertório de genes codificadores destes domínios variáveis V (*shuffling* de cadeia). Nesta técnica, durante processo de clonagem mantém-se o gene de um dos domínios, por exemplo, o VL, enquanto que o outro, codificando o VH, é trocado por inúmeras variações dele. Em seguida é feita a seleção contra determinado antígeno, para se obter o fragmento scFv (VH e VL) com a afinidade desejada. Schier e colaboradores em 1996, usaram o *shuffling* de cadeia para aumentar a afinidade de scFvs humanos de uma biblioteca não-imune, os quais reconhecem o antígeno tumoral glicoproteico *c-erbB-2* com uma afinidade de $1,6 \times 10^{-8}M$, neste estudo a afinidade do scFv parental foi aumentada em seis vezes ($K_d = 2,5 \times 10^{-9}M$) pelo *shuffling* da cadeia leve e em cinco vezes ($K_d = 3,1 \times 10^{-9}M$) pelo *shuffling* da cadeia pesada, valores comparáveis àqueles para anticorpos contra o mesmo antígeno produzidos por hibridomas. (Dantas-Barbosa, 2005; Inbar *et al*, 2012)

1.7 Anticorpos recombinantes e o grupo de Imunologia Molecular

O início tímido da terapia com anticorpos em nada se compara ao visto hoje na indústria de biofármacos, o grande investimento em anticorpos de uso clínico gerou uma ampla variedade de moléculas modificadas com o propósito tanto de direcionar especificamente sua ação quanto de minimizar seus efeitos colaterais. Atualmente existem

anticorpos monoclonais (mAbs) em várias formas e alvos diferentes podendo ser de fragmentos (abciximab), conjugados a toxinas (gemtuzumab ozogamicin), marcados com radioisótopos (ibritumomab, tositumomab) e derivados de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos (adalimumab) já aprovados para o uso terapêutico (Oliveira, 2009). Há ainda em desenvolvimento mAbs de sequência humana obtidos a partir de camundongos transgênicos, derivados de bibliotecas apresentadas na superfície de fagos, de ribossomos e de leveduras (Lonberg , 2005; Hoogenboom , 2005).

O grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília desenvolveu uma estratégia de humanização do anticorpo anti-CD3 por meio da técnica de *CDR grafting* (Citado em Maranhão e Brígido, 2002). Para tal, foram escolhidos arcabouços humanos para cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) que possuíssem a maior similaridade com a sequência do anticorpo murino, visando, assim, reter a especificidade de ligação característica do OKT3.

Na humanização da cadeia variável pesada foi utilizada uma sequência germinal humana que possui a maior similaridade com a VH do OKT3, a HV1B, tendo uma identidade de 71,4% com a VH do OKT3 (Reis, 2000), variando-se apenas o resíduo 86, entre uma treonina (T) e uma arginina (R). Em relação a cadeia leve. Foi inicialmente proposta uma cadeia leve humanizada utilizando uma abordagem mista que incluía a busca do *germlines* mais próximos diretamente em nível de sequência, associada a um alinhamento estrutural para selecionar o *germline* candidato (Fonseca, 2000). A VL gerada dessa maneira se mostrou capaz de formar um paratopo reativo com CD3 humano, mas com pouca capacidade de deslocar o OKT3 (Costa, 2004). Em uma segunda tentativa, foi testada uma cadeia leve proposta utilizando apenas a abordagem de busca em nível de sequência do *germline* mais próximo. Essa segunda VL também foi capaz de formar um paratopo reativo com o CD3 humano, mesmo que mostrando um perda de afinidade (Silva 2009).

Nos trabalhos anteriores realizados no grupo de imunologia molecular foram testados anticorpos anti-CD3 utilizando cadeias de VL humanizadas, que apesar de apresentarem atividade biológica, perderam parte da afinidade do anticorpo original. Nesse trabalho propomos o *suffling* de VL, baseada em uma biblioteca de VL humana, no sentido de conseguir novos anticorpos com afinidade e seletividade pelo antígeno CD3. Utilizando protocolos previamente estabelecidos e revisados juntamente com técnicas de biologia molecular voltadas para a produção de anticorpos recombinantes por *Phage*

Display, a partir uma biblioteca de VL humanos. Especificamente, mostramos nesse trabalho a construção de uma biblioteca de VL no contexto de scFv a partir de uma biblioteca construída na forma de Fab.

II-Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Construção do plasmídeo para phage display contendo um scFv anti-CD3 fusionado com o gene3 e preparação de uma biblioteca de VL visando a seleção de novos anticorpos anti-CD3.

2.2- Etapas Metodológicas

- Desenho de um gene sintético anti-CD3 fusionado ao o gene 3 de M13.
- Construção do vetor pCIgRVL_gene 3.
- Desenho do sistema de reação e as condições para a reação da técnica de PCR a ser utilizada.
- Amplificação pela técnica de PCR de genes de VL a partir de uma biblioteca de Fab.
- Clonagem no vetor pGEM- T easy dos produtos da PCR com o intuito de comprovar variabilidade dos clones. (Promega)

III – Estratégia

A estratégia experimental consiste na construção de um vetor contendo o gene que codifica a proteína 3, constituinte do capsídeo fago M13, fusionado a um VH humanizado e VL murino na forma de scFv baseado em um anticorpo anti-CD3 humanizado previamente caracterizado pelo grupo (Silva 2008).

Em uma segunda etapa consiste na amplificação do conjunto de VL humanas a partir de uma biblioteca de Fab humanos clonados no vetor pCOMB 3X (Dantas-Barbosa, 2005), utilizando PCR. Vários sistemas foram testados visando estabelecer as condições de temperatura e também as concentrações dos reagentes para que a biblioteca pudesse ser amplificada de forma eficiente para ser clonada. A biblioteca resultante foi analisada quanto a diversidade de clones obtidos.

IV – Materiais e Métodos

4.1 – Materiais

4.1.1 – Linhagens Bacterianas

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

- **XL 10 Gold (Agilent Technologies[®])** - Tet^rdelta- (*mcrA*)183 delta- (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI^kZDM15 Tn10* (Tet^r) Amy Cam^r].

4.1.2 - Plasmídios e Biblioteca Utilizada

- GS54231-8 pBSK- Fusão scFvRVL- gene 3 (Figura 10)

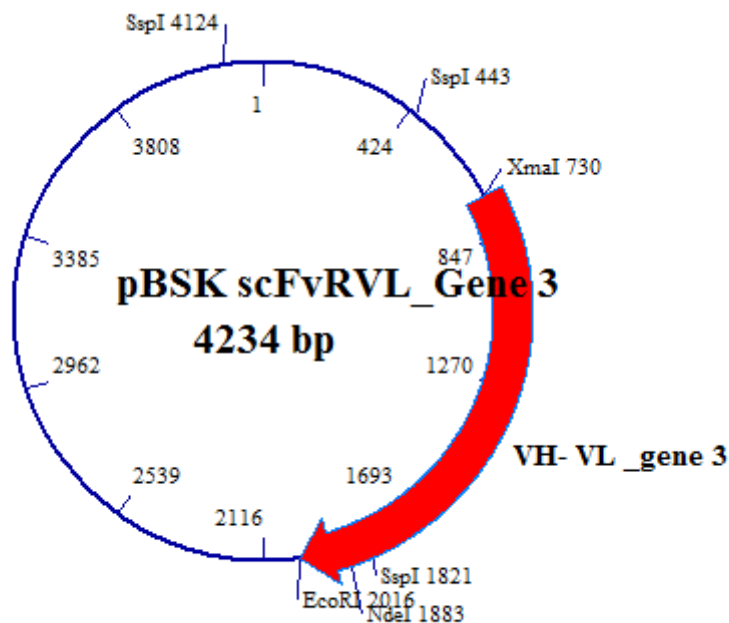


Figura 10: Vetor com fusão scFvRVL_Gene3 sintetizado quimicamente.

- pGEM-T (Promega ®) - The pGEM®-T Vector is derived from the circular pGEM®-5Zf(+) Vector (GenBank® Accession No. X65308)
- pCOMBFab- Biblioteca de FABs humanos, VH e VL humanizado construída a partir de anticorpos contra Osteosarcoma humano (Dantas- Barbosa, 2004).
- pCIgRM- anti-CD3 (hVH^{R86} humanizado versão R e VL murino) (Costa, 2004).

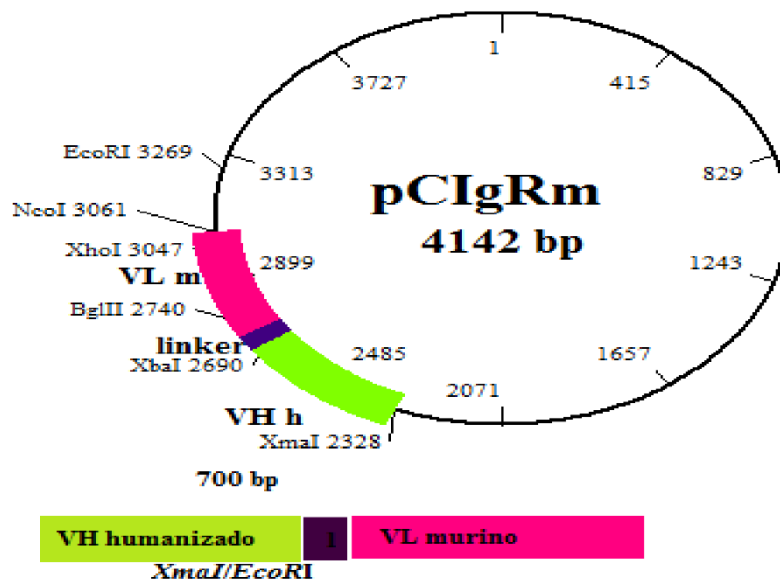


Figura 11: Fagomídeo pCIgRM – anti-CD3.

- pCIg 316 Z-22- fagomídeo pCIg 316 Z22 (Maranhão & Brígido, 2000).

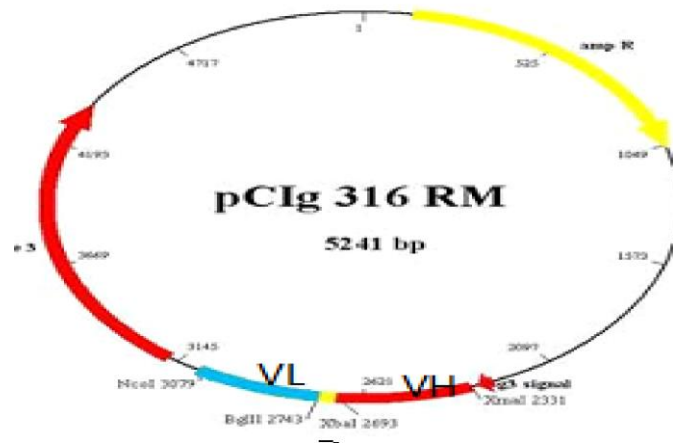


Figura 12: Fagomídeo pCIg 316 Z22.

4.1.3- Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento

Os oligonucleotídeos foram solubilizados em água Mili-Q para concentração de uso de 10 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$. A tabela 2 mostra as sequências dos nucleotídeos utilizados no experimento.

Tabela 2. Oligonucleotídeos sintéticos específicos utilizados.

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

4.1.4 - Meios de cultura e soluções Utilizadas

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

Após dissolver os reagentes em água, todos os meios de cultura foram autoclavados. A seguir adicionava-se, quando necessário, o agente antimicrobiano apropriado: ampicilina,

na concentração final de 100 µg/mL ou 200 µg/mL no caso de eletroporação, ou tetraciclina 50 µg/mL .

4.1.5 - Soluções e tampões de uso geral

Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10mM

EDTA pH 8,0 1mM

Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

Solução estoque de glicose 2M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Solução estoque de Mg 2M

MgCl₂ 1M

MgSO₄ 1M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

IPTG 0,1M

Solução estoque a 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.

4.1.6 – Soluções e material para preparo de células competentes e transformação-bactéria.

Solução de CaCl²CaCl² 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

Glicerol 50% (v/v)

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

Cubetas de eletroporação (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad®, nº catalogo : 165-2086)

4.1.7- Soluções e material 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

Acetato de Amônio 7,5 M

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

Acetato de Sódio 3M, pH 4,8

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

4.1.8 – Tampões de endonuclease de restrição

-Comercializado pela New England Biolabs®:

-NEB 1

-NEB 2

-NEB3

-NEB4.

4.1.9 -Tampões de outras enzimas

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

Tampão SAP (Promega ®)

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

4.1.10 – Soluções para eletroforese em gel de agarose

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base 0,89M

Ácido Bórico	0,89M
EDTA	0,02M
pH 8,0	

Tampão de corrida TAE 50X

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

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídeo 20.000X

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

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

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200mL
pH ajustado para 6,8 com HCl.	

4.1.11 – Marcadores para DNA e proteína

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

Fragmentos de DNA em pb.

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

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

4.1.12 - Enzimas

Enzimas de restrição *Bst I*- *New England Biolabs* # RO168S (3,000 unidades)
Enzima de restrição *Nco I*- *New England Biolabs* # RO193S (1,000 unidades)
Enzima de restrição *EcoR I*- *New England Biolabs* # RO101S (10,000 unidades)
Enzima de restrição *Bgl II*- *New England Biolabs* # RO144S (2,000 unidades)
Enzima de restrição *XmaI*- *New England Biolabs* # RO180L (2,500 unidades)
Enzima de restrição *Nde I* - *New England Biolabs* # RO111S (4,000 unidades)
Enzima de restrição *Psi I*- *New England Biolabs* # RO657L (1,000 unidades)
- Taq Polimerase Platinun Invitrogen®

4.1.13- Kits Comerciais

- **QIAGEN Plasmid Mini Kit 100** – Para preparação de DNA em pequena escala (Qiagen, nº. cat. 27106).
- **QIAGEN Plasmid Midi Kit 100** – Para preparação de DNA em escala intermediária (Qiagen, nº. cat. 12145).
- **Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze** – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore, nº. cat. 42600).
- **Filtro de soluções 0.22µm**

4.2 – Métodos

4.2.1 – Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (adaptado de Sambrook *et al.*, 2001).

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” de 1,5 ml, sendo o sobrenadante desprezado a cada centrifugação.

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

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

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

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

6- Ao sobrenadante eram adicionados 1µL de RNase A e incubava-se por 3 hora a 37°C.

7- Adicionava-se 300µL de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.

8- Adicionava-se 300µL de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.

9- O DNA era então precipitado com 2,0v de etanol 100% gelado por, no mínimo 2 horas a -20°C ou overnight.

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

11- Adicionavam-se 1mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.

12- Secava-se o sedimento a vácuo ou por simples exposição ao ar.

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

4.2.2 – Preparação de DNA plasmidial em larga escala (Azevedo *et al.*, 2003)

- 01- Coletavam-se 200 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescida em meio LB/Amp (150µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 minutos a 3.000 X g, desprezando-se o sobrenadante.
- 02- Ressuspencia-se o sedimento em 5 mL de solução I sob forte agitação
- 03- Adicionava-se 10 mL de solução II e homogeneizava-se as amostras, invertendo-se lentamente o tubo várias vezes. Incubava-se no gelo por 10 min.
- 04- Adicionava-se 7,5 mL de solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 20 min.
- 05- Centrifugava-se a 10.000 x g por 30 min a 4° C.
- 06- O sobrenadante era filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante era adicionados 0,6 v de isopropanol e, após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente centrifugava-se a 12.000 x g por 20 min também a temperatura ambiente.
- 07- Descartava-se o sobrenadante e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento era ressuspensionado em 500 µL de TE ao qual eram adicionados 2µL de RNase A, numa concentração final de 2 µg/mL. Incubava-se a 37°C por 3 horas.
- 08- Adicionava-se 1 v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
- 09- Repetia-se o passo anterior mais uma vez
- 10- Adicionava-se 1 v de clorofil e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo
- 11- Adicionava-se 0,5 v de acetato de amônio 7,5 M e 2,0 v de etanol 100% gelado e incubava-se por 2 horas a -20°C no mínimo ou overnight.
- 12- Centrifugava-se a 12000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
- 13- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12000 rpm por 15 min a 4 °C.
- 14- Após secagem o sedimento era ressuspensionado em 200 µL de TE. E as amostras conservadas em -20°C.

4.2.3 – Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

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

4.2.4 – Análise do DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook e Russel, 2001)

A agarose era preparada de 0,8 a 1,2% em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose eram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5 X. Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador e a imagem era digitalizada em aparato de fotodocumentação.

4.2.5- Eluição dos fragmentos de DNA de gel de agarose

Os fragmentos de DNA a serem eluídos eram cortados no gel de agarose após eletroforese. A eluição do DNA do gel eram submetidos ao Freezer- Squeeze:

- 1- A banda do DNA cortada do gel era transferida para uma bolsa feita utilizando pedaços de Parafilm®. Duas extremidades da bolsa eram juntas e seladas com o auxílio da parte cônica de um microtubo de 1,5 mL. A banda era inserida dentro da bolsa pela parte não selada.
- 2- A bolsa contendo o fragmento era congelada a -40° C.
- 3- Após o congelamento total do fragmento era macerado até se liquifazer.
- 4- O líquido e o gel eram transferidos para as colunas ultrafree DA centrifugal Unit (Millipore®).
- 5- O material era centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente.

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

4.2.6- Reação de Desfosforilação com a fosfatase alcalina de camarão (SAP)

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

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

4.2.7 – Ligação de fragmento de DNA

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

$$\text{Ng vetor} \times \text{tamanho do inserto em pb} \times \text{Razão inserto} = \text{ng de inserto}$$

Tamanho do vetor em pb

vetor

A razão de ligação era realizada de acordo com a instrução do fabricante da T4 DNA Ligase utilizada. E após incubação, em geral 16 horas a 4°C, eram usados para transformar em E.Coli.

4.2.8 – Preparação de células competentes

4.2.8.1 – 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 aliqotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.

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

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

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

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

4.2.8.2 – 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 ressuspenso 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 ressuspenso 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 ressuspenso 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.

4.3 – Amplificação das seqüências variáveis humanas – PCR

Para uma reação de PCR ter uma alta eficiência é necessário que todos os reagentes estavam em concentrações equilibradas uns com os outros para que possam reagir sem que ocorra excesso de material ou falta de amplificação da amostra. Para isso foram montados 23 sistemas (Tabela 3), variando em concentração de reagente e condições da temperatura, tempo e número de ciclos em virtude de estabelecer uma otimização da PCR para a seqüência codificadora da cadeia leve da amostra VL humano.

Tabela 3: **Sistemas para teste de amplificação da biblioteca FAB.**

sistemas	DNA molde (biblioteca Fabs clonadas no pComb 3XSS) ng	Taq DNA Polimerase μL	Primer 5' (Tabela 2) μM	Primer 3' (Tabela 2) μM	-MgCl ₂ (tampão de reação) μL	MgCl ₂ mM	dNTP mM
1	0,2	1	0,4	0,4	5	2	1
2	0,2	1	0	0,4	5	2	1
3	0,2	1	0,4	0	5	2	1
4	0	1	0,4	0,4	5	2	1
5	0,4	1	0,4	0,4	5	3	1
6	0,4	1	0	0,4	5	3	1
7	0,4	1	0,4	0	5	3	1
8	0	1	0	0,4	5	3	1
9	0,6	1	0,4	0,4	5	4	1
10	0,6	1	0	0,4	5	4	1
11	0,6	1	0,4	0	5	4	1
12	0	1	0,4	0,4	5	4	1
13	0,2	1	0,4	0,4	5	2	1
14	0,4	1	0,4	0,4	5	1	3
15	0,6	1	0,4	0,4	5	4	1

O volume final das reações é de 50 μL e foram realizadas em Eppendorf no termociclador testando as seguintes condições (Sistema 1 – 15):

- 1) 94°C 3 min (em seguida era adicionada a enzima)
- 2) ciclos: 5
 - 94°C 1 min
 - 60°C 1 min
 - 72°C 2 min

- 3) ciclos: 40 94°C 1 min
 57°C 2 min
 72°C 2 min
 4) Extensão final 72°C 10 min
 5) Hold 4°C ∞

sistemas	DNA molde (biblioteca Fabs clonadas no pComb 3XSS) ηg	Taq DNA Polimerase μL	Primer 5' (Tabela 2) μM	Primer 3' (Tabela 2) μM	-MgCl ₂ (tampão de reação) μL	MgCl ₂ mM	dNTP mM
16	0,4	1	0,4	0,4	5	3	0,4
17	0,4	1	0,4	0,4	5	3	1
18	0,4	1	0,2	0,2	5	3	2
19	0,4	1	0,4	0,4	5	1	0,4
20	0,4	1	0,4	0,4	5	2	0,4
21	0,4	1	0,4	0,4	5	2	0,4
22	0,4	1	0,4	0,4	5	1	1
23	0,4	1	0,4	0,4	5	1	0,2

O volume final das reações é de 50μL e foram realizadas em Eppendorf no termociclador testando as seguintes condições (Sistema 16-23):

- 1) 94°C 3 min
 2) ciclos: 30 94°C 1 min
 60°C 1 min e 30 seg
 72°C 2 min
 3) Extensão final 72°C 10 min
 5) Hold 4°C ∞

Protocolo para ligação em pGEM- T[®] vector se encontra no endereço eletrônico <http://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/pgem-t%20and%20pgem-t%20easy%20vector%20systems%20protocol.pdf>

5- Resultados e Discussão

Estratégia para a montagem da Biblioteca de VL

5.1 Clonagem do inserto que codifica o scFv anti- CD3 do vetor pCIg Rm no pCIg 316 Z22.

5.1.1 Construção do vetor pCIg 316 RM

O experimento consiste na clonagem do inserto que contém hVH^{R86} humanizado versão R e VL murino no vetor pCIg316 Z22 (Maranhão & Brígido, 2000), que contém o gene 3, como demonstrado na figura 12. Após a clonagem, o VL murino da construção do novo vetor pCIg316Rm seria substituído pela biblioteca de VL de anticorpos humanos -pComb 3XSS (Dantas- Barbosa, 2004) (Figura 13).

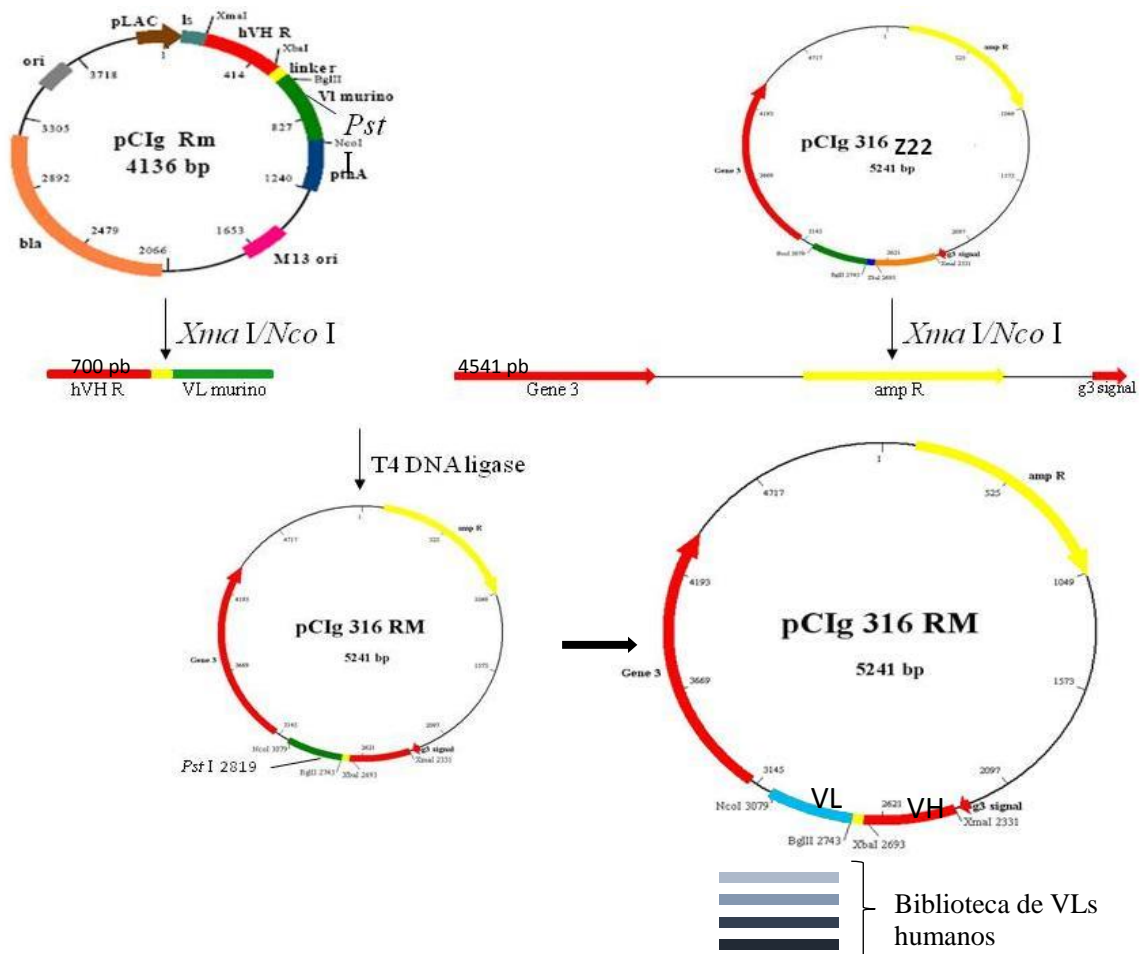


Figura 13. Estratégia de clonagem. Figura esquemática da clonagem da sequência codificadora do scFv anti-CD3 do plasmídeo pCIg Rm no vetor pCIg 316, em seguida a clonagem da biblioteca de VLs humanos no plasmídeo pCIg 316 RM em *Bgl II* e *Nco I* no lugar do VL murino. Amp R – gene de resistência a ampicilina. Gene 3 – sequência codificadora da proteína pIII do fago.

Dessa forma procedeu-se a transferência do scFv RM obtido do vetor pCIgRM para o vetor de phage display pCIg316, substituindo alí o VH e VL do anticorpo Z22 dando origem a uma nova construção scFv – gene 3 + arcabouço do pCIg316 (introduzindo as características do anti-CD3). Essa etapa de construção do vetor é muito importante no projeto pois após a amplificação da biblioteca de VL humanos, os mesmos seriam inseridos no lugar do VL murino do novo vetor, criando uma biblioteca de sequências VL humanas.

Foi feita a clonagem do inserto RM anti-CD3 com o objetivo de trazer o VH humanizado anti-CD3 para o fagomídeo pCIg316 Z22 (Maranhão & Brígido, 2000). Tal clonagem é indispensável para a posterior na seleção de VLs ligantes ao CD3 recombinante. Nesta clonagem, o plasmídeo pCIgRM (4136 pb) (Fonseca, 2000) foi

digerido com as enzimas de restrição *Xma* I e *Nco* I, com isso o fragmento de 750pb liberado na digestão foi eluído em gel agarose a 1%. Procedeu-se então, a mesma digestão (*Xma*I e *Nco*I) com o plasmídeo pCIg 316 Z22, e em gel de agarose a 1%, onde o fragmento desejado de 4591 pb foi eluído (Figura 14).

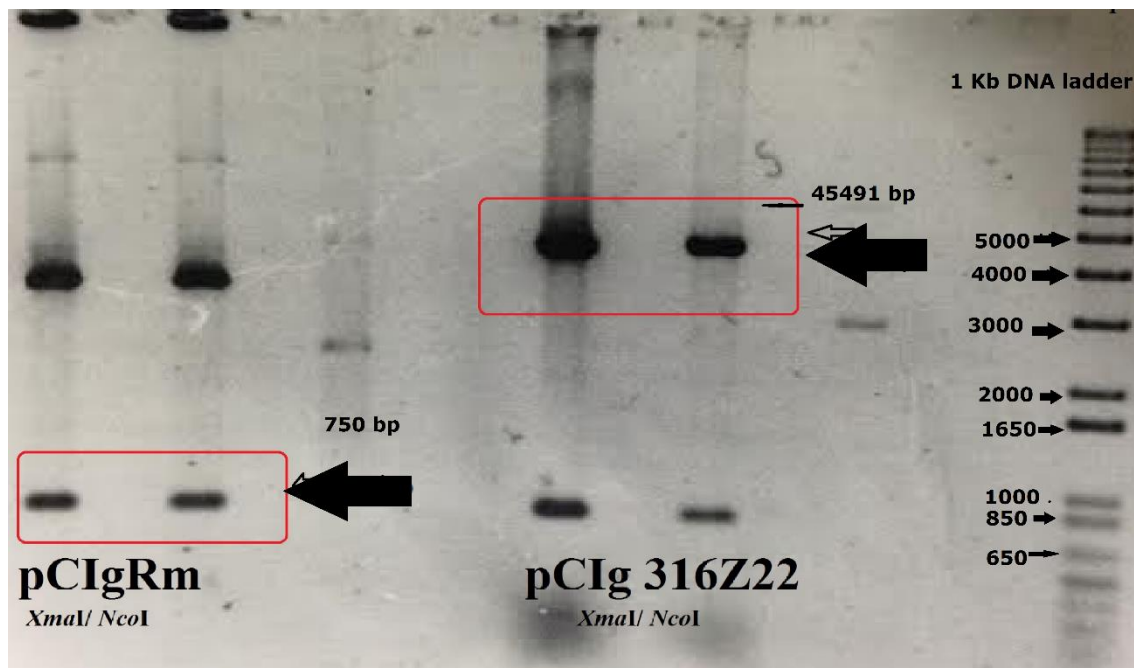


Figura 14: Digestão dos plasmídeos pCIg Rm e pCIg316 Z-22 com as enzimas *Xma*I/*Nco* I em comparação ao plasmídeo intacto. Respectivamente: pCIgRM digerido com *Xma*I/*Nco* I (2 poços); pCIgRM intacto; pCIg 316 Z-22 digerido com *Xma*I/*Nco* I (dois poços); pCIg316 Z- 22 intacto; Marcador 1 Kb plus Invitrogen®.

Após a eluição foi feita a ligação com a enzima T4 DNA Ligase da Invitrogen® e transformação da linhagem bacteriana XL1-Blue para células competentes por Cloreto de Cálcio (Azevedo *et al*, 2003) e transfecção do material finalizando com a extração do DNA dos clones obtidos. Apesar de a clivagem conseguir atender as expectativas de liberar o inserto de 750 pb e o vetor de 4591 pb, a transformação não deu resultado pois não houve crescimento de colônias nas placas, como controle positivo, transformamos o plasmídeo intacto pCIgRM. Dentre vários fatores que poderiam contribuir para esse resultado, a oscilação de temperatura da Estufa utilizada no experimento foi crucial para o experimento, fato esse comprovado pois o mesmo experimento, com os mesmos materiais, foi refeito porém utilizando outra estufa que resultou em crescimento das

colônias. Apesar do resultado positivo, o cálculo da eficiência da transformação não foi satisfatório.

5.1.2 Construção do Plasmídeo pCIgRVL_G3.

A construção scFv são moléculas recombinantes em que os domínios VH e VL são conectados por um linker de peptídeo para que o sitio de ligação ao antígeno seja regenerado em uma única molécula (Reiter *et al*, 1996). Recentemente a atenção tem sido focada na geração de moléculas recombinantes baseadas na construção scFv, devido também as suas propriedades farmacológicas, que se dá ao encurtamento entre o link VH e VL da estrutura. Essa construção possui inúmeras vantagens como alta penetrabilidade em tecidos, facilitando sua ação dentro de tumores e devido à natureza de sua estrutura (Monocistrônica) que permite uma fácil manipulação genica e não possui região Fc sendo útil em terapia que não desejam a sua função efetora (Hollinger e Hudson, 2005).

Como alternativa à clonagem do scFv RM no vetor pCIg316, utilizamos uma sequência sintética contendo um scFv anti-CD3 (RVL) que codifica um VH e VL humanizado e o gene 3 – sequência codificadora da proteína pIII do fago M13 utilizado no *Phage display* (figura 13). A partir desta nova construção, scFvRVL_gen3, seria possível inserir essa sequência no vetor pCIgRM, introduzindo nesse vetor uma VL humanizada e o gene 3.

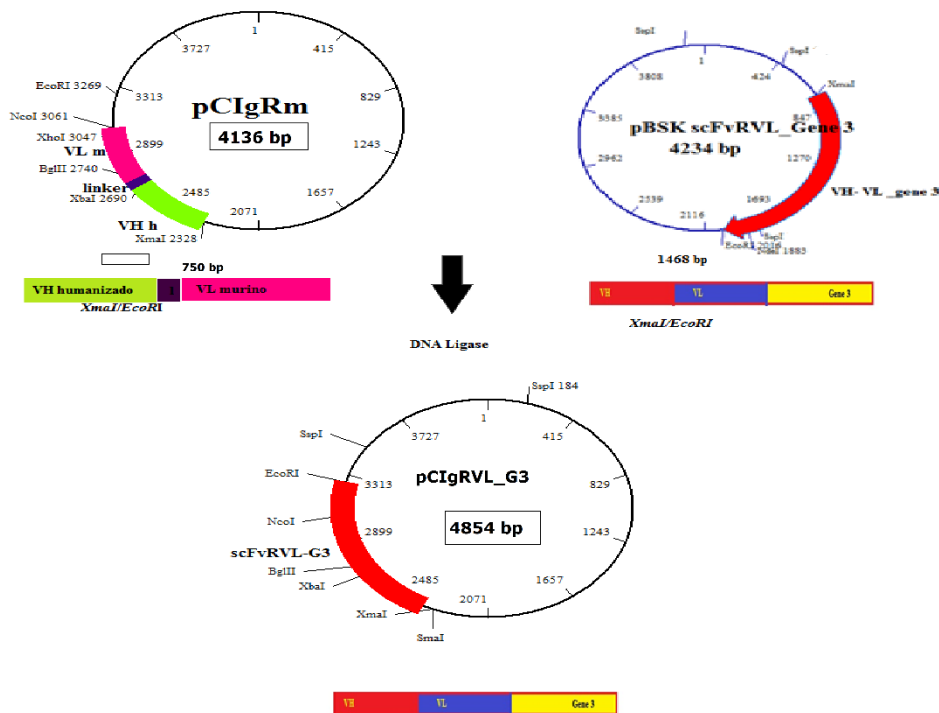


Figura 15. Estratégia de Clonagem do vetor pCIgRVL_G3. Figura esquemática de clonagem da sequência codificadora pCIgRVL_G3 no vetor pCIgRM substituindo a sequência de hVH e VL murino existente. No vetor final a biblioteca de VLs humanas (pCOMB) será clivada no sítio BglII e NcoI no lugar do VL humanizado.

Foi feita a clonagem do inserto *contendo a fusão scFvRVL_gen3*, no fagomídeo pCIgRM que não possui o gene 3, como ilustrado na figura 15. É importante salientar que, em trabalhos anteriores do grupo (Costa, 2004), foi demonstrado a eficácia da ligação deste VH em conjunto com a VL murina original no reconhecimento ao antígeno na superfície de células humanas, em níveis comparáveis ao anticorpo monoclonal murino (OKT3). Nesta clonagem, a construção sintética, que possui o tamanho de 4232pb, foi digerido com as enzimas *XmaI* e *EcoRI*, e foi eluído em gel de agarose 1% separando o fragmento de 1468 bp do resto do vetor. Procedeu-se a mesma (*XmaI* e *EcoRI*) com o Plasmídeo pCIg Rm separando o fragmento desejado de 3386 pb (figura 16).

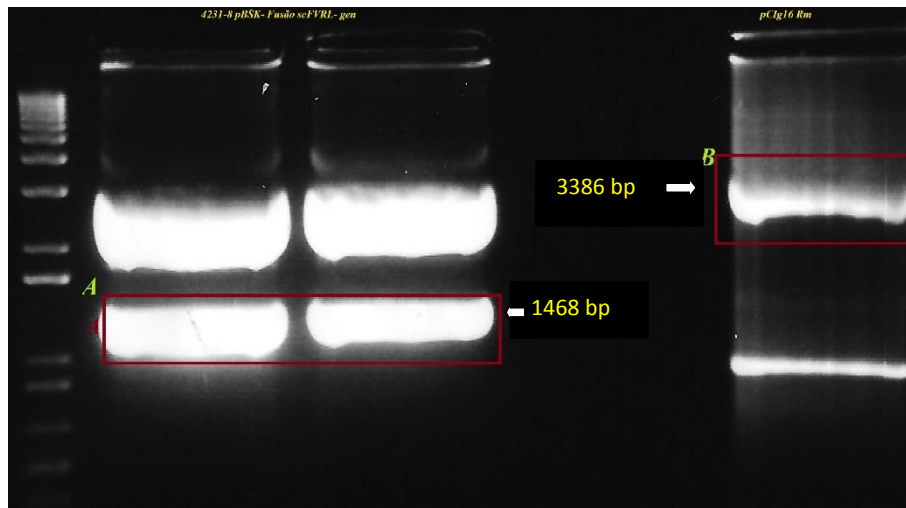


Figura 16. Gel de eletroforese apresentando a digestão dos plasmídeos *GS54231-8 pBSK- Fusão scFVRL- gen3* separando o inserto (*Fusão scFVRL- gen3*) do arcabouço. Digestão do vetor *pCIg 16 Rm* com enzimas de restrição *Xma I*, *EcoR I*, liberando duas bandas: **A**- fragmento de 1468pb referente ao inserto *Fusão scFVRL- gen3*. **B**- fragmento de 3386 pb referente ao vetor *pCIg 16 Rm*.

Após a eluição dos fragmentos, as amostras foram precipitadas durante a noite a -20° e os fragmentos desejados foram ligados por meio do protocolo descrito pelo fabricante da enzima T4 DNA Ligase Invitrogen®. Para uma transformação eficiente por eletroporação é necessária uma alta competência das células, que depende dos materiais utilizados e procedimentos realizados. Uma das várias razões existentes para tantas tentativas de clonagem seria algum erro na execução do protocolo, podendo ser desde a ligação não ter ocorrido da maneira esperada, como também, após o choque, o procedimento de recuperação das células, um passo extremamente importante, não ter sido realizado de uma maneira eficiente e rápida. Outro fator importante quando abordado o tema construção de um vetor, é o sistema de ligação: A quantidade necessária de vetor e inserto em um sistema influencia diretamente o resultado da transformação. Quantidades exageradas tanto do vetor como de inserto impedem uma eficiência assim como ausência de material, por esse motivo o cálculo de proporção entre um vetor e um inserto em um sistema de ligação é essencial para o resultado da transformação, seja ela por método de Eletroporação bem como por choque térmico com CaCl_2 . Foi feito então uma minipreparação por QIAGEN Plasmid Mini Kit® dos clones obtidos. De forma a confirmar se a ligação ocorreu da maneira esperada e se o novo vetor foi construído de maneira correta, foi verificado no mapa de restrição as melhores enzimas a serem utilizadas.

A partir do mapa de restrição do vetor **pCIgRVL_G3**, observou-se que a enzima *SspI* corta em três sítios diferentes inclusive, dentro da sequência que codifica o gene 3, liberando três bandas de 3601, 823 e 430 pb (Figura 17). O tamanho do plasmídeo intacto é de 4854 pb.

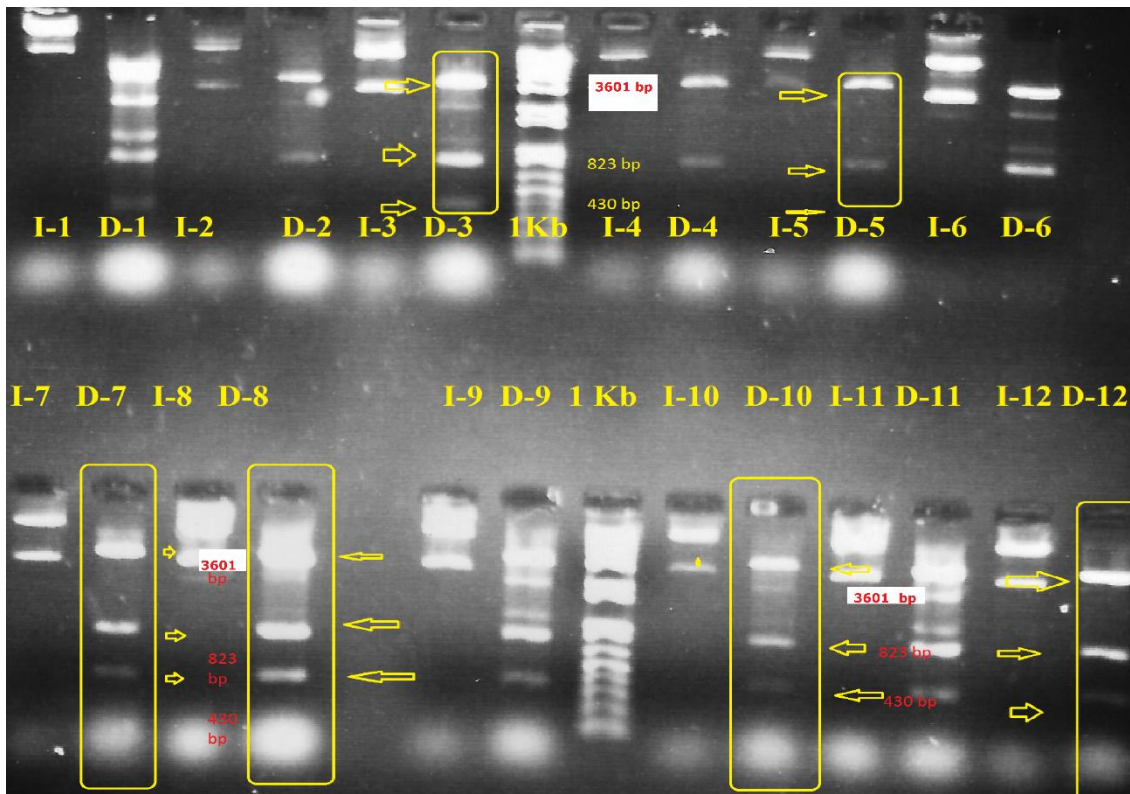


Figura 17. Obtenção do fagomídeo pCIgRVL_G3. Digestão com a enzima *SspI*, de preparação plasmidial de 12 clones (vetor pCIgRM+ Inseto scFVRL-gene3) analisados em gel de agarose 0,8%. I- Intacto, D- Digerido. As amostras apresentaram o mesmo perfil de digestão. Os clones 3,5,7 e 12 foram selecionados. Observamos a presença de fragmentos com respectivamente 3601, 823 e 430. Marcador 1 KB plus invitrogen.

Dentre os clones obtidos, 4 (clone 3, 5, 7 e 12) foram selecionados baseado no tamanho dos fragmentos clivados pela enzima *SspI*. Uma nova digestão foi realizada utilizando as enzimas de restrição *NdeI/ PsiI*, que liberariam dois fragmentos de 815 pb

e 4039 pb dentro do inserto do Gene III e também no vetor pCIgRm (figura 18). As duas digestões forma utilizadas para um controle da clonagem entre o vetor e o inserto para a construção do novo plasmídeo. Por meio das digestões com as enzimas de restrição, que foram estudadas pelo mapa gênico, observamos os fragmentos com os tamanhos esperados. As mostras serão sequenciadas para a confirmação dos clones do vetor pCIgRVL_G3, contendo o VL humanizado que deverá ser substituído pelos VL presentes nos anticorpos da biblioteca pComb Fab. Os clones obtidos serão submetidos ao sequenciamento e as sequencias geradas serão analisadas para a confirmação da nova construção pCIgRVL_G3.

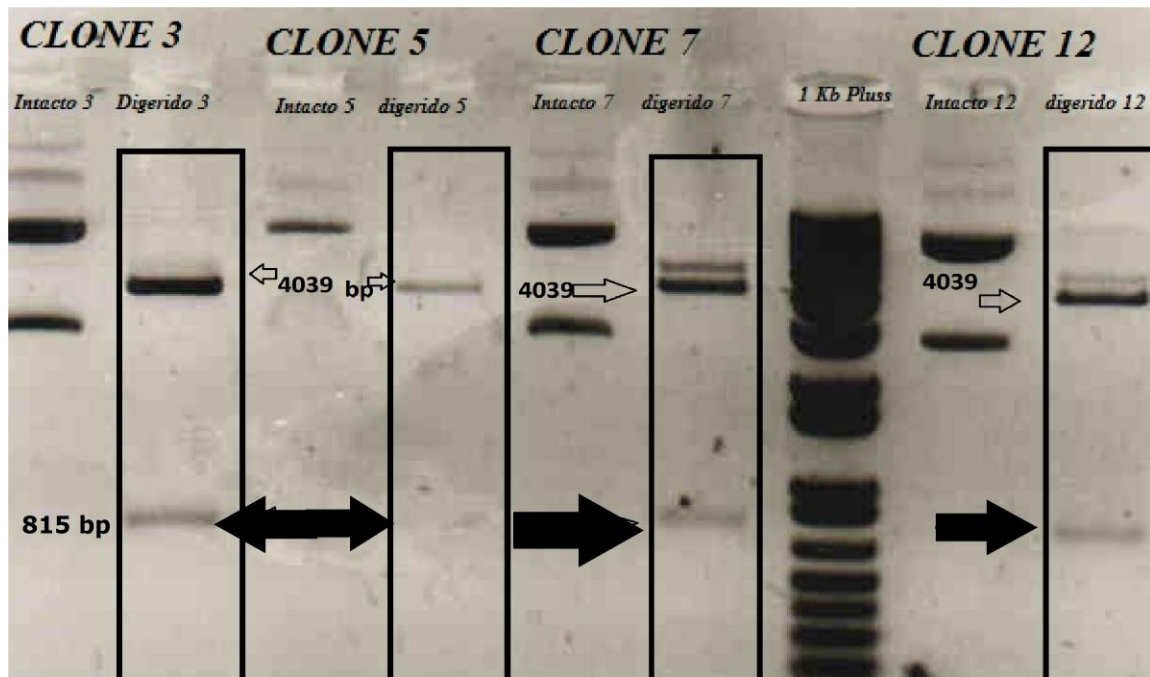


Figura 18: Clones do plasmídeo pCIgRVL_G3. Os 4 clones foram digeridos pelas enzimas Nde I/ Psi I e apresentaram o mesmo padrão de digestão, liberando duas bandas de 815 pb e 4039 pb respectivamente. O clone 5 apresenta a banda de 815 pb quase imperceptível no gel, mas quando observado através da luz UV pode ser confirmada. Marcador 1 Kb plus invitrogen.

5.2- Amplificação da biblioteca de VL humanos a partir do pCOMB FAB.

A biblioteca combinatória de Fabs humanos pCOMB FAB, produzida por Dantas-Barbosa e cols (2005) junto ao laboratório de imunologia molecular, contém um repertório de VH e VL humano variado e foi produzido a partir de linfócitos de pacientes com Osteosarcoma. A partir dessa biblioteca foi possível descrever o isolamento de anticorpos monoclonais que possuem diferentes domínios VH e VL contra antígenos tumorais (Barbosa et al, 2009). Essa propriedade garante um maior número de recombinações contra diversos alvos, ampliando a resposta contra um mesmo antígeno, uma vez que a biblioteca possui o tamanho real, incluindo genes funcionais de $1,45 \times 10^8$ (Dantas-Barbosa et al., 2005).

O vetor **pCIgRVL_G3**, contém VL e VH humanizados, na forma de scFv fusionado ao gene 3 do bacteriófago M13. O VL do plasmídeo **pCIgRVL_G3** deverá ser substituída pelos diferentes VL presentes nos anticorpos da biblioteca pCOMB FAB, assim gerando uma biblioteca de VL no contexto do VH humanizado. Essa biblioteca será utilizada para seleção de novos anticorpos anti-CD3 pela técnica de *Phage Display*.

Uma grande dificuldade encontrada quando se desenha uma reação de PCR é a quantidade ideal de reagentes a serem utilizados. Um exemplo observado durante o experimento é que o excesso de alguns dos reagentes causam uma ausência de amplificação ou uma amplificação correta porém com um depósito de reagentes (quando observados por eletroforese). Para isso foi-se necessário o desenho de 23 sistemas para PCR variando entre eles os reagentes envolvidos na reação e as condições para a reação e assim visando uma otimização do sistema.

Os primeiros 12 sistemas (figura 19) foram analisados não só quanto ao resultado da reação de amplificação mas também testando a qualidade de todos os agentes envolvidos nos sistemas (DNA, Primer's, $MgCl_2$). Como controle o primer 3' ou 5' foi retirado do sistema. Esse ensaio tem o objetivo de aumentar a quantidade de material amplificado, uma vez que visamos uma grande variedade de VL humanos.

DNA [ug]	0,2	0,2	0,2	-	0,4	0,4	1 Kb Plus	0,4	-	0,6	0,6	0,6	-
Primer 5' [μM]	0,2	-	0,4	0,4	0,4	-		0,4	0,4	0,4	-	0,4	0,4
Primer 3' [μM]	0,4	0,4	-	0,4	0,4	0,4		-	0,4	0,4	0,4	-	0,4
dNTP [mM]	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1
MgCl ₂ [mM]	2	2	2	2	3	3		3	3	4	4	4	4
-MgCl ₂ 10x [μL]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

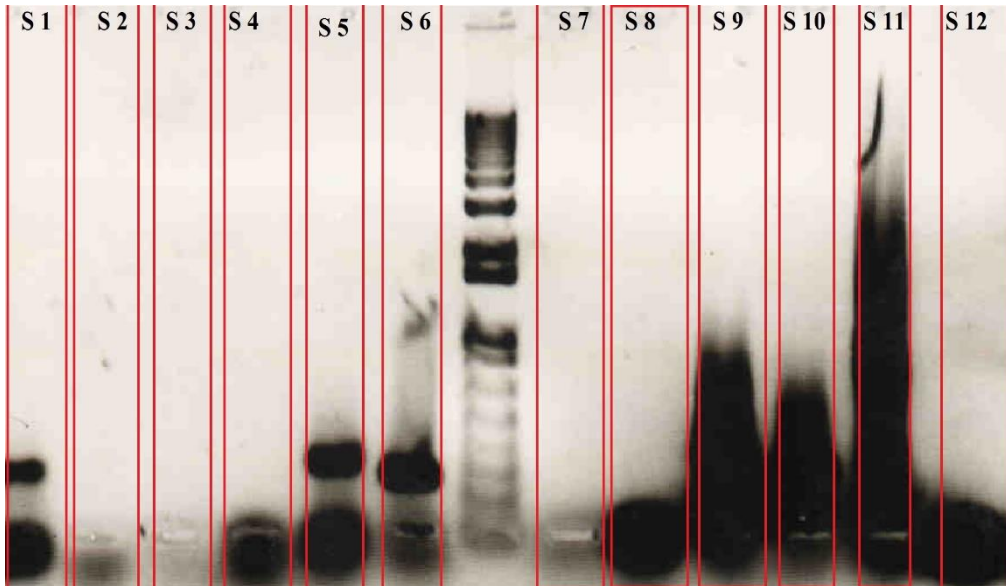


Figura 19. Amplificação da biblioteca de anticorpos FAB humanizados pelo método de PCR. Foram testados treze sistemas variando a quantidade dos componentes. Como controle utilizamos os sistemas 2, 6, 10 com ausência do Primer 5' e variando quando a concentração dos outros componentes. Os sistemas 4, 8, 12 com ausência da biblioteca pCOMB. Os sistemas 3, 7, 11 ausente de Primer 3'. Os sistemas 1, 5, 9 apresentam todos os reagentes variando conforme a sua concentração.

O ajuste entre a quantidade de Magnésio e a quantidade de DNA assim como o equilíbrio entre os outros componentes e as condições ideais foram testadas. O conjunto de todos esses fatores gera uma amplificação do material genético pela técnica de PCR. O ajuste da quantidade de magnésio é importante pois age como um cofator durante o processo da reação, necessário a atividade enzimática. Quando o magnésio se encontra em abundância, a DNA polimerase perde em fidelidade o que leva a erros no processo de cópia observado nos sistemas 9. Também quando o mesmo está escasso, a reação não acontece na velocidade que deveria, pois uma parte da DNA polimerase não é ativada e portanto também não resulta em um sistema eficiente. Para controle houve a ausência dos seguintes componentes: da biblioteca pCOMB FABs humanos (Dantas-Barbosa et al., 2005) (sistema 4, 8 e 12), do primer 5' (sistema 2, 6 e 10) e do primer 3' (sistema 3,7 e 11) que foram testados quanto a qualidade da reação e como esperado, a ausência dos

mesmos resultou na não amplificação do material. Nos sistemas 10 e 11, o que observamos é um excesso dos reagentes utilizados e acumulado no fim do gel e prejuízo da amplificação do material genético.

DNA [ug]	0,4	0,4	0,4	0,4	1 Kb Plus	0,4	0,4
Primer 5' [μM]	0,4	-	0,4	-	-	-	0,2
Primer 3' [μM]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2
dNTP [mM]	0,4	0,4	1	1	0,2	0,2	0,2
MgCl ₂ [mM]	3	3	3	3	3	3	3
-MgCl ₂ 10x [μL]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

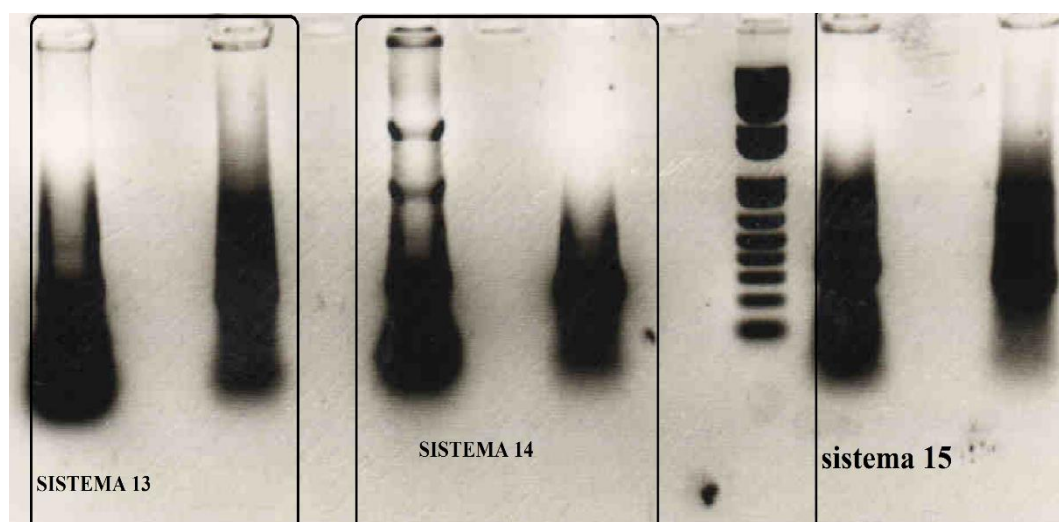


Figura 20. Sistemas 13 a 15 utilizados na amplificação da sequência codificadora VL a partir da biblioteca pCOMB FABS humanos. Da esquerda para direita na sequência: Sistema 13 com todos os reagentes e o controle sem o Primer 5'; sistema 14 com todos os reagentes e controle sem o Primer 5'; marcador de tamanho 1 Kb Plus Invitrogen®; Sistema 15 com todos os reagentes e controle sem o Primer 5'. Todos os sistemas variam quanto a quantidade de Primer's e dNTP. A mesma condição de reação foi utilizada para esses sistemas.

Nos sistemas 13 a 15, variamos quanto a concentração de dNTP e primer's nas reações. Para a amplificação do material genético é necessário uma quantidade suficiente de deoxinucleotídeos na reação, sendo um fator importante. Em excesso causa esse acúmulo de material que pode ser observado na figura 20.

DNA [ug]	0,4	0,4	0,4		0,4	0,4	0,4
Primer 5' [μM]	0,4	-	0,4		-	-	0,4
Primer 3' [μM]	0,4	0,4	0,4		0,4	0,4	0,4
dNTP [mM]	0,4	0,4	0,4		0,4	0,2	0,2
MgCl ₂ [mM]	1	1	2	1Kb	2	1	1
-MgCl ₂ 10x [μL]	0,1	0,1	0,1	pluss	0,1	0,1	0,1

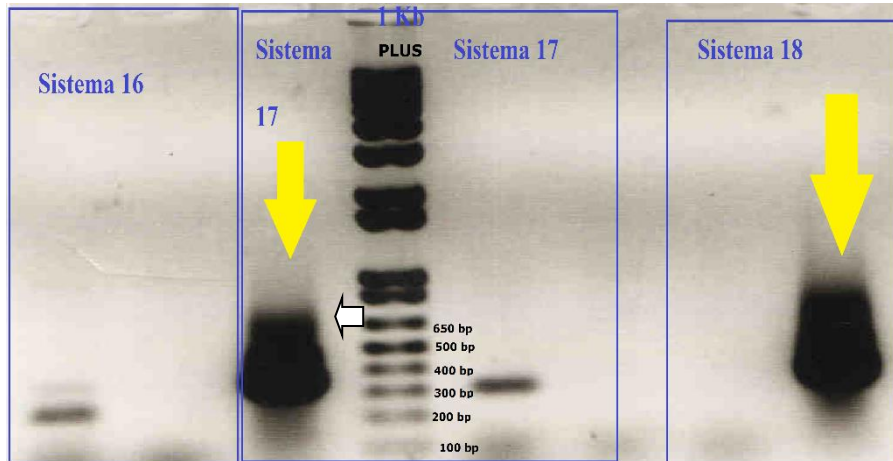


Figura 21. Sistemas para reação de PCR 16 a 18. Gel de agarose a 0,8% com o resultado da amplificação dos sistemas de PCR. A quantidade de dNTP e MgCl₂ variam de sistema para sistema.

Novos sistemas de reação foram desenhados, sendo que a partir do Sistema 16 (figura 21), mudou-se as condições de tempo e temperatura da reação, além da concentração dos reagentes. Apesar da mudança em nenhum dos sistemas foi observado o resultado almejado, ocorrendo uma ausência de amplificação ou uma amplificação com uma aparência no gel de “arrastada” exemplificando um sistema com excesso de material. Para cada sistema desenhado, como controle utilizamos a ausência do primer 5’.

Mantendo a concentração de DNA e Primer em todos os sistemas (16 a 18), usamos como variáveis dNTP e a concentração de MgCl₂ (figura 21). Também mudamos as condições de temperatura e tempo das reações (vide métodos item 4.3). Apesar de apresentar uma amplificação com menos material em excesso no gel, o sistema 16 ainda apresenta problema quanto ao tamanho das bandas que variam entre 100 a 500 bp.

DNA [ug]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Primer 5' [μM]	0,4	-	0,4	-	0,4	-
Primer 3' [μM]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
dNTP [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2
MgCl ₂ [mM]	2	2	1	1	1	1
-MgCl ₂ 10x [μL]	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1



Figura 22. Sistemas 19 a 21 utilizados na amplificação da sequência codificadora VL a partir da biblioteca pCOMB FABs humano. Gel de agarose a 0,8. Da esquerda para a direita em sequência: Sistema 19 com todos os reagentes; Controle do sistema 19 sem o primer 5'; Sistema 20 com todos os reagentes; Controle do sistema 20 sem o primer 5'; Sistema 21 com todos os reagentes; Controle do sistema 21 sem o primer 5'.

Nos sistemas 19 a 21 (figura 22), ainda variamos quanto a concentração de dNTP e MgCl₂ porém, ainda o mesmo resultado insatisfatório foi encontrado onde não existe amplificação e dois mais de um fragmento foi observado por poço. Buscando uma banda de aproximadamente 300 bp (VL) e sem excesso de material no poço, construímos mais dois sistemas de ligação (22 e 23) modificando em relação a quantidade de dNTP.

DNA [ug]	0,4
Primer 5' [μM]	0,4
Primer 3' [μM]	0,4
dNTP [mM]	0,2
MgCl ₂ [mM]	1
-MgCl ₂ 10x [μL]	0,1

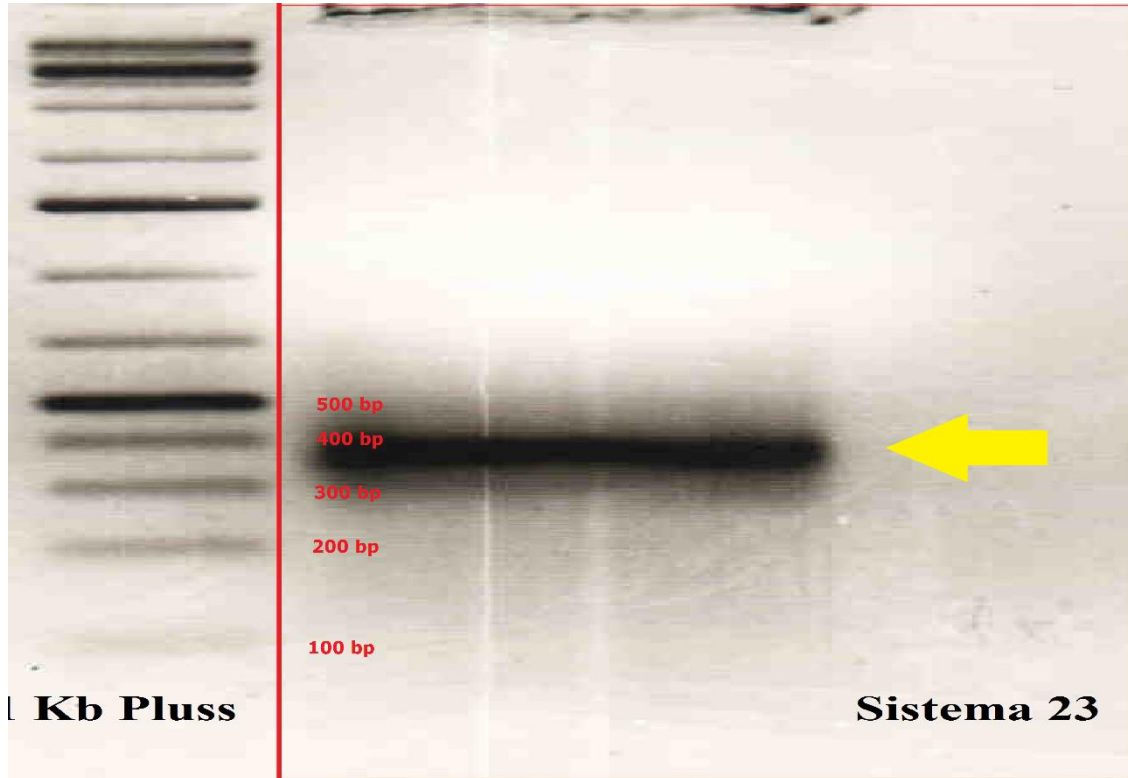


Figura 23: Amplificação da biblioteca de anticorpos FAB humanizados pelo método de PCR. Gel de agarose a 0,8% do sistema 23. Respectivamente da esquerda para a direita: Marcador de tamanho 1 Kb plus Invitrogen ®. Seta horizontal: Sistema 23 amplificado pela reação de PCR .

Analisando todos os sistemas de PCR podemos perceber que mantendo o DNA com a mesma quantidade assim como os Primer's, não houve grande alteração, porém modificando a quantidade de MgCl₂ e de dNTP conseguimos menos excesso de material. No sistema 23 (figura 23), diminuimos a concentração de dNTP e MgCl₂. O resultado da amplificação do sistema 23 foi uma única banda com tamanho aproximado de 320 bp com uma grande quantidade de material amplificado e sem excesso dos reagentes envolvidos na reação. O controle da reação, com as mesmas concentrações de reagente mas sem o primer 3'apresentou o perfil esperado: nenhuma amplificação e sem acumulado de material no fim do gel, indicando que a concentração dos reagentes estava suficiente para a reação.

5.3- Ligação do produto da amplificação no vetor pGEM- T easy ® Promega e análise dos clones por enzimas de restrição específicas quanto a sua variabilidade genética.

O produto do PCR obtido acima foi clonado em pGEM-T para avaliar o grau de diversidade e abundância das sequências de VL. O material amplificado foi adenilado, Após a adenilação, a reação foi eluída em gel de agarose a 1,0% e solução TAE 1x. o material foi separado do gel por meio de freeze squeeze e o seu DNA foi precipitado conforme protocolo de Azevedo e colaboradores (2003) e então ligado ao vetor pGEM T easy (Promega) de acordo com protocolo do fabricante, incluindo os cálculos para a quantidade necessária de inserto para as proporções de 1:5 e 1:8.

Durante o procedimento de Transformação em linhagem bacteriana *E.Coli* (XL1- BLUE), ocorreram dificuldades, pois após a eletroporação, não era observada nenhuma colônia formada. Com o intuito de concluir essa etapa, novas células eletrocompetentes foram preparadas testando sua eficiência, com plasmídeo intacto, apresentando um ótimo resultado, mesmo assim não ocorria a transformação por eletroporação. Fato esse que nos levou a Transformação por cloreto de cálcio com a linhagem bacteriana *E. Coli* (XL 10- gold), que resultou em um crescimento de colônias brancas em placa de LB ágar com IPTG e X-gal. O material genético foi então extraído por QIAGEN Plasmid Mini Kit e ligado ao vetor pGEM- T easy ® Promega conforme Protocolo previamente estabelecido pelo fabricante, obedecendo também o cálculo para a quantidade adequada de inserto a ser ligada ao vetor de expressão. A ligação foi então transformada com células XL1- blue por Cloreto de Cálcio (Azevedo *et al*, 2003). E colocados em placa contendo IPTG e X-Gal, e mantidos em estufa a 37° C ao abrigo de luz. As colônias de cores brancas foram cultivadas em meio LB e extraído o material genético por meio do QIAGEN Plasmid Mini Kit ®, totalizando 24 minipreparações. Oito amostras foram escolhidas aleatoriamente, e foram analisadas com a enzima de restrição *Bst*NI (figura 23), observando que todos os clones apresentavam perfis distintos indicando uma variabilidade genética, uma vez que o arcabouço plasmidial é o mesmo nos diversos clones, as diferenças observadas nos padrões de bandeamento são atribuídas à sequência do VL.

Além da confirmação com a enzima de restrição quanto a variabilidade genética, utilizou-se a enzima *Eco*RI para confirmar o tamanho dos inserto obtidos no vetor

pGEM®T easy (figura 24). A enzima corta em dois sítios estratégicos no vetor pGEM- T na posição 52 e 70, entre o local onde ocorreu a clonagem do inserto VL. Observamos que os clones 1 a 9 apresentaram dois fragmentos distintos com o tamanho esperado de aproximadamente de 3000 pb (Vetor) e outro menor que corresponde ao inserto com um pouco do vetor, demonstrando que a clonagem e também à amplificação do fragmento de PCR que tem o tamanho de 318 bp aproximadamente. Diferenças de fragmentos pode inferir uma variabilidade genética que deve ser confirmada por sequenciamento.

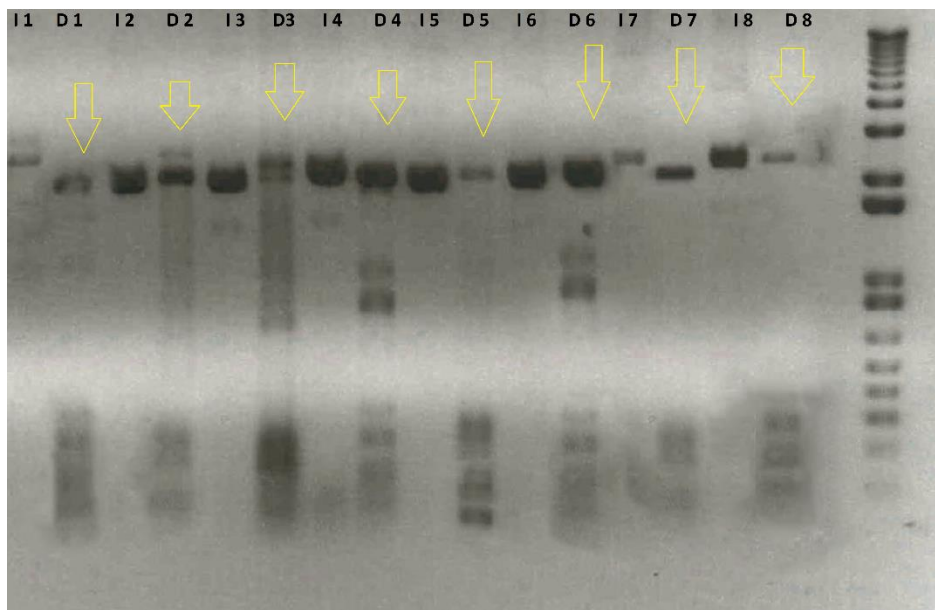


Figura 24. Gel de eletroforese com diferentes perfil de digestão dos clones. Os Clones foram digeridos com a enzima de restrição *BstNI* revelando perfis distintos e indicando uma variabilidade genética. A letra D indica o perfil das amostras digeridas com a enzima *BstNI* e a letra I indica o perfil da amostra intacta sem nenhuma digestão.

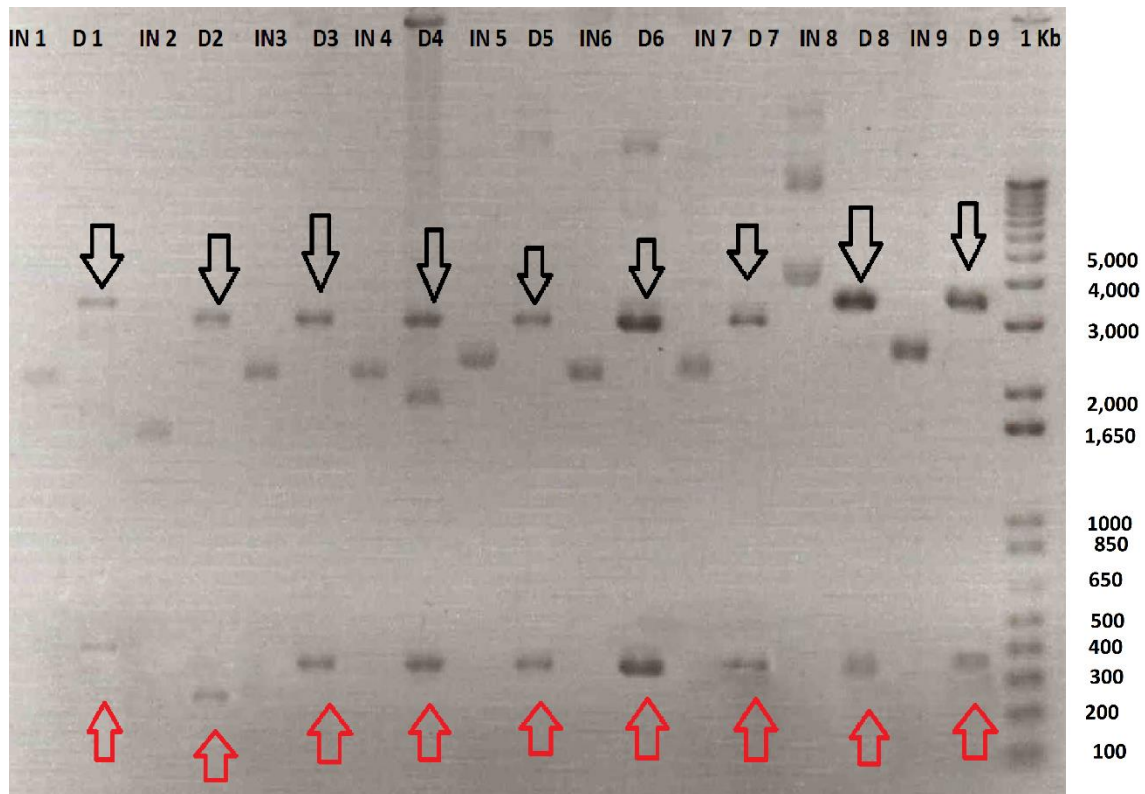


Figura 25. Análise por eletroforese da digestão com enzima *EcoRI* dos clones obtidos. Os clones foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* para a dissociação do vetor e inserto, indicando se a clonagem ocorreu no local correto. Na banda superior observa-se o vetor com aproximadamente 3000bp enquanto o fragmento inferior indica a sequência de VL humana com aproximadamente 318 bp.

Os clones devem apresentar um tamanho aproximado de 3318 pb sendo que 318 pb são referentes ao tamanho do fragmento VL de 300 pb + 18 pb do fragmento resultante do sítio de clivagem da enzima *EcoRI*. Podemos observar que os clones 3-9 apresentam esse padrão de bandas com o tamanho esperado referente ao inserto de 318 pb. Os clones 3-7 apresentam o tamanho esperado para o inserto 300- 400 bp e para o vetor ~3000 bp. Alguns clones não apresentaram o tamanho esperado e portanto não devem ser validados. Dos dez nove clones selecionados para a digestão, apenas a amostra 2 não apresenta a liberação do inserto e do vetor no tamanho esperado. Apesar desse resultado, de 9 amostras aleatórias, digeridas com a enzima de restrição, oito apresentam o resultado satisfatório como observado na figura 2, indicando uma diversidade nos VL clonados, que deve ser confirmada por sequenciamento. Para a confirmação desses clones é necessário fazer o sequenciamento. Os clones resultantes tanto da ligação da sequência VL amplificada com os clones resultantes da construção do pCIgRVL_G3 mostram-se importantes ferramentas para a construção do anticorpo anti- CD3 humano.

5- Conclusão

O uso de anticorpos recombinantes na área clínica incentiva a uma pesquisa para a utilidade dos mesmos em várias áreas para uso acadêmico ou clínico. Tecnologias moleculares e biotecnológicas como o Phage Display possibilita o desenvolvimento de bibliotecas combinatórias de anticorpos com uma maior especificidade sendo um grande potencial para pesquisas biológicas. Nesse estudo, a partir de uma construção sintética scFvRVL_gen3 contendo VH e VL humanizado e a sequência genica codificadora da proteína 3 (gene 3) foi possível construir um plasmídeo baseado no pCIgRM, para a apresentação de scFv em superfície de fagos fusionado à proteína 3 do M13. Em paralelo foi possível à amplificação dos genes VL a partir de uma biblioteca de anticorpos humanos, após estabelecido um sistema de reação assim como as condições ideais para a PCR. O produto foi finalmente clonado no vetor pGEM-T mostrando diversidade de sequências. Todos os resultados serão confirmados por sequenciamento dos clones obtidos. Uma vez confirmado, os clones resultantes deste estudo mostram-se úteis para eventuais trabalhos visando a construção de anticorpos monoclonais anti-CD3 humano além da construção *in vitro* de cadeias leves humanas para a seleção de novos anticorpos anti-CD3.

6 - Referências Bibliográficas

ADAMS, J.J.; SIDHU, S.S. Synthetic antibody technologies. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 24, p. 1-9, 2014.

AHMED, M.; GOLDGUR, Y; HU, J.; GUO, H.F.; CHEUNG, N.K. In silico driven redesign of a clinically relevant antibody for the treatment of GD2 positive tumors. *Plos One*. v.8, N. 5, P. 63359, 2013.

ANDRADE, E.F.; FREITAS, S.M.; VENTURA, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; BRIGIDO, M.M. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1726, n. 3, p. 296-301, 2005.

ANDRADE, E.V.; ALBUQUERQUE, F.C.; MORAES, L.M.; BRIGIDO, M.M.; SANTOS-SILVA, M.A. Single-chain Fv with Fc fragments of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. *The Journal of Biochemistry*, v. 128, n. 6, p. 891-895, 2000.

BRIGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas combinatórias em Phagos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, n. 26, p. 44-51, 2002.

CARPENTER, P.A.; TSO, J. Y.; PRESS, O.W.; YU, X.; ANASITTI, C. Non- FCR-binding, humanized anti- CD3 antibody Hu291 induces apoptosis os human t cell more effectively than OKT3 and is immunosuppressive *in vivo*. *Transplant. Proc.* v 32, n7, p. 1545-1546, 2000.

CARTER, P.; PRESTA, L; GORDMAN, C.M. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*.v. 89, n. 10, p. 4285–4289, 1996.

CHAPMAN, K.; NICK, P.; LEE, C.; DEMPSTER, M.; ANDREWS, L; BAJRAMOVIC, J.; BALDRICK, P; BUCKLEY, L.; JACOBS, A.; HALE, G.;

GREEN, C.; RAGAN, I.; ROBINSON, V. Preclinical development of monoclonal antibodies. *mAbs*, v. 1, n. 5, p. 505–516, 2009.

CHARPENTIER, B.; HIESSE, C.; FERRAN, C.; LANTZ, O.; FRIES, D.; BACH, J.F.; CHATENOUD, L. Acute clinical syndrome associated with OKT3 administration, prevention by single injection of an anti-human TNF monoclonal antibody. *Presse Medicale*. v. 20, n. 40, p. 2009-2011, 1991.

CHATENOUD, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 2, p. 123-132, 2003.

CHATENOUD, L. Therapeutic targeting of B Cells and T cells in autoimmune diabetes: is it a solution? *Diabetes*, v. 62, n. 8, p. 2659- 2661, 2013.

CHATENOUD, L.; BAUDRIHAYE, M.F.; CHKOFF, N.; KREIS, H.; GOLDSTEIN, G.; BACH, J.F. Restriction of the human *in vivo* immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. *The Journal of Immunology*, v. 137, n. 3, p. 830-838, 1986.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J.A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Natural Reviews Immunology*, v. 7, n. 8, p. 622-632, 2007.

CHOTHIA, C; LESK, A.M.; TRAMONTANO, A. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, v. 342, p. 877–883, 1989.

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

DANTAS-BARBOSA, C.; BRIGIDO, M.M; MARANHÃO, A.Q. Antibody phage display libraries: contributions to oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 5, p. 5420-5440, 2012.

DANTAS-BARBOSA, C; BRIGIDO, M.M; MARANHÃO, A.Q. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of Osteosarcoma patients. *Genetics and Molecular Research*. v, 4, n. 2, p. 126-140, 2005.

DANTAS-BARBOSA, C; FARIA, F.P; BRIGIDO, M.M; MARANHÃO, A.Q. Isolation of Osteosarcoma-associated human antibodies from a combinatorial Fab phage display library. *Journal of Biomedicine e Biotechnology*. v. 2009, article ID 157531, p. 8, 2009.

DEAN, Y.; DEPIS, F.; VILBOIS, M.K. Combination therapies in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune disease. *Swiss Med. Wkly.*, n. 142, p. 2-11, 2012.

DÉPIS, F.; HATTERER, E.; BALLETT, R.; DAUBEUF, B.; CONS, L.; GLATT, S.; REITH, W.; KOSKO-VILBOIS, M.K; DEAN, Y. Characterization of a surrogate murine antibody to model anti- human CD3 therapies. *mAbs*, v. 5, n. 4, p. 555-564, 2013.

FERRAN, C.; DAUTRY, F.; MERITE, S.; SHEEHAN, K.; SCHREIBER, R.; GRAU, G. *et al.* Anti –tumor necrosis factor modulates anti- CD3- triggered T cell cytokine gene expression. *In vivo. J. clin. Invest.* V 93, n5, p.2189-2196, 1994.

FERREIRA, K.S; MARANHAO, A.Q; GARCIA, M.C.C.; BRIGIDO, M.M.; SANTOS, S.S.; LOPES, J.D.; ALMEIDA, S.R. Dendritic cells transfected with scFv from Mab 7.B12 mimicking original antigen gp 43 induces protection against experimental *paracoccidioidomycosis*. *Plos one*, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2011.

FONSECA, A.S.D. *Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3*. Brasília, 2000. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

GETTS, D.R.; GETTS, M.T; MCCARTHY, D.P.; CHASTAIN, E.M.L.; MILLER, S.D. Have we overestimated the benefit of human (ized) antibodies? *mAbs*, v. 2, n. 6, p. 682-694, 2010.

- GILBERT, S.F. *Developmental biology*. 8th ed. Sunderland, MA: Sinauer, 2006.
- HARRIS, L.G.; LARSEN, S.B.; MCPHERSON, A. Comparison of intact antibody structures and the implications for effector functions. *Advances in immunology*. N.72, p. 191-208, 1999.
- HEINES, C.; RENTERO, I.; Screening of large molecule diversities by phage display. *Chimia*. V 65, n 11, p. 843- 845. 2011
- HIVANG, L.; SU, X.; FEROFF, H.J. Single- Chain fragment variable passive immunotherapies for neurodegenerative diseases. *International journal of molecular science*. V. 14, n.9, p.19109 – 19127, 2013.
- HOEN, P.A.C; JIRKA, S.M.G; BROEKE, B.R; SCHULTES, E.A; AGUILERA, B.; PANG.K.H.; HEEMSKERK,H.; RUS, A.A.; OMMEN, G.J.; DUNNEN, J.T. Phage display screening without repetitious selection rounds. *Analytical Biochemistry*, v. 421, n.2, p. 622-631, 2012.
- HOLLINGER, P., HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 9, p. 1126-1136, 2005.
- HOOGENBOOM, H.R. Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nature Biotechnology*, n. 23, p. 1105-1116, 2005.
- HOOKS, M.A.; WADE, C.S.; MILLIKAN Jr., W.J. Muromonab CD3: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use in transplantation. *Pharmacotherapy*, v. 11, n. 1, p. 26-37, 1991.
- HUDSON, P.J; SOURIAU, C. Engineered antibodies. *Nature Medicine*, v. 9, n. 1, p. 129–134, 2003.
- HUSTON, J.S.; GEORGE, A.J. Engineered antibodies take center stage. *Human antibodies*, n 10, p. 127-142. 2001.
- INBAR, N.H.; BENHAR, I. Selection of antibodies from synthetic antibody libraries. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 526, n. 2, p. 87-98, 2012.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Immunobiology*. 5th ed. New York and London: Garland Publishing, 2001.

KAUFMAN, A; HEROLD, K.C. Anti- CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, v. 25, n. 4, p. 302-306, 2009.

KAUFMAN, R.J; DAVIS, M.V; WASLEY, L.C; MICHNICK, D. Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 16, p. 4485-4490, 1991.

KENANOVA, V.; OLAFSEN, T.; CROW, D. M.; SUNDARESAN, G.; SUBBARAYAN, M.; CARTER, N.M. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer rew*, v 65, n 2, p. 622-631, 2005.

KJER- NIELSEN, L.; DUNSTONE, M.A.; KOSTENKO, L.; ELY, L.K.; BEDDOE, T.; MIFSUD, N.A. *et al.* Crystal structure of the human t cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc. Natl. acad sci. USA*, v 101, n 20, p. 7675- 7680, 2004.

KUHN, C; YOU, S; VALETT, F; HALE, G; Van ENDERT, P; BACH, J-F; WALDMANN, H; CHATENOU, L. Human CD3 transgenic mice: preclinical testing of antibodies promoting immune tolerance. *Science Translation Medicine*, v. 3, n. 68, p. 1-9, 2011.

LI, B.; WANG, H.; DAI, J.; JI, J.; QIAN, W.; ZHANG, D; HOU, S.; GUO, W.; Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. *Immunology*, v. 116, n. 4, p. 487-498, 2005.

LI, F.; MENG, F.; JIN, Q.; SUN, C.; LI, W.; LI, H.; JIN, S. Fusion protein of single-chain variable domain fragments for treatment of myasthenia gravis. *Neural Regeneration Research*, v. 9, n. 8, p. 851- 856, 2014.

LITMAN, G.W, CANNON, J.P; DISHAW, L.J. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat. Rew. Immunology*, n 5, p. 866-879,2005.

MARKS, J.D.; HOOGENBOOM, H.R.; BONNERT, T.P.; MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A.D; WINTERBERG. By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of Molecular Biology*, v. 222, n. 3, p. 581-597, 1991.

MARRACK, P. KAPPLER, J. Control of T cell viability. *Annual review of immunology*, n 22, p. 765-787, 2004.

MIERSCH, S.; SIDHU, S.S. Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations. *Methods*, v. 57, n. 4, p. 486-498, 2012.

MÓTYÁN, J.A.; TÓTH, F., TOZSÉR, J. research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*. V.3, n.4, p. 923-942, 2013.

OLIVEIRA, Y.S. Evolução in vitro de anticorpos anti-CD3 pela seleção de cadeias em (VL) humanas por phage display. Brasília, 2009, 82 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

PRESTA, L.G.; LAHR, S.J.; SHIELDS, R.L.; PORTER, J.P.; GORMAN, C.M.; FENDLY, B.M.; JARDIEU, P.M. Humanization of an antibody directed against IgE. *The Journal of Immunology*, v. 151, n. 5, p. 2623–2632, 1993.

RAVN, U.; DIDELOT, G.; VENET, S.; NG, K.; GUENEAU, F.; ROUSSEAU, F.; CALLOUD, S.; KOSKO-VILBOIS, M.; FISHER, N. Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery. *Methods*, v. 60, n. 1, p. 99-110, 2013.

REITER, Y.; BRNKMANN, U; LEE. B; PASTAN, I. Engineering antibody FV fragments for cancer detection and therapy: bisulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnology*, v. 14, p. 1239-1245, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual, cold spring*. 3rd edition. New York , NY, USA: Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, R.V; LIMA, P.M.G; NITSHE, A; HARTH, F.M; MELO, F.Y; AKAMATSU, H. T; LIMA, H.C. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* – v. 29, n. 2, 2006.

SERPIERI, F; INOCENCIO, A; de OLIVEIRA, J.M.; PIMENTA, A.A, Jr.; GARBUIO, A.; KALIL, J.; BRIGIDO, M.M.; MORO, A.M. Comparison of humanized IgG and FvFc anti-CD3 monoclonal antibodies expresses in CHO cells. *Molecular Biotechnology.* v.45, n.3, p. 218-225, 2010

SILVA, H.M. Caracterização da atividade ligante e da função efetora de anticorpos humanizados anti-CD3 humano. Brasília, 2008, 166 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

SMITH, J.A.; TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. Partial TCR signals delivered by FcR-nonbinding anti-CD3 monoclonal antibodies differentially regulate individual Th subsets. *The Journal of Immunology*, v. 160, n. 10, p. 4841-4849, 1998.

STERN, M.; HERRMANN, R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 54, n. 1, p. 11–29, 2005.

SWAIN, S.L. Regulation of the generation and maintenance of t- cell memory: a direct, default pathway from effectors to memory cells. *Microbs and infection*, n 5, p. 213-219, 2003.

't Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, Vreugdenhil E, Vossen RH, de Menezes RX, Boer JM, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. *Nucleic. Acid. Res.* v 36, n 21, p. 4-11. 2008.

VASWANI, S.K.; HAMILTON, R.G. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. *Annual allergy asthma immunology*, n81, 105-119. 1988.

VAUGHAN, T.J.; WILLIAMS, A.J.; PRITCHARD, K.; OSBOURN, J.K.; POPE, A.R.; EARNSHAW, J.C.; MCCAFFERTY, J.; HODITS, R.A.; WILTON, J; JOHNSON, K.S.

Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized Phage Display Library. *Natural Biotechnology*, n. 14, p. 309-314, 1996.

ZAZA, G.; TOMEI, P.; GRANATA, S.; BOSCHIERO, L.; LUPO, A. Monoclonal antibody therapy and renal transplantation: focus on adverse effects. *Toxins*, v. 6, n. 3, p. 869-891, 2014.