



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

**Expressão e Caracterização de Fragmentos de  
Anticorpos Recombinantes Anti-CD3 Humano em  
*Pichia pastoris*.**

Victor Edgard Tavares Sousa

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Queiróz Maranhão

Brasília

2010



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular

# **Expressão e Caracterização de Fragmentos de Anticorpos Recombinantes Anti-CD3 Humano em *Pichia pastoris*.**

Victor Edgard Tavares Sousa

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Coorientadora: Profa. Dra. Andrea Queiróz Maranhão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2010

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Marcelo de Macedo Brígido (Presidente-orientador)

Profa. Andrea Queiroz Maranhão (Co-orientadora)

Profa. Fabrícia Paula de Faria (membro externo – UFG)

Prof. Tatsuya Nagata (UnB)

Profa. Lídia Pepe de Moraes (UnB)

Trabalho desenvolvido no grupo de Imunologia Molecular do Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do CNPq.

Dedico este trabalho à minha família,  
Neusa, José e Rodrigo. Certamente essa  
jornada seria mais árdua sem vocês.

“Existem verdades que só podemos dizer depois de ter conquistado o direito de dizê-las.”

*Jean Cocteau*

“Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio e eis que a verdade se me revela.”

*Albert Einstein*

# AGRADECIMENTOS

Como se não bastasse todas as bênçãos, agradeço a Ele por mais uma conquista nessa longa jornada. Afinal, ninguém me disse que iria ser fácil.

Aos meus orientadores, Marcelo e Andréa, por terem a coragem de confiar no maluco que sou, pelos conselhos científicos, pelas sugestões certeiras, e por aquelas nem tão certeiras assim. Por terem me ajudado a crescer como pessoa e como cientista, pela ajuda nos momentos em que precisei, pela seriedade nos momentos necessários e pela descontração quando oportuna. Por permitirem o pensamento livre de cada um de seus orientandos, isso realmente engrandece nossas conquistas, mas de vez em quando queremos respostas certeiras e objetivas, ok?! Pensar cansa! Mas gera uma satisfação enorme quando conseguimos. Acho que agora entendo vocês.

À minha segunda família, o Lab1! Bárbara, praticamente minha mãe quando iniciei minha vida cientista! Pelos conselhos honestos e por muitas vezes tão diretos que deixava qualquer um sem graça. Maryani, a eterna baladeira seguidora do Chiclete! Por seu jeito louco de ser, pelas reclamações (como eu gostava de colocar caixa de isopor em cima da sua bancada...), pela ajuda nessa reta final, pelo tampão 10x, pelas caronas insanas nos almoços, por ter aumentado meu vocabulário, pela amizade. Kellyyyy, pôxa vida! Brigadão viu!? Pelas análises computacionais altamente requintadas, pelo ombro amigo, por colocar um pouco de ordem naquele laboratório (se bem que agora já era), pelos conselhos, nossa quantos conselhos, eu bem que podia seguir algum deles. Tentei!!! Ok, tem uns que não tinha como não! Mas, nos outros tentei mesmo. Por ter me acolhido em sua família em Cuiabá, por ter acreditado em mim. Obrigado. Bem, temos o Yuri! Graaaande Yuri! Valeu rapaz! Pra você é só isso! Brincadeira, pelo visto a Barbarela criou juízo em ti! Valeu pelos auxílios experimentais e por tirar o sangue da Janaina (não vou comentar as suas (8) tentativas de tirar sangue do rapaz aqui), minha cara amiguinha séria e pontual!

Aos coleguinhas de ombro, literalmente: à minha direita a Fernanda e seus momentos “raros” de “tô com preguiça de fazer conta, Victor meu amigo, me ajuda...”; à minha esquerda o Rafa e suas ajudas, conselhos, baladas e pela companhia que tornou nossa jornada mais divertida, velhos e bons tempos... À galerinha que sempre estava presente (ou quase) para ajudar: Izabel e Isabela, Tay, Luana, Tatá, o Paulo e sua tranqüilidade impressionante. Os vizinhos de Lab's: Marciano e sua “sabedoria”, Thomson, Ivonildes, Fátima, Samuca, Velba, Ju, Tay, Túlio, as Vivis, Érica (e seu plano para o ELISA!).

Aos professores: Lídia, Fernando, Ildinete, Cíntia, pela ajuda e colaboração. Ao amigo de longa jornada, Ricardo. Valeu pelos socorros rapaz!

Aos meus amigos biológicos, espero que sejamos felizes com nossos caminhos, e que eles se cruzem algumas vezes!

À minha família biológica, como não poderia deixar de ser: minha querida e estimada mamãe, Neusa, pela batalha, garra e confiança (em excesso às vezes!); meu brother eterno Rodrigo e suas hilárias histórias de vida e irmandade; meu amado pai, José, pela criação correta e pelo eterno desejo de me ver melhorar, também desejo à você, meu pai! Amo todos vocês.

À Camila, que apesar de nosso namoro recente, sempre esteve presente antes, quando precisei. Espero que sejamos mais felizes ainda!

À todos aqueles que participaram desta conquista de alguma forma mas que minha mente limitada não conseguiu recordar neste momento. Meus eternos agradecimentos

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	1
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	3
1. Introdução.....	7
1.1. O Sistema Imune.....	7
1.2. Imunoglobulinas .....	8
1.3. Classificação das Imunoglobulinas .....	10
1.4. Imunoglobulina G .....	11
1.5. Fragmentos de Imunoglobulina G .....	12
1.6. Linfócitos T e Seus Receptores de Membrana .....	14
1.7. Reconhecimento Antigênico e a Transdução de Sinal .....	17
1.8. Aplicações farmacêuticas e a Biotecnologia .....	17
1.9. Anticorpos Anti-CD3.....	19
1.10. A Humanização de Anticorpos.....	22
1.11. Expressão heteróloga de anticorpos recombinantes .....	25
2. Objetivos.....	29
3. Materiais .....	30
3.1. Linhagens celulares .....	30
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	30
3.1.2. <i>Pichia pastoris</i> .....	31
3.2. Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento .....	31
3.3. Plasmídeos .....	31
3.4. Meios e Soluções.....	31
3.4.1. <i>Pichia pastoris</i> .....	32
3.5. Inibidores de proteases.....	37
3.6. Uso Comum .....	37
3.7. <i>E. coli</i> .....	36
3.8. Extração de DNA plasmidial.....	38
3.9. Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida.....	39
3.10. Coloração de gel de poliacrilamida com <i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250). 41	
3.11. Coloração de gel de poliacrilamida com Prata.....	41

3.12.	Ensaio imunológico (ELISA, <i>Western</i> , <i>Colony</i> e <i>Dot blotting</i> ) .....	42
3.13.	Marcadores de Massa molecular .....	43
3.14.	Resinas cromatográficas.....	44
3.14.1.	Soluções para cromatografias .....	45
3.15.	Concentração, diálise e quantificação de proteínas purificadas. ....	45
3.16.	Kits comerciais.....	46
3.17.	Enzimas .....	46
3.18.	Anticorpos utilizados em imunoenaios .....	47
3.19.	Membranas .....	47
3.20.	Softwares .....	47
4.	Métodos.....	49
4.1.	Preparação de DNA para transformação de <i>P. pastoris</i> .....	49
4.2.	Transformação de <i>Pichia pastoris</i> (adaptado de Wu e Letchworth, 2004) ...	49
4.3.	Análise dos transformantes de <i>P. pastoris</i> por <i>Colony blot</i> . ....	50
4.4.	Expressão das proteínas recombinantes em <i>P. pastoris</i> – fermentação em frasco * .....	51
4.5.	Preparação de DNA plasmidial em pequena escala* .....	52
4.6.	Preparação de DNA plasmidial em larga escala* .....	53
4.7.	Digestão do DNA com enzimas de restrição.....	54
4.8.	Análise de DNA em gel de agarose .....	54
4.9.	Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose .....	55
4.10.	Ligação de fragmentos de DNA.....	55
4.11.	Preparação de células competentes e transformação bacteriana por tratamento com CaCl <sub>2</sub> e choque térmico*.....	55
4.12.	Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com TCA .....	56
4.13.	Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE .....	57
4.14.	Coloração do gel de SDS-PAGE .....	57
4.15.	Análise de proteínas por <i>Western Blot</i> .....	58
4.16.	Análise de proteínas por <i>Dot Blot</i> . ....	59
4.17.	Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade	59
4.17.1.	Utilizando HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE Healthcare®) – IgG's anti- CD3	59
4.17.2.	Utilizando HisTrap™ HP 1mL (GE Healthcare®) – F(ab') <sub>2</sub> anti-CD3...	60
4.18.	Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA .....	60

4.19.	ELISA – Ensaio de quantificação dos F(ab') <sub>2</sub> recombinantes .....	61
4.20.	Quantificação das amostras purificadas de hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3.....	62
4.21.	Expressão do antígeno recombinante CD3 em <i>E. coli</i> .....	62
4.22.	Purificação do antígeno recombinante CD3 em <i>E. coli</i> .....	63
4.23.	ELISA – Ensaio de ligação direta.....	63
5.	Resultados e Discussão .....	65
5.1.	Desenvolvimento das sequências de anticorpos IgG anti-CD3.....	65
5.2.	Clonagens em vetor de expressão em levedura. ....	68
5.2.1.	Obtenção dos vetores contendo sequências da IgG anti-CD3 .....	68
	hemi-humanizadas. ....	68
5.2.2.	Obtenção do vetor contendo sequência do fragmento F(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 hemi-humanizado. ....	73
5.2.3.	Obtenção do vetor contendo sequência do fragmento F(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 completamente humanizado.....	75
5.3.	Transformação das construções em <i>P. pastoris</i> . ....	76
5.4.	Expressão dos anticorpos recombinantes em <i>P. pastoris</i> .....	78
5.5.	Purificação das IgGs anti-CD3 em coluna de Proteína A Sepharose.....	80
5.6.	Purificação dos hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC .....	83
5.7.	Quantificação das amostras de hF(ab') <sub>2</sub> purificadas. ....	85
5.8.	Análise das purificações de hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	87
5.9.	Expressão do peptídeo CD3εγ em <i>E. coli</i> .....	91
5.10.	Imunoensaios de Ligação Direta – ELISA .....	92
6.	Conclusão e Perspectivas .....	96
7.	Referências Bibliográficas .....	99

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de imunoglobulina.....	9
Figura 2. Representação esquemática de CDRs.....	10
Figura 3. Fragmentos de imunoglobulina G liberados por digestão enzimática.....	14
Figura 4. Modelo de transdução de sinal via TCR/CD3.....	16
Figura 5. Modelo de sinalização precoce da célula T com interação CD3-OKT3/TCR.....	20
Figura 6. Possíveis modos de ação do OKT3.....	21
Figura 7. Processo de humanização de anticorpos via Transplante de CDRs (CDR <i>grafting</i> ).....	24
Figura 8. Representação de alguns possíveis fragmentos de anticorpos obtidos por engenharia genética de anticorpos.....	26
Figura 9. Representação esquemática do cassete de expressão projetado.....	66
Figura 10. Análise de possíveis sítios de N-glicosilação das imunoglobulinas recombinantes.....	67
Figura 11. Modelo das imunoglobulinas hemi-humanizadas (VH humanizado e VL murino) produzidas a partir da síntese química das sequências nucleotídicas.....	68
Figura 12. Representação esquemática da obtenção dos vetores pPIgLe IgG anti-CD3 selvagem e mutante.....	70
Figura 13. Representação esquemática do vetor pPIgLe IgG CD3 contendo as sequências codificadoras da imunoglobulinas G anti-CD3.....	71
Figura 14. Perfil de restrição dos vetores pUC57 contendo a sequência codificadora da imunoglobulina anti-CD3 selvagem (S1) e mutante (S2); e do vetor pPIgLE, após tratamento com <i>Psi I</i> e <i>EcoR I</i> .....	71
Figura 15. Perfil de restrição para confirmação de clonagem dos plasmídeos pPIG Le S2 e S1.....	72
Figura 16. Abordagem experimental para obtenção dos vetores pPIgLe F(ab') <sub>2</sub> anti-CD3.....	73
Figura 17. Perfil de restrição de plasmídeos pPIgLE S1 e S2 intactos comparados àqueles digeridos com enzima de restrição <i>Apa I</i> .....	74
Figura 18. Perfil de restrição por <i>Apa I</i> para confirmação da clonagem em pPIgLe F(ab') <sub>2</sub> .....	75
Figura 19. Alinhamento das seqüências anti-CD3 da cadeia leve murina, da cadeia leve humanizada comparadas à cadeia leve humanizada por nosso grupo.....	76
Figura 20. Imunodeteccção de proteínas recombinantes secretadas por colônias produtoras e aderidas na membrana de nitrocelulose por <i>Colony Blot</i> .....	77
Figura 21. Imunoensaio qualitativo da cinética expressão das proteínas recombinantes anti-CD3 por <i>Dot blot</i> .....	78
Figura 22. Análise da cinética de indução das proteínas recombinantes IgG CD3 S1 por SDS-PAGE.....	79
Figura 23. Análise por SDS-PAGE e <i>Western blots</i> da purificação das proteínas recombinantes IgG CD3 S1 por Proteína A.....	82

Figura 24. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do fragmento hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3.....	84
Figura 25. Linha de tendência sobre os pontos da quantificação por ELISA de IgG Humana comercial em quantidades conhecidas.....	86
Figura 26. Análise por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> da purificação do fragmento hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC, em condições redutoras.....	88
Figura 27. Possíveis configurações de cadeias do fragmento hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 por reduções incompletas ou reoxidações das pontes dissulfeto.....	89
Figura 28. Análise por SDS-PAGE e <i>Western blot</i> da purificação do fragmento hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC, em condições não-redutoras.....	90
Figura 29. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do antígeno rCD3 por <i>Dot blot</i> .....	92
Figura 30. Absorbâncias médias da análise qualitativa da ligação do hF(ab') <sub>2</sub> anti-CD3 ao rCD3 por ELISA. ....	93
Figura 31. Imunoensaio de ligação direta ao rCD3 pelo fragmento bivalente hF(ab') <sub>2</sub> . ....	94
Figura 32. Imunoensaio enzimático de ligação direta ao rCD3 comparando o hF(ab') <sub>2</sub> com o OKT3 comercial.....	95

## SIGLAS E ABREVIATURAS

Amp <sup>R</sup>	Gene de resistência à ampicilina ( $\beta$ -lactamase).
AOX1, 2	Genes da álcool oxidase 1 e 2.
APS	Persulfato de Amônio.
BCA	Ácido bicinônico
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato.
Bret	Brometo de Etídeo.
BSA	Albumina bovina sérica.
CDR	Região determinante de complementaridade.
CH	Domínio constante da cadeia pesada 1,2,3.
CH1	Domínio constante da cadeia pesada 1
CH2	Domínio constante da cadeia pesada 2
CH3	Domínio constante da cadeia pesada 3
Ck	Domínio constante da cadeia leve, subtipo kappa
CL	Domínio constante da cadeia leve
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético.
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de anticorpo bivalente de ligação ao antígeno
Fab	Fragmento de anticorpo monovalente de ligação ao antígeno.
Fc	Fração cristalizável do anticorpo (domínios CH2- CH3)
Fv	Fragmento variável do anticorpo.
FvFc	Fragmento de anticorpo contendo domínio variável e fração cristalizável
hF(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de anticorpo humanizado bivalente de ligação ao antígeno
hF(ab') <sub>2</sub>	Fragmento de anticorpo humanizado bivalente de ligação ao antígeno
HIS4	Gene histidinol desidrogenase.

hVH	Domínio variável da cadeia pesada humanizada
hVL	Domínio variável da cadeia leve humanizada
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgG1	Imunoglobulina do tipo G subtipo 1
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosideo.
kB	Quilobase
kDa	Quilodalton
mAb	Anticorpo monoclonal
mRNA	RNA mensageiro
mVL	Domínio variável da cadeia leve murino
NBT	Nitro Blue Tetrazole.
°C	Graus Celcius
OKT3	Anticorpo monoclonal anti-CD3.
PB	Par de base
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rCD3	Antígeno recombinante CD3 de cadeia única
rlg	Imunoglobulina recombinante
RPM	Rotações por minuto
S1	Imunoglobulina selvagem recombinante anti-CD3
S2	Imunoglobulina mutante recombinante anti-CD3
SDS	Sódio Dodecil-Sulfato
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina
Ug	Micrograma
VH	Domínio variável pesado
VL	Domínio variável leve
YNB	Yeast Nitrogen Base.
DTT	1,4-Dithiothreitol

## RESUMO

As imunoglobulinas são moléculas complexas de interesse biofarmacêutico que têm sido geralmente produzidas em células animais. Biorreatores alternativos, tais como leveduras também foram considerados, mas sua utilização é dificultada pelo dobramento ineficiente dos anticorpos e adição de cadeias de carboidratos. O objetivo deste trabalho foi produzir um vetor de expressão otimizado para produção de anticorpos completos e seus fragmentos bivalentes F(ab')<sub>2</sub> na levedura *Pichia pastoris*. Desenvolvemos um vetor de expressão de anticorpos em cadeia única que utiliza uma seqüência reconhecida pela protease KEX para o processamento das cadeias do anticorpo. Usamos este vetor de expressão para inserir um fragmento gênico de uma cadeia variável humanizada anti-CD3, desenhada de forma a otimizar o uso de códons e seu conteúdo GC. Os plasmídeos resultantes foram introduzidos na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, linhagem GS115, e cultivado em meio BMMY. A melhor indução foi obtida com metanol 2%. O fragmento de anticorpo mantém sua capacidade de reconhecimento ao antígeno recombinante CD3 produzido em *E. coli*. Análises por SDS-PAGE e *Western Blot* indicam degradação das construções recombinantes de anticorpos completos. Para verificar atividade biológica das imunoglobulinas recombinantes, também desenvolvemos um peptídeo recombinante CD3 de cadeia única, contendo cadeias gama e epsilon do antígeno CD3. O antígeno foi expresso na forma de corpúsculo de inclusão em *Escherichia coli* BL21 pLysE. A associação do antígeno-anticorpo foi verificada por meio de ELISA. Portanto, foi descrito um vetor de expressão em *P. pastoris* eficiente para a expressão de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> com capacidade de ligação ao antígeno CD3.

## ABSTRACT

Antibody is a complex biopharmaceutical that has been usually produced in animal cell. Alternative bioreactors such as yeasts have also been considered, but its use is hampered by the inefficient antibody folding and carbohydrate addition. The aim of this work is to produce an optimized expression vector for complete antibodies and its divalent Fab antibody fragment production. We developed a single-chain F(ab')<sub>2</sub> expression vector that codes for a KEX cleavage site, used to process antibody's chains. We used this expression vector to insert a humanized anti-CD3 variable region gene fragment, optimally designed for codon usage and GC content. The resulting plasmid was introduced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* strain GS115 and it was grown in BMMY media. Improved induction was achieved using 2% methanol. The antibody fragment appears to maintain its affinity to the antigen site CD3. This suggests that it harbors correctly processed heavy and light chains. SDS-PAGE and Western Blot analyses showed a degradation of the antibody complete form when compared to its fragment F(ab')<sub>2</sub>. To check F(ab')<sub>2</sub> biological activity, we also developed a recombinant CD3 peptide, containing gamma and epsilon chain of CD3 antigen produced as a single chain molecule. The antigen was expressed as inclusion bodies in *E. coli* BL21 pLysE. The antibody-antigen association was observed by ELISA. Therefore, we had described an efficient F(ab')<sub>2</sub> expression vector for *P. pastoris*, successfully used for the production of a biologically active anti-CD3 antibody F(ab')<sub>2</sub>.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. O Sistema Imune

De acordo com definições clássicas, o Sistema Imune está organizado para prevenir a infecção e a destruição de nosso corpo por microrganismos. Entretanto, cresce atualmente a discussão sobre a função primária do sistema imunológico. De fato, sabe-se que a imunidade inicia-se pelo reconhecimento, destruição e apresentação de microrganismos nocivos por grupos de células (fagócitos, linfócitos) que, quando recrutados, desencadeiam uma resposta imune duradoura envolvendo células distintas do sistema imune e moléculas de reconhecimento que em conjunto, neutralizam qualquer contato posterior com um desses patógenos. Todavia, tal mecanismo de defesa é, na verdade, resultado de um sistema maior, regulador da homeostase, que permite ao organismo uma manutenção de sua ordem interna ao limitar possíveis danos oriundos ou não de fatores exógenos. Tal definição é corroborada quando o sistema é reativo às células alteradas geradas a partir de mitoses anormais; quando atua retirando células mortas ou reage contra enxertos. Diagnósticos de auto-imunidades e alergias, doenças comprovadamente originadas a partir da desregulação do sistema imune também apóiam essa visão (Janeway, 2001).

Os processos gerais da resposta imunológica, independente da definição das funções do sistema imunitário, mantêm-se os mesmos. Estão baseados em células especializadas tais como macrófagos e células dendríticas, que digerem os patógenos ou partículas consideradas estranhas (antígenos) ao corpo e os apresentam na forma de fragmentos peptídicos a linfócitos do tipo T. Estes reconhecem, por intermédio de seus receptores (TCR) antígeno-específicos, os antígenos peptídicos apresentados no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) tipo II na membrana das células apresentadoras de antígeno. As células T, denominadas T auxiliares (Th - do inglês *helper*), atuam indiretamente, secretando proteínas denominadas citocinas que, por sua vez, ativam outras células a destruírem aquelas portando os antígenos apresentados. As Th também interagem com linfócitos B antígeno-específicos, estimulando-os a produzir anticorpos. A variedade de células e mecanismos de resposta do Sistema Imunológico denota sua

complexidade e importância na manutenção da vida dos vertebrados. (Janeway, 2001).

As respostas imunes podem ser classificadas em inata (mecanismos de defesa gerais e inespecíficos, como a fagocitose por macrófagos) e adquirida, ou específica. Esta última é subdividida em duas categorias: a imunidade mediada por células, que leva à morte celular por meio do reconhecimento de antígenos presentes em células infectadas por patógenos, tais como células infectadas por vírus; e a imunidade mediada por anticorpos (humoral), que é efetiva contra patógenos como vírus e bactérias presentes no sangue ou linfa, bem como contra produtos solúveis produzidos ou não pelos patógenos, tais como as toxinas (Janeway, 2001).

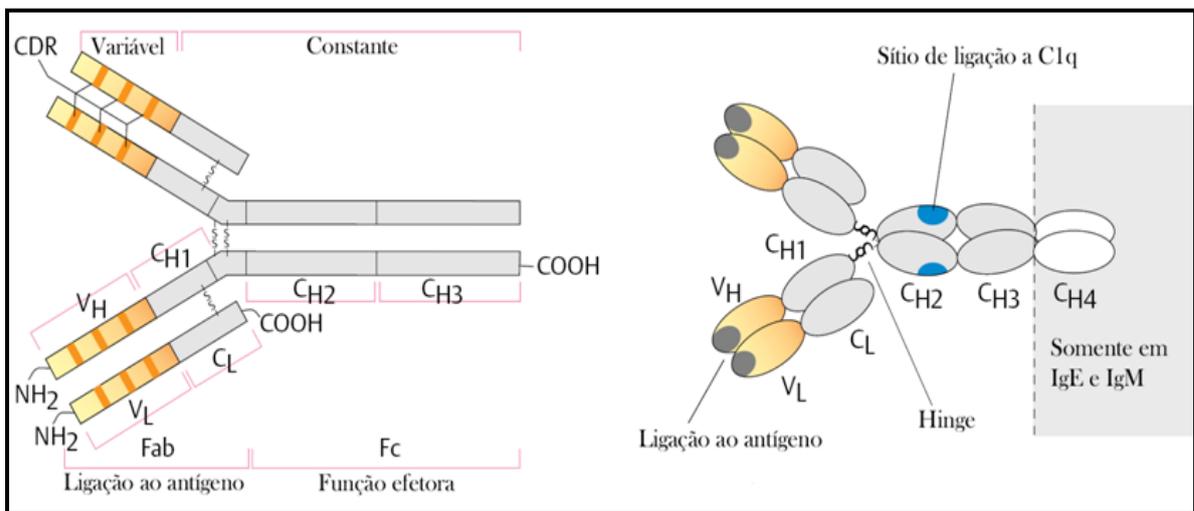
Toda resposta imune adquirida, uma vez desenvolvida, está direcionada exclusivamente contra os antígenos envolvidos, o que caracteriza sua especificidade. Após o sistema imune ter produzido anticorpos ou células T antígenos-específicos, uma nova exposição ao mesmo microrganismo estimula a rápida produção de grandes quantidades de células T ou imunoglobulinas antígeno-reativas, que interagem com este, neutralizando-o. Tal capacidade de resposta rápida e vigorosa após subsequente exposição a um antígeno é referida como memória imunológica e confere resistência contra reinfecções. Tal resposta tem, ainda, a capacidade de discriminação dos antígenos exógenos (não próprios e possivelmente danosos) daqueles do hospedeiro (próprios e inócuos), interagindo apropriadamente de acordo com a situação apresentada, fato que condiz com regulação da homeostase (Janeway, 2001).

## 1.2. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, também chamadas de anticorpos, estão dentre as moléculas mais versáteis da natureza. Essas clássicas moléculas, usualmente representadas pela letra Y (figura 1) correspondem a proteínas solúveis, produzidas por plasmócitos (células B ativadas), que interagem especificamente contra determinados antígenos presentes no sistema circulatório ou em fluidos corpóreos, neutralizando-os ou destruindo-os. Foram reportadas pela primeira vez por Emil Behring em 1894, à época denominadas de antitoxinas. Suas unidades básicas

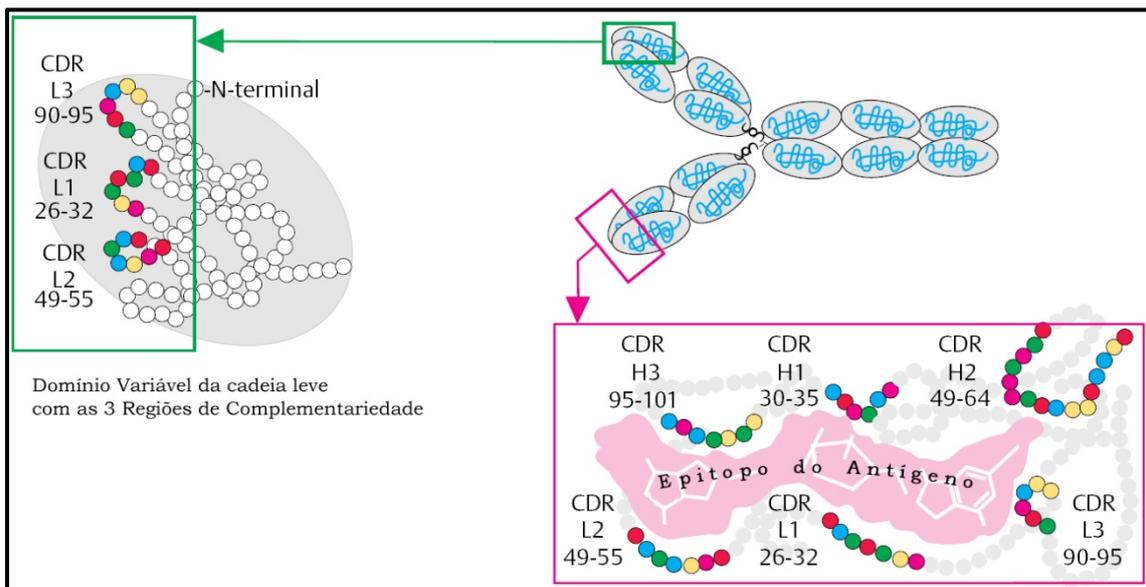
consistem em quatro cadeias polipeptídicas formando pares: duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) idênticas, ligadas entre si por pontes dissulfeto (Janeway, 2001). Ambas, H e L, encontram-se organizadas em domínios discretos, homólogos, que apresentam aproximadamente 110 aminoácidos e um dobramento exclusivo (Edelman, 1970). Cada um destes domínios possui uma estrutura conservada e característica que é estabilizada por uma ponte dissulfeto interna formando um *loop* contendo cerca de 65 aminoácidos (Amzel e Poljak, 1979).

Os domínios N-terminal das cadeias H e L compreendem as regiões variáveis (VH e VL), compostas de 107 a 118 aminoácidos (Tonegawa, 1983), nas quais são encontradas três áreas de enorme variabilidade de sequência (regiões hipervariáveis) separadas entre si por regiões de arcabouço contendo sequência aminoacídica relativamente constante (Janeway, 2001). As regiões hipervariáveis das cadeias H e L formam um sítio potencialmente ligante a antígeno sendo referidas, portanto, como Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs) (Kabat, 1982). Apesar da grande variabilidade de sequência das CDRs, a variabilidade estrutural dos *loops* das CDRs é, em geral, restringida a um número limitado de estruturas canônicas (Chothia, Lesk *et al.*, 1989).



**Figura 1. Representação esquemática de imunoglobulina.** A porção da molécula formada pelo par VH-VL é referida como Fv do anticorpo e é responsável pela ligação ao antígeno. O domínio C-terminal das cadeias pesada e leve são mais conservados em sequência sendo referidos como regiões constantes. A cadeia pesada constante (CH) de uma IgG típica (isotipo  $\gamma$ ) consiste em três domínios (CH1, CH2 e CH3) com a dobradiça (hinge) conectando os domínios CH1 e CH2. As cadeias leves possuem apenas um domínio constante (CL) pareado ao CH1. A função efetora é determinada pela região constante do Fc que determina, entre outros, o grau de ligação à proteínas do complemento (C1q) e a receptores celulares. CDR: Região Determinante de Complementariedade; Fab: Fragmento de ligação ao antígeno; Fc: fragmento cristalizável. (adaptado de Burmester e Prezzuto, 2003).

A especificidade de ligação de um anticorpo é, portanto, determinada pelos resíduos de aminoácidos nos domínios variáveis de suas cadeias pesadas e leves (Figura 2). Tal especificidade é conferida pela complementaridade química entre o antígeno e seu sítio de ligação, em termos de forma e da localização de grupos carregados, grupos apolares, pontes de hidrogênio e demais interações intermoleculares não-covalentes.



**Figura 2. Representação esquemática de CDRs.** Os domínios variáveis da cadeia leve e pesada contêm seqüências hipervariáveis de aminoácidos (círculos destacados). Tais regiões consistem de 6 a 8 resíduos de aminoácidos por volta das posições 30, 50 e 93 das cadeias leves e por volta das posições 32, 55 e 98 das cadeias pesadas. As CDRs determinam a especificidade de ligação ao antígeno. A substituição de um simples aminoácido nestas regiões pode afetar de modo crucial a especificidade a determinado antígeno. H1, H2, H3 representam as 3 CDRs da cadeia pesada. L1, L2, L3 representam as 3 CDRs da cadeia leve. (adaptado de Nelson e Cox, 2006).

### 1.3. Classificação das Imunoglobulinas

Originalmente as imunoglobulinas foram classificadas de acordo com suas reatividades a anticorpos específicos ou antisoro (Hames e Glover, 1996), as seqüências de aminoácidos apresentam variações consideráveis somente quando se alteram os isotipos das regiões constantes (C). O isotipo é classificado de acordo com a região constante da cadeia pesada (CH) e define a classe e subclasse das imunoglobulinas de mamíferos (Janeway, 2001). As oito classes e subclasses de IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM estão definidas pelo isotipo da cadeia H, sendo denotadas por suas respectivas letras gregas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ , respectivamente.

As regiões CH de mamíferos são responsáveis por mediar as funções imunológicas efetoras, tais como a fixação da via complemento via ligação ao complexo C1q (Figura 1), ligação à receptores presentes na membrana celular com decorrente ativação da resposta citotóxica (Janeway, 2001), podendo inclusive, serem produzidas ancoradas à membrana plasmática ou sob forma solúvel, distinguíveis entre si pelas sequências da região C-terminal (Alt, Bothwell *et al.*, 1980). Não há relatos, na literatura pesquisada, de diferenças funcionais para os dois isotipos conhecidos para as cadeias leve (CL): kappa (K) e lambda ( $\lambda$ ).

As regiões CH podem conter de 2 a 4 domínios dependendo da classe de imunoglobulina. Cada um desses domínios apresenta similaridade de sequência entre si e entre os domínios das CL. Alguns isotipos de CH possuem regiões de dobradiça (*hinge*) que se ligam covalentemente uma à outra unindo as cadeias pesadas por pontes dissulfeto. Aparentemente o *hinge* também facilita a estabilização da interação anticorpo-antígeno por aumentar a flexibilidade da cadeia pesada (Poljak, 1978) durante um possível processo de ajuste induzido.

#### 1.4. Imunoglobulina G

A imunoglobulina G (IgG) representa o anticorpo circulante mais comum em seres humanos, perfazendo cerca de 80% das imunoglobulinas do organismo e está igualmente distribuída nos compartimentos extracelulares sendo a única que atravessa a placenta (Mota e Silva, 2003). A IgG apresenta massa molecular de aproximadamente 150kDa, sendo composta por quatro cadeias polipeptídicas unidas aos pares por pontes dissulfeto intercadeias (Figura 2, esquerda). Em uma única molécula de IgG, duas cadeias leves idênticas, de 25kDa de massa molecular, se acoplam a duas cadeias pesadas idênticas, com massa molecular de 50kDa. Uma IgG funcional consiste em duas unidades de ligação ao antígeno, cada qual apresenta uma cadeia pesada e uma cadeia leve. Portanto, os anticorpos tipo G são bivalentes, podendo se ligar a dois epítomos idênticos.

As diferentes subclasses de IgG foram inicialmente identificadas na década de 60, sendo posteriormente classificadas as quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Atualmente, as quantificações e caracterizações sobre as funções das diversas subclasses de IgG são imprecisas, no entanto, o conhecimento sobre suas

aplicações gerais e certas limitações permitem a seleção de determinadas subclasses para usos na clínica (Tabela 1).

**Tabela 1. Propriedades biológicas e físico-químicas das subclasses de IgG.** (adaptado de Roitt, 2004)

Parâmetro	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Porcentagem relativa a IgGs totais	65-70	20-25	7-10	3-6
Massa Molecular (kDa)	146	146	170	146
Meia Vida (dias)	21	20	7	21
Cadeia Pesada	$\gamma$ 1	$\gamma$ 2	$\gamma$ 3	$\gamma$ 4
Número de Pontes Dissulfeto	2	4	15	2
Concentração média sérica(mg/mL)	9	3	1	0,5
Resposta a estímulos antígenicos crônicos	-	-	-	+++
Resposta a antígenos protéicos	++++	-	++++	-
Fixação de C1q	+++	++	++++	-

## 1.5. Fragmentos de Imunoglobulina G

Atualmente, os modelos estruturais e de funcionalidade biológica dos domínios C-terminal e N-terminal das imunoglobulinas têm alicerce em experimentos acerca da maneira como os domínios de imunoglobulinas encontram-se associados, e foram publicados na história recente da Imunologia. A partir dos estudos sobre os produtos da clivagem proteolítica de IgGs pelas enzimas Papaína e Pepsina (Porter, 1959) foi possível a observação de fragmentos Fab, Fc, ambos com aproximadamente mesma massa molecular (50kDa), e do fragmento F(ab')<sub>2</sub> com massa molecular duas vezes superior aos primeiros (Figura 3).

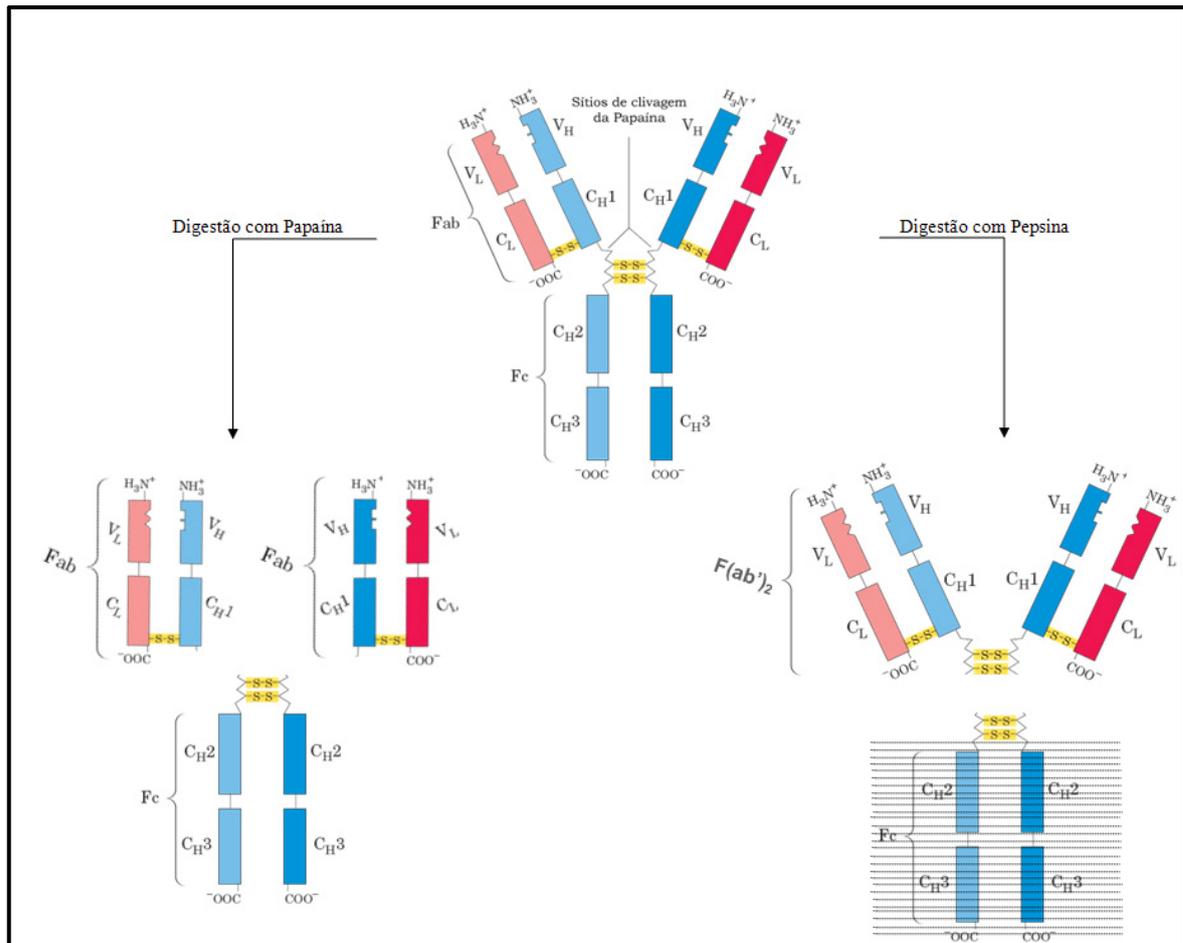
Moléculas de imunoglobulina podem, portanto, ser clivadas enzimaticamente em fragmentos discretos com a utilização dessas enzimas. Os principais fragmentos de imunoglobulina G que podem ser produzidos com essas digestões são:

**-Fab (fragmento de ligação ao antígeno):** produto da proteólise da molécula de imunoglobulina por papaína. Contém os domínios VH, CH1, VL, e CL. Dois fragmentos Fab são produzidos na clivagem de uma imunoglobulina por papaína e cada fragmento tem apenas um sítio de ligação ao antígeno, sendo classificados como monovalentes.

**-Fc (fragmento constante e cristalizável):** fragmento também gerado pela clivagem da molécula de imunoglobulina com papaína. A porção Fc contém os domínios CH2 e CH3. É a região responsável pelo recrutamento das atividades efetoras que ocorrem após ligação ao epítopo do antígeno.

**-F(ab')<sub>2</sub>:** produto da clivagem proteolítica da molécula de anticorpo pela ação da pepsina. Uma imunoglobulina irá produzir um único fragmento F(ab')<sub>2</sub> contendo dois segmentos VH e CH1 unidos por ligações dissulfeto à cadeia leve. Um F(ab')<sub>2</sub> contém dois sítios de ligação ao epítopo do antígeno, sendo classificado como bivalente.

Tendo em vista que o emprego de um anticorpo completo visa, primariamente, a ativação da resposta efetora do sistema imune pela presença do fragmento Fc da imunoglobulina quando esse está ligado ao antígeno, os fragmentos que resguardam a ligação ao antígeno são muito utilizados para diagnósticos e no tratamento de doenças, onde a função efetora do anticorpo não é requerida (Holliger e Hudson, 2005).



**Figura 3. Fragmentos de imunoglobulina G liberados por digestão enzimática.** A digestão de uma IgG com papaína causa clivagem proteolítica da molécula nativa na região de dobradiça liberando três fragmentos. Um é composto pelos domínios CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> e por ser facilmente cristalizável é reconhecido como fragmento Fc. Os outros dois, designados fragmentos Fab (ligação ao antígeno), são idênticos e consistem em uma cadeia leve completa combinada ao fragmento Fd, que abarca os domínios VH-CH<sub>1</sub>. Digestão com pepsina acarreta clivagem proteolítica de forma que os dois Fabs permanecem ligados pelas pontes dissulfeto sob a forma de fragmento F(ab')<sub>2</sub> com o fragmento Fc sendo degradado. (adaptado de Nelson e Cox, 2006).

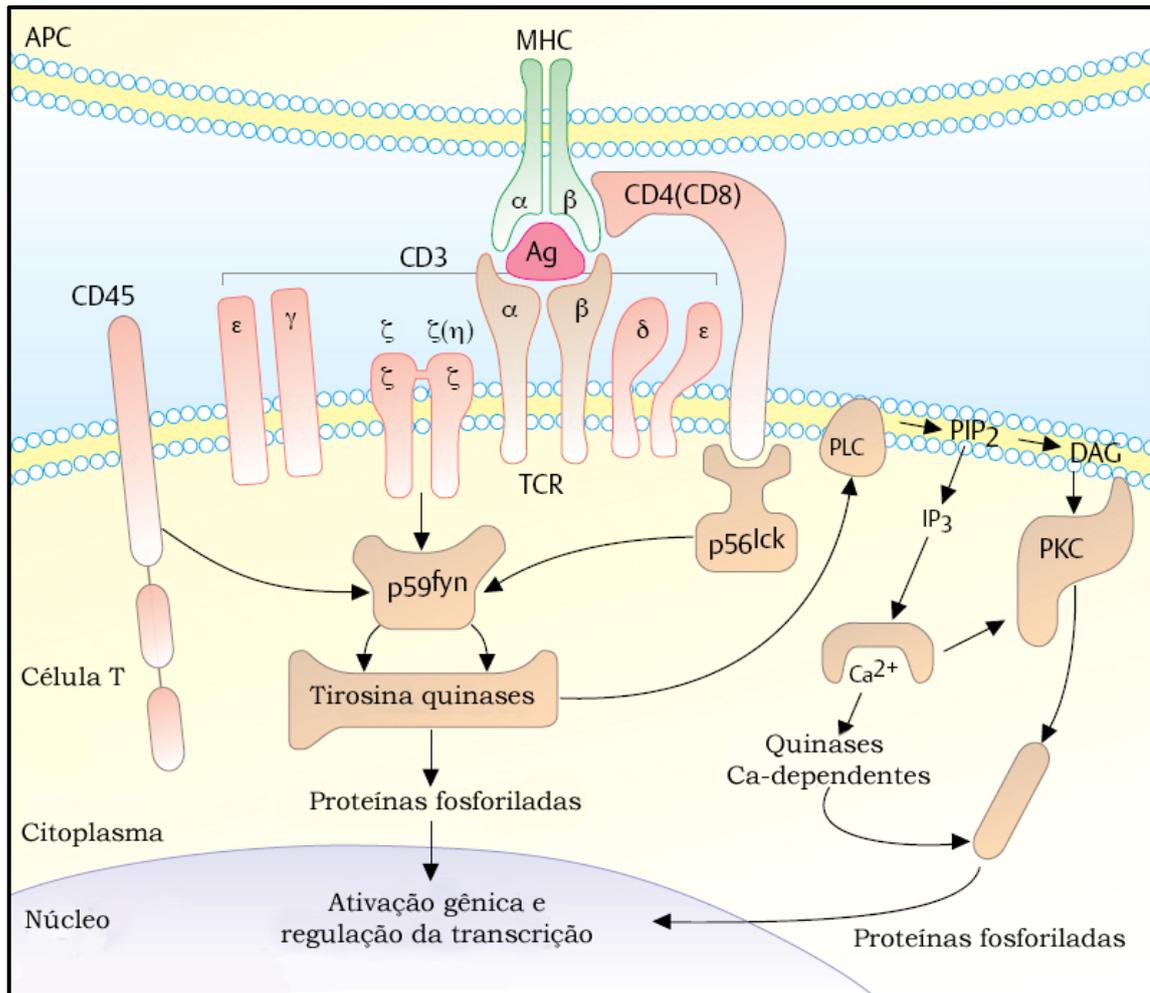
## 1.6. Linfócitos T e Seus Receptores de Membrana

Linfócitos T são células que interagem especificamente com antígenos por meio de seus receptores (TCRs) presentes na superfície celular. Esses receptores compõem um complexo protéico multimérico ancorado à membrana plasmática (Weiss, 1991) que inclui cadeias peptídicas variáveis (TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$ ) e proteínas invariáveis CD3- $\gamma$ , CD3- $\delta$ , CD3- $\epsilon$ , e cadeias  $\zeta$ . Enquanto as glicoproteínas TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  são responsáveis pela interação com o antígeno, as proteínas CD3 estão envolvidas na regulação dessa interação e, ao contrário de outros receptores celulares que apresentam segmentos especializados nos domínios intracelulares, o

TCR utiliza as proteínas CD3 para a transdução de sinal. O arranjo preciso dos componentes do complexo TCR/CD3 não é conhecido pela ausência de dados cristalográficos. Entretanto, um modelo bivalente do complexo (Exley, Terhorst *et al.*, 1991) é amplamente aceito e suportado, entre outros, por experimentos que inferem a massa molecular aparente do complexo (Exley, Wileman *et al.*, 1995).

As glicoproteínas TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  contêm uma sequência líder, um domínio extracelular N-terminal, um único domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática (Exley, Terhorst *et al.*, 1991). A maioria dos receptores heterodiméricos  $\alpha\beta$  de células T é covalentemente ligada por pontes dissulfeto, enquanto que o heterodímero  $\gamma\delta$  geralmente associa-se não-covalentemente (Kjer-Nielsen, Dunstone *et al.*, 2004). Tanto as glicoproteínas  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$  pertencem à superfamília de imunoglobulinas apresentando o seu dobramento característico e, inclusive, domínios variáveis e constantes.

Em relação às glicoproteínas CD3- $\gamma$  e CD3- $\delta$ , estas são encontradas como cópias únicas contrastando com as duas cópias da proteína CD3- $\epsilon$  não-glicosilada presentes no complexo no complexo TCR/CD3 maduro (Blumberg, Ley *et al.*, 1990).



**Figura 4. Modelo de transdução de sinal via TCR/CD3.** O TCR encontra-se ancorado à membrana da célula T. A cauda citoplasmática das cadeias polipeptídicas  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  (não mostrado) não possuem sequências sinalizadoras ou motivos ativadores ITAMs (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) para a transdução de sinais. Estes sinais são fornecidos pelas moléculas do complexo CD3 (CD3 $\delta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$  e cadeia  $\zeta$ ) que se associam não covalentemente ao TCR gerando uma cascata de reações que culminam na regulação em nível de núcleo. Ao contrário dos anticorpos, os TCRs não se associam com epitopos solúveis. Ligam-se apenas a fragmentos de moléculas maiores já processadas, capazes de interagir com os sulcos de ligação das moléculas do MHC classe I ou II (complexo peptídeo-MHC, pMHC). A ligação do TCR com pMHC é estabilizada pela interação associada de CD8 ou CD4 com os domínios constantes das moléculas de MHC classe I e II, respectivamente. APC: Célula Apresentadora de Antígeno Profissional; Ag: Antígeno. (adaptado de Burmester e Prezzuto, 2003).

Além dos TCRs, todas as células T possuem outra proteína superficial que atua como um co-receptor, as moléculas CD4 ou CD8 (Figura 4). Células T auxiliares expressam o co-receptor protéico CD4, capaz de ligar-se ao complexo pMHC classe II (exclusivo de células apresentadoras de antígenos profissionais) enquanto que células T citotóxicas expressam o co-receptor CD8, capaz de ligar-se ao complexo pMHC classe I (expresso em virtualmente todas as células de vertebrados). Tais co-receptores intensificam as interações moleculares e

potencializam a ativação dos linfócitos T. Por suas especificidades aos complexos MHC, as moléculas CD4 e CD8 são amplamente utilizadas como marcadores *in vitro* visando diferenciar linfócitos T auxiliares dos citotóxicos (Janeway, 2001).

### 1.7. Reconhecimento Antigênico e a Transdução de Sinal

O reconhecimento antigênico é mediado pelos receptores de células T (TCR) que interagem com as moléculas apresentadas no MHC (pMHC) (Davis e Bjorkman, 1988). O mecanismo pelo qual a ligação ao TCR é percebida em uma transdução de sinal não é precisamente conhecido, embora envolva uma oligomerização do TCR associado aos complexos pMHC da sinapse imunológica (Davis, Ikemizu *et al.*, 2003) e seus co-receptores, incluindo moléculas CD3. No entanto, as transduções de sinais podem ocorrer antes do acoplamento TCR-pMHC, fato que envolveria uma mudança conformacional do CD3 $\epsilon$  induzida por algum ligante (Alarcon, Gil *et al.*, 2003). As subunidades  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  associam-se formando um heterodímero CD3 $\epsilon\gamma$ , um heterodímero CD3 $\epsilon\delta$ , e um homodímero CD3 $\zeta\zeta$  (Call, Pyrdol *et al.*, 2002). Experimentos envolvendo transfecções (Berkhout, Alarcon *et al.*, 1988) e *knockouts* de genes (Wang, Wang *et al.*, 1998) revelaram que as moléculas CD3 são fundamentais para a correta expressão do TCR na membrana, no desenvolvimento de células T normais e na ativação destes linfócitos.

### 1.8. Aplicações farmacêuticas e a Biotecnologia

A variedade de métodos terapêuticos existentes para tratamento de inúmeras enfermidades com a utilização de anticorpos dá-se pela versatilidade natural dessas moléculas. Inúmeras técnicas relativas ao emprego de anticorpos na clínica são publicadas anualmente visando o combate a uma série de doenças sobre as quais, há algum tempo atrás, não havia esperança de cura.

A administração de imunoglobulinas exógenas foi, historicamente, o modo de terapia mais eficaz para pessoas com deficiências generalizadas de anticorpos (hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia). Os produtos eram, normalmente, imunoglobulinas tipo G administradas por via intravenosa ou por infusão de plasma

(Stiehm, Vaerman *et al.*, 1966). Visto que são derivadas de soros imunes humanos, tais anticorpos podem reagir contra uma ampla variedade de antígenos sem causar grandes prejuízos ao paciente. O benefício fornecido pelo tratamento dura aproximadamente um mês uma vez que a meia-vida sérica de IgG é cerca de 21 dias (Tabela 1) o que pode ser repetido em intervalos mensais a fim de manter os níveis de anticorpos. Visto que imunoglobulinas também atuam como agentes imunomoduladores, podem regular a ativação do complemento, alterar a produção de anticorpos, e suprimir vários mediadores inflamatórios podendo ser benéficas em situações nas quais imunodeficiência não é o problema subjacente, como no tratamento da Púrpura Trombocitopênica Idiopática (Stasi, Pagano *et al.*, 2001).

A pesquisa com anticorpos e a revelação do seu título ou teor apresentam grande importância quando nos referimos à saúde pública mundial ou até mesmo em termos econômicos e tecnológicos, visto que inúmeras doenças são diagnosticadas por meio desses recursos. Para o controle do tratamento e inquéritos epidemiológicos, estas são comumente utilizadas. Assim, reações de Wassermann (sífilis), Widal (febres tifóide e paratífóide), Sabin-Feldman (toxoplasmose), Paul-Bunnell-Davidson (mononucleose infecciosa), Montenegro (leishmaniose tegumentar), Mantoux (tuberculose), Mitsuda (hanseníase), Fava Neto (blastomicose sul-americana), Weinberg (cisticercose), Craig (amebíase), Muniz Freitas (doença de Chagas), esquistossomina (esquistossomose) são exemplos de provas sorológicas ou cutâneas largamente empregadas.

Recentemente, a biotecnologia alcançou um patamar tal que tornou possível a engenharia de anticorpos. Este novo ramo abrange, dentre outras atribuições, a capacidade de construir um anticorpo recombinante (rAb), que pode estar presente em soros e antídotos sem o emprego das tradicionais técnicas de obtenção de soro i.e. soro antiofídico purificado a partir do plasma sanguíneo de eqüinos.

A estratégia quanto ao uso dos rAb como método terapêutico pode variar segundo dois objetivos gerais: o primeiro ocasiona a morte de células ou organismos e é usado quando se deseja combater a proliferação de células, cancerígenas ou bacterianas; o segundo promove a neutralização de moléculas solúveis e é majoritariamente empregado na inativação de toxinas liberadas numa infecção bacteriana ou citocinas produzidas constantemente em casos de doenças crônicas. Uma terceira função, mais pontual e recente, visa promover uma cascata de transdução de sinal intracelular diferenciada a partir da ligação do anticorpo ao seu

receptor específico, esta última sendo importante no tratamento de doenças auto-imunes ou rejeição à transplantes (Mackenzie, Kamili *et al.*, 2010).

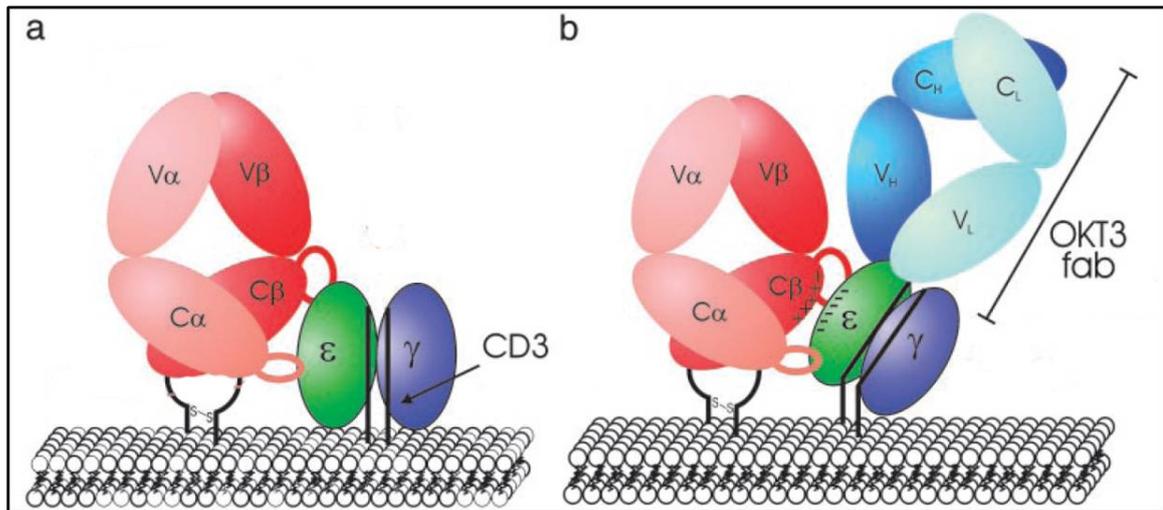
A escolha da classe e subclasse do anticorpo monoclonal recombinante (mAb) é um ponto chave no desenvolvimento de um anticorpo terapêutico eficiente, o que determinará as respostas biológicas geradas *in vivo*. Contudo, ainda não é possível prever com precisão a atividade *in vivo* da proteína recombinante. Parâmetros como a subclasse da IgG (Tabela 1), as glicofomas possíveis geradas por glicosilações incompletas em um possível sítio de glicosilação presente no fragmento Fc e os diversos polimorfismos dos receptores ao Fc celulares podem alterar a funcionalidade esperada para a imunoglobulina.

### 1.9. Anticorpos Anti-CD3

Atualmente, anticorpos anti-CD3 são representantes dessa nova categoria de agentes imunoterapêuticos, podendo promover o tratamento de auto-imunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (Chatenoud, 2003). Têm como alvo a molécula do antígeno de superfície CD3, parte constituinte do complexo receptor de célula T (TCR), de fundamental importância para a resposta imune adaptativa, responsável pelo reconhecimento de peptídeos. Embora o modo de ação de anticorpos anti-CD3 envolva mecanismos múltiplos, suas atividades dependem da interação específica com a molécula CD3 $\epsilon$  (Chatenoud, 2003). Dados cristalográficos indicam que o um anticorpo anti-CD3, o OKT3, interage exclusivamente com um epítipo conformacional da subunidade CD3 $\epsilon$  (Figura 5). A interface CD3/OKT3 é rica em resíduos aromáticos, característica típica de interações antígeno-anticorpo. (Kjer-Nielsen, Dunstone *et al.*, 2004)

Apesar dos mecanismos pelos quais a interação de anticorpos anti-CD3 ligado ao co-receptor CD3 e o TCR (Figura 5) não serem plenamente conhecidos, acredita-se que ao se ligarem à molécula CD3, os anti-CD3 promovem uma transdução de sinal diferenciada daquela observada quando há o correto engajamento do complexo TCR (Figura 4) resultando em alguns outros mecanismos distintos e não exclusivos (Figura 6), como a não-proliferação, ou inativação, de células T (Smith, Tang *et al.*, 1998). Tal inativação impede o reconhecimento de antígenos por estas células (Vigeral, Chkoff *et al.*, 1986) e induz o surgimento de

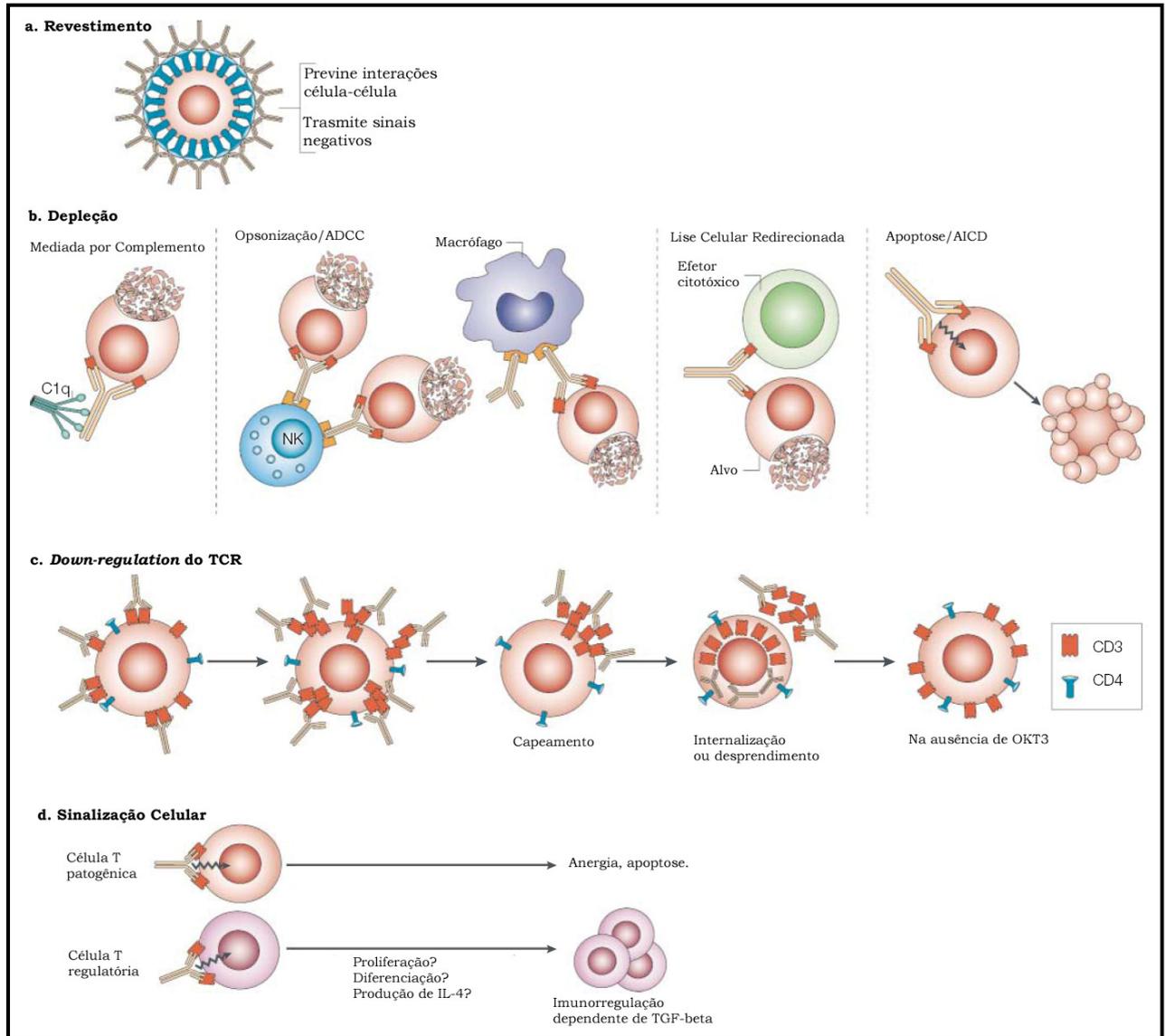
células T regulatórias que suprimem respostas imunes (Belghith, Bluestone *et al.*, 2003; Bisikirska, Colgan *et al.*, 2005). Com isso, antígenos não são apresentados e neutralizados, proporcionando uma imunossupressão específica generalizada como aquela observada em pacientes que sofreram transplante renal e foram tratados com anticorpos anti-CD3 (Vigeral, Chkoff *et al.*, 1986).



**Figura 5. Modelo de sinalização precoce da célula T com interação CD3-OKT3/TCR.** O emparelhamento usual das moléculas de CD3 ao TCR (a) induz uma mudança conformacional nos domínios transmembrana do TCR que, quando ligado ao pMHC, promove a transdução de sinal. Nesse mecanismo de sinalização dinâmica, a ligação do anticorpo OKT3 ao CD3 (b) promove um deslocamento anormalmente oblíquo deste co-receptor que, em conjunto com as propriedades eletrostáticas do CD3 e TCR, promovem uma mudança conformacional que culmina na sinalização precoce e diferenciada, anterior à interação TCR/pMHC. (Kjer-Nielsen, Dunstone *et al.*, 2004).

O anticorpo monoclonal murino OKT3 anti-CD3 humano, muromonab (-CD3, Ortho Biotech), foi o primeiro a ser utilizado na prática clínica (Cosimi, Burton *et al.*, 1981) sendo aprovado pelo FDA para uso em humanos desde 1986 (Li, Wang *et al.*, 2005). Tal mAb é utilizado no tratamento de episódios de rejeição aguda a transplantes (Groupomts, 1985). Anticorpos derivados deste mAb também são utilizados no tratamento de diabetes tipo 1 (Chatenoud, 2003) e psoríase (Utset, Auger *et al.*, 2002). Sua atividade supressora é atribuída principalmente à depleção de células T devido à sua ligação às moléculas de CD3 participantes do complexo TCR/CD3 presentes nas membranas de tais células. No entanto, tem se mostrado que os efeitos do anti-CD3 monoclonal podem ser mais diversificados, o que aumenta a complexidade dos mecanismos pelos quais se atinge a imunorregulação inclusive no desenvolvimento de um subconjunto de células T CD4 regulatórias (Chatenoud, 2003). Quando administrado em tratamentos de curto prazo, gera um

perfil imunorregulatório antígeno-anticorpo específico, não baseado em imunossupressão crônica, fator importante em tratamentos de transplantes (Nicolls, Aversa *et al.*, 1993) e em doenças auto-imunes (You, Leforban *et al.*, 2007).



**Figura 6. Possíveis modos de ação do OKT3.** Revestimento celular (a); depleção celular (b); *down-regulation* dos receptores de células T, TCR (c); e sinalização celular (d). Tais mecanismos dependem da especificidade e isotipo do imunoterápico. O *down-regulation* e a sinalização celular parecem ser os principais mecanismos guiados por anticorpos anti-CD3, embora a depleção de células T também seja observada em menor escala. O revestimento celular também provocaria uma sinalização negativa. Este último é observado raramente com anticorpos anti-CD3 específicos. ADCC, citotoxicidade celular de anticorpo AICD, morte celular induzida por ativação; NK, células *natural killer*; TGF- $\beta$ , fator de crescimento transformante  $\beta$ . (Chatenoud, 2003).

Em modelos murinos, anticorpos anti-CD3 específicos são usados na prevenção da rejeição de transplante do coração (Plain, Chen *et al.*, 1999), da GVHD aguda (do inglês, *Graft Versus Host Disease*) (Blazar, Jenkins *et al.*, 1997),

da encefalomielite auto-imune experimental (EAE, do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) (Kohm, Williams *et al.*, 2005), na artrite induzida por colágeno e em doenças inflamatórias intestinais (Hughes, Wolos *et al.*, 1994).

Por apresentar toxicidade decorrente de sua natureza murina, o OKT3 é capaz de gerar uma resposta imunogênica quando em tratamento prolongados, denominada resposta anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês, *Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta acarreta a produção de imunoglobulinas, principalmente IgM e IgG, contra os anticorpos murinos promovendo uma rápida remoção e neutralização de sua atividade e, assim, reduz sua eficácia e pode levar o paciente ao óbito devido a liberação desregulada de citocinas (Li, Wang *et al.*, 2005). Com isso, podemos afirmar que uma das principais limitações impostas ao uso de alguns anticorpos murinos, inclusive o anti-CD3, aprovados atualmente para uso clínico está relacionada à imunogenicidade em resposta à origem murina da molécula. Esta é reconhecida como de origem estranha pelo organismo do paciente, que prontamente responde ao produzir anticorpos neutralizantes contra o imunoterápico, diminuindo seu efeito.

#### 1.10. A Humanização de Anticorpos

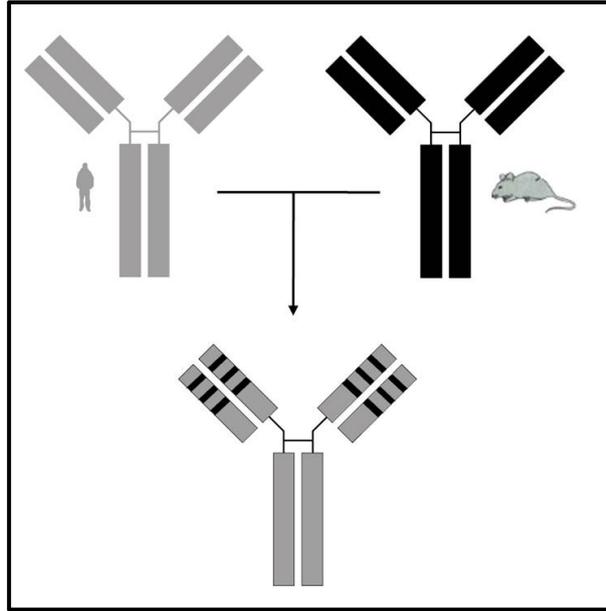
A Humanização de Anticorpos envolve métodos que buscam produzir uma molécula de anticorpo que mantenha a especificidade e afinidade do anticorpo parental não-humano e que possua o mínimo de imunogenicidade quando usada na clínica. Tal metodologia teve início com a técnica de Quimerização (Morrison, Johnson *et al.*, 1984), um método que consiste na combinação, por meio de engenharia genética, dos domínios variáveis (VL e VH) murinos, responsáveis pela especificidade, com os domínios constantes humanos (CL e CH) para gerar moléculas com sequência humana próxima a 70%. Anticorpos quiméricos tiveram sucesso quanto à manutenção de suas especificidades e redução de imunogenicidade, embora ainda acarrete uma Resposta Imunogênica Humana Contra Anticorpos Quiméricos (HACA) (Hwang e Foote, 2005). Posteriormente, a técnica de Transplantes de CDR (*CDR grafting*) (Jones, Dear *et al.*, 1986) foi desenvolvida baseada na troca de CDRs dos domínios variáveis (VH e VL) de anticorpos humanos por aquelas murinas. A especificidade é mantida e a

imunogenicidade diminuída porque apenas uma pequena fração, a responsável pela ligação ao epítipo, da proteína permanecer como de origem murina (Figura 7).

Visando incrementar a especificidade, há métodos guiados por modelos computacionais que comparam, por homologia, regiões de anticorpos murinos àquelas de humanos. Ressaltando-se que vários aminoácidos localizados fora dos CDRs interagem com estes ou com o próprio antígeno e podem ser adicionados ao anticorpo humanizado para melhorar a ligação por meio dessa técnica.

Os métodos de humanização podem englobar inúmeras estratégias, tais como *Resurfacing* (Padlan, 1991), Superhumanização (Tan, Mitchell *et al.*, 2002) e Otimização de Conteúdo Humano (Lazar, Desjarlais *et al.*, 2007). Assim como os transplantes de CDR, tais métodos dependem de análise da estrutura do anticorpo e comparação de seqüência de anticorpos humanos e não-humanos, a fim de avaliar o impacto potencial do processo de humanização da molécula final. Todos estes métodos têm em comum a produção de algumas variantes humanizadas que podem ser testadas quanto à capacidade de ligação, afinidade, imunogenicidade e demais propriedades físicas, químicas e biológicas.

De modo a contornar as dificuldades envolvidas com o uso de anticorpos heterólogos em aplicações clínicas (Jones, Dear *et al.*, 1986), o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, por meio de pesquisas inseridas no projeto Humanização de um Anticorpo Anti-CD3, o OKT3, desenvolveu técnicas que tornam os anticorpos anti-CD3 mais similares àqueles humanos (Caldas, Coelho *et al.*, 2003) e com perfis de imunorregulação comparáveis ao murino (Silva, Vieira *et al.*, 2009).



**Figura 7. Processo de humanização de anticorpos via Transplante de CDRs (CDR *grafting*).** As seqüências codificadoras, inclusive das CDRs, de anticorpo monoclonal murino (em preto) são obtidas a partir do cDNA da proteína expressa em clones produtores desse anticorpo monoclonal. Essas seqüências são comparadas com seqüências germinais a partir de um banco de genes germinais de anticorpos humanos (em cinza) utilizando-se do programa FASTA propondo-se a imunoglobulina humanizada contendo os CDRs murinos (seta). Posteriormente aos testes em modelos tridimensionais, obtém-se o cDNA da seqüência aminoacídica que será sintetizado a partir de oligonucleotídeos sintéticos e PCR. O novo gene para o anticorpo humanizado é clonado em vetor de expressão apropriado e expresso.

No caso particular do anti-CD3, o grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília concluiu a humanização dos domínios VH e VL pela técnica de transplante de CDR murinas para um arcabouço dos domínios variáveis com seqüência humana de maior similaridade ao arcabouço murino (Fonseca, 2000). O *CDR grafting* foi empregado para se produzir, portanto, por manipulação gênica, um anticorpo anti-CD3 com arcabouço humano (baseado em seqüências germinais acessadas em bancos de dados) e apenas as regiões CDR, responsáveis pela ligação ao antígeno, mantidas de sua origem murina (Figura 7) (Silva, 2008; Maranhão e Brigido, 2001). A partir de ensaios de ligação direta por meio de citometria de fluxo comparando-se versões humanizadas (VH e VL humanizados), hemi-humanizadas (VH murino e VL humanizado ou, VH humanizado e VL murino) com aquela totalmente murina (VH e VL murinos), foi demonstrado que a construção hemi-humanizada com VH murino e VL humanizado perdeu sua capacidade de ligação ao antígeno, sugerindo que a humanização do VL não foi bem sucedida (Costa, 2004). Diante dessa dificuldade, foi proposta uma nova humanização da cadeia leve, onde uma sequencia germinal mais similar àquela da cadeia leve do

OKT3 foi selecionada para doação do arcabouço onde seriam inseridos os CDRs murinos. Posteriormente, a construção de um fragmento FvFc contendo a nova VL humanizada foi realizada (Silva, 2008) a fim de avaliar se a interação gerada pela presença da cadeia leve humanizada restabeleceria a afinidade da molécula. Resultados recentes por ensaio de competição demonstram que os anticorpos humanizados bloqueiam parcialmente a ligação do OKT3, sugerindo uma perda de afinidade ao antígeno CD3 que é acompanhada, aparentemente por um ganho em atividade imunorregulatória, quando comparada ao anticorpo original, em ensaio *in vitro* com PBMC humanas. (Silva *et al.*, 2009)

Apesar do sucesso do grupo na produção de fragmentos de anticorpos como a molécula FvFc e Fab (Figura 8), carece-se ainda de um sistema eficiente para a produção heteróloga de imunoglobulina completa e de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>.

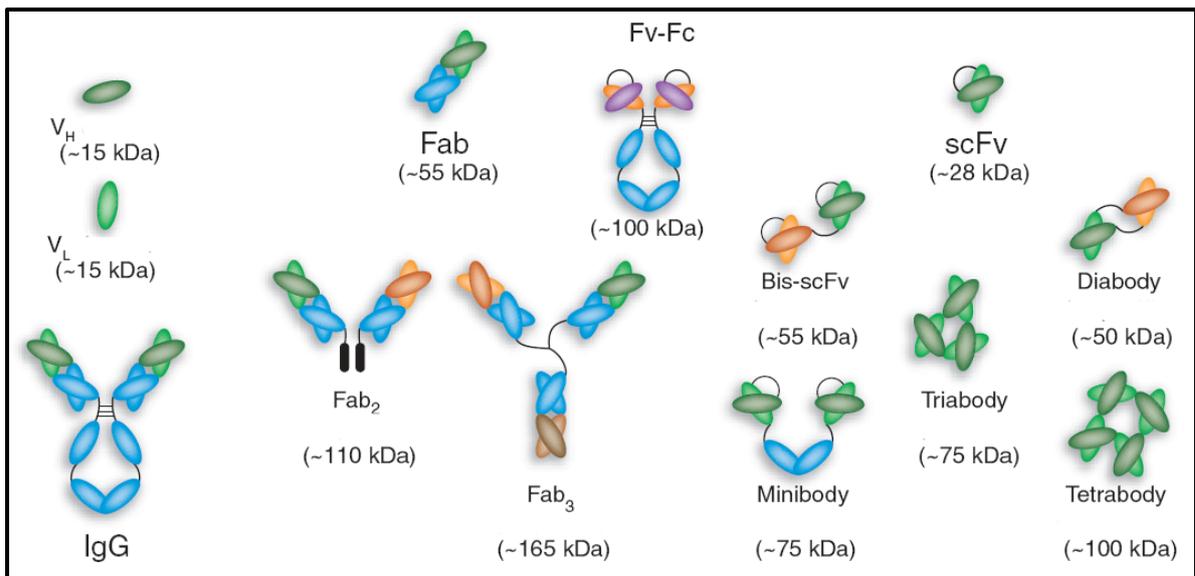
### 1.11. Expressão heteróloga de anticorpos recombinantes

A afinidade de ligação e a especificidade de anticorpos permitem um aumento de seus valores analíticos. Dois tipos de preparações de anticorpos estão em uso atualmente: policlonais e monoclonais. Anticorpos policlonais são aqueles produzidos por diferentes linfócitos B (plasmócitos) que responderam a um determinado antígeno. Células na população de linfócitos B produzem anticorpos que se ligam especificamente a epitopos distintos do antígeno. Assim, as preparações policlonais contêm uma mistura de anticorpos que reconhecem diferentes porções do antígeno. Os anticorpos monoclonais, em contrapartida, são sintetizados por uma população de células idênticas B, de origem clonal. Estes anticorpos têm paratopos homogêneos, todos reconhecendo o mesmo epítipo.

Anticorpos monoclonais recombinantes (mAbs) foram produzidos pela primeira vez em cultura de células (Kohler e Milstein, 1975) a partir da imortalização de clones de linfócitos B. Entretanto, mais recentemente a ênfase deslocou-se em direção aos fragmentos de anticorpos produzidos por microorganismos, principalmente em *Escherichia coli* e leveduras. Atualmente, a expressão de anticorpos em *E. coli* é uma alternativa favorável em virtude de fatores como genômica bem conhecida, sistemas de transformação eficientes, disponibilidade de bons vetores, rápido crescimento celular, meios de culturas baratos, capacidade em

expandir a produção para grande escala. Uma desvantagem recorrente diz respeito à sua incapacidade de glicosilar moléculas produzidas o que poderia comprometer as funções efetoras da imunoglobulina recombinante. Tal fato torna-se relevante nos casos para uso *in vivo*.

Tentativas de produzir uma molécula de anticorpo completa armazenada no citoplasma de *E. coli* exigem etapas adicionais de solubilização e renaturação visto que os polipeptídeos resultantes não raramente se encontram na forma insolúvel de corpos de inclusão (Hakim e Benhar, 2009). Uma das primeiras demonstrações bem sucedidas de produção de um heterodímero heterólogo em *E. coli* ocorreu com um fragmento Fab (Better, Chang *et al.*, 1988). A partir de então houve o desenvolvimento de outros fragmentos de anticorpos trabalhados por engenharia genética (Figura 8). A construção de moléculas de fragmentos variáveis de anticorpos de cadeia única (scFv), que conservam a especificidade do anticorpo original (Bird e Walker, 1991), assim como fragmentos FvFc (Andrade, Albuquerque *et al.*, 2000), ou o fragmento Fab (Burtet, Santos-Silva *et al.*, 2007) são alternativas que facilitam a manipulação gênica da proteína recombinante até que se consiga aperfeiçoar ao máximo sua capacidade de ligação ao antígeno. Com isso, economizam-se tempo e recursos até a implementação de uma construção recombinante de uma imunoglobulina completa.



**Figura 8. Representação de alguns possíveis fragmentos de anticorpos obtidos por engenharia genética de anticorpos.** Fragmentos trivalentes (Triabody) e tetravalentes (Tetrabody) são construídos de maneira similar aos fragmentos bivalentes (Fab<sub>2</sub>, Fab, Bis-scFv, Diabody, Minibody). Todos são alcançados pela fusão de três, quatro ou dois sítios ligantes formados pelos domínios VH-VL (cores verde, laranja, marrom ou roxo). Modelos azuis representam domínios constantes. (Holliger e Hudson, 2005).

Os percentuais de moléculas funcionais e corretamente dobradas tomaram maior proporção em sistemas de expressão em leveduras quando comparadas aos sistemas procariontes. Algumas características corroboram com tal observação, dentre elas a utilização de promotores considerados fortes e com elevada capacidade de ativação da transcrição do gene *downstream*, o que acarreta altos níveis de produção apresentados.

A utilização de um micro-organismo eucarioto, como a *Pichia pastoris*, apresenta as vantagens dos sistemas de expressão eucarióticos superiores tais como o processamento e dobramento de proteínas, modificações pós-traducionais, sendo tão simples de manipular como *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*. É mais rápido e menos dispendioso para uso do que outros sistemas de expressão eucarióticos, tais como cultura de tecidos de mamíferos, e geralmente apresenta maiores níveis de expressão. Como uma levedura, partilha as vantagens da manipulação molecular e genética com *Saccharomyces cerevisiae*, e apresenta vantagens relativas aos níveis de expressão maiores que aqueles de células de mamíferos. Estas características tornam *P. pastoris* muito útil como um sistema de expressão de proteínas.

Em relação a outras leveduras utilizadas para a expressão de genes, como *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* tem a vantagem de não realizar a hiperglicosilação da proteína secretada, fato que tornaria a proteína mais imunogênica em humanos e/ou interferir no enovelamento da mesma, diminuindo sua função biológica (Cregg, 1999). Tanto *S. cerevisiae* quanto *P. pastoris* apresentam padrões de glicosilação com a adição de carboidratos do tipo manose N-ligada. Porém, em *S. cerevisiae*, as proteínas costumam apresentar cadeias polissacarídeas de mais de 50 resíduos de manose, caracterizando assim a condição de hiperglicosilação. Em *P. pastoris*, a N-glicosilação se inicia no retículo endoplasmático (ER) com a transferência de uma unidade de oligossacarídeo ligado à lipídio para o aminoácido asparagina presente na seqüência de reconhecimento Asn-X-Ser/Thr.. Há evidências que este tipo de ligação seja responsável pela hiperimunogenicidade apresentada por algumas proteínas expressas em *S. cerevisiae* (Cregg, Vedvick *et al.*, 1993) visto que a levedura não é capaz de realizar glicosilações terminais do tipo  $\alpha$ 1,3 (Cereghino e Cregg, 2000).

A expressão heteróloga em *P. pastoris* pode ser feita de forma intracelular ou via secreção. A vantagem da segunda é que *P. pastoris* secreta poucas proteínas nativas, facilitando, portanto a posterior purificação (Daly e Hearn, 2005).

## 2. OBJETIVOS

---

### Objetivo geral:

Produção de uma IgG recombinante anti-CD3 e seus fragmentos F(ab')<sub>2</sub> hemi-humanizados (hVH e mVL) e totalmente humanizados (hVH e hVL) com expressão em *P. pastoris*, purificação, caracterização conformacional e da atividade ligante.

### Objetivos específicos:

(1) Clonar as versões das rIgG's, selvagem e mutante, em vetor de expressão em *P. pastoris*.

(2) A expressão e caracterização da atividade ligante e efetora da imunoglobulina recombinante anti-CD3 hemi-humanizada.

(3) Análise e comparação dos níveis de glicosilação da imunoglobulina recombinante anti-CD3 pela mutagênese de um possível sítio para N-glicosilação presente na porção Fc da molécula.

(4) Clonagem em vetor expressão em levedura, expressão e a caracterização da atividade ligante e efetora do fragmento F(ab)<sub>2</sub> hemi-humanizado da imunoglobulina recombinante anti-CD3.

(5) Humanização completa do fragmento F(ab')<sub>2</sub> pela troca do domínio VI murino por um humanizado

(6) Clonagem em vetor expressão em levedura, expressão e a caracterização da atividade ligante e efetora do fragmento F(ab)<sub>2</sub> completamente humanizado da imunoglobulina recombinante anti-CD3.

### 3. MATERIAIS

---

#### 1.12. Linhagens celulares

##### 1.12.1. *Escherichia coli*

XL10-Gold® ultracompetent cells (Stratagene): Tetr  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ . Cat# 200314

DH 5 $\alpha$  (Invitrogen®) – F /*endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal<sup>r</sup>) relA1 D(lacZYA-argF)U169 deoR (F80dlacD(lacZ)M15)*.

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

MultiShot™ StripWell TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen): F- *mcrA  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 galU galK \Delta(ara-leu)7697 rpsL$  (StrR) endA1 nupG* Cat# C4096-01

*Nota: Essas linhagens foram utilizadas nos procedimentos de construção dos fragmentos de anticorpos anti-CD3.*

BL21 (DE3) pLysE (Stratagene®) → F- *ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm\lambda* (DE3)pLysE.

*Nota: Essa linhagem foi utilizada nos procedimentos de expressão do antígeno rCD3.*

### 1.12.2. *Pichia pastoris*

GS115: *his4*. Fenótipo: His<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup> (Creeg *et al.*, 2000)

Esta linhagem de *P. pastoris* foi utilizada para a integração, no locus *HIS4* genômico, do plasmídio com os genes de interesse, para a expressão dos fragmentos de anticorpos anti- CD3 recombinantes sob controle do promotor *AOX1*.

### 1.13. Oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento

Iniciador	Sequência	Alvo
7817R	5' CTG GGA GTT ACC CGA TTG GA 3'	pPlg Le VL Reverso
7806F	5' GTA ACT CCC AGG AGA GTG TC 3'	pPlg Le VL <i>Forward</i>

### 1.14. Plasmídeos

pPlgLe Fab (Burtet, 2006) – Derivado do plg 16.

pPlgLe Fab Xba- (Simi, 2009)

pGS-21a (SD0121) – Genscript

### 1.15. Meios e Soluções

*Nota: Todas as esterilizações por calor ocorreram à 121°C por 20 minutos em autoclave de calor úmido. Esterilizações por filtração foram realizadas com o uso de membranas com poros de 0,22µm.*

### 1.15.1. Meios e Soluções para o uso da levedura *Pichia pastoris*

#### 10X YNB (13,4% Yeast Nitrogen Base com sulfato de amônio, sem aminoácidos)

Dissolver 134 g de YNB (Yeast Nitrogen base) com sulfato de amônio e sem aminoácidos em 1L de água destilada. Dissolver o YNB em água destilada. Como alternativa, dissolver 34 g de YNB sem sulfato de amônio e sem aminoácidos e 100g de sulfato de amônio em 1L de água destilada.

Esterilização: Filtragem.

Conservação: 4 °C ao abrigo da luz.

#### 500X B (0,02% Biotina)

Dissolver 20 mg de biotina em 100 mL de água.

Esterilização: Filtragem.

Conservação: 4 °C ao abrigo da luz.

#### 10X D (20% dextrose)

Dissolver 200 g de D-glucose em 1000 mL de água destilada.

Esterilização: Filtragem ou autoclave

Conservação: 25°C.

#### 10X M (5% de metanol)

Misturar 5 mL de metanol com 95 mL de água destilada.

Esterilização: Filtragem

Conservação: 4 °C.

#### Tampão Fosfato de Potássio 1M, pH 6,0

Misturar 132 mL de 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 868 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> M 1 e confirmar que o pH = 6,0 ± 0,1 (se o pH precisar ser ajustado, usar ácido fosfórico ou KOH).

Esterilização: Autoclave

Conservação: 25°C.

10x YP

10% de extrato de levedura

20% peptona

Esterilização: Autoclave

Conservação: 25°C.

Ágar 2%

Ágar 5g

H<sub>2</sub>Od qsp 250mL

Esterilização: Autoclave.

Conservação: 25°C

Glicerol 50%

Glicerol 50mL

H<sub>2</sub>Od estéril qsp 100mL

Esterilização: Autoclave

YPD

YP 10% (v/v)

Glicose 2% (v/v)

H<sub>2</sub>Od estéril qsp Volume desejado

Conservação: 25°C.

BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*)

YP 10%

YNB 1,34% (p/v)

Tampão Fosfato pH 6,0 100mM

Biotina 4x10<sup>-5</sup>% (p/v)

Glicerol 1% (v/v)

H<sub>2</sub>Od estéril qsp Volume desejado

BMMY (Buffered Methanol Complex Medium)

YP	10%
YNB	1,34% (p/v)
Tampao Fosfato pH 6,0	100mM
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Metanol	1% (v/v)
EDTA	1mM
PMSF	1mM
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	Volume desejado

*Nota: Para preparo dos meios BMGY e BMMY, foram preparadas as soluções estoques YP 10X (extrato de levedura e peptona de caseína) e dos demais reagentes (YNB, Biotina, EDTA), todos esterilizados. No momento da utilização as soluções estoque foram misturadas a fim de se obter as concentrações acima relacionadas sendo dissolvidas em água destilada estéril.*

Meio Mínimo MD (Minimal Dextrose Medium)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Glicerol	1% (v/v)
Ágar 2% estéril qsp	Volume desejado

Meio Mínimo MM (Minimal Methanol Medium)

YNB	1,34% (p/v)
Biotina	$4 \times 10^{-5}$ % (p/v)
Metanol	1% (v/v)
Ágar 2% estéril qsp	Volume desejado

Sorbitol 1M

D-Sorbitol	18,21g
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	Volume desejado
Esterilização: Autoclave	
Conservar a 4°C	

DTT

Ditiotreitol	100mM
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	Volume desejado
Esterilização: Filtragem.	
Conservar à -20°C	

Acetato de Lítio 1M

Acetato de Lítio	2,04g
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	20mL
Esterilização: Filtragem.	

Tris-HCl 100mM pH 7,5

Tris	0,6g
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	50mL
pH 7,5	
Esterilização: Filtragem.	

Tampao de Pré-tratamento (TPT)

Acetato de Lítio	100mM
DTT	10mM
Sorbitol	0,6M
Tris-HCl pH 7,5	10mM
H <sub>2</sub> Od estéril qsp	Volume desejado
Esterilização: Filtragem.	

Antiespumante

Antifoam A Emulsion. Sigma® - Cat#A5738

Cubetas de eletroporacao 0,2cm (BioAgency®, no catalogo: 165-2086N)

## 1.1. Meios e soluções para uso da bactéria *E. coli*

### Solução de CaCl<sub>2</sub>

CaCl <sub>2</sub>	50 mM
H <sub>2</sub> O estéril qsp	Volume desejado

Esterilizar por filtração.  
Conservar a 4°C

### Solução de CaCl<sub>2</sub> com 15% de Glicerol (v/v)

CaCl <sub>2</sub>	50 mM
Glicerol	15%
H <sub>2</sub> O estéril qsp	Volume desejado

Esterilização: Filtração.  
Conservar a 4°C

### IPTG 0,1M

Dissolvido em H<sub>2</sub>O estéril, esterilização por filtração e estocagem a 4°C ao abrigo da luz.

### Sorbitol 1M

### Lisozima

Solução estoque: 10 mg/mL em H<sub>2</sub>O Milli Q.  
Esterilização: Filtração.

Armazenamento: -20°C

### Tampão de Lise e Tampão de Amostra (1X)

Tris HCl (pH 6,8) 80 mM; Sacarose 12%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 2%; Azul de Bromofenol 0,01%. O tampão foi aliqotado em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -20 °C.

## 1.2. Inibidores de proteases

### PMSF (Phenilmethylsulfonyl Fluoride) 0,2 M

Dissolvido em isopropanol e estocado a temperatura ambiente por até 1 ano. É um inibidor de serino e tiol proteases como, por exemplo, tripsina, quimiotripsina, trombina, papaína. Concentração de uso 1mM.

### EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 0,5M

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

## 1.3. Meios e Soluções de Uso Comum

### Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

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

### Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

### Tampão Tris-HCl pH 8

Tris-HCl pH 8,0	10mM
-----------------	------

### Glicogênio

Glicogenio	20mg/mL
------------	---------

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

NaCl	1,5 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 M
NaN <sub>3</sub>	0,02% (p/v)

Tampão PBST 1X, pH 7,4

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

## 1.4. Soluções para extração de DNA plasmidial

Solucao I

Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
Glicose	50 mM
H <sub>2</sub> O estéril qsp	Volume desejado
Conservar a 4°C	

Solucao II

NaOH	0,2 M
SDS	1,0% (p/v)
H <sub>2</sub> O estéril qsp	Volume desejado

Solucao III

Acetato de potássio	3 M
Acido Acetico	2 M
pH 4,8 - 5,0	
H <sub>2</sub> O estéril qsp	Volume desejado
Conservar a 4°C	

RNAse A

RNAse A (Invitrogen®, cat# 12091-021).

Clorofane

Fenol equilibrado em pH 7,6	1 volume
Cloroformio	1 volume
B-hidroxiquinilona	0,05% (p/v)
Tris-HCl 100 mM pH 7,6	0,1 volume

Clorofil

Cloroformio	24 volumes
Alcool isoamilico	1 volume
Tampao TE	0,25 volumes

Etanol 100%Etanol 70%Isopropanol 100%Acetato de amonio 7,5 M

### 1.5. Soluções para eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Tampão de corrida TEB 10X

Trizma base	0,9M
Ácido Bórico	0,9M
EDTA	0,02M
pH 8,0	

Tampão de amostra para gel de agarose 10X

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

Solução de brometo de etídio 20.000X

Brometo de etídio	10mg/mL
-------------------	---------

Tampão de Corrida para SDS-PAGE

Trizma base	125mM
Glicina	960mM
SDS	0,5% (p/v)
pH 8,3	

Tampão de Amostra 2X para SDS-PAGE

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

APS 10% (p/v)

Persulfato de amônio	100 mg/mL
Dissolver em água destilada	

TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilenodimetilamina)Gel Concentrador SDS-PAGE

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

Gel Separador SDS-PAGE

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

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

#### Soluções Estoque para a Coloração

Ácido acético	7,5% (v/v)
Ácido tricloro acético (TCA)	12,5% (v/v)
Sulfato de amônia	20% (p/v)

#### Solução Corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (500mL)

Sulfato de amônio	30g
Ácido fosfórico	2% (v/v)
Comassie Brilliant Blue (G-250)	0.5g

*Nota: O Comassie Brilliant Blue (G-250) deve ser previamente purificado, conforme Harlow e Lane (1988), e só adicionado na solução quando o sulfato de amônia estiver completamente dissolvido no ácido fosfórico.*

#### Solução Descorante para Gel SDS-PAGE

Metanol	40% (v/v)
Ácido Acético	10% (v/v)

### 1.7. Soluções para coloração de gel de poliacrilamida com Prata

#### Fixação e Parada/Preservação

Metanol	40% (v/v)
Ácido Acético	10% (v/v)

#### Lavagem

Etanol 50% (v/v)

#### Sensibilização (50mL)

Tiosulfato de sódio	10mg
---------------------	------

Nota: Solução fotossensível.

Coloração (50mL)

Nitrato de prata	100mg
Formaldeído	37µL

Revelação (50mL)

Tiosulfato de sódio 0,2mg/mL (p/v)	1mL
Carbonato de sódio	2g
Formaldeído	25µL

Nota: Preparar logo antes ao uso.

Solução de Secagem (50mL)

Metanol	50% (v/v)
---------	-----------

### 1.8. Soluções para ensaios imunológicos (ELISA, *Western*, *Colony* e *Dot blotting*)

Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)

Tris-HCl pH 9,5	100mM
NaCl	100mM
MgCl <sub>2</sub>	50mM

Tampão para Transferência Semi-Seca de Proteínas, pH 8.3

Trizma-base	50mM
Glicina	40mM
SDS	0,04% (p/v)
Metanol	20% (v/v)

Bloqueio - *Western*, *Colony* e *Dot blotting*

Leite em pó desnatado	5% (p/v)
-----------------------	----------

Nota: Dissolver em PBST 1X

Bloqueio - ELISA

BSA fração 5 3% (p/v)

Nota: Dissolver em PBST 1x

Solução Reveladora para ELISA

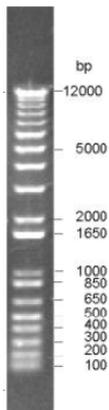
pNPP (para-nitro-fenil-fosfato) 1mg/mL

Dissolvido em APB

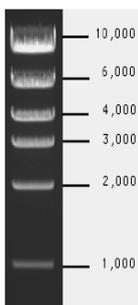
Solução Reveladora NBT/BCIP (n°. cat. 00-2209 Zymed/Invitrogen)Membrana de Nitrocelulose

Hybond-C Extra Amersham Bioscience® (cat# RPN 303E)

## 1.9. Marcadores de Massa molecular

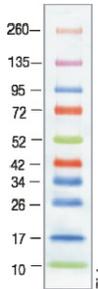
1 kb plus DNA Ladder – (Invitrogen® cat# 10787-026)

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

High Mass DNA Ladder (Invitrogen® cat# 10496-016)

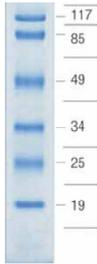
Mistura equimolar de fragmentos de DNA em pb de 10.000; 6.000; 4.000; 3.000; 2.000 e 1.000. Utilizando 2 ul do marcador, há correspondente massa de 100; 60; 40; 30; 20 e 10 ng, respectivamente.

**Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas® cat# SM1842)**



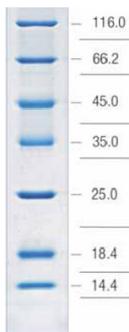
Fragmentos de proteínas em kDa: 260;  
135; 95; 72; 52; 42; 34; 26; 17 e 10.

**Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas® cat# SM0441)**



Fragmentos de proteínas em kDa: 117;  
85; 49; 34; 25; 19.

**Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas® cat# SM0431)**



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

## 1.10. Resinas cromatográficas

HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE Healthcare, cat#. 17-0402-01). Para purificação Das IgG completas anti-CD3.

HisTrap HP 1 mL GE Healthcare, cat#. 71-5027-68). Para purificação dos F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.

#### 1.10.1. Soluções para cromatografias

##### Tampão de Equilíbrio HiTrap Protein A

Fosfato de Sódio 20mM, pH7,0

##### Tampão de Eluição HiTrap Protein A

Ácido Cítrico 0,1M, pH3,0

##### Tampão de ligação HisTrap HP

20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl,

20 mM imidazole, pH 7.4

##### Tampão de Eluição HisTrap HP

20 mM Fosfato de Sódio, 0.5 M NaCl,

500 mM imidazole, pH 7.4

#### 1.11. Concentração, diálise e quantificação de proteínas purificadas.

Concentradores Amicon® Bioseparations:

Centricon YM-10 (cat#. 4206)

Centriprep YM-10 (cat#. 4305), YM-30 (cat#. 4307) e YM-50(cat#. 4308)

Microcon YM-100 (cat# 42413)

Concentrador: Stirred Ultrafiltration Cell Millipore, Modelo 8400 (n°. cat. 5124)

Membrana: Ultrafiltration Membrane. NMWL: 10.000 (cat#. 13642)

Kit BCA – Ácido Bicinrônico Pierce® (cat#. 23225)

## 1.12. Kits comerciais

Qiagen Plasmid Midi Kit 100 – Para preparação plasmidial em escala intermediária (Qiagen®, cat# 12145).

Qiaquick Gel Extraction kit 50 – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen ® , cat# 28704).

Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore®, cat# 42600).

PlusOne Silver Staining kit Protein. Para coloração de géis de poliacrilamida com prata. (GE lifescience®, cat# 17-1150-01).

Kit BCA – Ácido Bicinrônico (Pierce® ) para quantificação de proteínas. (cat#. 23225).

## 1.13. Enzimas

FastDigest® EcoR I cat# FD0274 Fermentas®

FastDigest® Psi I cat# FD2064 Fermentas®

FastDigest® Pvu II cat# FD0634 Fermentas®

FastDigest® Sal I cat# FD0644 Fermentas®

FastDigest® Apa I cat# FD1414 Fermentas®

T4 DNA Ligase cat#15224-041 Invitrogen®

FastDigest® Bgl II cat# FD0084 Fermentas®

FastDigest® Xho I cat# FD0694 Fermentas®

#### 1.14. Anticorpos utilizados em imunoensaios

Anti – IgG humana (Ck específico) feito em cabra (Pierce® cat# A9544).

Anti – IgG de cabra feito em coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma® cat# A-4187)

IgG humana Policlonal (Sigma® cat# K 9001)

Anti-IgG humano H+L feito em Cabra (Sigma® A 8542)

Anti-IgG camundongo feito Cabra conjugado com fosfatase alcalina (Pierce ® Cat#31160)

His-probe G-18 SC-804 IgG Coelho Policlonal anti-His (Santa Cruz Biotechnology)

Anti-GST Z-5 SC-459 IgG Coelho policlonal anti-GST (Santa Cruz Biotechnology)

#### 1.15. Membranas

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

#### 1.16. Softwares

Blastn

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn>) para análise de similaridade de sequências nucleotídicas com genes já descritos -

BioEdit 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para diversas análises de sequências nucleotídicas, mapas de restrição, alinhamento, criação de modelos de plasmídeos e previsão de padrões de migração eletroforética.

Cusp (Emboss) (<ftp://emboss.open-bio.org/pub/EMBOSS/>), DNAWorks  
(<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) e GCUA

([http://gcu.schoedl.de/sequential\\_v2.html](http://gcu.schoedl.de/sequential_v2.html)) para geração e análise de tabelas de *codon usage* a partir de um conjunto de seqüências codificantes.

NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) para previsão de possíveis sítios de N-glicosilação em proteínas humanas.

DNA Stats ([http://www.genscript.com/sms2/dna\\_stats.html](http://www.genscript.com/sms2/dna_stats.html)) para análise dos percentuais totais de bases de sequencias nucleotídicas.

MFold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) para análise teórica do nível de dobramento da sequência nucleotídica.

## 4. MÉTODOS

---

*Nota: Os métodos listados a seguir, quando invariáveis e que exijam muitas etapas de processamento, foram organizados em forma de itens seqüenciais numerados de modo a facilitar consultas posteriores. Os demais estão organizados em formato dissertativo.*

### 2.1. Preparação de DNA para transformação de *P. pastoris*

Aproximadamente 10 µg do plasmídio foi linearizado por digestão com a enzima de restrição *Sal* I. Essa enzima cliva o plasmídeo no gene *HIS4*, permitindo a integração do plasmídio no locus do gene *his4* defectivo da levedura, após eficiente transformação. A linearização dos plasmídios a serem transformados foi confirmada por análise em gel de agarose. Após a confirmação o material foi precipitado com acetato de sódio 0,3M e 2,5v de etanol 100% por no mínimo 2 horas a -20°C. Seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 45 min a 4°C, adição de 200µL de etanol 70% e nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4°C. O sedimento foi então ressuspendido em 10µL de H<sub>2</sub>O miliQ estéril.

### 2.2. Transformação de *Pichia pastoris* (adaptado de Wu e Letchworth, 2004)

1. Inoculou-se uma colônia da linhagem GS115 de *P. pastoris* em 10mL de meio YPD em tubo Falcon 50mL. Incubou-se durante a noite em *shaker* a 30°C com 200rpm.
2. Diluiu-se esse pré-inóculo em 100mL de meio YPD de modo a atingir uma OD600 de 0,3. Incubou-se em *shaker* com 200rpm a 30°C até atingir uma OD600 de 1 a 2.
3. Centrifugou-se esse inóculo a 3000 x *g* por 10 minutos sob temperatura ambiente.
4. Ressuspendeu-se o *pellet* em 8 mL do tampão de pré-tratamento (TPT) e incubou por 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugou-se a ressuspensão por 10 minutos a 3000 x *g*, 4°C.

6. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1,5 mL de Sorbitol 1M e centrifugou-se a 3.000 x g por 10 minutos, 4°C. E repetiu-se o processo para totalizar 3 centrifugações.
7. Ressuspendeu-se o *pellet* em Sorbitol 1M de modo a obter-se células em concentração de  $10^8$  a  $10^{10}$  por mL.
8. Incubou-se, em gelo por 5 minutos, de 3ng a 5ug de DNA linearizado com 80µL de células em cubeta de eletroporação de 0,2cm.
9. Transformou-se por eletroporação seguindo os parâmetros: 1,5 kV, 25 uF e 200ohms (Gene Pulser com Pulser Controller, BioRad).
10. Semeou-se, em placas contendo meio MD, 100µL da diluição de 1:10 e 1:100 do volume transformado.
11. Incubou-se as placas em estufa a 30°C por 48h ou até o aparecimento de colônias

### 2.3. Análise dos transformantes de *P. pastoris* por *Colony blot*.

1. Uma pequena porção de massa celular de alguns dos clones obtidos nas placas de transformação foi repicada serialmente, com palitos estéreis, em duas placas de meio mínimo contendo metanol (MM) ou glicose (MD).
2. Incubou-se as placas a 30°C por 2 a 3 dias adicionando-se a cada 24 horas 500 µL de metanol 100% na tampa das placas com meio MM.
3. Após esse tempo de indução montou-se um “sanduíche” sobre as placas MM da seguinte forma: membrana de nitrocelulose diretamente em contato com as colônias, 3 folhas de papel de filtro Watmann® 3 mm sobrepostas por várias camadas de papel toalha.
4. Colocou-se um peso sobre o “sanduíche” e o incubava a 30°C por 3 horas. 5- Passado o tempo de transferência, desmontou-se o sanduíche e a membrana era lavada com PBST 1X até a remoção completa do excesso de células.
5. Incubou-se a membrana com a solução de bloqueio por, no mínimo, 1 hora, sob agitação a 4°C.
6. Removeu-se a solução de bloqueio e lavou-se a membrana 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.

7. Incubou-se a membrana com o anticorpo primário, diluído em PBS 1X, por 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
8. Removeu-se o anticorpo primário e lavava-se a membrana novamente 3X com PBST 1X.
9. Incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (conjugado a fosfatase alcalina), diluído em PBS 1X, por mais 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
10. Removeu-se o anticorpo conjugado e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X e posteriormente 1X com 10mL de APB (tampão da fosfatase alcalina).
11. Adicionou-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavou-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima.
12. Preservou-se a membrana seca, sobre papel filtro.

#### 2.4. Expressão das proteínas recombinantes em *P. pastoris* – fermentação em frasco \*

1. Colônias que se mostravam positivas no *colony blotting* tinham suas réplicas correspondentes da placa MD inoculadas em 100 a 200mL de meio de crescimento BMGY num frasco erlenmeyer de 1L com aletas. Incubava-se sob agitação de 250 a 300 rpm e temperatura de 30°C durante 48 horas.
2. Coletou-se as células por centrifugação a 1.500 x g por 5 min a temperatura ambiente, desprezando-se o sobrenadante.
3. Ressuspendeu-se as células em 100mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril a temperatura ambiente repetindo-se em seguida o mesmo procedimento de centrifugação.
4. Ressuspendeu-se as células em 100mL de meio de indução BMMY e incubava-se pelo tempo de crescimento desejado (24 a 96 horas) sob agitação de 250 a 300 rpm e temperatura de 20 a 30°C.
5. A cada 24 horas adicionou-se 1% de metanol para manter a indução. E, quando desejado, a cada 24 horas eram coletados 5mL da cultura para

processamento do sobrenadante e análise da expressão da proteína recombinante.

6. Ao final do tempo desejado de indução centrifugou-se as células por 2 vezes e o sobrenadante era filtrado com a membrana Millipore 0,45µm.
7. Concentrava-se o sobrenadante utilizando o sistema Amicon *Stirred Ultrafiltration Cell Millipore* com uma membrana de ultrafiltração (NMWL: 10.000).
8. Ao sobrenadante filtrado e concentrado eram adicionados os seguintes inibidores de protease: EDTA 0,6mg/mL e PMSF 100µg/mL.

*\*adaptado do Manual do kit de Expressão em Pichia pastoris, Invitrogen®*

## 2.5. Preparação de DNA plasmidial em pequena escala\*

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 “ependorfs”, 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 5µL de RNase A e incubava-se por 1 hora a 37°C.
7. Adicionava-se 1/2v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 10.000 rpm à temperatura ambiente, a fase aquosa era coletada para outro tubo.
8. Adicionava-se 1/2v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.

9. O DNA era então precipitado com 2,5v de etanol 100% por, no mínimo 2 horas a -20°C.
10. Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezava-se o sobrenadante.
11. Adicionavam-se 200µL de etanol 70% e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15min a 4°C.
12. Após secagem o sedimento era ressuspendido em 40µL de TE. E as amostras conservadas a 4°C.

\*adaptado de Sambrook *et al.*, 1989

## 2.6. Preparação de DNA plasmidial em larga escala\*

1. Coletavam-se 200mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com o plasmídeo de interesse, crescidas em meio LB/Amp (100µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x *g*, desprezando-se o sobrenadante.
2. Ressuspendia-se o sedimento em 5mL de Solução I. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.
3. Adicionavam-se 10mL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo-se gentilmente o tubo várias vezes. Incubava-se à temperatura ambiente por 5 min.
4. Adicionavam-se 7,5mL de Solução III, repetindo-se o mesmo procedimento de homogeneização e incubava-se no gelo por 20 min.
5. Centrifugava-se a 10.000 x *g* por 30 min a 4°C.
6. O sobrenadante era filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante eram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente centrifugava-se a 12.000 x *g* por 20 min a temperatura ambiente.
7. Desprezava-se o sobrenadante e, após a secagem, o sedimento era ressuspendido em 500µL de TE ao qual eram adicionados 10µL de RNase A. Incubava-se por 1 hora a 37°C.

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

\*adaptado de Sambrook *et al.*, 1989

## 2.7. Digestão do DNA com enzimas de restrição.

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

## 2.8. Análise de DNA em gel de agarose

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

## 2.9. Eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose

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

## 2.10. Ligação de fragmentos de DNA

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

## 2.11. Preparação de células competentes e transformação bacteriana por tratamento com CaCl<sub>2</sub> e choque térmico\*.

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 250 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD600nm) de 0,1 a 0,3.
2. Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.
3. O sedimento era ressuspenso em 10mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
4. Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante.

5. O sedimento era ressuscitado em 1mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 50mM estéril gelada, com movimentos suaves.
6. Após incubação de 1 hora em banho de água/gelo as células eram aliqüotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.
7. Incubava-se de 100 a 200µL de célula competente com o DNA de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
8. Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 37°C por 3 min (sistema em tubos de hemólise para maximizar as trocas de calor).
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.

\*adaptado de Maranhão e Azevedo *et al.*, 2003

## 2.12. Precipitação das proteínas do sobrenadante de cultura com TCA

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

### 2.13. Análise de proteínas em gel de SDS-PAGE

1. Inicialmente preparava-se o gel separador em concentração de 10 ou 12% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
2. Após a polimerização do gel separador, vertia-se o gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v), tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
3. Uma vez vertido o gel concentrador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços. E uma vez polimerizado o gel era acoplado ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços eram lavados com tampão de corrida.
4. Imediatamente antes da aplicação das amostras, procedia-se à fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.
5. Após a corrida do gel, de 50 a 80mA, o mesmo era submetido aos procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250). Ou, caso o objetivo fosse a realização de *Western Blotting* o gel era submetido à transferência para membrana de nitrocelulose.

### 2.14. Coloração do gel de SDS-PAGE

#### Comassie Brilliant Blue R-250

1. Após a eletroforese o gel era colocado em solução fixadora por 30 min, sob agitação, a temperatura ambiente.
2. Descartava-se a solução anterior e incubava-se o gel com a solução de Comassie R-250 por no mínimo 2 horas, sob agitação.
3. Aplicava-se a solução descorante em 4 etapas: 15 min, 45 min, 120 min, 120 min. Trocando-se a solução descorante a cada etapa.
4. O gel era guardado em ácido acético 5%.

## 2.15. Análise de proteínas por *Western Blot*

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

1. Conforme instruções do fabricante, fazia-se um "sanduíche" de papéis de filtro, previamente embebidos em tampão de transferência contendo, nessa ordem, 6 papéis de filtro, a membrana, o gel e mais 6 papéis de filtro.
2. O "sanduíche" era colocado entre os eletrodos de grafite e submetido a uma corrente elétrica de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana por 1h 40 min.
3. Após este procedimento, a membrana, contendo as proteínas transferidas, era embebida em solução de bloqueio e incubada por 1 h à temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.
4. Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X a temperatura ambiente.
5. Incubava-se a membrana com o anticorpo primário, diluído em PBS 1X, por 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
6. Removia-se o anticorpo primário e lavava-se a membrana novamente 3X com PBST 1X.
7. Incubava-se a membrana com o anticorpo secundário (conjugado a fosfatase alcalina), diluído em PBS 1X, por mais 1 a 2 horas sob agitação a 4°C.
8. Removia-se o anticorpo conjugado e lavava-se a membrana 3X com PBST 1X e posteriormente 1X com 10mL de APB (tampão da fosfatase alcalina).
9. Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas era controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

## 2.16. Análise de proteínas por *Dot Blot*.

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

## 2.17. Purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade

### 2.17.1. Utilizando HiTrap™ Protein A HP 1mL (GE Healthcare®) – IgG's anti-CD3

1. Acoplava-se a coluna cromatográfica em uma bomba peristáltica.
2. Após a montagem lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.
3. Aplicava-se o sobrenadante previamente filtrado e concentrado.
4. Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.
5. Para a eluição das proteínas ligadas adicionava-se 8 volumes de tampão de eluição coletando-se as amostras em microtubos do tipo *Eppendorf* de 1 em 1 mL.
6. As amostras eram imediatamente neutralizadas com 100  $\mu$ L Tris-HCl 1,5M pH 11,0, previamente colocados em cada tubo de coleta, para neutralização do pH.
7. Lavava-se a coluna com mais 10 volumes de tampão de ligação.
8. Aplicava-se etanol 20%, no qual se estocava novamente a resina a 4°C.
9. Imediatamente após o fim da coleta, 5 $\mu$ L de cada amostra eram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Dot Blot*.
10. As amostras onde se detectavam proteínas eram passadas na coluna Centricon YM-10 (Amicon® ), com membrana de exclusão para proteínas menores que 10 kDa para diálise e concentração.

### 2.17.2. Utilizando HisTrap™ HP 1mL (GE Healthcare®) – F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3

Culturas celulares de *P. pastoris*, linhagem GS115, crescidas por 24h em meio BMGY e induzidas por 24h e 48h em meio BMMY foram submetidas à 3000g por 10min. Os sobrenadantes foram filtrados prontamente em membranas com poros de 0,45µm e estocados entre 0-4°C. A coluna cromatográfica foi acoplada à uma bomba peristáltica com fluxo máximo limitado a 1mL/min. Alternativamente à purificação em câmara-fria, os frascos contendo Tampão de Ligação, Tampão de Eluição, Água bidestilada e sobrenadante filtrados foram acondicionados em banho água-gelo. Tal procedimento visou manutenção da temperatura do sistema próxima a 4°C, fato percebido pela condensação da umidade atmosférica nas tubulações da bomba e na própria coluna, reduzindo riscos de degradação das proteínas de interesse e propiciando maior conforto térmico durante sua operação. O processo de purificação se deu como o descrito pelo fabricante. A solução Etanol 20% foi removida da coluna com água bidestilada seguida da aplicação de Tampão de Ligação. Amostras de sobrenadante com volume de 200mL foram injetadas sendo o *flow-thru* continuamente coletado em outro frasco, de igual volume, em banho água-gelo. Ao restar apenas 1mL de sobrenadante para ser aplicado, tubos de 1,5mL foram posicionados logo abaixo da coluna para coleta de *flow-thru*, que conteve, sequencialmente: resquícios de sobrenadante, lavagem com tampão de ligação, fração eluída e reequilíbrio com tampão de ligação. Enquanto o *flow-thru* inicialmente recolhido no frasco de 200mL era reaplicado à coluna para aumentar o rendimento (procedimento repetido 3 vezes por volume de sobrenadante), volumes de 5µl de cada tubo de 1,5mL foram coletados e aplicados em membrana de nitrocelulose para rastreamento e análise de eficiência, por *Dot blot*, da purificação da proteína recombinante.

### 2.18. Quantificação das proteínas utilizando o kit BCA

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

1. Adicionavam-se 100  $\mu$ L de cada padrão diluído (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu$ g/mL de BSA) e da amostra a ser quantificada em placas de microtitulação, em triplicata.
2. A essas amostras adicionavam-se 2mL de reagente WR presente no kit em cada. Incubava-se a placa por 1 hora a 37°C.
3. Após essa incubação determinava-se a absorbância a 450nm utilizando-se PBS 1X como branco.
4. A partir desses dados eram feitos os cálculos e a curva-padrão de BSA, a partir da qual podia-se estimar a concentração das proteínas recombinantes purificadas.

## 2.19. ELISA – Ensaio de quantificação dos F(ab')<sub>2</sub> recombinantes

1. Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com imunoglobulina humana policlonal em quantidades conhecidas que variavam em diluições seriadas., 100 $\mu$ L por poço, durante 2 horas a temperatura ambiente.
2. Lavava-se 3X com PBST 1X, 150 $\mu$ L por poço.
3. Bloqueava-se com leite desnatado 3%, 200 $\mu$ L por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com as amostras de F(ab')<sub>2</sub> purificados. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo de coelho anti-H+L humano 1:5.000 por 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com o anticorpo de cabra anti-IgG coelho conjugado com fosfatase alcalina 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavava-se 3X com PBST 1X e 1X com tampão para fosfatase alcalina (APB).
8. Revelava-se e fazia-se os cálculos de concentração baseados na curva padrão de IgG humana, sempre desconsiderando os poços brancos (com PBS 1X em todas as etapas).

## 2.20. Quantificação das amostras purificadas de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.

A partir da equação da linha de tendência das amostras de massas conhecidas diluídas de forma seriada, temos:

Como:

$$y = 0,185x + 0,105$$

sendo  $y$  a absorvância (405nm) e  $x$  a massa (ng) dos padrões,

E que no modelo de quantificação de hF(ab')<sub>2</sub> temos ponto mediano:

$$\frac{\left(\frac{m}{9} + \frac{m}{27}\right)}{2} \rightarrow \frac{(0,147+0,122)}{2}$$

sendo  $m$  a massa de hF(ab')<sub>2</sub> presente,

temos que:

$$m \rightarrow 0,907$$

Aplicando na equação, teremos:

$$y = 0,185x + 0,105$$

$$(0,907) = 0,185x + 0,105$$

$$x = 4,34 \text{ ng}$$

O que indica que ao aplicar 4,34ng de F(ab')<sub>2</sub>, teremos uma absorvância de 0,907.

## 2.21. Expressão do antígeno recombinante CD3 em *E. coli*.

Inicialmente, uma colônia de *E. coli* da linhagem BL21a transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 3 mL de meio 2YT suplementado com o antibiótico de seleção; ampicilina (100 µg/mL). Este pré-inóculo foi incubado por 16 h a 37°C sob agitação de 220 RPM. Após este período, o inóculo foi diluído 1:100 em meio 2YT contendo o antibiótico adequado e incubado a 30°C sob agitação de 220 RPM até obter OD600 = 0,6 a 0,8. Uma alíquota de 2 mL da cultura (antes da

indução) foi retirada e processada: centrifugada a 6000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 1 mL de PBS 1X e ressuspendido em 60 µl de tampão de lise 1X. Em seguida, a indução foi realizada adicionando-se IPTG à cultura de modo a obter a concentração final de 1 mM, e esta foi incubada por 3 horas a 30°C. Durante esse tempo, mais duas alíquotas de 2 mL foram retiradas, com 1,5 h e 3 h de indução, processadas como descrito anteriormente e analisadas em SDS-PAGE 12%. Passadas as três horas de indução, a cultura de bactérias foi centrifugada a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 10 mL de PBS 1X e armazenado a -80 °C até a purificação das proteínas recombinantes.

## 2.22. Purificação do antígeno recombinante CD3 em *E. coli*.

Os sedimentos obtidos ao final do processo de expressão foram descongelados em banho de água-gelo e ressuspendidos em 2 mL de PBS 1X gelado contendo coquetel de inibidores de proteases e 1 mM de DTT. Adicionou-se lizozima para a concentração final de 0,2 mg/mL e incubou-se à temperatura ambiente sob agitação branda por 30 minutos. As células foram lisadas por sonicação em banho de gelo, 4 pulsos de 15 s com intervalos de 45 s em uma amplitude de 50%. Os extratos obtidos foram clarificados por centrifugação a 12000 x g durante 10 min. a 4 °C, de modo a eliminar a fração celular insolúvel contendo os corpos de inclusão. O processo de purificação ocorreu com o uso de resina cromatográfica HisTrap HP 1mL sob refrigeração e conforme manual do fabricante

## 2.23. ELISA – Ensaio de ligação direta

1. Os poços de interesse na placa eram sensibilizados com antígeno rCD3 purificado (diluído em PBS 1X, 100ng por poço) durante 1 horas a 37°C.
2. Lavava-se 3X com PBST 1X, 200µL por poço.
3. Bloqueava-se com solução de bloqueio, 200µL por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente.

4. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se com os F(ab')<sub>2</sub> purificados. Como controle positivo utilizava-se o próprio anticorpo monoclonal OKT3 (diluído na mesma solução que as proteínas recombinantes). Tudo era feito em diluições seriadas e em triplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se os poços com F(ab')<sub>2</sub> com o anticorpo de coelho anti-Ck humano 1:5.000 por 1 hora a temperatura ambiente, e os contendo OKT3 com PBS.
6. Lavava-se 3X com PBST 1X e incubava-se os poços com F(ab')<sub>2</sub> com o anticorpo de cabra anti-IgG de coelho 1:5.000 conjugado com fosfatase alcalina 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente, e os contendo OKT3 com anticorpo anti-IgG camundongo conjugado com fosfatase alcalina 1:5000.
7. Lavava-se 3X com PBST 1X e 1X com tampão para fosfatase alcalina (APB).
8. Revelava-se e a ligação dos F(ab')<sub>2</sub> recombinantes.

Nota: Devido ao sistema de revelação do OKT3 ser diferente do utilizado para os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> não torna-se possível a comparação dos sinais apresentados pelas mesmas massas aplicadas dos dois anticorpos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Desenvolvimento das sequências de anticorpos IgG anti-CD3

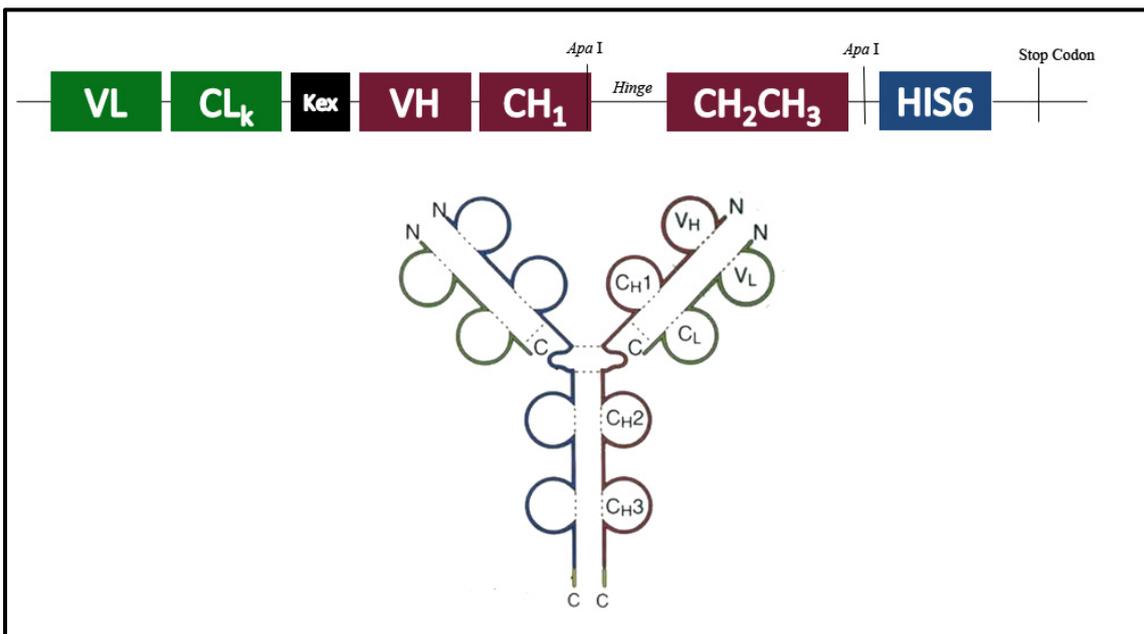
Anteriormente à síntese química, as sequências codificadoras das regiões constantes das imunoglobulinas propostas neste trabalho foram comparadas às existentes em bancos de dados com a utilização do programa BLAST. Apesar de apresentarem alguns poucos polimorfismos, observamos que tais sequências se alinhavam ao marcador de IgG1 humana e às relativas aos domínios VH, CH1, CH2 e CH3 do fragmento FvFc e rIgG encontrado nos vetores humanizados anteriores descritos pelo nosso grupo (Silva, Vieira *et al.*, 2009), fato que corrobora com o desenvolvimento desta imunoglobulina completa.

Em trabalhos anteriores, foram percebidas perdas de afinidades apresentadas pela versão completamente humanizada (VH e VL) de fragmentos FvFc anti-CD3 (Silva, Vieira *et al.*, 2009). Tal prejuízo foi relacionado ao processo de humanização da cadeia leve (VL), onde foram vistos que alguns resíduos importantes para a manutenção do paratopo do anticorpo murino foram substituídos por aminoácidos não conservados no processo de humanização. Para tanto, consideramos, em um primeiro momento, que a sequência a ser sintetizada para o desenvolvimento deste trabalho deveria ser hemi-humanizada, possuindo VL murino e VH humanizado de modo manter a afinidade ao CD3 (Silva, Vieira *et al.*, 2009).

Tendo em vista à expressão heteróloga da proteína recombinante na levedura *Pichia pastoris*, foram escolhidos códons preferenciais visando a expressão nessa levedura. Seguindo a degeneração do código genético, o desenho da sequência codificadora foi norteada de modo a guiar o processo de tradução com o uso dos RNA transportadores mais abundantes em *P. pastoris*. Tal otimização foi realizada gerando uma tabela de uso de códons com o programa CUSP do pacote EMBOSS a partir de três genes altamente expressos em *P. pastoris*, aqueles cujos produtos são: álcool oxidase, fosfogliceraldeído quinase e gliceraldeído fosfato desidrogenase. A tabela de uso de códons resultantes foi usada como parâmetro para gerar a sequência codificadora por meio do programa Back translation do pacote EMBOSS.

Os genes presentes no cassete de expressão encontram-se alterados quando comparados aos de trabalhos anteriores do grupo (Silva, 2008 e Pimentel, 2008). Tal modificação, que consiste simplesmente na alteração da ordem dos genes

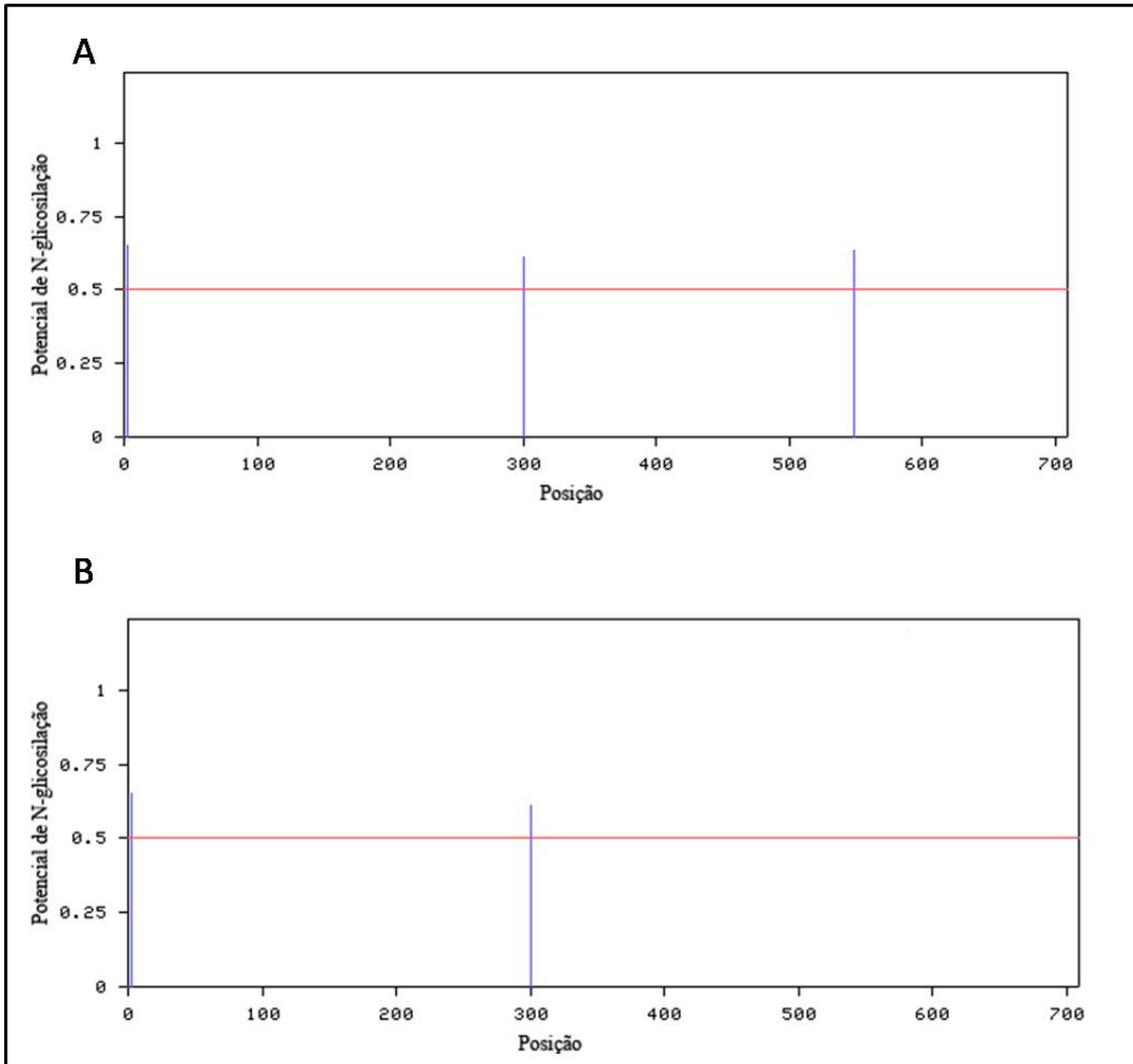
codificadores dos domínios da proteína recombinante, facilitará a geração de um vetor para fragmentos do tipo F(ab')<sub>2</sub> a partir de um único processo de clonagem da mesma sequência sintetizada (Figura 9). Com isso, eleva-se o número de proteínas recombinantes que podem ser produzidas a partir de uma única sequência gênica o que diminui custos e aumenta as opções de produção de diferentes anticorpos potenciais para possíveis aplicações terapêuticas.



**Figura 9. Representação esquemática do cassete de expressão projetado.** As sequências codificadoras dos domínios VL, CL são separadas daquelas dos VH, CH1, CH2, CH3 pela sequência reconhecida pela endopeptidase Kex2 (Kex) presente em *P. pastoris*. Após a clivagem do sítio pela protease KEX, os domínios leve (VL-CL) e pesado (VH-CH1-CH2-CH3) são separados permitindo que se acoplem por pontes dissulfeto, gerando a imunoglobulina completa. Para a geração do fragmento F(ab')<sub>2</sub> basta tratar a sequência nucleotídica com enzima de restrição *Apa I* que retira a sequência codificadora dos domínios CH2-CH3, e mantém a fase aberta de leitura, gerando uma cauda de seis resíduos de histidina.

Com a utilização de software *NetNGlyc 1.0*, os padrões de glicosilação apresentados por imunoglobulinas humanas foram comparados à sequência peptídica proposta (Figura 10). Percebemos, na tradução computacional dos nucleotídeos para aminoácidos, a ocorrência de três sítios possíveis de N-Glicosilação. O primeiro está presente na sequência codificadora do peptídeo sinal (fator  $\alpha$ ), que promove o sinal para exportação, fato que não interfere a estrutura dos anticorpos recombinantes. O segundo sítio encontra-se na sequência codificadora do domínio VH. O terceiro sítio é Asn297, presente no domínio CH2, sítio natural de glicosilação. Como a glicosilação em sítios contendo sequência de aminoácidos

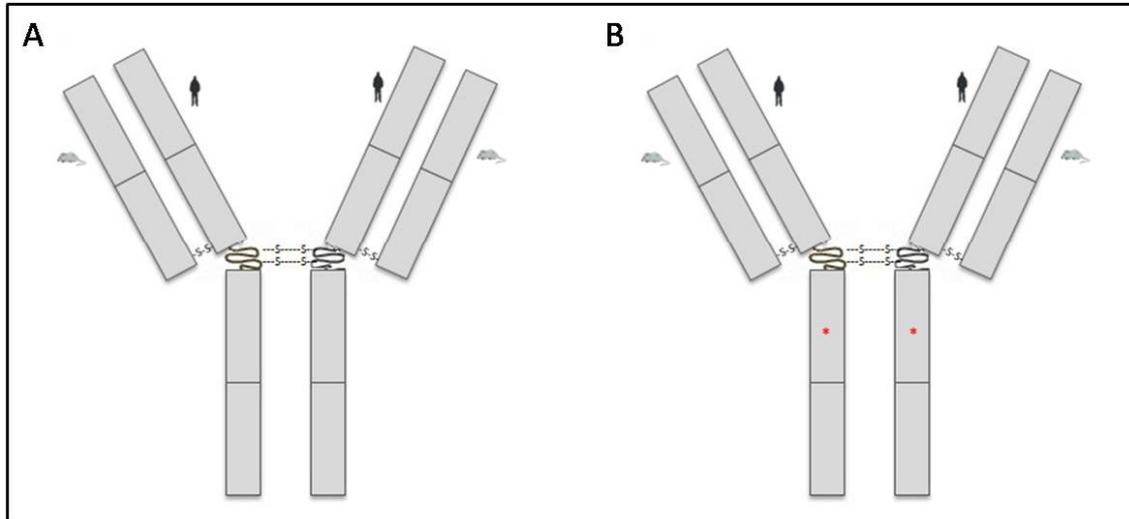
NPS normalmente não é glicosilada, uma mutação foi introduzida apenas em Asn297Ala de modo a produzir uma versão não glicosilada da imunoglobulina recombinante para análise de possíveis alterações conformacionais e na atividade biológica causadas pela glicosilação em *P. pastoris*.



**Figura 10. Análise de possíveis sítios de N-glicosilação das imunoglobulinas recombinantes.** A linha vermelha representa o *Threshold* e indica o limiar aceitável calculado para a ocorrência de sítios de N-glicosilação. As linhas azuis representam as posições dos possíveis sítios de N-glicosilação na cadeia aminoacídica (abscissas). Há a ocorrência de três prováveis sítios de glicosilação na IgG anti-CD3 selvagem (A) comparada aos dois sítios da IgG anti-CD3 com mutação em Asn297Ala (B). O primeiro sítio ocorre no sítio presente na sequência do peptídeo sinal, não promovendo modificações pós-traducionais na proteína recombinante. O segundo sítio está localizado no domínio VH na sequência NPS, e provavelmente não é glicosilado naturalmente. Figura gerada com o uso do software NetNGlyc 1.0.

Diante do exposto, foram sintetizadas quimicamente duas sequências codificadoras de imunoglobulinas recombinantes: uma selvagem (S1) e outra contendo mutação Asn297Ala (S2). Ambas apresentam VH humanizado (hVH) e VL

murino (mVL) (Figura 11). Os genes sintéticos apresentam um CAI (do inglês, *codon adaptation index*) para *P. pastoris* próximo a 0.91 e um conteúdo de GC de 47,9%.



**Figura 11. Modelo das imunoglobulinas hemi-humanizadas (VH humanizado e VL murino) produzidas a partir da síntese química das seqüências nucleotídicas.** A IgG selvagem (A) difere-se da IgG mut Asn297Ala (B) pela presença da mutação desse aminoácido presente no domínio CH2 (asteriscos). Adaptado de Simi (2009).

## 3.2. Clonagens em vetor de expressão em levedura.

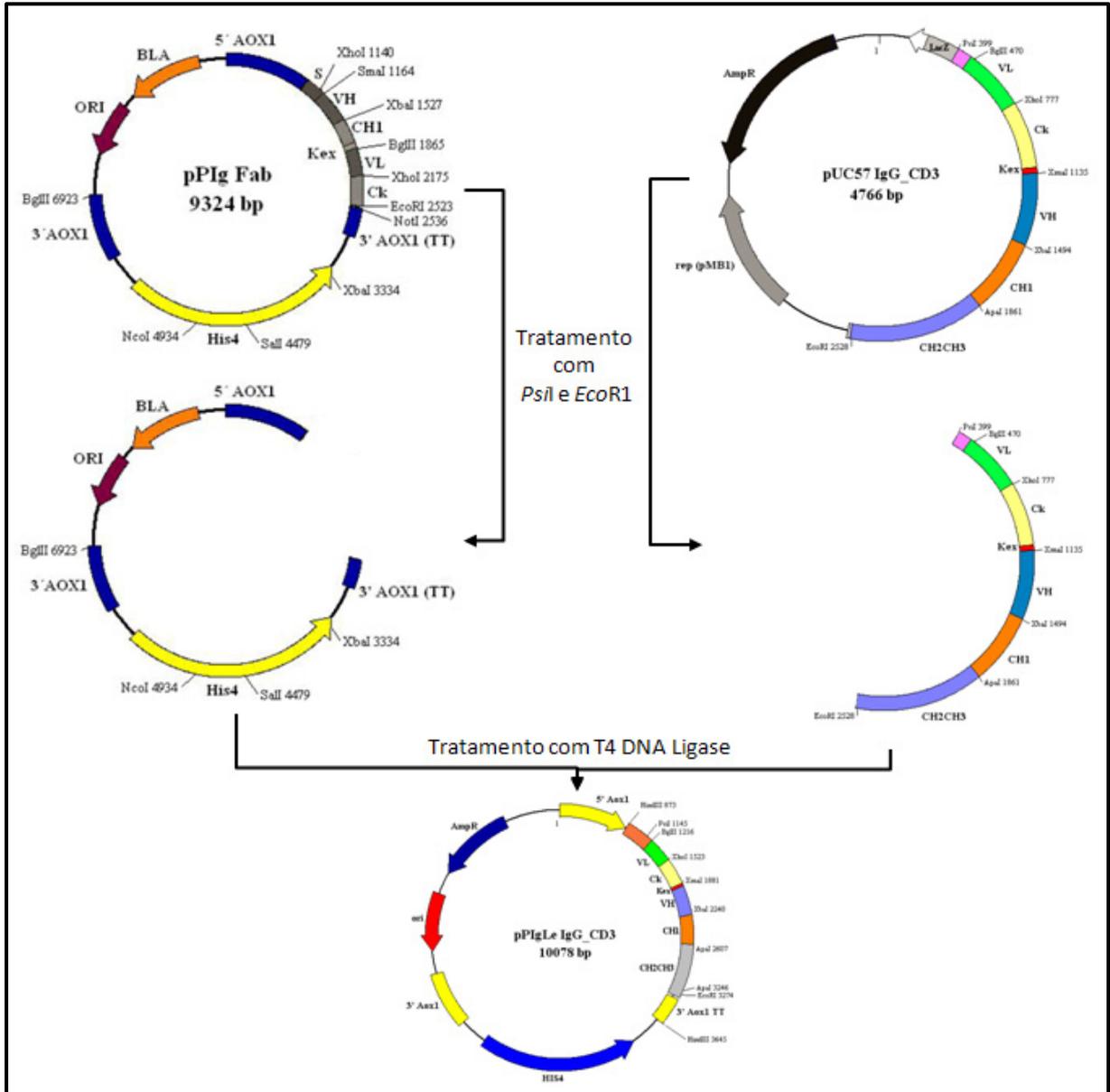
### 3.2.1. Obtenção dos vetores contendo seqüências da IgG anti-CD3 hemi-humanizadas.

As duas seqüências das IgG's anti-CD3 hemi-humanizadas foram sintetizadas quimicamente pela empresa Genescript (San Diego, CA, EUA) e fornecidas clonadas em plasmídeos pUC57.

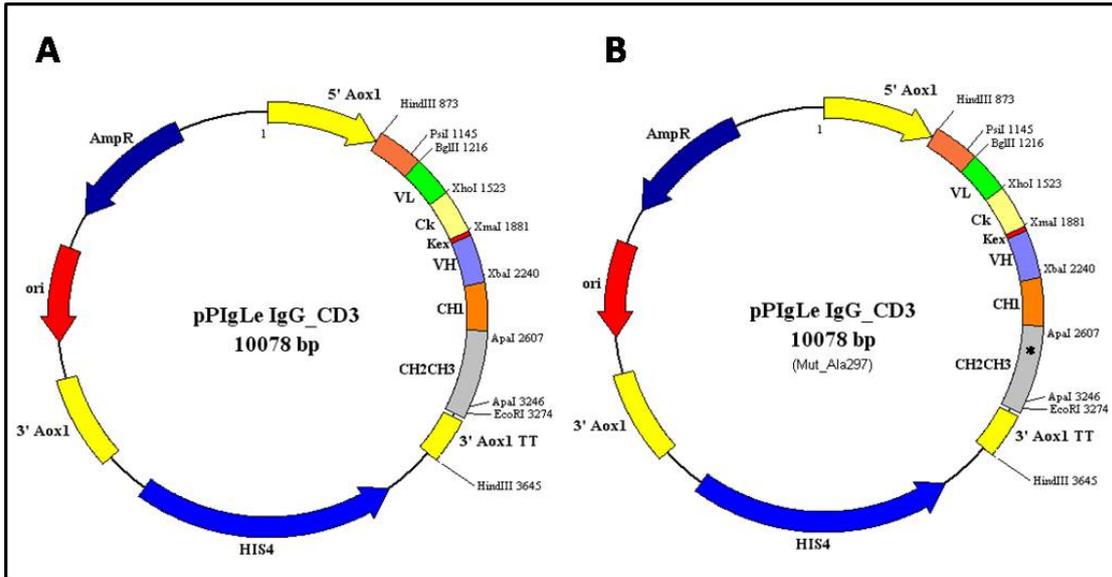
Os segmentos gênicos codificantes das imunoglobulinas anti-CD3 selvagem e mutante, presentes no vetor pUC57, foram clonados no vetor de expressão em levedura pPIgLE Fab (Figura 13) (Simi, 2009), derivado do pPIg16. Este vetor de expressão, construído em trabalhos anteriores do grupo, possibilita a produção de proteínas recombinantes, em cassete de expressão monocistrônico, com dobramento tridimensional correto e em quantidades suficientes para caracterizações posteriores, por meio da utilização do promotor *AOX1* induzível por metanol que dirige a transcrição do gene de interesse. Apresenta, portanto, (1) sinal

de secreção do fator  $\alpha$ , que promove a secreção da proteína expressa que pode ser coletada diretamente do sobrenadante de cultura, (2) o fragmento 3' AOX1 de terminação da transcrição, (3) fase de leitura aberta do gene *HIS4* que promove a integração deste no genoma de levedura *Pichia pastoris*, (4) origem de replicação de *E. coli* e (5) gene da  $\beta$ -lactamase que confere resistência à ampicilina.

A clonagem foi realizada por meio da clivagem dos vetores pPIgLE Fab e pUC57 com as enzimas de restrição *Psi* I e *EcoR* I (Figura 12). Após a ligação das sequências codificadoras das rlg nos vetores de expressão em *P. pastoris* foram obtidos dois vetores que se diferenciam por apenas um aminoácido (Figura 13).

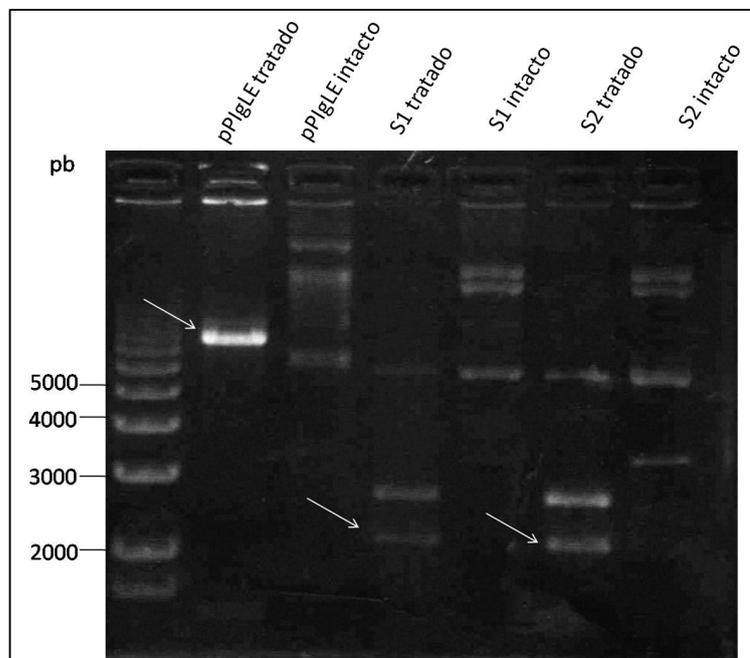


**Figura 12. Representação esquemática da obtenção dos vetores pPIgLe IgG anti-CD3 selvagem e mutante.** O vetor pPIg Fab (Simi, 2009) foi escolhido para receber as sequências codificadoras dos anticorpos recombinantes presentes em PUC57. O tratamento do PUC57 com enzimas *Psi* I e *Eco*R I resulta na formação de dois fragmentos: um de 2129pb contendo VL-CL(k)-Kex-VH-CH1-CH2-CH3; e outro de 2630pb correspondente ao vetor. O vetor resultante do processo apresenta as sequências codificadoras das IgG's anti-CD3 hemi-humanizadas mutante e selvagem, que diferem-se entre si por uma mutagênese precisamente em Asn297Ala, com alteração de um aminoácido na região CH2 (não mostrada).



**Figura 13.** Representação esquemática do vetor pPIgLe IgG CD3 contendo as seqüências codificadoras da imunoglobulina G anti-CD3. A versão mutante (B) difere-se daquela selvagem (A) por uma mutagênese em Asn297Ala presente no domínio CH2CH3 (asterisco).

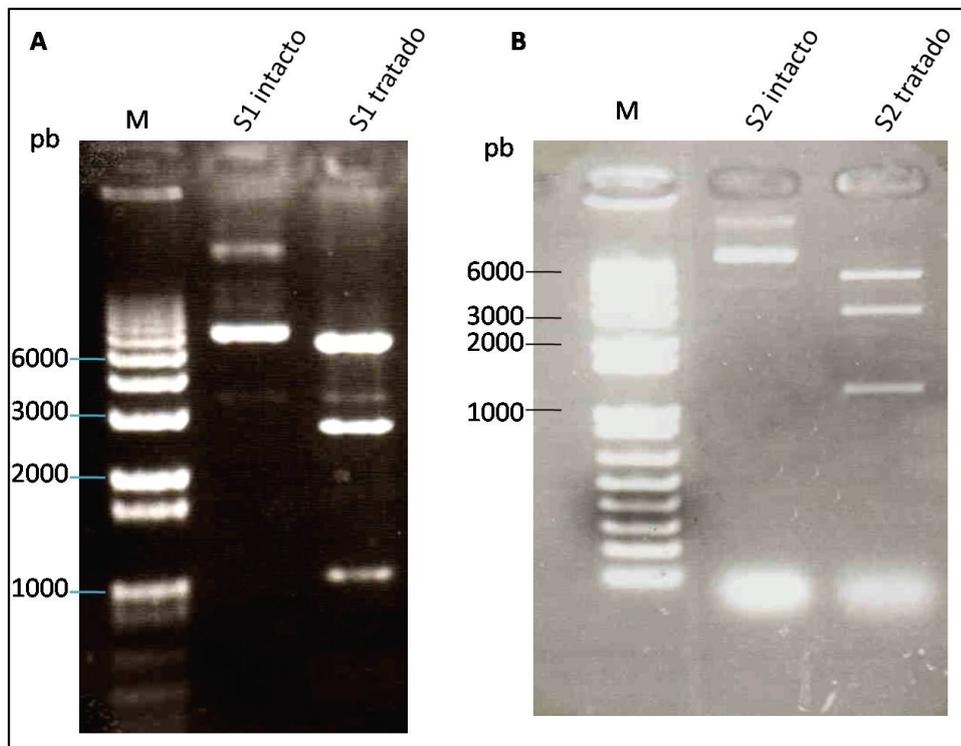
O vetor pUC57 liberou um fragmento de aproximadamente 2,1kb que correspondia ao segmento VL-CL(k)-Kex-VH-CH1-CH2-CH3 das IgG's completas anti-CD3 (Figura 14).



**Figura 14.** Perfil de restrição dos vetores pUC57 contendo a seqüência codificadora da imunoglobulina anti-CD3 selvagem (S1) e mutante (S2); e do vetor pPIgLE, após tratamento com *Psi* I e *Eco*R I. Clones foram tratados com as enzimas *Psi* I e *Eco*R I. Após tratamento de S1 e S2, fragmentos de massa aparente de 2,1kb correspondentes à seqüência codificadora dos domínios VL-CL(k)-Kex-VH-CH1-CH2-CH3 foram liberados. Setas representam fragmentos eluídos do gel de agarose e eluídos. M: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen®).

Esses fragmentos de massa aparente de 2,1kb foram eluídos, purificados e clonados em vetor pPIg que continha uma sequência codificadora de Fab utilizada em trabalhos anteriores (Burtet, 2006), sendo esta retirada previamente durante o tratamento com endonucleases *Psi* I e *EcoR* I. Os sistemas de ligações foram inseridos em linhagem bacteriana XL10Gold por tratamento com Cloreto de Cálcio, sendo semeados posteriormente em meios seletivos contendo Ampicilina. Os clones, nativo e mutante, foram denominados S1 e S2 respectivamente.

Para o rastreamento de clones positivos das clonagens de S1 e S2 em pPIgLE, foram realizadas digestões com enzima de restrição *Pvu* II (Figura 15).

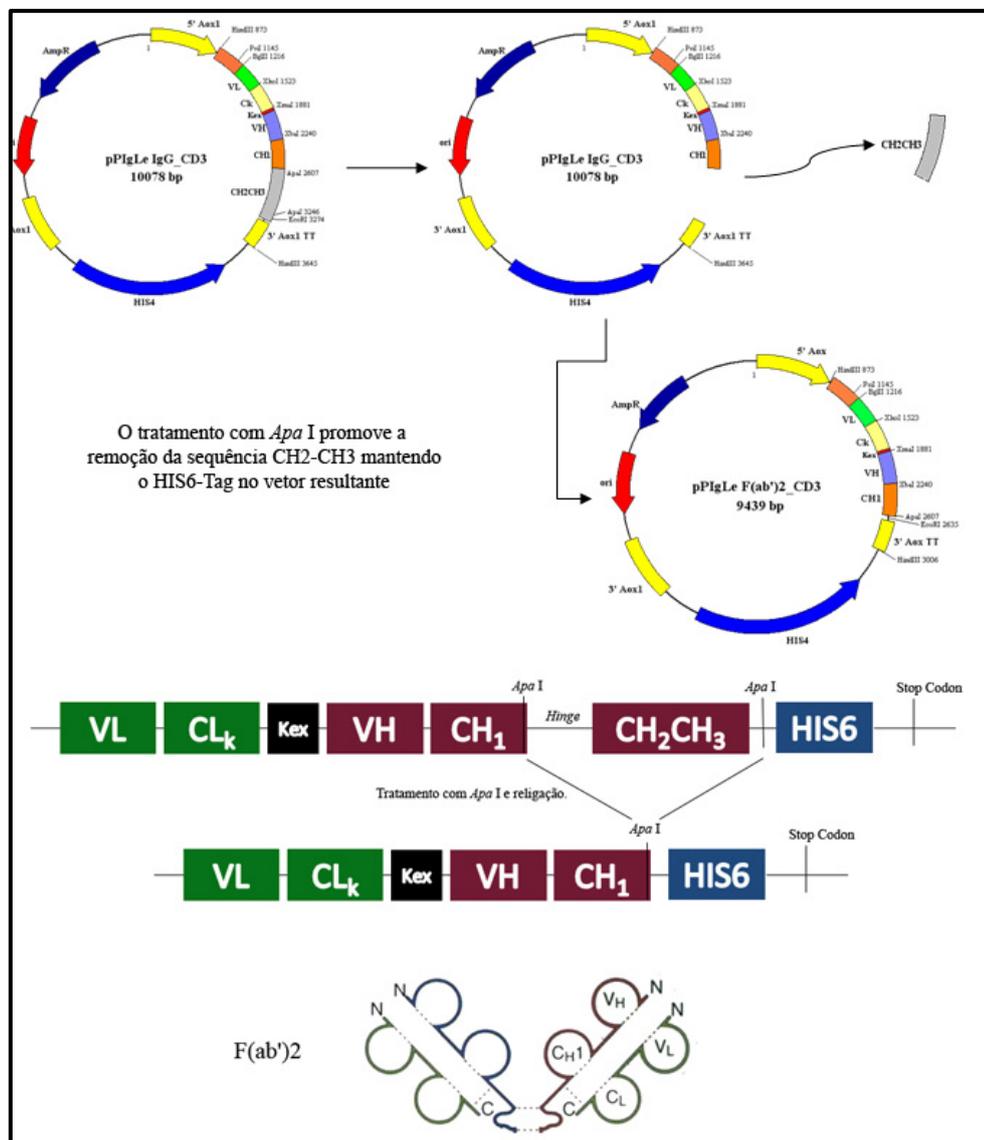


**Figura 15. Perfil de restrição para confirmação de clonagem dos plasmídeos pPIG Le S2 e S1.** Plasmídeos pPIgLE S1 e S2 intactos foram comparados àqueles digeridos com enzima de restrição *Pvu* II. Para confirmação da construção dos plasmídeos pPIgLE contendo a IgG anti-CD3 selvagem (A) e mutante (B), os vetores pPIgLE IgG CD3 foram submetidos à ação da endonuclease *Pvu* II. Aqueles considerados positivos liberaram fragmentos de massa aparente de 1,1kb, 2,9kb e 6,0kb após serem tratados. M: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen®)

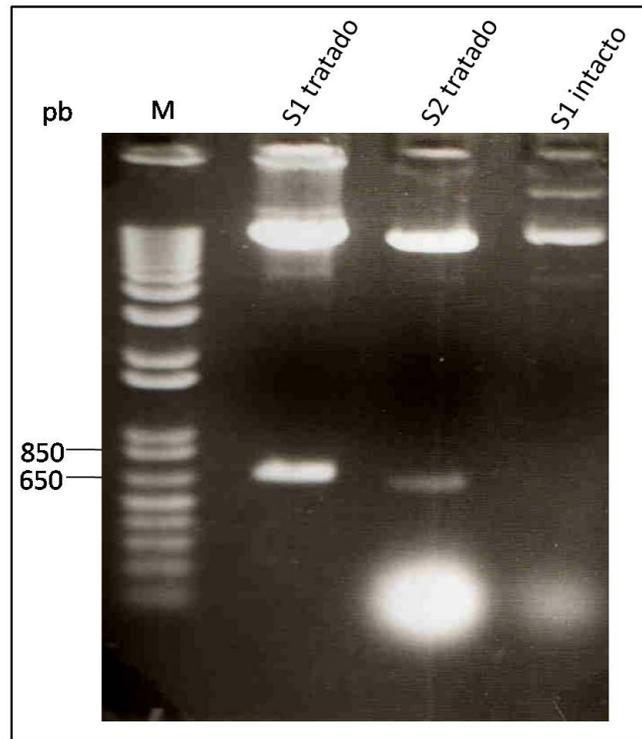
Com isso foram obtidos, e confirmados, os vetores de expressão em *P. pastoris* contendo as sequências codificadoras das imunoglobulinas selvagens (S1) e mutantes (S2): pPIgLE S1 e pPIgLE S2.

### 3.2.2. Obtenção do vetor contendo sequência do fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 hemi-humanizado.

Para a construção do fragmento F(ab')<sub>2</sub>, os vetores pIgLe contendo as sequências codificadoras da IgG anti-CD3 selvagem (S1) ou mutante (S2) foram tratados com a enzima de restrição *Apa* I (Figura 16) de modo a promover a retirada do domínio CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (Figura 17). Para a obtenção desse fragmento torna-se indiferente qual dos plasmídeos pIgLe S2 ou pIgLe S1 foram tratados, visto que o sítio mutagenizado está localizado na sequência codificadora da região Fc da imunoglobulina completa, domínio ausente no fragmento F(ab')<sub>2</sub> obtido.

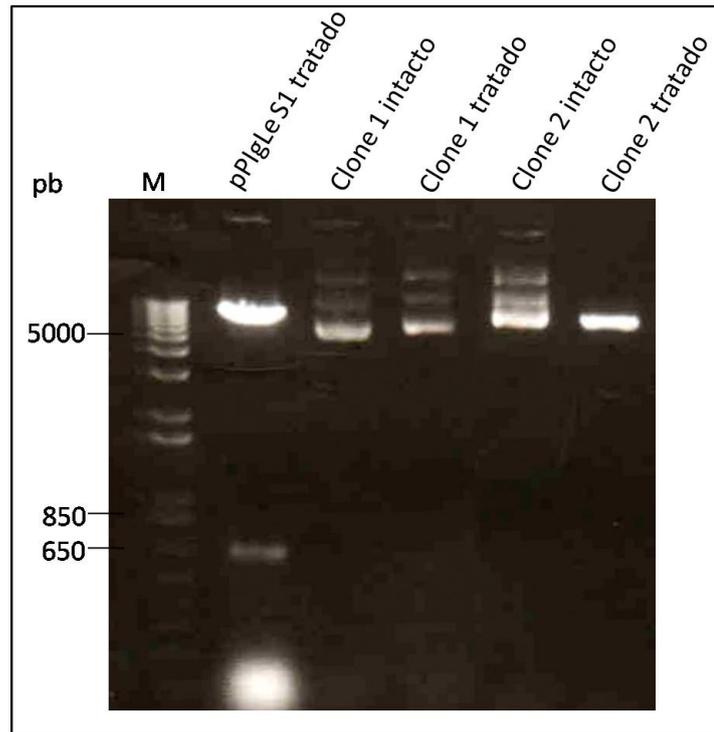


**Figura 16.** Abordagem experimental para obtenção dos vetores pIgLe F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3. O vetor resultante após o processo de religação apresenta a sequência codificadora do fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 hemi-humanizado.



**Figura 17. Perfil de restrição de plasmídeos pIgLE S1 e S2 intactos comparados àqueles digeridos com enzima de restrição *Apa* I.** Os vetores pIgLe IgG CD3 S1 e S2 liberam, após digestão com *Apa* I, as sequências codificadoras dos domínios CH2-CH3 de aproximadamente 650pb, responsáveis pela formação da porção Fc da imunoglobulina. M: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen®)

Os vetores foram eluídos do gel, religados com T4 DNA Ligase e utilizados para transformar a linhagem XL10 Gold de *E. coli* visando suas ampliações. Foi realizada uma preparação plasmidial em pequena escala e seus DNA's extracromossomais foram analisados após digestão com a enzima de restrição *Apa* I de modo a confirmar a clonagem bem-sucedida no vetor pIg Le (Figura 18).

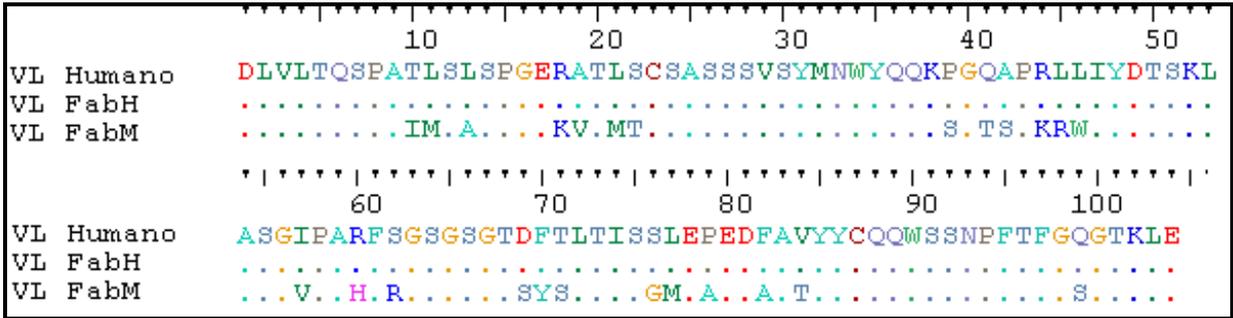


**Figura 18. Perfil de restrição por *Apa* I para confirmação da clonagem em pPIgLe F(ab')<sub>2</sub>.** Para confirmação da construção dos plasmídeos pPIgLe contendo a sequência F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3, o vetor pPIgLe IgG CD3 e dois clones transformados foram submetidos à tratamento com a endonuclease *Apa* I. O clone 2 demonstrou-se positivo por linearizar sem a liberação de nenhum fragmento após o tratamento. M: 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen®)

### 3.2.3. Obtenção do vetor contendo sequência do fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 completamente humanizado.

Para a humanização completa do fragmento hemi-humanizado F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3, o vetor pPIgLe F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 teve sua sequência codificadora do VL murino retirada em uma etapa de clonagem utilizando as enzimas *Bgl* II e *Xho* I (figura 13) sendo substituída por um VL humanizado por *CDR graft* (Silva, 2008)

A confirmação da clonagem resultando na substituição do mVL pelo hVL foi realizada por seqüenciamento da região codificadora de VL, visto que ambas apresentam igual número de aminoácidos, fato que dificulta a análise comparativa de perfil de restrição (Figura 19).



**Figura 19. Alinhamento das seqüências anti-CD3 da cadeia leve murina, da cadeia leve humanizada comparadas à cadeia leve humanizada por nosso grupo.** São mostradas as seqüências de aminoácidos do domínio da cadeia leve do anticorpo monoclonal OKT3 (VL FabM), de sua versão humanizada (VL FabH) e a seqüência humanizada do vetor doador (VL Humano). Pontos representam identidade de aminoácido comparativo à seqüência humana.

A partir do resultado do seqüenciamento indicando que a etapa de clonagem foi bem sucedida, obtivemos um novo vetor codificador de um fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 totalmente humanizado, denominado de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.

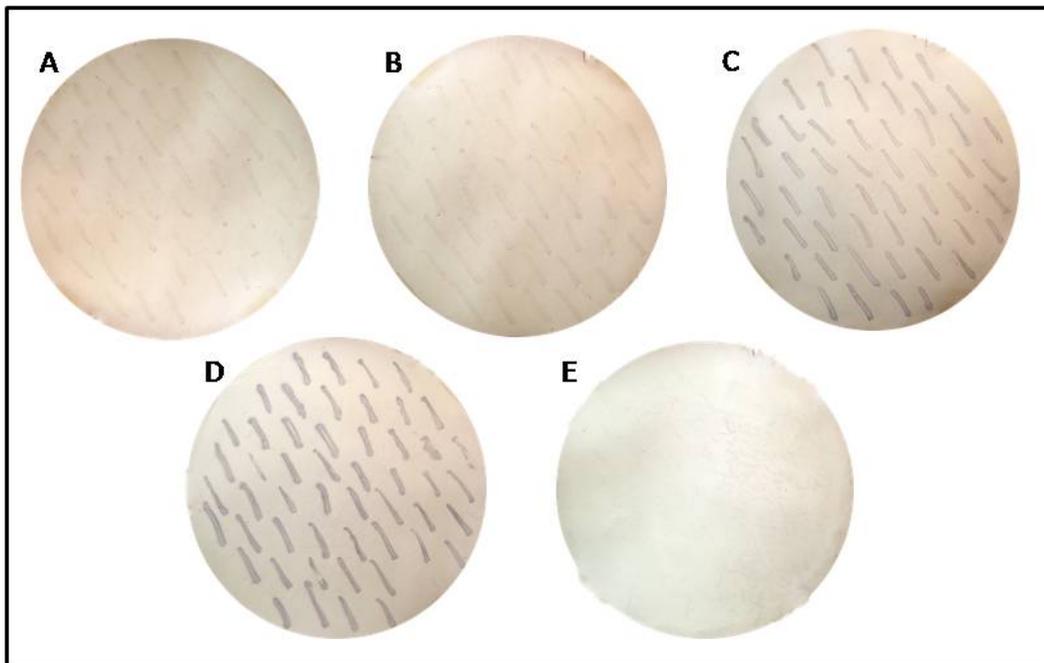
### 3.3. Transformação das construções em *P. pastoris*.

Finalizadas as construções dos vetores, foram iniciadas as transformações da levedura *P. pastoris*. Os DNAs linearizados foram transformados, por eletroporação, na linhagem GS115, mutante auxotrófico para a proteína HIS4 (*his4*) que não é capaz de produzir a enzima histidinol desidrogenase, sendo dependente da adição de histidina para cultivo.

O tratamento prévio de *P. pastoris* com acetato de lítio e ditioneitol (DTT) aumenta a eficiência de transformação por eletroporação em cerca de 150 vezes (Wu e Letchworth, 2004). Baseando-se nessas informações o método de transformação constante no protocolo do Manual do Kit de expressão em *Pichia pastoris*, Invitrogen, 2002, foi adaptado. Para a transformação, os plasmídeos obtidos nas clonagens anteriores foram linearizados com a enzima de restrição *Sal* I. O sítio de restrição desta enzima localiza-se dentro do gene *HIS4*, possibilitando a integração do vetor no locus *his4* por meio de recombinação homóloga restaurando o fenótipo His<sup>+</sup>. Este evento faz com que os clones transformantes expressem a enzima histidinol desidrogenase, o que restaura a capacidade destas leveduras de crescerem em meio deficiente em histidina, chamada de marca auxotrófica. Esta linhagem contém também uma cópia funcional do gene da Álcool oxidase 1 (AOX1)

responsável por aproximadamente 85% da utilização do metanol (Daly e Hearn, 2005).

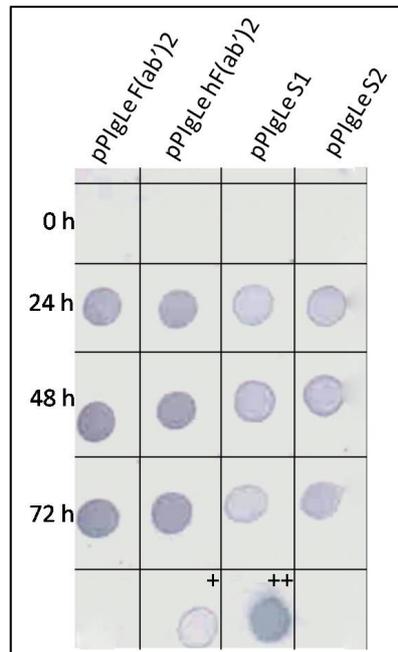
As culturas foram, posteriormente, semeadas em meio sólido seletivo sem histidina. Aqueles clones que foram transformados com sucesso tornaram-se capazes de sintetizar o aminoácido ausente e tiveram crescimento normalizados sendo re-semeados em meio seletivo em presença de metanol, agente indutor do promotor AOX. Tal promotor encontra-se a montante das sequências codificadoras das proteínas recombinantes construídas, o que permitiu a transcrição do mRNA específico e sua posterior tradução, comprovada pelo método de *Colony Blot* (Figura 20). Como controle negativo foi transformado o vetor sem sequências gênicas de interesse, PIC9.



**Figura 20. Imunodeteção de proteínas recombinantes secretadas por colônias produtoras e aderidas na membrana de nitrocelulose por *Colony Blot*.** Durante 1 hora a 37°C, a membrana foi mantida em contato direto com a placa onde foram estriadas colônias de leveduras transformadas e crescidas por 72 horas em meio indutor. Foram feitas as imunodeteções das proteínas (A) IgG anti-CD3 S1, (B) IgG anti-CD3 S2, (C) F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 e (D) hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3. O controle negativo (E) é formado por clones transformados com vetor PIC9 sem cassete de expressão, e passou pelos mesmos tempos de incubação dos demais.

### 3.4. Expressão dos anticorpos recombinantes em *P. pastoris*.

Alguns clones positivos nos tratamentos com anticorpos para detecção das proteínas recombinantes foram selecionados ao acaso para iniciar os ensaios de cinética de indução. Para tanto, os clones transformados com as diferentes proteínas recombinantes tiveram seus crescimentos normalizados a partir de uma mesma OD<sub>600</sub> para o final do período de crescimento de 24 h de modo a iniciar a indução com mesmas cargas celulares. A cinética foi analisada qualitativamente por meio de *Dot blot* de pontos de amostras coletadas a cada 24 h durante 3 dias de indução (Figura 21).

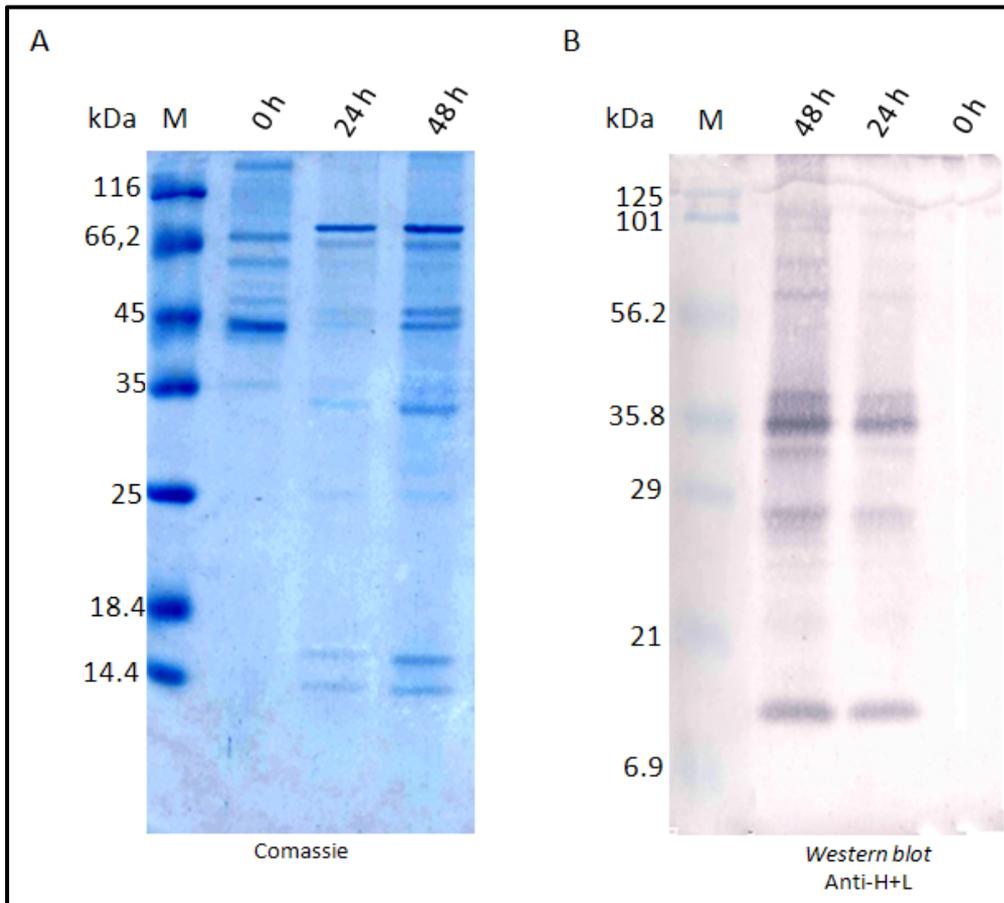


**Figura 21. Imunoensaio qualitativo da cinética expressão das proteínas recombinantes anti-CD3 por *Dot blot*.** 5ul de sobrenadantes foram aplicados antes da indução (0h) como controle negativo, após um dia (24h), dois dias (48h) e três dias (72h) de indução ininterrupta. Os controles positivos são os anticorpos primário e secundário. +: IgG de cabra anti-IgG humana (H+L) ++: IgG de coelho anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina.

O processo de expressão, com adição diária de metanol e PMSF apresentou resultados que mostram que a partir de 24 h de indução já são percebidas proteínas presentes no sobrenadante de cultura, não aumentando consideravelmente suas concentrações no decorrer dos dias subseqüentes da cinética (Figura 21). Portanto,

foram normalizados os tempos de indução para 24 h com coleta de sobrenadantes e ressuspensão do sedimento celular em novo meio de indução para outra rodada de fermentação com duração de mais 24 h de modo a aumentar o nível de proteínas recombinantes coletadas. Os sobrenadantes foram processados e armazenados refrigerados.

A análise do perfil de migração em gel redutor SDS-PAGE (Figura 22) das proteínas recombinantes IgG anti-CD3 S1 e IgG anti-CD3 S2 presentes no sobrenadante de cultura das induções demonstra que esses anticorpos encontram-se altamente degradados visto que inúmeros fragmentos de massas moleculares aparentes variáveis e não condizentes com as massas teóricas calculadas para a cadeia leve completa, em torno de 25 kDa, e da cadeia pesada completa, em torno de 50 kDa.



**Figura 22. Análise da cinética de indução das proteínas recombinantes IgG CD3 S1 por SDS-PAGE.** Géis a 12% corados com Comassie Brilliant Blue G-250 (A) com espelho em *Western Blot* (B). Amostras de até 48h de indução do sobrenadante de transformantes produtores de IgG. Para revelação do *Western blot* foram utilizadas IgG de cabra anti-IgG humana (H+L) seguida de IgG de coelho anti-IgG de cabra conjugado com fosfatase alcalina.

O processamento do pró-peptídeo do fator alfa é de extrema importância para a secreção da proteína heteróloga. A proteína pode estar sendo secretada para o sobrenadante em estado já degradado visto que inibidores de proteases como EDTA e PMSF não pareceram minimizar as degradações observadas nas construções de anticorpos completos. Apesar de inúmeras alterações das concentrações desses inibidores, incluindo a diminuição da temperatura para 15°C durante a indução, não foram observadas melhorias relativas no nível de degradação das IgGs completas. Foram percebidas, em análises comparativas de OD<sub>600</sub>, que as taxas de crescimento das culturas contendo EDTA e PMSF apresentaram-se inferiores àquelas sem inibidores, provavelmente por um efeito negativo sobre enzimas responsáveis pelo metabolismo do microorganismo.

Apesar dos níveis de degradação não terem sido diminuídos após várias tentativas de produção, um processo de purificação por afinidade à Proteína A foi realizado visando identificar a composição dos fragmentos observados.

### 3.5. Purificação das IgGs anti-CD3 em coluna de Proteína A Sepharose

A molécula de Proteína A é composta por seis regiões diferentes, cinco das quais mostram uma forte ligação específica a domínios *Ig-like*, regiões homólogas aos domínios constantes ou variáveis das imunoglobulinas (Vanamala et al., 2003). Devido a essa característica, apresentou-se como um método atrativo para purificação e caracterização da composição de fragmentos observados durante os ensaios de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura (figura da análise de cinética) visto que a molécula imobilizada de Proteína A pode se ligar à região Fc de, pelo menos, duas moléculas de IgG. Será possível observar um aumento da massa aparente durante a eletroforese caso a região Fc esteja covalentemente ligada aos domínios CH1-VH (fragmento Fd), com manutenção do *hinge*, além de observar o seu grau de integridade.

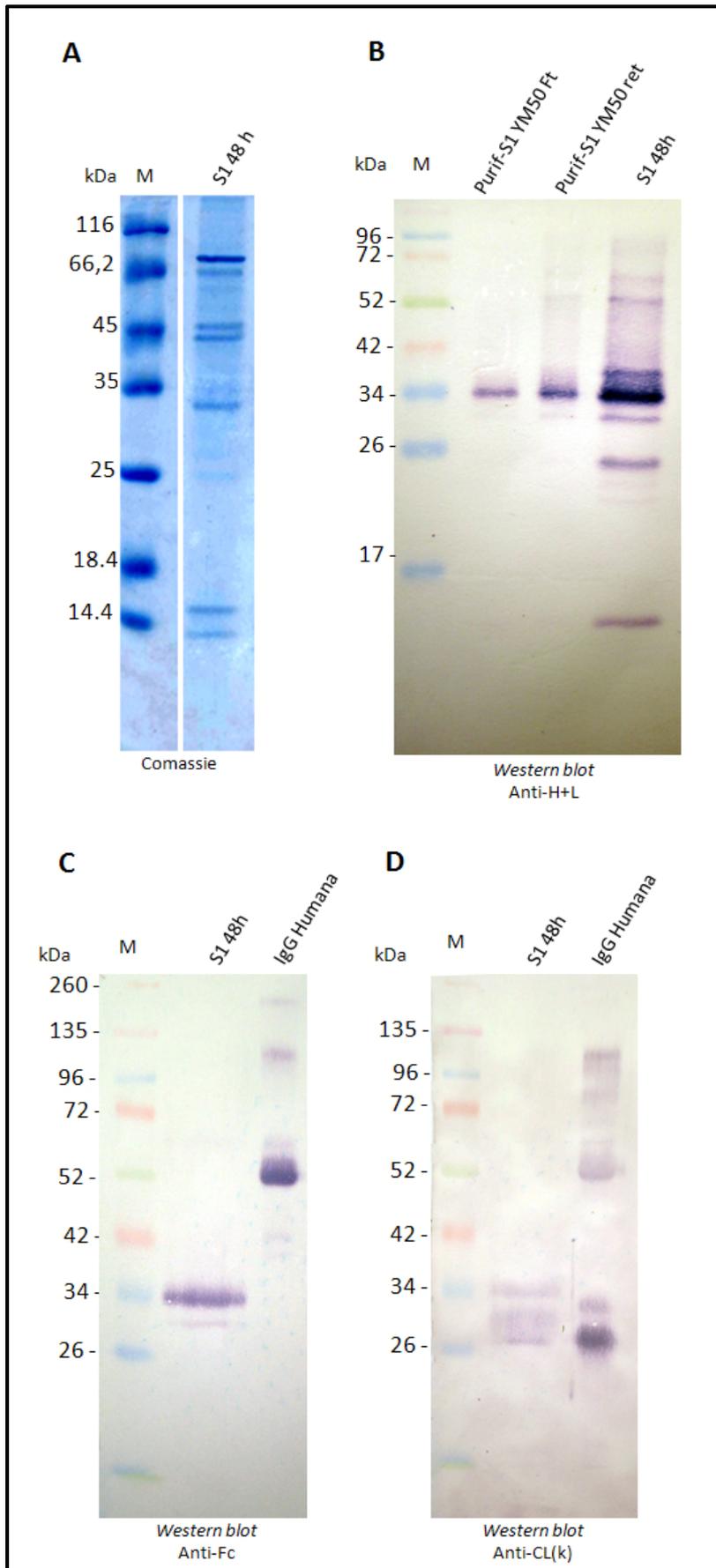
Partindo-se de 48 h de indução em frasco, sobrenadantes filtrados foram aplicados em resina HiTrap Protein A HP (Amersham) de 1mL com o processo de purificação ocorrendo sob refrigeração, conforme descrito em Materiais e Métodos.

As frações eluídas foram sondadas por *Dot blot* e as aquelas responsivas foram dialisadas e concentradas em membranas YM-50. A análise do perfil de migração das frações retidas e do *flow-thru* foram realizadas por SDS-PAGE e *Western blot* com o uso de anticorpos primários específicos para determinadas regiões da imunoglobulina (Figura 23).

Análises comparativas em SDS-PAGE corado por *Comassie* e, *Western blot* com o uso de anticorpos policlonais anti-H+L, permitem afirmar quais fragmentos presentes nos sobrenadantes não purificados após 48h de indução apresentam os domínios de Imunoglobulinas (Figura 23 A e B, S1 48h). Aqueles de massa molecular aparente próxima a 34 kDa apresentam a região Fc do anticorpo, fato corroborado por *Western blot* usando anticorpos anti-Fc específicos (Figura 23, C). Entretanto, tal massa não corresponde à cadeia pesada completa do anticorpo (~50 kDa) apresentada, sem degradações, pela IgG humana comercial usada como controle (Figura 23, C). Ao utilizar anticorpos anti-CL(k) específicos podemos identificar fragmentos com massa aparente variando entre 34 kDa e 26 kDa, que apresentam a cadeia leve da imunoglobulina (Figura 23, D).

De modo a prever a extensão das degradações apresentadas, após as purificações por afinidade à Proteína A as frações eluídas foram obrigadas a transpor membrana com poros de 50 kDa. Tal valor permite deduzir também se há formação de agregados ou multímeros dos domínios das IgG's.

Amostras que transpuseram ou permaneceram retidas na membrana YM-50 foram analisadas por *Western blot* com uso de anticorpos policlonais anti-H+L (Figura 23, B). Tendo por base a reconhecida ligação da Proteína A à região Fc da imunoglobulina recombinante, podemos afirmar que uma pequena fração relativa à cadeia pesada completa, retida pela membrana, permanece apresentando ~50 kDa. Entretanto, os fragmentos de valor próximo a 34 kDa são majoritários, sendo provavelmente resultados de degradação da região Fc. O processo de purificação não foi capaz de reter fragmentos que continham a cadeia leve haja vista a não ocorrência destes nas frações purificadas analisadas em *Western blot* com o uso de anticorpos anti-H+L (Figura 23, B).



**Figura 23. Análise por SDS-PAGE e Western blots da purificação das proteínas recombinantes IgG CD3 S1 por Proteína A.** Perfil de migração de proteínas totais presentes no sobrenadante de cultura após 48h (S1 48h), coloração por *Comassie* (A) e análises por *Western blots* utilizando anticorpos de cabra anti-IgG humana H+L (B), IgG cabra anti-Fc humano (C) e IgG de cabra anti-CL(k) humano (D). IgG humana comercial foi utilizada como parâmetro para comparação dos perfis de migração das amostras (C e D). Frações de sobrenadante purificados foram filtradas em membranas YM-50 com o *flow-thru* (Purif-S1 YM50 Ft) e fração retida (Purif-S1 YM50 ret) foram analisadas (B).

Com a degradação caracterizada para as rlg anti-CD3, não foi possível caracterizar as imunoglobulinas recombinantes produzidas e purificadas do sobrenadante. O nível de degradação permite observar os domínios simples da rlg, tais como VH, VL, CH1 ou CL, cujas massas são próximas a 12 kDa, parecem ser observados visivelmente em amostras não purificadas (Figura 23, B).

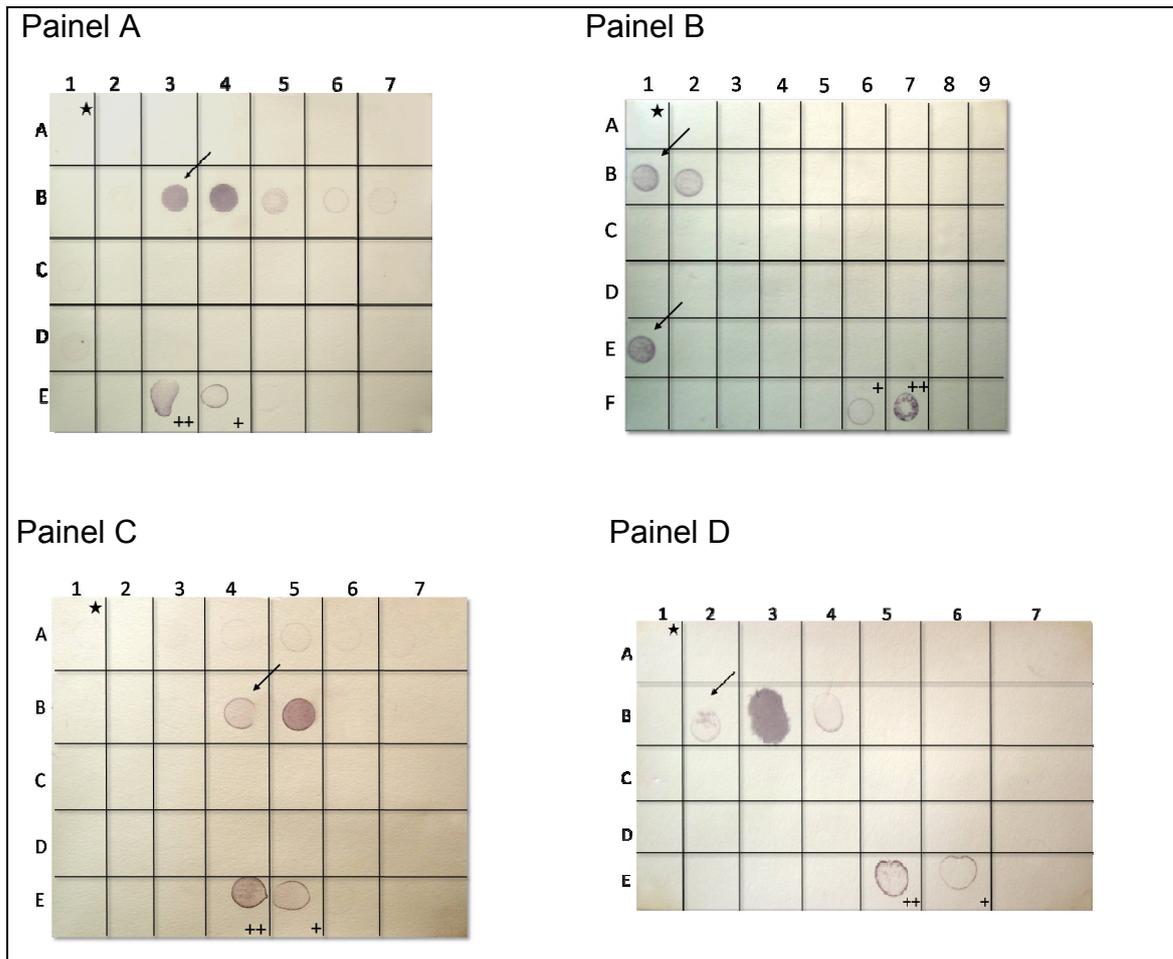
Como alternativa, os vetores contendo a sequência codificadora de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> foram tratados com a endonuclease *Sa*I para transformação por eletroporação em *P. pastoris*. O processo de seleção dos clones produtores foi feito por *Colony blot* (Figura 20) e alguns que se apresentaram positivos foram selecionados para crescimento em meio líquido e fermentação em frasco seguindo os mesmos procedimentos realizados para a expressão das IgGs S1 e S2.

A cinética de indução por até três dias também foi realizada e os dados qualitativos obtidos por *Dot blot* de amostras diárias partindo do ponto inicial sem indução (0h) demonstraram que fermentações de 24 h já apresentam níveis significativos de proteínas recombinantes presentes no sobrenadante de cultura (Figura 21). As fermentações foram realizadas por três rodadas de 24h, com coleta e ressuspensão do sedimento celular em novo meio de indução, o processo geral de indução foi semelhante aos realizados para as IgGs S1 e S2. Entretanto, de modo a tentar minimizar a recorrência de degradações, os sobrenadantes das culturas foram aplicados em coluna de purificação de Níquel logo após serem recolhidos dos frascos.

### 3.6. Purificação dos hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC

A purificação dos hF(ab')<sub>2</sub> recombinantes foi realizada em coluna HiTrap™ HisTrap HP. Um protocolo alternativo ao sugerido pelo fabricante foi estabelecido, conforme consta em métodos. O mesmo se mostrou mais adequado aos fragmentos estudados, reduzindo riscos de degradação das proteínas e propiciando maior conforto térmico durante sua operação.

Os volumes coletados dos diferentes tempos de coleta da purificação da proteína recombinante foram aplicados em membrana de nitrocelulose para rastreamento e análise de eficiência, por *Dot blot*, (Figura 24).



**Figura 24. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.** O mesmo volume de sobrenadante (200 mL) com 24 h de indução foi filtrado e purificado repetidamente por IMAC em coluna HiTrap™ HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). Setas representam início de cada eluição. Painéis A, B e C compõem a primeira série de 4 purificações. Painel D representa a primeira purificação após descarregar e recarregar a coluna com Sulfato de Níquel. Cada ponto representa 5ul de frações coletadas em tubos de 1,5 mL. Os pontos + e ++ representam IgG Humana comercial. Estrela representa início do processo de lavagem. Para revelação foram utilizados IgG cabra anti-IgG humana H+L seguida de IgG coelho anti-IgG cabra conjugado com fosfatase alcalina.

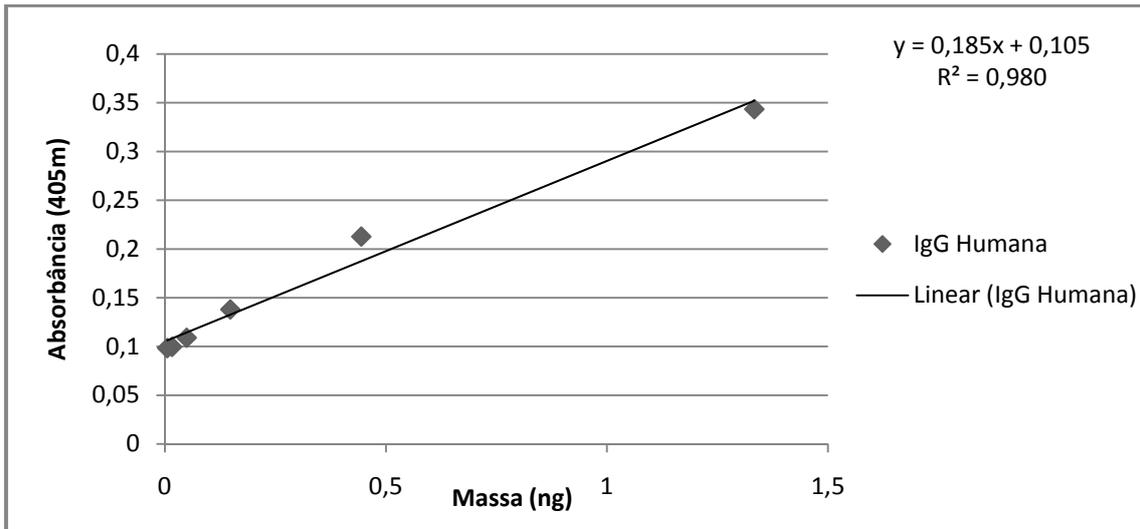
Apesar do manual da coluna (71-5027-68 Edition AA) informar que esta possui capacidade de ligação dinâmica de 40 mg de proteínas que apresentem cauda His6, tal capacidade é dependente do tipo de proteína a ser purificada. Portanto, cada sobrenadante sofreu séries de 4 purificações de modo a otimizar o procedimento. Mesmo adotando tal metodologia, ainda era possível observar a presença de proteínas recombinantes no eluato da coluna, o que permitiria a obtenção de maiores massas purificadas sem a necessidade de novo processo fermentativo. Com o término de cada série, a coluna era descarregada em presença de tampão contendo agente quelante (EDTA) para a retirada dos cátions de Níquel

bivalentes, sendo recarregada em seguida com Sulfato de Níquel segundo protocolo descrito. Tal procedimento permitiu a obtenção de frações mais concentradas, tais como as observadas nas primeiras purificações de cada série. Segundo o manual do fabricante, torna-se necessário o recarregamento da coluna após 7 purificações. Entretanto, a capacidade de ligação foi diminuída notavelmente após 4 séries.

As frações eluídas que mostraram-se positivas em análise por *dot blot* foram reunidas e dialisadas/concentradas.

### 3.7. Quantificação das amostras de hF(ab')<sub>2</sub> purificadas.

Procedimentos colorimétricos rotineiros de quantificação de proteínas, tais como BCA ou BRADFORD, apesar de rápida execução, quantificam proteínas totais presentes na amostra analisada o que pode levar à equívocos por superestimar as concentrações reais da proteína de interesse no *pool* total de proteínas. Portanto, para a quantificação das proteínas hF(ab')<sub>2</sub> foram utilizados métodos imunoquímicos utilizando anticorpos específicos ligantes à hF(ab')<sub>2</sub>. Como padrões foram realizadas diluições seriadas de massas conhecidas de IgG Humana pura. Analogamente à ensaios do tipo ELISA, tais padrões foram sondados por anticorpos. Tendo por base a absorbância média das diluições seriadas realizadas em triplicata, uma linha de tendência foi traçada e sua equação com o valor de R<sup>2</sup> calculados (Figura 25).



**Figura 25. Linha de tendência sobre os pontos da quantificação por ELISA de IgG Humana comercial em quantidades conhecidas.** A partir da função do gráfico foi realizada a aferição das concentrações de fragmentos hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 presentes nas amostras purificadas por IMAC.

Concomitante aos padrões de IgG Humana, triplicatas de amostras purificadas de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 foram diluídas de forma seriada para cálculo posterior de suas concentrações a partir dos padrões. A absorbância a 405nm do ponto mediano dos dados relativos ao fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 (Tabela 2) foi selecionado para o cálculo do par ordenado massa-absorbância.

**Tabela 2. Modelo de quantificação das amostras de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 purificadas.**

Massa adicionada	Absorbâncias* (405nm)	Desvio-padrão
m	0,378	0,030
m/3	0,227	0,017
m/9	0,147	0,004
m/27	0,122	0,005
m/81	0,104	0,001
m/243	0,101	0,002

\* Valores representam a diferença entre as médias dos valores medidos e a absorbância do poço controle (PBS).

A partir de cálculos de quantificação, apresentados em Métodos, sobre equação apresentada na quantificação dos padrões conhecidos de IgG Humana (Figura 25) foi possível concluir que a concentração final do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-

CD3 presente nas amostras após as purificações é de aproximadamente 20 µg/mL, perfazendo um total de 100ug de proteínas recombinantes purificadas.

De modo a conhecer o nível de impurezas presentes nas amostras purificadas foi realizada uma quantificação por método colorimétrico com BCA. Tal técnica, por ser sensível à ligações peptídicas e a macroestrutura de proteínas, permite inferir o grau de pureza das amostras a serem utilizadas em ensaios posteriores de ligação direta e competição ao sítio ligante, além de guiar o processo de otimização da purificação do sobrenadante de cultura.

As concentrações obtidas por esse método, para as mesmas amostras purificadas correspondiam à valores superiores àqueles obtidos por ELISA, indicando que há impurezas que podem afetar ensaios de ligação posteriores. Para tanto, foi realizada a análise do perfil de migração, em gel de poliacrilamida, das proteínas presentes nas amostras.

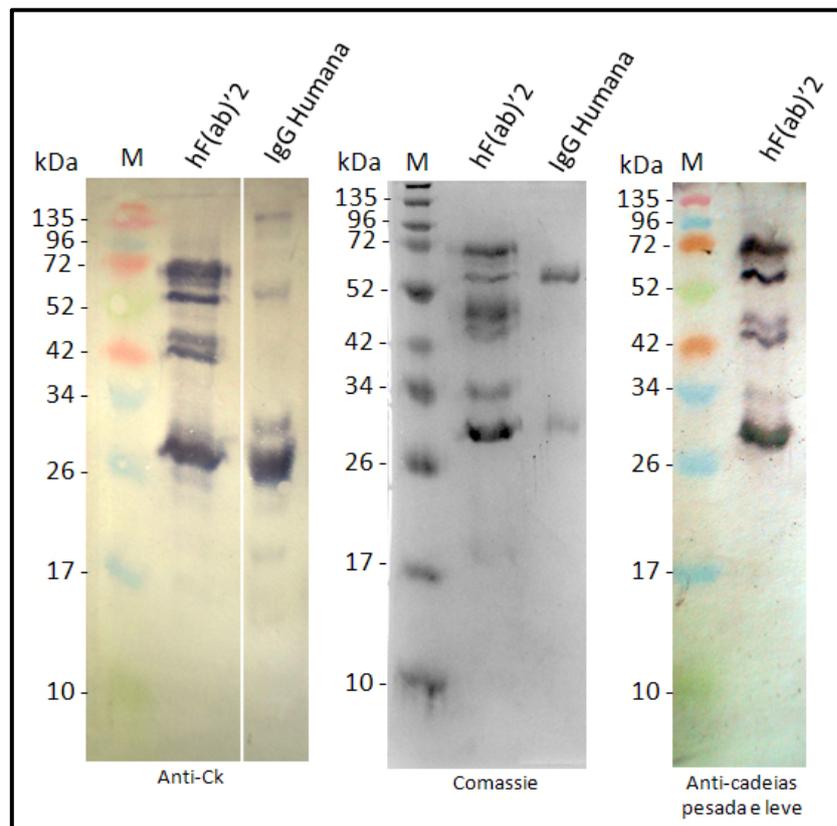
### 3.8. Análise das purificações de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 por SDS-PAGE e *Western blot*

A análise comparativa em SDS-PAGE e *Western blot* foi efetuada para avaliar a pureza das amostras e a integridade dos anticorpos produzidos. O resultado observado no gel, com agente redutor, corado com *Comassie* evidencia certo grau de pureza das proteínas, embora ainda apresente contaminantes perceptíveis, que não são revelados no *Western blot* (Figura 26), e que podem estar relacionados com o alto valor calculado na quantificação por BCA. Entretanto, ainda foi possível observar uma prevalência de fragmentos de massa aparente correspondente à massa predita. O resultado do *Western blot*, quando comparado ao SDS-PAGE, confirma a presença dos hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3. Entretanto, o número de fragmentos de outras massas moleculares foi superior ao esperado. Em migração em gel com agente redutor presente, foram notados cinco fragmentos de maior intensidade apresentando massas moleculares aparentes que podem estar relacionados à possíveis configurações de cadeias para as proteínas recombinantes (Figura 27).

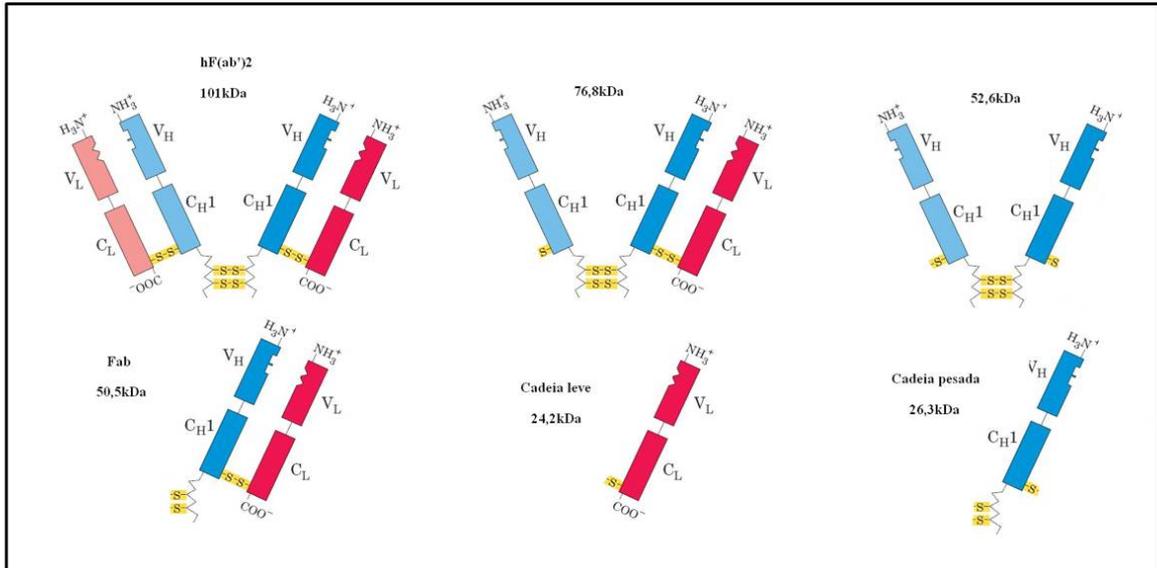
O não processamento do sítio de clivagem reconhecido por KEX (Figura 16) e do peptídeo sinal do Fator α (sinalização para exportação) presentes na sequência codificadora da proteína recombinante também podem ser responsáveis por

algumas das configurações observadas visto que o cassete de expressão não processado por KEX apresenta produto final em torno de 54 kDa de massa teórica.

A presença de um sítio de N-glicosilação na porção relativa ao domínio VH (Figura 10) pode estar alterando significativamente a massa aparente das cadeias polipeptídicas devido à adição de cadeias de carboidratos às primieras. Esta glicosilação não ocorre de modo constante, a adição incompleta dos resíduos acarreta variantes que resultam em moléculas com massas moleculares distintas e impossíveis de previsão precisa. O uso de enzimas que clivam tais glicosilações permitiriam a retirada das cadeias polissacarídicas resultando em um perfil de migração uniforme da proteína, composta agora apenas por seus aminoácidos.

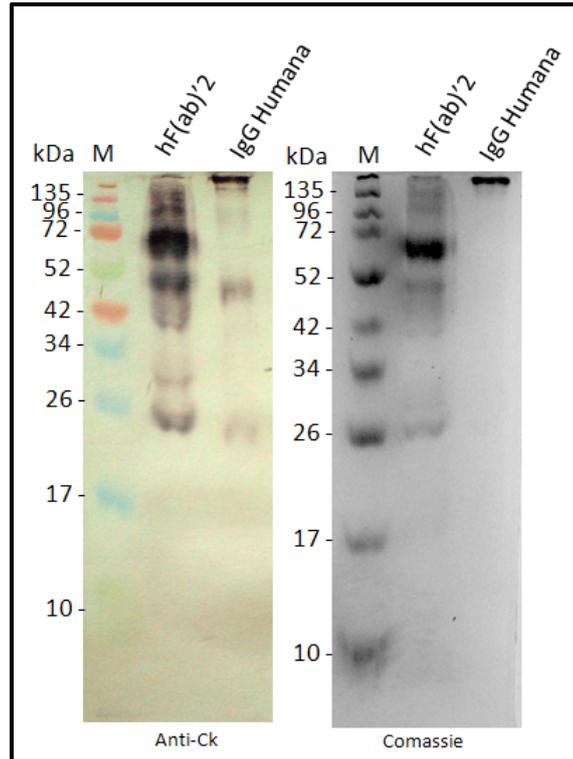


**Figura 26. Análise por SDS-PAGE e *Western blot* da purificação do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC, em condições redutoras.** Logo após o procedimento de purificações, as amostras foram concentradas e dialisadas com PBS sendo submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% com agente redutor betamercaptoetanol. Podemos observar a presença de uma banda com massa molecular aparente próxima a 26 kDa que, comparadas ao perfil de migração da IgG Humana comercial, equivalem às cadeias leve e pesada dissociadas. Fragmentos de massa molecular aparente próxima a 42 kDa não ocorrem no perfil da IgG Humana.



**Figura 27. Possíveis configurações de cadeias do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 por reduções incompletas ou reoxidações das pontes dissulfeto.** As massas moleculares são teóricas e calculadas a partir da soma das massas individuais dos aminoácidos que compõem cada domínio do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.

Dentre as bandas observadas em gel não redutor (Figura 28), foi possível identificar um fragmento com massa aproximada de 50 kDa, correspondente ao Fab. O fragmento com massa aparente próxima a 25 kDa é, provavelmente, composto pela sobreposição dos domínios da cadeia pesada (CH1-VH) com a cadeia leve (CL-VL), fato que justifica sua alta intensidade no gel redutor, comparável com aquela vista pela redução da IgG Humana no *Western blot* (Figura 26).



**Figura 28. Análise por SDS-PAGE e *Western blot* da purificação do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 por IMAC, em condições não-redutoras.** Logo após o procedimento de purificações, as amostras foram concentradas e dialisadas com PBS sendo submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12% sem agentes redutores. Podemos observar que a intensidade da banda com massa molecular aparente próxima a 26 kDa apresenta-se diminuída quando comparada com a migração em condições redutoras. Fato que pode representar a manutenção das pontes dissulfeto entre cadeias. A IgG Humana, por apresentar tamanho superior a 150 kDa, e não estar reduzida, não adentrou o gel.

Apesar de apresentarem-se dissociados, em sua maior parte, os domínios da cadeia leve e pesada parecem estar parcialmente reduzidos gerando conformações intermediárias. Para identificar se a cadeia leve participa das bandas observadas, dois *Western blot* foram desenvolvidos com anticorpos primários diferentes: um anticorpo específico contra a constante leve (CL) e outro policlonal específico para cadeias pesadas e leve. (Figura 26). Não foram observadas diferenças significativas.

A redução das moléculas de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 foi parcial com a presença da cadeia leve em todas as bandas sondadas. Apesar da utilização do agente redutor betamercaptoetanol em concentrações padrão, este se demonstrou ineficiente em dissociar os domínios que compõe o fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3. Além disso, os limites impostos pela resolução do gel permitem apenas especular sobre suas possíveis composições. A utilização de outros agentes redutores como o DTT,

associada a testes que avaliem suas concentrações efetivas devem ser realizados posteriormente.

Em SDS-PAGE e *Western blot* sem agentes redutores, partindo da mesma carga molar e mesmos tempos de incubação e revelação, o fragmento de massa próxima a 25 kDa perdeu intensidade quando comparado ao gel em condições redutoras. Tal efeito foi em virtude da manutenção das pontes dissulfeto entre as cadeias, o que aumentou a massa aparente da molécula. Um fragmento de massa próxima a 70 kDa teve sua intensidade comparada aumentada; outra entre 100 kDa foi observada apenas nessas condições não redutoras, sugerindo a presença de fragmentos hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 não reduzidos (Figura 26 e 28).

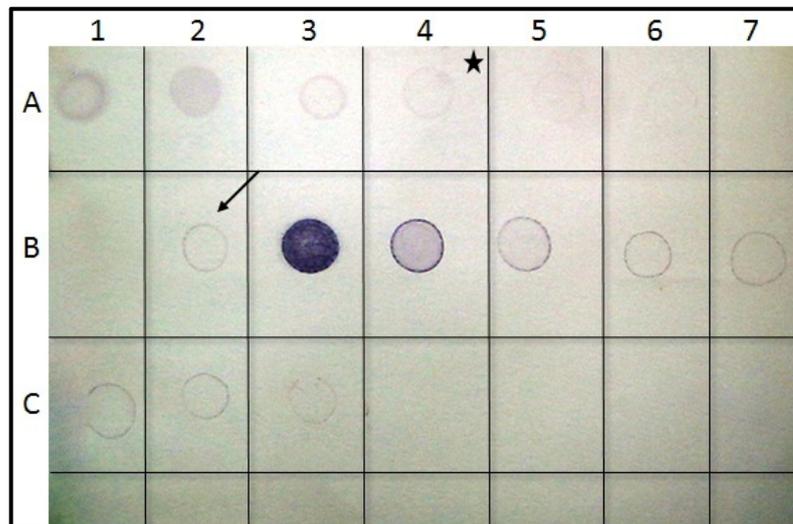
Comparando as amostras analisadas com a IgG humana utilizada como padrão dos géis, redutor e não redutor, apenas os fragmentos em torno de 40 kDa e 70 kDa não foram reativos no *Western blot* embora não estejam presentes como fragmentos perceptíveis em coloração com *Comassie*.

### 3.9. Expressão do peptídeo CD3εγ em *E. coli*

Para os ensaios de ligação direta, tornou-se necessária a obtenção do antígeno ao qual os anticorpos recombinantes produzidos neste trabalho se ligam especificamente. O antígeno recombinante CD3 constitui-se de um polipeptídeo de cadeia única onde as subunidades εγ estão ligadas por um conector polipeptídico de 26 resíduos de aminoácidos, que une as extremidades carboxi-terminal do CD3γ e amino-terminal do CD3ε (Kjer-Nielsen, Dunstone *et al.*, 2004). O rCD3 foi obtido pela expressão em *E. coli* de um gene sintético clonado no vetor pGS-21a. Este induz a síntese de um polipeptídeo de 56 kDa fusionado à GST e flanqueado por duas caudas HIS6. (Oliveira, 2009). Após transformação de linhagem celular BL21 pLys E, foi realizada a expressão da proteína recombinante e as análises das produções foram sondadas com o anticorpos anti-GST, anti-HIS e anti-CD3 (OKT3) em imunoenaios tipo *Dot blot*. Depois de bloqueadas, membranas foram incubadas com três anticorpos distintos para análise da integridade do peptídeo CD3εγ, suas caudas HIS6 e a presença da fusão GST. Após a ruptura da membrana plasmática e parede celular, amostras da fração solúvel e insolúvel foram analisadas. Em análises de intensidade comparada em *Dot blot* com o uso dos três

anticorpos citados, o anti-GST apresentou maior sinal e o anti-CD3, o menor. Apesar de estarem presentes na fração solúvel, os antígenos CD3 também co-localizavam na fração insolúvel, provavelmente devido a formação de corpos de inclusão.

A partir da confirmação da produção, os sobrenadantes foram purificados por IMAC em coluna de Níquel com frações eluídas analisadas por *Dot blot* utilizando como sonda o anti-GST. Frações eluídas foram concentradas e dialisadas em PBS sendo quantificadas por BCA para iniciar os imunoenaios de ligação direta.

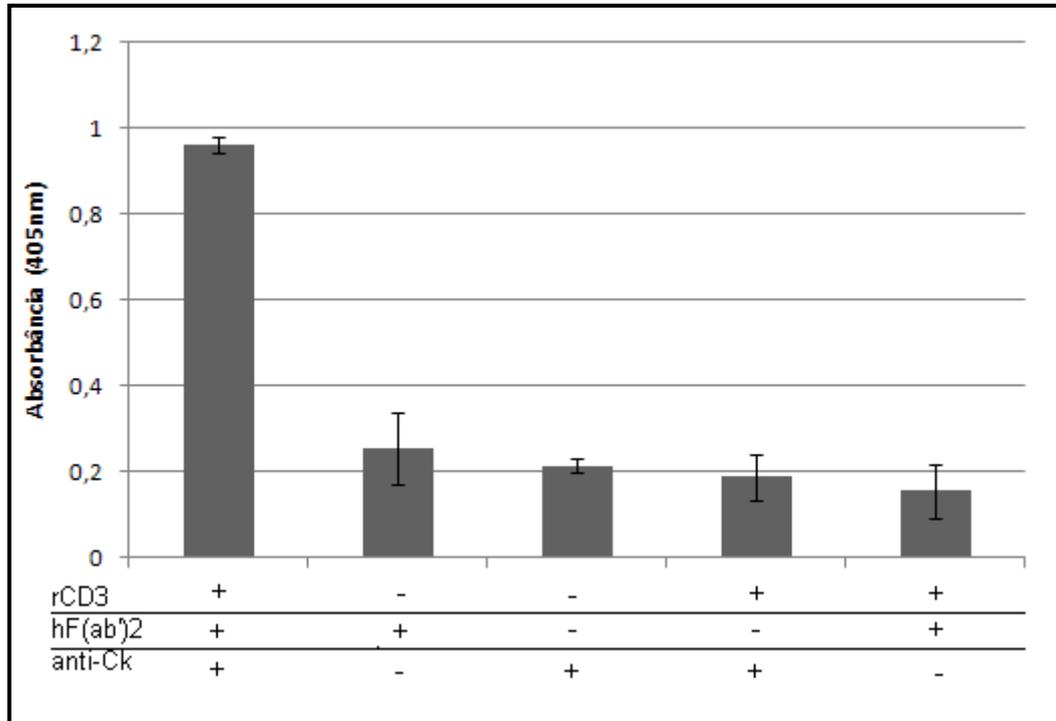


**Figura 29. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do antígeno rCD3 por *Dot blot*.** Após o processo de indução, a fração solúvel foi filtrada e purificada repetidamente por IMAC em coluna HiTrap™ HisTrap HP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences). Estrela representa início do processo de lavagem após aplicação da fração solúvel. Para revelação foram utilizados IgG cabra anti-GST seguida de IgG coelho anti-IgG cabra conjugado com fosfatase alcalina. Amostras relativas aos dois pontos subseqüentes ao início da eluição foram dialisadas, concentradas e quantificadas para os imunoenaios de ligação direta.

### 3.10. Imunoenaios de Ligação Direta – ELISA

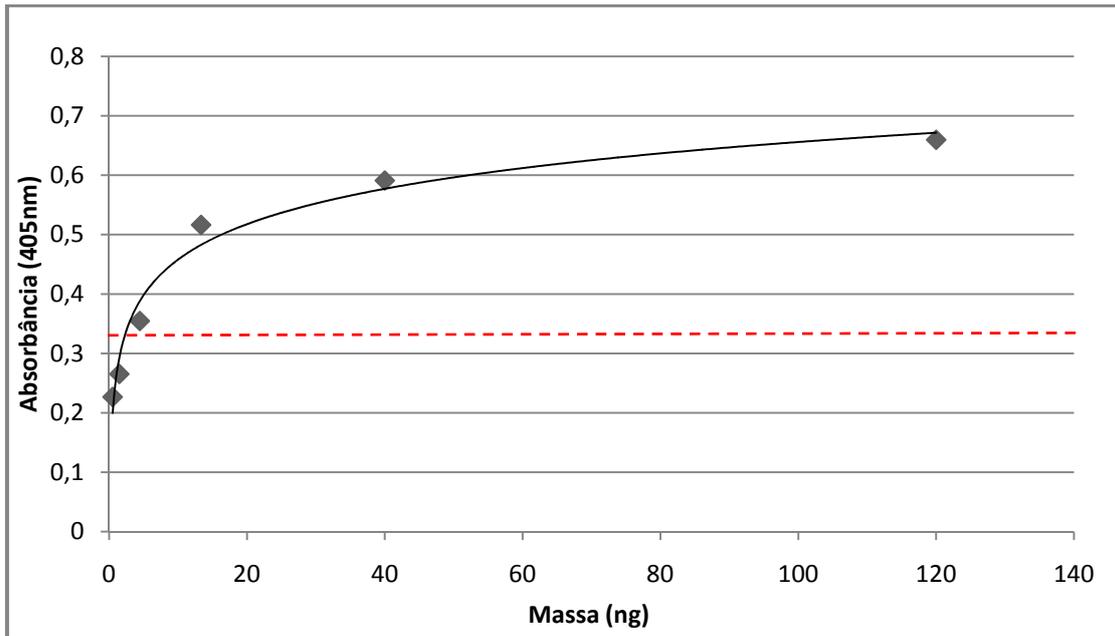
O ensaio de ligação direta foi realizado imobilizando-se o peptídeo CD3 (rCD3), produzido em *E. coli*, e purificado por IMAC, em placa de microtitulação seguindo-se procedimentos descritos em Materiais e Métodos. Como controles negativos foram utilizados, em triplicata, poços: contendo apenas PBS, não sensibilizados com rCD3, não incubados com anticorpo primário, não incubados com hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3. Os controles sofreram os mesmos tratamentos que os poços-teste, exceto que quando não incubados com determinada solução, a mesma era substituída por PBS. Tendo em vista os dados obtidos pelo teste imunoenzimático

(Figura 30), percebe-se a que a atividade ligante do fragmento hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 ocorre em presença do rCD3 eximindo os anticorpos primário e secundário do alto sinal apresentado pela presença do anticorpo hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3.



**Figura 30. Absorbâncias médias da análise qualitativa da ligação do hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 ao rCD3 por ELISA.** Poços, em triplicata, foram sensibilizados com 100ng de rCD3, bloqueados e adicionados de 100ng de hF(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 purificado. O bloqueio se deu com o uso de leite em pó desnatado a 5% em PBS. Para a revelação foram utilizados IgG de cabra anti-Ck Humano e IgG de coelho anti-IgG de cabra conjugado à fosfatase alcalina como anticorpos primário e secundário em diluições de 1:5000 e 1:2500 respectivamente.

Em um segundo ensaio, o fragmento hF(ab')<sub>2</sub> apresentou atividade ligante ao rCD3 dependente do aumento da massa de hF(ab')<sub>2</sub>. Massas superiores a 10ng de hF(ab')<sub>2</sub> apresentaram resposta de ligação ao rCD3 visivelmente acima do limiar máximo obtido pelos controles negativos. (Figura 31)

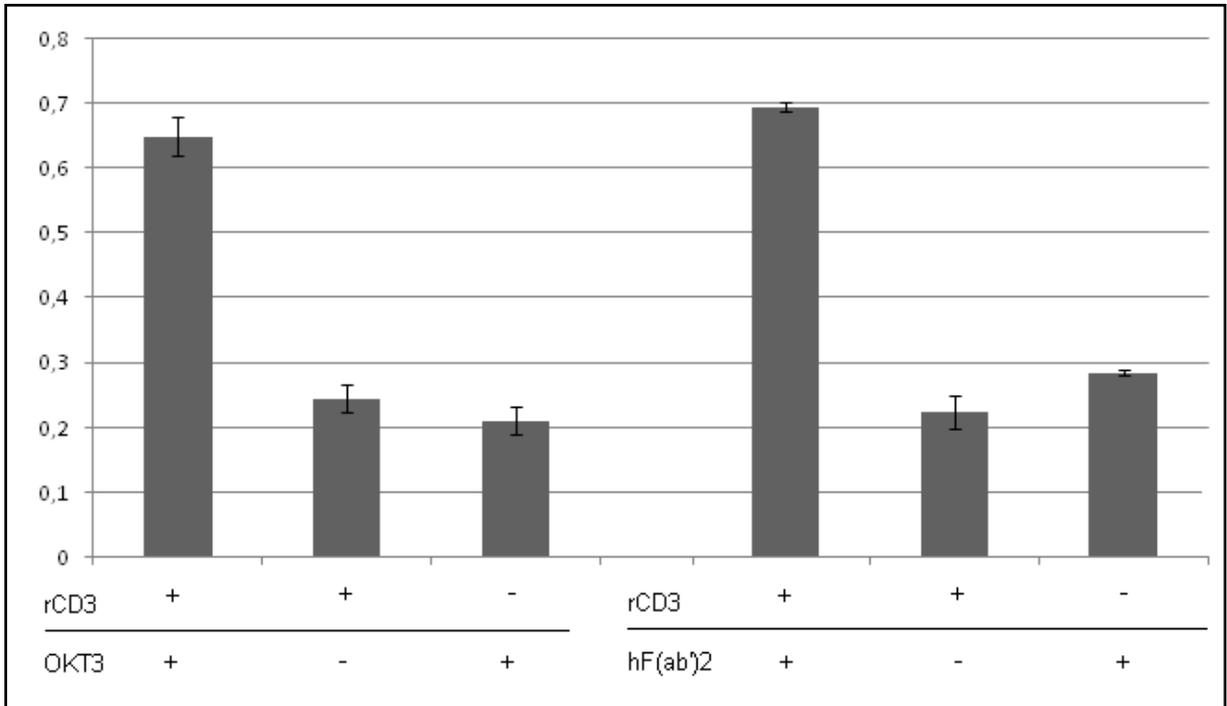


**Figura 31. Imunoensaio de ligação direta ao rCD3 pelo fragmento bivalente hF(ab')2.** Uma placa de microtitulação foi sensibilizada com rCD3 (100ng), bloqueada com 3% BSA e incubada com hF(ab')2 purificado, em diferentes quantidades. Os pontos no gráfico representam a absorvância média de triplicatas. A linha tracejada indica a maior linha de base obtida nos controles negativos: poços sensibilizados com rCD3 mas não incubados com hF(ab')2. A reação colorimétrica foi visualizada por solução de pNPP a 2 mg/mL. A proteína de interesse foi detectada com o anticorpo de anti-Ck humano feito em cabra, seguido de anti-IgG de cabra conjugado a fosfatase alcalina feito em coelho, ambos em diluições 1:5000

De forma a comparar a ligação entre o hF(ab')2 e o mAb OKT3, foi realizado um ensaio de ligação direta. Neste ensaio, os poços foram sensibilizados com a mesma carga (100ng) de rCD3 produzido em *E. coli* e com cargas também idênticas de proteínas totais de hF(ab')2 e de OKT3 (1000ng) tendo por base quantificações realizadas por BCA. Ressalvando o fato do OKT3 utilizado ter grau de pureza superior ao fragmento hF(ab')2 produzido neste trabalho, esse mAb completo possui estrutura cerca de 1/3 superior aos hF(ab')2 o que denota que, para as mesmas massas aplicadas, mantendo níveis de purezas semelhantes, o número de partículas hF(ab')2 será cerca de 1/3 superior àquele do OKT3. As absorvâncias superiores de hF(ab')2 quando comparadas com as observadas para o OKT3 (Figura 32) não indicam, *a priori*, maior afinidade ou especificidade da construção hF(ab')2 pelo rCD3 em comparação com o OKT3 haja vista as diferenças entre suas massas moleculares e o uso de diferentes anticorpos primário e secundário para as revelações do ELISA.

A ligação do hF(ab')2 ao rCD3 observada em ensaios anteriores é decorrente da afinidade desse anticorpo recombinante ao peptídeo rCD3, visto que o mesmo

padrão de sinal é percebido quando em presença de OKT3 (Figura 32), nosso controle positivo.



**Figura 32. Imunoensaio enzimático de ligação direta ao rCD3 comparando o hF(ab')2 com o OKT3 comercial.** A mesma massa (1 µg) de proteínas totais de OKT3 comercial e hF(ab')2 foram testadas quanto às suas capacidades de ligação à 100ng de rCD3 imobilizado na placa. Para revelação relativa ao fragmento hF(ab')2 foi utilizado anticorpo anti-Ck humano feito em cabra, seguido de anti-IgG de cabra conjugado a fosfatase alcalina feito em coelho, ambos em diluições 1:5000. Para aquela relativa ao mAb OKT3; e anti-IgG de camundongo feito em Cabra conjugado com fosfatase alcalina 1:5000, para a revelação de OKT3. O *background* deve-se ao PnPP, agente usado para revelação, a 2 mg/mL.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

---

Anticorpos anti-CD3 específicos são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterápicos que induzem a tolerância por meio de sua capacidade de induzir células T imunomoduladoras. Seus efeitos podem fornecer um tratamento para auto-imunidades estabelecidas e permitir maior sobrevida de enxertos. A capacidade inerente aos anticorpos anti-CD3 de se ligarem à molécula do antígeno de superfície CD3, parte constituinte do complexo receptor de célula T (TCR), surge como de fundamental importância para a resposta imune adaptativa, responsável pelo reconhecimento de peptídeos e permite mediar uma imunossupressão ativa, um mecanismo central para explicar suas propriedades tolerogênicas.

No presente trabalho foram obtidos vetores de expressão em *P. pastoris* contendo sequências codificadoras de: (1) anticorpo recombinante anti-CD3 hemi-humanizado (VL murino e VH humanizado); (2) anticorpo recombinante anti-CD3 hemi-humanizado mutante Ala297Asn, sítio canônico de N-glicosilação na porção Fc de imunoglobulinas; (3) fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 hemi-humanizado; e (4) fragmento F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 totalmente humanizado. As proteínas recombinantes foram produzidas e purificadas em processos de cromatografia de afinidade específicos.

Os anticorpos completos produzidos em fermentações em frasco demonstraram níveis maiores de degradação quando comparados com fermentações dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> sob mesmas condições. Resultados anteriores do grupo apresentam fragmentos do tipo FvFc que sofrem degradação, e outros fragmentos FvFc que continuam intactos. Tal fato deve-se às diferenças de sequência das regiões, característica será estudada comparativamente de modo a solucionar esse revés.

Alguns confôrmeros foram observados em análises de perfil de migração em SDS-PAGE dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> produzidos. A partir dos dados relatados acreditamos que o processo de redução das pontes dissulfeto foi parcial, permitindo suas. Estudos adicionais com o uso de agentes alquilantes devem ser realizados de modo a inibir a reoxidação das pontes permitindo auxiliando as análises das conformações majoritárias desses fragmentos.

As concentrações de anticorpos recombinantes hF(ab')<sub>2</sub> obtidas em fermentações em frasco com aletas de 1L permitem a obtenção de maior massa protéica. Com isso, torna-se possível a realização de outros ensaios como citometria de fluxo (FACS) ou de competição ao sítio ligante. Entretanto, observamos que as etapas de purificação precisam ser otimizadas de modo a obtermos quantidades suficientemente puras para análises mais refinadas de conformação em ensaios de Dicroísmo Circular ou BiaCore, inclusive para análises comparativas em ensaios de competição em FACS. Portanto, o fator limitante para tais análises encontra-se justamente na capacidade de purificação dessas proteínas recombinantes produzidas em leveduras.

A ausência do domínio Fc nos fragmentos de imunoglobulinas produzidos parece estar relacionada a dois fatores não exclusivos: o alto nível de degradação da rIgG, a retenção intracelular de proteínas mal-dobradas. De acordo com a literatura pesquisada, o domínio CH1 pode participar dificultando a secreção das proteínas caso não se acople corretamente ao domínio CL no peptídeo nascente, esse dobramento incorreto obriga a retenção da molécula no retículo endoplasmático rugoso, que acaba por não ser secretada ou o sê-la sob formas truncadas.

Aparentemente, os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> não demonstraram ser degradados. Proteases específicas presentes no sobrenadante, ou intracelulares, podem ter sítio de clivagem presente no fragmento Fc não sendo inibidas por agentes como PMSF e EDTA.

A análise do perfil de glicosilação ficou prejudicada devido à degradação da IgG completa anti-CD3, visto que o sítio provável de glicosilação está presente na porção Fc da molécula. Entretanto, para análises e usos clínicos que não requeiram funções efectoras, ou que exijam um *clearance* rápido ou até mesmo uma permeabilidade tissular aumentada, a utilização de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> pode ser realizada sem prejuízos.

A partir dos resultados apresentados, são propostos ensaios como (1) ligação direta dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-CD3 humanizados ao antígeno CD3 presente na membrana de PBMC a ser realizada por meio de Citometria de Fluxo de modo a confrontar com os dados obtidos nos ensaios em placa de microtitulação; (2) uso de agentes alquilantes no processo de redução dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> durante análises do perfil de migração em SDS-PAGE em condições redutoras; (3) análise

da presença de proteínas recombinantes retidas no ambiente intracelular de *P. pastoris* por meio de lise celular; (4) purificação dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> por meio de cromatografia de exclusão molecular em HPLC com posterior análise usando anticorpos específicos para cadeia leve, pesada e fragmento Fc; (5) comparação das sequências peptídicas das regiões Fc de anticorpos não degradados com a sequência da IgG anti-CD3 produzida; (6) ensaios de competição ao sítio ligante *in vitro*, comparando contra outros anticorpos comerciais anti-CD3 humano.

Ultrapassadas as etapas de otimização de purificação, o cassete de expressão do F(ab')<sub>2</sub> humanizado poderá ser utilizado para a produção de fragmentos de anticorpos em experimentos de imunomodulação desde que sua imunogenicidade teoricamente reduzida pelo processo de humanização total seja devidamente testada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Alarcon, B., D. Gil, P. Delgado e W. W. Schamel. Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. Immunol Rev, v.191, Feb, p.38-46. 2003.
- Alt, F. W., A. L. Bothwell, M. Knapp, E. Siden, E. Mather, M. Koshland e D. Baltimore. Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. Cell, v.20, n.2, Jun, p.293-301. 1980.
- Amzel, L. M. e R. J. Poljak. Three-dimensional structure of immunoglobulins. Annu Rev Biochem, v.48, p.961-97. 1979.
- Andrade, E. V., F. C. Albuquerque, L. M. Moraes, M. M. Brigido e M. A. Santos-Silva. Single-chain Fv with Fc fragment of the human IgG1 tag: construction, *Pichia pastoris* expression and antigen binding characterization. J Biochem, v.128, n.6, Dec, p.891-5. 2000.
- Belghith, M., J. A. Bluestone, S. Barriot, J. Megret, J. F. Bach e L. Chatenoud. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. Nat Med, v.9, n.9, Sep, p.1202-8. 2003.
- Berkhout, B., B. Alarcon e C. Terhorst. Transfection of genes encoding the T cell receptor-associated CD3 complex into COS cells results in assembly of the macromolecular structure. J Biol Chem, v.263, n.17, Jun 15, p.8528-36. 1988.
- Better, M., C. P. Chang, R. R. Robinson e A. H. Horwitz. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. Science, v.240, n.4855, May 20, p.1041-3. 1988.
- Bird, R. E. e B. W. Walker. Single chain antibody variable regions. Trends Biotechnol, v.9, n.4, Apr, p.132-7. 1991.
- Bisikirska, B., J. Colgan, J. Luban, J. A. Bluestone e K. C. Herold. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. J Clin Invest, v.115, n.10, Oct, p.2904-13. 2005.
- Blazar, B. R., M. K. Jenkins, P. A. Taylor, J. White, A. Panoskaltis-Mortari, R. Korngold e D. A. Vallera. Anti-CD3 epsilon F(ab')<sub>2</sub> fragments inhibit T cell expansion in vivo during graft-versus-host disease or the primary immune response to nominal antigen. J Immunol, v.159, n.12, Dec 15, p.5821-33. 1997.
- Blumberg, R. S., S. Ley, J. Sancho, N. Lonberg, E. Lacy, F. Mcdermott, V. Schad, J. L. Greenstein e C. Terhorst. Structure of the T-cell antigen receptor: evidence for two CD3 epsilon subunits in the T-cell receptor-CD3 complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.18, Sep, p.7220-4. 1990.
- Burtet, R. T., M. A. Santos-Silva, G. A. Buss, L. M. Moraes, A. Q. Maranhao e M. M. Brigido. Production of a recombinant Fab in *Pichia pastoris* from a Monocistronic expression vector. J Biochem, v.142, n.6, Dec, p.665-9. 2007.
- Caldas, C., V. Coelho, J. Kalil, A. M. Moro, A. Q. Maranhao e M. M. Brigido. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. Mol Immunol, v.39, n.15, May, p.941-52. 2003.
- Call, M. E., J. Pyrdol, M. Wiedmann e K. W. Wucherpfennig. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. Cell, v.111, n.7, Dec 27, p.967-79. 2002.
- Cereghino, J. L. e J. M. Cregg. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, v.24, n.1, Jan, p.45-66. 2000.

- Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nat Rev Immunol, v.3, n.2, Feb, p.123-32. 2003.
- Chothia, C., A. M. Lesk, A. Tramontano, M. Levitt, S. J. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. A. Padlan, D. Davies, W. R. Tulip e Et Al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature, v.342, n.6252, Dec 21-28, p.877-83. 1989.
- Cosimi, A. B., R. C. Burton, R. B. Colvin, G. Goldstein, F. L. Delmonico, M. P. Laquaglia, N. Tolkoff-Rubin, R. H. Rubin, J. T. Herrin e P. S. Russell. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. Transplantation, v.32, n.6, Dec, p.535-9. 1981.
- Costa, P. L. N. Caracterização da atividade ligante de domínios variáveis humanizados de um anticorpo anti-CD3 humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick e W. C. Raschke. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y), v.11, n.8, Aug, p.905-10. 1993.
- Daly, R. e M. T. Hearn. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit, v.18, n.2, Mar-Apr, p.119-38. 2005.
- Davis, M. M. e P. J. Bjorkman. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature, v.334, n.6181, Aug 4, p.395-402. 1988.
- Davis, S. J., S. Ikemizu, E. J. Evans, L. Fugger, T. R. Bakker e P. A. Van Der Merwe. The nature of molecular recognition by T cells. Nat Immunol, v.4, n.3, Mar, p.217-24. 2003.
- Edelman, G. M. The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. XI. Functional implications. Biochemistry, v.9, n.16, Aug 4, p.3197-205. 1970.
- Exley, M., C. Terhorst e T. Wileman. Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen. Semin Immunol, v.3, n.5, Sep, p.283-97. 1991.
- Exley, M., T. Wileman, B. Mueller e C. Terhorst. Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex. Mol Immunol, v.32, n.11, Aug, p.829-39. 1995.
- Fonseca, A. S. D. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2000.
- Groupomts. A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. Ortho Multicenter Transplant Study Group. N Engl J Med, v.313, n.6, Aug 8, p.337-42. 1985.
- Hakim, R. e I. Benhar. "Inclonals": IgGs and IgG-enzyme fusion proteins produced in an *E. coli* expression-refolding system. MAbs, v.1, n.3, May, p.281-7. 2009.
- Holliger, P. e P. J. Hudson. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol, v.23, n.9, Sep, p.1126-36. 2005.
- Hughes, C., J. A. Wolos, E. H. Giannini e R. Hirsch. Induction of T helper cell hyporesponsiveness in an experimental model of autoimmunity by using nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody. J Immunol, v.153, n.7, Oct 1, p.3319-25. 1994.
- Hwang, W. Y. e J. Foote. Immunogenicity of engineered antibodies. Methods, v.36, n.1, May, p.3-10. 2005.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. e Shlomchik, M. Immunobiology. New York and London: Garland Publishing. 2001

Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger e G. Winter. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature, v.321, n.6069, May 29-Jun 4, p.522-5. 1986.

Kabat, E. A. Antibody diversity versus antibody complementarity. Pharmacol Rev, v.34, n.1, Mar, p.23-38. 1982.

Kjer-Nielsen, L., M. A. Dunstone, L. Kostenko, L. K. Ely, T. Beddoe, N. A. Mifsud, A. W. Purcell, A. G. Brooks, J. McCluskey e J. Rossjohn. Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.20, May 18, p.7675-80. 2004.

Kohler, G. e C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, v.256, n.5517, Aug 7, p.495-7. 1975.

Kohm, A. P., J. S. Williams, A. L. Bickford, J. S. McMahon, L. Chatenoud, J. F. Bach, J. A. Bluestone e S. D. Miller. Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol, v.174, n.8, Apr 15, p.4525-34. 2005.

Lazar, G. A., J. R. Desjarlais, J. Jacinto, S. Karki e P. W. Hammond. A molecular immunology approach to antibody humanization and functional optimization. Mol Immunol, v.44, n.8, Mar, p.1986-98. 2007.

Li, B., H. Wang, J. Dai, J. Ji, W. Qian, D. Zhang, S. Hou e Y. Guo. Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. Immunology, v.116, n.4, Dec, p.487-98. 2005.

Mackenzie, P., Q. U. Kamili, A. Menter e B. Cooper. Lymphoma and immunosuppression: a report of a case associated with efalizumab therapy. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, v.10, n.1, Feb, p.E14-6. 2010.

Maranhão, A. Q. e Brigido, M. M. Anticorpos Humanizados. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, v.IV. 2001.

Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg e V. T. Oi. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.21, Nov, p.6851-5. 1984.

Nicolls, M. R., G. G. Aversa, N. W. Pearce, A. Spinelli, M. F. Berger, K. E. Gurley e B. M. Hall. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. Transplantation, v.55, n.3, Mar, p.459-68. 1993.

Padlan, E. A. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol Immunol, v.28, n.4-5, Apr-May, p.489-98. 1991.

Plain, K. M., J. Chen, S. Merten, X. Y. He e B. M. Hall. Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. Transplantation, v.67, n.4, Feb 27, p.605-13. 1999.

Porter, R. R. The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem J, v.73, Sep, p.119-26. 1959.

Silva, H.M., Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti-CD3 Humano. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Silva, H. M., P. M. Vieira, P. L. Costa, B. M. Pimentel, A. M. Moro, J. Kalil, A. Q. Maranhao, V. Coelho e M. M. Brigido. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. Immunol Lett, v.125, n.2, Aug 15, p.129-36. 2009.

Simi, K.C.R., Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos (FABs) anti-HIV-1 em *Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

Smith, J. A., Q. Tang e J. A. Bluestone. Partial TCR signals delivered by FcR-nonbinding anti-CD3 monoclonal antibodies differentially regulate individual Th subsets. J Immunol, v.160, n.10, May 15, p.4841-9. 1998.

Stasi, R., A. Pagano, E. Stipa e S. Amadori. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood, v.98, n.4, Aug 15, p.952-7. 2001.

Stiehm, E. R., J. P. Vaerman e H. H. Fudenberg. Plasma infusions in immunologic deficiency states: metabolic and therapeutic studies. Blood, v.28, n.6, Dec, p.918-37. 1966.

Tan, P., D. A. Mitchell, T. N. Buss, M. A. Holmes, C. Anasetti e J. Foote. "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28. J Immunol, v.169, n.2, Jul 15, p.1119-25. 2002.

Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. Nature, v.302, n.5909, Apr 14, p.575-81. 1983.

Utset, T. O., J. A. Auger, D. Peace, R. A. Zivin, D. Xu, L. Jolliffe, M. L. Alegre, J. A. Bluestone e M. R. Clark. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. J Rheumatol, v.29, n.9, Sep, p.1907-13. 2002.

Vigeral, P., N. Chkoff, L. Chatenoud, H. Campos, M. Lacombe, D. Droz, G. Goldstein, J. F. Bach e H. Kreis. Prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney recipients. Utilization of OKT3 as the sole immunosuppressive agent. Transplantation, v.41, n.6, Jun, p.730-3. 1986.

Wang, B., N. Wang, M. Salio, A. Sharpe, D. Allen, J. She e C. Terhorst. Essential and partially overlapping role of CD3gamma and CD3delta for development of alphabeta and gammadelta T lymphocytes. J Exp Med, v.188, n.7, Oct 5, p.1375-80. 1998.

Weiss, A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. Annu Rev Genet, v.25, p.487-510. 1991.

Wu, S. e G. J. Letchworth. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. Biotechniques, v.36, n.1, Jan, p.152-4. 2004.

You, S., B. Leforban, C. Garcia, J. F. Bach, J. A. Bluestone e L. Chatenoud. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.15, Apr 10, p.6335-40. 2007.