



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

---

---

## **Estudo da Interação com o Antígeno de um Anticorpo Anti-CD3 humano**

**Janaína do Nascimento Lima Matias de Paula**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Brasília  
2012



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

## **Estudo da Interação com o Antígeno de um Anticorpo Anti-CD3 humano**

**Janaína do Nascimento Lima Matias de Paula**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor (a) em Biologia Molecular.

**Ficha Catalográfica**

De Paula, Janaína do Nascimento Lima Matias  
Estudo da Interação com o Antígeno de um Anticorpo Anti-CD3 humano  
[Brasília] 2012.  
xx, 117p. 210 mm.

- |                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| 1. Biologia Molecular     | 2. Imunologia Molecular |
| 3. Anti CD3 Humanizado    | 4. CD3 $\epsilon\gamma$ |
| 5. Expressão de Proteínas |                         |

**Referência Bibliográfica**

De Paula, J.N.L.M.; 2012. Estudo da Interação com o Antígeno de um Anticorpo Anti-CD3 humano [Brasília] 2012, Brasília, DF, 117p.

**Cessão de Direitos**

**Nome do Autor:** Janaína do N. Lima Matias de Paula

**Título:** Estudo da Interação com o Antígeno de um Anticorpo Anti-CD3 humano, 2012.

É permitida a reprodução desta tese desde que citado o autor e somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte deste texto pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Janaína do N. Lima Matias de Paula  
Janaína23@gmail.com  
Brasília-DF, 29 de fevereiro de 2012.

## **Banca Examinadora**

### **Membro Externo:**

**Dra. Natália Florêncio Martins – Embrapa/Cenargen**

### **Membros Internos:**

**Dra. Galina Gulis – UnB**

**Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira - UnB**

**Dr. Marciano Régis Rubini - UnB**

**Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido - UnB**

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

Brasília – DF  
2012

Meus queridos Beto, Diego, Giovanna e Larissa,  
Aqui no pórtico desta Tese – que Vocês quiseram bela – caiba a

HOMENAGEM

Mais merecida.

Amor. Gratidão. Amor.

Não sei dizer mais; nem é preciso.

Mas, Vocês mesmo, não sabem o quanto esse trabalho é de Vocês.

Janaína de Paula.

Brasília, 29-II-12.

A colheita é comum, mas o capinar é sozinho.

... O real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.

O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.

Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas.

... Mas a natureza da gente é muito segundas-e-sábados. Tem dia e tem noite.

Essa vida é de cabeça-para-baixo, ninguém pode medir suas perdas e colheitas.

Viver – não é? – é muito perigoso. Porque ainda não se sabe. Porque aprender-a-viver é que é o viver, mesmo.

... Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando. Afinam e desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou. Isso que me alegra, montão.

... Eu não sentia nada. Só uma transformação pesável. Muita coisa importante falta nome.

Agora... Tudo o que já foi, é o começo do que vai vir, toda a hora a gente está num cômputo... Viver é muito perigoso; e não é não. Nem sei explicar estas coisas. Um sentir é o do sentente, mas o outro é o do sentidor.

Mas... Somente com alegria é que a gente realiza bem – mesmo até as tristes ações...

E... No viver tudo cabe.

Com esses aforismos do nosso - do meu João Guimarães Rosa – no GS:V, penso nessa trajetória. Nonada. É o que eu digo, se for... Existe é homem humano. Travessia.



Janaína de Paula.  
Brasília, 29-II-12.

## Agradecimentos

Agradeço...

Aos órgãos financiadores.

À Universidade de Brasília, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Laboratório de Biologia Molecular.

À Doutoranda Kelly Simi pelo apoio nos modelos computacionais. Ao Doutorando Rafael Burtet pelo apoio nos ensinamentos de imunologia.

À Dra. Wanessa Carvalho pelo apoio, assistência e especial contribuição.

Pelo encaminhamento da pesquisa e orientação da Tese – agradeço – ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcelo Brígido e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Andrea Maranhão.

E aos demais, que de alguma forma contribuíram na elaboração desta Tese.

## Sumário

<b>Índice de Figuras</b>	xii
<b>Índice de Tabelas</b>	xiv
<b>Lista de Abreviaturas</b>	xv
<b>Resumo</b>	xix
<b>Abstract</b>	xx
<b>1. Introdução</b>	2
1.1 - Os Anticorpos	4
1.2 - Regiões determinantes de co-complementariedade (CDRs)	5
1.3 - Anticorpo anti-CD3	6
1.4 - Mecanismo de Ação do Anticorpo anti-CD3	10
1.5 - Anticorpos Humanizados	15
1.6 - Expressão Heteróloga de Anticorpos	19
1.7 - Anticorpos anti-CD3 e o Grupo de Imunologia Molecular da UnB	23
<b>2 – Objetivos</b>	29
2.1 - Objetivo Geral	29
2.2 - Objetivos Específicos	29
<b>3 - Materiais e Métodos</b>	25
3.1 - Materiais	31
3.1.1 - Células	31
3.1.2 - Plasmídios Utilizados	31
3.1.3 - Soluções Estoques de Inibidores de Proteases	32



3.1.4 - Iniciadores Utilizados para as Mutagêneses Sítio Dirigidas e Sequenciamento.	32
3.1.5 - Meios De Cultura E Soluções Para Bactérias	33
3.1.6 - Meios de Cultura e Soluções para Cultura de Células de Mamíferos Meio Ham-F12 com L-Glutamina a 2 mM	35
3.1.7 - Soluções e Tampões de Uso Geral	37
3.1.8 - Soluções e Material para Preparo de Células Competentes e Transformação Bacteriana	37
3.1.9 - Soluções para Extração de DNA Plasmidial	38
3.1.10 - Tampões de Endonucleases de Restrição	39
3.1.11 - Tampões de Outras Enzimas	39
3.1.12 - Soluções e Reagentes para Eletroforese	40
3.1.13 - Soluções para Coloração de Gel de Poliacrilamida	42
3.1.14 - Soluções e Materiais para os Ensaio Imunológicos	42
3.1.15 - Coluna de Cromatografia de Afinidade	43
3.1.16 - Soluções para Cromatografia de Afinidade	43
3.1.17 - Materiais para Concentração de Sobrenadantes de Cultura e Proteínas Purificadas e Diálise	44
3.1.18 - Marcadores Moleculares para DNA e Proteína	44
3.1.19 - Kits Comerciais	45
3.1.20 - Soluções e Materiais para os Experimentos com Citometria de Fluxo	45
3.1.21 - Soluções para Purificação de Anticorpos por Precipitação com Sulfato de Amônio	46
3.1.22 - Anticorpos	47
3.1.23 - Resinas Cromatográficas	48
3.1.24 - Soluções para Cromatografia	48

3.2- Métodos	49
3.2.1 - Preparação de DNA plasmidial	49
3.2.2 - Recuperação dos Fragmentos de PCR Gerados Contendo os anti-CD3 Humanizados com suas Respectivas Mutações	50
3.2.3 - Mutagênese Sítio Dirigida por PCR OverLap	51
3.2.4 - Digestão do DNA Plasmidial com Enzimas de Restrição	53
3.2.5 - Análise de DNA Plasmidial em Gel de Agarose	53
3.2.6 - Eluição de Fragmentos de DNA de Gel de Agarose	53
3.2.7 - Ligação de Fragmentos de DNA	54
3.2.8 - Preparação de Células Competentes e Transformação Bacteriana	54
3.2.9 - Sequenciamento Automático de DNA e Análise de Sequências	56
3.2.10 - Cultura de Células de Mamíferos	56
3.2.11 - Expressão dos FvFc com as Mutações de Interesse em CHO	58
3.2.12 - ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )	63
3.2.13 - Diálise do Sobrenadante de Cultura Utilizando Membrana de Alta Retenção	64
3.2.14 - Purificação dos FvFc Recombinados com as Mutações de Interesse por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Proteína A	64
3.2.15 - Análise de Proteínas por <i>Imuno Blot</i>	65
3.2.16 - Análise de Proteínas em SDS-PAGE	65
3.2.17 - Coloração do SDS-PAGE	66
3.2.18 - Análise de Proteínas por <i>Western Blot</i>	66
3.2.19 - Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico	67
3.2.20 - Reação de Imunofluorescência para FACS	68
3.2.21 - Leitura da Reação de FACS no Citômetro de Fluxo	69

3.2.22 - Precipitação dos Anticorpos com Sulfato de Amônio	69
3.2.23 - Expressão da Proteína Recombinante CD3 $\epsilon\gamma$ em BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysE	70
3.2.24 - Purificação das Proteínas Recombinantes – CD3 $\epsilon\gamma$ por Cromatografia de Afinidade com HisTrap <sup>TM</sup> FF	71
3.2.25 - Purificação das Proteínas Recombinantes – CD3 $\epsilon\gamma$ por Cromatografia de Afinidade com GSTrap <sup>TM</sup> HP	71
3.2.26 - Detecção de Proteínas com Reagente Bradford	72
<b>4 – Resultados e Discussão</b>	74
4.1 - Estudo Comparativo do Complexo OKT3-CD3	74
4.2 - Mutagênese Sítio Dirigida por PCR <i>OverLap</i>	76
4.3 - Detecção da Expressão e Secreção dos Anticorpos FvFc anti-CD3 Mutados no Sobrenadante de Cultura de CHO, em Diferentes Concentrações de Geneticina	79
4.4 - Padronização da Cromatografia de Afinidade em Coluna de Proteína A, para Purificação dos FvFc Mutados	82
4.5 - Ensaio de Ligação para Verificar a Atividade dos Anticorpos Humanizados Anti-CD3 Mutados, nas Células Monocucleares de Sangue Periférico Humano	92
4.6 - Expressão do CD3 $\epsilon\gamma$ no Vetor pGS21aCD3 $\epsilon\gamma$ em <i>E. Coli</i> e Purificação do Antígeno por Cromatografia de Afinidade	96
<b>5 – Conclusão e Perspectivas</b>	103
5.1 - Conclusão	103
5.2 - Perspectivas	104
<b>6 - Referências Bibliográficas</b>	106

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Representação esquemática de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos	5
<b>Figura 2.</b>	Gráfico de Kabat-Wu. Apresenta o nível de variabilidade de aminoácidos presentes nos domínios variáveis de cadeias leve de imunoglobulinas	6
<b>Figura 3.</b>	Propostas de mecanismos de ação de anticorpos monoclonais terapêuticos	12
<b>Figura 4.</b>	Diagrama esquemático do complexo receptor de células T (TCR)	13
<b>Figura 5.</b>	Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação do CD3 ao $\alpha\beta$ TCR	14
<b>Figura 6.</b>	Classificação de anticorpos terapêuticos	15
<b>Figura 7.</b>	Organograma do processo de humanização de anticorpos	17
<b>Figura 8.</b>	Mecanismo de ação do sítio interno de entrada ribossomal (IRES, do inglês, Internal Ribosome Entry Site) em um processo de tradução	22
<b>Figura 9.</b>	Estrutura do fragmento FvFc, a fração variável (Fv) de cadeia única é fusionada a fração constante (Fc) de uma IgG1	24
<b>Figura 10.</b>	Representação esquemática das mutagênese sítio dirigidas nos genes VH e VL do anticorpo FvFc RVL	52
<b>Figura 11.</b>	Representação esquemática do Plasmídeo pMIREs hCD3	59
<b>Figura 12.</b>	Alinhamento comparativo das cadeias VH do anticorpo OKT3 1SY6 e do anticorpo humanizado	74
<b>Figura 13.</b>	Alinhamento comparativo das cadeias VL do anticorpo OKT3 1SY6 e do anticorpo humanizado	75
<b>Figura 14.</b>	Amplificação dos VH e VL mutados por reação de PCR de overlap, na primeira fase	77
<b>Figura 15.</b>	Amplificação final dos VH e VL mutados por reação de PCR OverLap, na segunda fase	78

<b>Figura 16.</b>	Curva padrão IgG humana	80
<b>Figura 17.</b>	Expressão de anticorpos FvFc anti-CD3 mutados em CHO	81
<b>Figura 18.</b>	Análise das frações obtidas durante as cromatografias 1 e 2	86
<b>Figura 19.</b>	Análise das frações obtidas durante as cromatografias 3 e 4	87
<b>Figura 20.</b>	Análise das frações obtidas durante as cromatografias 5 e 6	88
<b>Figura 21.</b>	Análise comparativa das cromatografias realizadas em tampão de ligação NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM, pH 7.0, com e sem adição de NaCl e precipitadas com SAS	90
<b>Figura 22.</b>	SDS-PAGE 12% corado com <i>Comassie Brilliant Blue</i>	90
<b>Figura 23.</b>	Ensaio de ligação para localização da população de linfócitos T CD4 sobre células monocucleares de sangue periférico humano	92
<b>Figura 24.</b>	Ensaio de ligação para verificar atividade de anticorpos UCHT, OKT3 e RVL usados como controle positivos, sobre células monocucleares de sangue periférico humano	93
<b>Figura 25.</b>	Ensaio de ligação para verificar atividade de anticorpos humanizados sobre células monocucleares de sangue periférico humano com os anticorpos humanizados FvFc VHT7K e VLF70Y	94
<b>Figura 26.</b>	Ensaio de ligação para verificar atividade de anticorpos humanizados sobre células monocucleares de sangue periférico humano com os anticorpos humanizados FvFc VHS31R e VLL45R	95
<b>Figura 27.</b>	Análise da expressão antígeno CD3 $\epsilon\gamma$ e GST em SDS-PAGE 12%, e purificação a partir da fração solúvel, em GStrap™ HP	98
<b>Figura 28.</b>	Análise por <i>Imuno Blot</i> das frações obtidas durante o processo de expressão do CD3 $\epsilon\gamma$ e GST	99
<b>Figura 29.</b>	Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CD3 $\epsilon\gamma$ em BL21 DE03 plysE e purificação em coluna GStrap™ HP 1mL e HisTrap™ FF	101

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados pelos órgãos competentes (FDA) dos Estados Unidos e União Européia.	18
<b>Tabela 2.</b>	Microrganismos utilizados	31
<b>Tabela 3.</b>	Relação dos iniciadores utilizados para as mutagêneses sítio dirigidas e sequenciamento	33
<b>Tabela 4.</b>	Relação dos Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, Western Blot, imuno Blot e FACS	47
<b>Tabela 5.</b>	Representação dos dados obtidos durante a padronização das cromatografias	85
<b>Tabela 6.</b>	Intensidade Média de Fluorescência (MIF) em Ensaios de Ligação com as Diferentes Construções de Anticorpos AntiCD3	96

## Lista de Abreviaturas

<b>AICD</b>	Morte celular induzida por ativação
<b>Amp<sup>R</sup></b>	Gene de resistência à ampicilina ( $\beta$ -lactamase)
<b>Å</b>	Angstrom
<b>APS</b>	Persulfato de amônio
<b>AOXI</b>	Gene da álcool oxidase 1
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Cloro-indolil fosfato
<b>°C</b>	Graus Celcius
<b>CD</b>	Marcador de superfície celular ( <i>Cluster of differentiation</i> )
<b>cdNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CDR</b>	Região determinante de complementariedade
<b>CH</b>	Cadeia constante pesada de anticorpo
<b>CHO</b>	Células de ovário de hamster chinês
<b>CL</b>	Cadeia constante leve de anticorpo
<b>C</b>	Terminal Extremidade carboxi – terminal
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCC</b>	Citotoxicidade celular mediada por anticorpos
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água destilada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	Ensaio de ligação imunoenzimática
<b>Fab</b>	Fragmento (de anticorpo) de ligação ao antígeno
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activeted Cell Sorter</i>
<b>Fc</b>	Fragmento (de anticorpo) cristalizável (porção constante)
<b>FcR</b>	Receptor de Fc
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> (EUA)
<b>FITC</b>	Fluoresceína isotiocianato
<b>FL</b>	Fluorescência

<b>FR</b>	Arcabouço ( <i>Framework</i> )
<b>FSC</b>	Dispersão frontal ( <i>Forward scattering</i> )
<b>Fv</b>	Fragmento (do anticorpo) variável
<b>G</b>	Grama
<b>G</b>	Aceleração da gravidade
<b>H</b>	Hora
<b><i>His4</i></b>	Gene histidinol desidrogenase
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ITAM</b>	Motivos de ativação baseados no imunoreceptor tirosina
<b>ITIM</b>	Motivos de inibição baseados no imunoreceptor tirosina
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliampere
<b>mAb</b>	Anticorpo Monoclonal
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>Min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MM</b>	Massa Molecular
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>Ms</b>	Milisegundo
<b>NBT</b>	Nitro Blue Tetrazole
<b>Ng</b>	Nanograma
<b>OD</b>	densidade ótica
<b>OKT3</b>	Anticorpo monoclonal anti-CD3 clone OKT3
<b>Ori</b>	Origem de replicação



<b>P</b>	Peso
<b>Pb</b>	Par de base
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfato
<b>PCR</b>	Reação polimerásica em cadeia
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PEG</b>	Poli(etil)enoglicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>Pmol</b>	Picomol
<b>PLC<math>\gamma</math>1</b>	Fosfolipase C $\gamma$ 1
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonato
<b>ptnA</b>	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAase</b>	Ribonuclease
<b>scFv</b>	Fragmento variável (de anticorpo) de cadeia única
<b>SDS</b>	Sódio Duodecil Sulfato
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida / SDS
<b>SSC</b>	Dispersão lateral ( <i>Side scattering</i> )
<b>TCR</b>	Receptor de Célula T
<b>TEMED N,N,N',N'</b>	Tetrametil etilenodimetilamina
<b>Th</b>	Células T auxiliares
<b>Treg</b>	Células T regulatórias
<b>Tris</b>	Tri (hidroximetil) aminometano
<b>U</b>	UCTH Anticorpo monoclonal anti-CD3 do clone UCTH
<b>UTR</b>	Região não traduzida do gene
<b>UV</b>	Raios ultravioleta
<b>V</b>	Volume

<b>VH</b>	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
<b>VL</b>	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
<b>μF</b>	Micro Faraday
<b>Mg</b>	Micrograma
<b>μL</b>	Microlitro
<b>Mm</b>	Micrômetro
<b>μM</b>	Micromolar

## Resumo

A estratégia de humanização de anticorpos tem sido eficiente para melhorar o uso clínico desses biofármacos. Porém, a manipulação da cadeia polipeptídica, eventualmente, leva a uma perda de afinidade, reduzindo sua eficácia. Este estudo é uma continuação dos testes necessários para a melhoria da afinidade de ligação, de um anticorpo humanizado pelo Grupo de Imunologia Molecular da UnB. Em trabalhos anteriores descritos pelo grupo, um anticorpo anti-CD3 humanizado para fins clínicos, foi comparado com o anticorpo original murino quanto a sua capacidade de ligação ao antígeno humano CD3. Os resultados sugeriram que parte da afinidade foi perdida durante o processo de humanização. Então, este estudo visa compreender a interação química e estrutural entre o anti-CD3 humanizado e seu antígeno. Para isto, foram realizadas mutagêneses sítio-dirigidas por PCR *overlap*, no anticorpo humanizado, com base na estrutura cristalina do complexo OKT3-CD3, que identificou a participação de ligação dos resíduos de aminoácidos chave envolvidos na ligação. Os anti-CD3 com as mutações de interesse foram produzidos em células de ovário de hamster chinês (CHO) na forma de fragmento de anticorpo FvFc (scFv ligado diretamente aos domínios CH2-CH3 de IgG 1 humana). Purificamos estas proteínas e, em paralelo, produzimos um CD3 $\gamma\epsilon$  de cadeia única recombinante usando um sistema de expressão de antígenos solúveis em bactéria. Os anticorpos mutados e o antígeno, serão usados em testes de afinidade, competição, bloqueio e proliferação usando as técnicas de ELISA e FACS. O mapeamento detalhado dos resíduos chave envolvidos intimamente com a ligação ao antígeno, permitirá o desenvolvimento mais eficaz de anticorpos anti-CD3 para uso clínico no futuro.

## Abstract

The strategy of antibody humanization has been effective in improving the clinical use of biopharmaceuticals. Thus, the manipulation of the polypeptide chain, eventually leads to an affinity loss, reducing its effectiveness. This study is a continuation of the tests needed to improve the binding affinity of an antibody humanized by the Group of Molecular Immunology, UnB. In previous work described by the group, a humanized anti-CD3 antibody for clinical purposes, was compared with the original murine antibody and its ability to bind to the human CD3 antigen. The results suggested that part of the affinity was lost during the process of humanization. So, this study aims to understand the chemical and structural interaction between the anti-CD3 humanized antibody and its antigen. With this purpose, we performed site-directed mutagenesis in the humanized antibody, based on the crystal structure of the complex CD3-OKT3 (a murine monoclonal antibody), which identified the participation of key binding residues involved in binding. Some amino acids residues of the humanized anti-CD3, were selected and modified by PCR overlap. Mutants were produced Chinese Hamster Ovary (CHO) cells in the form of antibody fragment FvFc (a scFv linked to human IgG1 CH2-CH3 domains). We purified this protein and in parallel, produced a scFv CD3  $\gamma\epsilon$  recombinant expression system that permits the purification of soluble bacterial antigens. The recombinant molecules will be used in assays for affinity, competition, blocking and proliferation using the ELISA and FACS. The detailed mapping of key residues intimately involved with binding to the antigen, will allow the development of more effective anti-CD3 antibody for clinical use in the future.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas de elevado peso molecular que têm a capacidade de se ligar a antígenos especificamente e recrutar sistemas efetores para eliminá-los. Fisiologicamente, são responsáveis pela neutralização e opsonização de patógenos representando o lado humoral da resposta imune. Os anticorpos são produzidos por linfócitos B maduros e podem apresentar afinidade e especificidade muito alta por um determinado antígeno, devido ao mecanismo de maturação de afinidade. Essas propriedades tornam essa biomolécula um excelente reagente alvo-específico e de alta afinidade, que vem cada vez mais sendo explorado biotecnologicamente, desde o laboratório de pesquisa até a clínica médica (Abbas *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais (mAb) em 1975 por Kohler & Milstein revolucionou o estudo da imunologia. Utilizando-se esse método é possível obter anticorpos, sendo que o clone produtor é capaz de secretar um tipo de imunoglobulina que reconhece um alvo único podendo, assim, ser direcionada para um determinado antígeno ou um determinado tipo celular. Na clínica, os mAbs foram recebidos como uma nova geração de fármacos, com grande especificidade e poder terapêutico, as “balas mágicas” preconizadas por Paul Erlich já em 1909. Apesar de todo seu potencial, a terapia com mAb não correspondeu de imediato às expectativas e até o começo da década de 90 apenas um anticorpo, o Orthoclone OKT3, havia sido aprovado para uso clínico (Janeway *et al.*, 2001).

O principal entrave na utilização de anticorpos para fins terapêuticos mostrou ser a toxicidade da biomolécula. Produzidos experimentalmente em animais, normalmente camundongos, os mAbs são “vistos”, pelo sistema imune, nos organismos em que são administrados, como proteínas heterólogas, o que gera uma resposta adversa no paciente. Essa resposta adversa pode levar desde a uma perda gradual na eficácia do medicamento ou até, em situações extremas, à síndrome de "tempestade de citocina", uma resposta pleiotrópica que pode acarretar ao paciente choque e óbito (Suntharalingam *et al.*, 2006). Esses efeitos colaterais foram responsáveis pela estagnação do desenvolvimento de novos fármacos baseados em anticorpos monoclonais.

Na virada da década de 90 uma nova revolução se iniciou. A associação da técnica de geração de mAbs com técnicas de DNA recombinante, permitiu o desenvolvimento de uma segunda geração de biofármacos, os anticorpos recombinantes. Agora os anticorpos poderiam

ser produzidos em cultura células animais a partir de vetores plasmidiais ou virais contendo genes manipulados para codificar o anticorpo de interesse.

Com técnicas de DNA recombinante foi possível a geração de moléculas modificadas, menos tóxicas e mais próximas das moléculas encontradas em humanos, um processo conhecido por humanização de anticorpos. Essa técnica envolve a manipulação da sequência dos genes que codificam um dado anticorpo monoclonal de interesse para a inserção de sequências humanas homólogas, de forma a reduzir o componente heterólogo do anticorpo recombinante (Caldas *et al.*, 2000; Riechmann *et al.*, 1988). O objetivo com esta abordagem é introduzir o sítio ligante ao antígeno, o paratopo, em um arcabouço de anticorpo humano. O limite desse processo é a preservação da atividade biológica. Nos anticorpos modernos, o conteúdo de sequências murinas é limitado àqueles resíduos fundamentais para a ligação ao antígeno. Assim, foi possível produzir moléculas menos imunogênicas, e conseqüentemente mais compatíveis com o uso em pacientes. Essa técnica revolucionou o conceito de uso para esses fármacos, pois estes agora eram mais seguros e compatíveis com a administração em esquemas terapêuticos, ampliando sua gama de aplicações (Mirick *et al.*, 2004).

O desenvolvimento da tecnologia para a produção de anticorpos recombinantes redundou no aumento do número de novos anticorpos aprovados para uso clínico que vem acontecendo de forma acelerada. Na virada do milênio os anticorpos aprovados não chegavam a uma dezena, mas hoje são 22 anticorpos aprovados para terapia, a maioria anticorpos recombinantes, muitos deles humanizados e alguns totalmente humanos. Mas, a real dimensão dessa tendência pode ser observada nos mais de 200 anticorpos atualmente em testes clínicos. O mercado também reflete esse crescimento, pulando de menos de um bilhão de dólares em vendas na virada do milênio, para os atuais 20 bilhões de dólares, com um crescimento anual de cerca de 14% (Nelson & Reichert, 2009). Somente o anticorpo mais vendido atualmente, o Rituximab (Mabthera – Roche; que se liga ao antígeno CD20 dos linfócitos B), vende por ano cinco bilhões de dólares. A tendência de mercado é de crescimento, com o surgimento de novos alvos, novas aplicações para antigos anticorpos e o aparecimento de anticorpos em formatos cada vez menos tóxicos e mais eficazes. Nesse contexto, os fragmentos de anticorpos, ainda incipientes em participação no mercado, aparecem como uma possibilidade concreta.

## 1.1 Os Anticorpos

Os anticorpos (Ac), também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são produzidos por células, denominadas linfócitos B. São glicoproteínas presentes em líquidos biológicos do organismo e também na superfície de alguns tipos de células. Essas moléculas possuem a capacidade de reconhecer antígenos microbiais, de neutralizar a infectividade de micróbios e marcá-los para eliminação por vários mecanismos efetores. (Abbas *et al.*, 2008).

A síntese de anticorpos é realizada pelos linfócitos B. Estes têm origem a partir de células tronco progenitoras originadas na medula óssea. Estas células têm maturação na própria medula onde são produzidas as células B, que migram para o baço e linfonodos contendo o receptor de célula B (BCR), que na realidade é uma IgM de membrana, e ainda uma IgD em sua superfície. As células B maduras que migram para órgãos linfoides periféricos, são capazes de reconhecer e produzir anticorpos específicos contra antígenos que lhe serão apresentados. Esse processo culmina com a diferenciação do linfócito B em plasmócito, célula especializada na secreção de anticorpos (Abbas *et al.*, 2008).

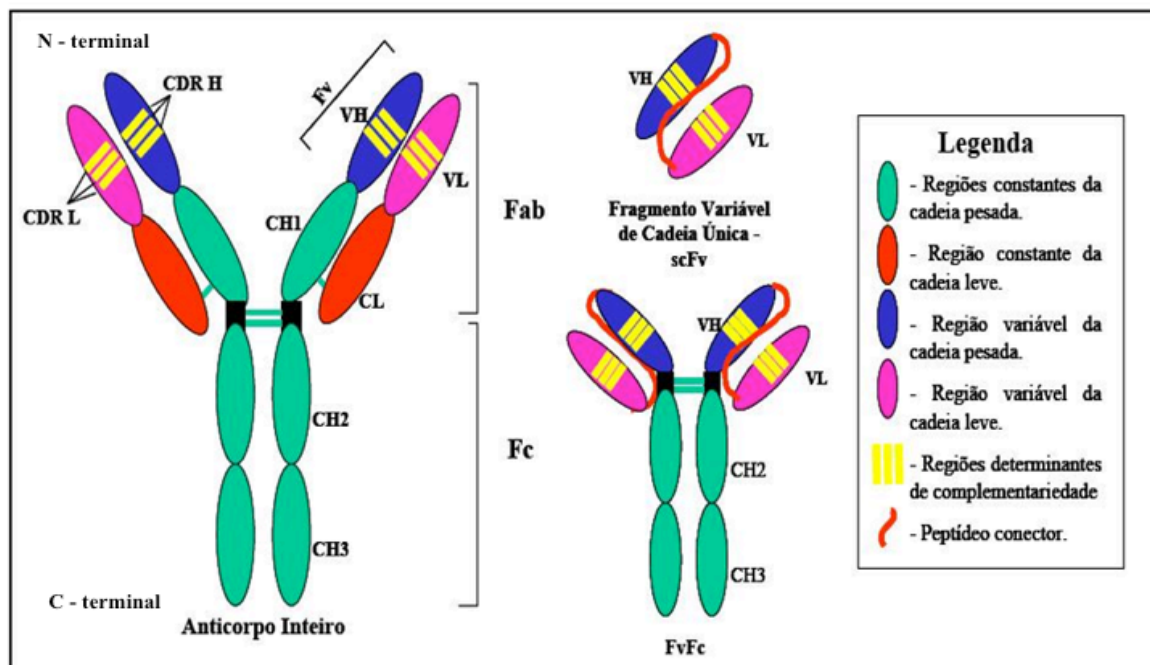
As moléculas de anticorpos possuem uma estrutura básica comum. Sua forma pode ser representada por um Y, possuindo a massa molecular em torno de 150 kDa (IgG), que pode variar conforme o isotipo. São compostos por dois tipos de cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas idênticas (50 kDa) e duas cadeias leves idênticas (25 kDa). Ambas possuem uma região aminoterminal variável ( $V_H$ , do inglês *Variable Heavy* e  $V_L$ , do inglês *Variable Light*) de reconhecimento e ligação ao antígeno (Janeway *et al.* 2001). Cada cadeia leve é ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto e, as duas cadeias pesadas, já ligadas às cadeias leves, são mantidas juntas covalentemente, também por pontes dissulfeto, formando o anticorpo (Abbas *et al.*, 2008) (Figura 1).

Cada molécula de anticorpo apresenta sequência única (paratopo) que permite sua ligação ao epitopo, que é a menor porção do antígeno com capacidade para gerar uma resposta imune. O conjunto de imunoglobulinas presentes no organismo é conhecido como repertório de anticorpos. Em humanos é estimado que este número de moléculas chegue a 10<sup>11</sup> (Janeway, 2001).

As cadeias das imunoglobulinas podem ser diferenciadas pelos seus isotipos. A cadeia leve é subdividida nos isotipos kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ), enquanto que a cadeia pesada se subdivide em cinco isotipos:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\mu$ . Esses cinco isotipos de cadeia pesada são utilizados para diferenciar as cinco classes de imunoglobulinas, sendo elas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM,



respectivamente. Em humanos, os isotipos IgA e IgG ainda podem ser subdivididos em subclasses relacionadas, ou subtipos, chamadas de IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A classe mais comum e abundante de anticorpo, dependendo do organismo, é a IgG, sendo também a mais utilizada para fins terapêuticos (Abbas, 2008).



**Figura 1. Representação esquemática de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos.** É mostrada a clássica molécula de IgG e fragmentos de anticorpos, incluindo Fab, Fragmento Variável de cadeia Única - scFv (do inglês, *single chain fragment variable*) e o FvFc.

FONTE: Maranhão A.Q. & Brígido M.M., 2001.

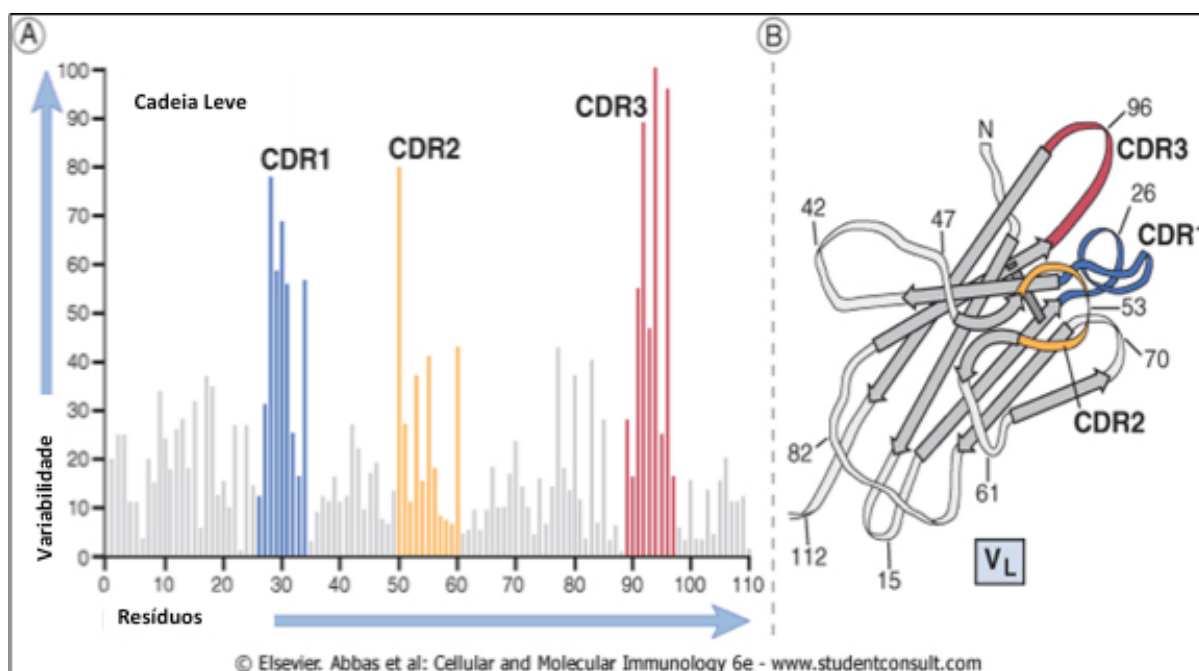
Atualmente, utilizando técnicas de engenharia genética, é possível obter fragmentos alternativos de anticorpos que apresentam de 12 kDa até mais de 150 kDa. Estes podem apresentar propriedades diferenciadas quanto a penetração no tecido, meia-vida e alcance dos alvos, quando comparados a moléculas inteiras de anticorpos (Carter P.J., 2006).

## 1.2 Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs)

As regiões variáveis pesadas e leves dos anticorpos, possuem três segmentos que apresentam alta variabilidade denominadas de regiões hipervariáveis ou Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs, do inglês, *Complementary Determinant Regions*), descritas em 1970 por Elvin Kabat e Wu. Nas CDR's, estão presentes sequências mais conservadas chamadas de arcabouço ou FR (do inglês, *Framework Regions*). Para formar sua estrutura tridimensional, as três regiões hipervariáveis dos domínios  $V_L$  e  $V_H$  (Fv,

do inglês *Variable Fragment*) se aproximam para formar o paratopo do anticorpo que é responsável pela ligação ao antígeno (Abbas, 2008).

Cada cadeia apresenta três CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3). Na Figura 2, é possível visualizar que a CDR3 apresenta maior variabilidade e por isso é a mais importante na determinação da especificidade/afinidade. Assim como as classes de imunoglobulinas, suas funções efetoras também são determinadas pelo tipo de cadeia pesada presente na molécula. A maioria das funções efetoras dos anticorpos é mediada pela interação da sua região carboxiterminal (região Fc, do inglês, *Cristal Fragment*) com moléculas presentes nas superfícies de outros tipos celulares (fagócitos; células NK, do inglês, *Natural Killer*, mastócitos) que atuam como receptores de FcR ( FcR, do inglês, *Fc Receptor*) e proteínas citoplasmáticas do sistema complemento. A interação da região Fc da imunoglobulina com seus receptores FcR, desencadeará mecanismos ativos de defesa do organismo, caracterizado pela função efetora distinta de cada isotipo da molécula.



**Figura 2 - Gráfico de Kabat-Wu. Apresenta o nível de variabilidade de aminoácidos presentes nos domínios variáveis de cadeias leve de imunoglobulinas. FONTE: Elsevier. Abbas *et al.* [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com).**

### 1.3 Anticorpo Anti-CD3

Em 1979, Kung e Goldstein desenvolveram uma linhagem celular de hibridoma de camundongo que produzia um anticorpo monoclonal (Orthoclone, OKT3), contra um

antígeno de superfície da célula T, que mostrou-se promissor para prevenir a rejeição do enxerto após o transplante (Vigeral P. *et al.*, 1986). Este anticorpo foi posteriormente identificado como sendo específico para a cadeia  $\epsilon$  do complexo CD3, que é o principal elemento de sinal de transdução do receptor de células T (Davis & Chien, 1999). O uso clínico do OKT3, no entanto, foi limitado pelo seu efeito colateral denominado resposta HAMA (do inglês, *Human Anti-mouse Anti-body*), causando febre alta, calafrios, cefaleia, sintomas gastrointestinais e em casos graves, edema pulmonar (Thistlethwaite *et al.*, 1988). Esta síndrome ocorre devido ao OKT3 fazer uma ligação cruzada com complexo TCR/CD3 fazendo com que a célula T libere citocinas, incluindo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferon- $\gamma$ , interleucinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 e granulócitos/macrófagos (Abramowicz *et al.*, 1989; Hirsch *et al.*, 1989). Quando células (como monócitos) são ativadas pela porção Fc do OKT3 ocorre uma potencialização da gravidade desta síndrome através da liberação de muitas citocinas (Chatenoud, *et al.*, 2003). Já foi visto que os fragmentos de anticorpos Fab2 possuem um efeito menos mitogênico (Van Wauwe *et al.*, 1980; Alegre *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1995). Esta observação levou ao desenvolvimento de anticorpos anti-CD3 FcR não obrigatório. Além disso, O OKT3, sendo um anticorpo monoclonal murino, estimula o desenvolvimento de anticorpos humanos anti-OKT3, o que faz com que ocorra uma rápida depuração desse quando injetado, reduzindo sua eficácia. A solução para este problema seria humanizar o anticorpo (Alegre *et al.*, 1994; Bolt *et al.*, 1993; Riechmann *et al.*, 1988). Com o advento da produção de versões humanizadas de anticorpos CD3 específicos com regiões Fc mutadas e a demonstração que o tratamento de curto prazo com anticorpos monoclonais murinos CD3 específicos podem induzir um estado de tolerância, novas aplicações clínicas têm emergido para essa molécula. Como exemplo podemos citar o tratamento da Diabetes Mielitus Tipo 1 (Herold *et al.*, 2005), psoríase (Kohm & Behrens, 2012) e diversas doenças inflamatórias e autoimunes (Utset *et al.*, 2002).

Em modelos murinos, anticorpos anti-CD3 específicos vêm sendo usados na prevenção da rejeição de transplante do coração (Plain *et al.*, 1999), da GVHD aguda (do inglês, *Graft Versus Host Disease*) (Li *et al.*, 2009), do modelo animal da esclerose múltipla humana (EAE, do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) (Belmar, *et al.*, 2009), na artrite induzida por colágeno (Wu *et al.*, 2010) e na doença inflamatória de Bowel (colite ulcerativa e doença de Crohn) (Ludviksson *et al.*, 1997). Além disso, um teste clínico está em andamento em pacientes com colite ulcerativa e outros estão planejados para serem realizados em pacientes com esclerose múltipla, psoríase e em transplante de órgãos (citado

em Chatenoud & Bluestone, 2007). Desta forma, os anticorpos anti-CD3 são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, podendo promover a cura de autoimunidades estabelecidas ou permitir uma sobrevida duradoura de órgãos transplantados (Chatenoud, 2003). Atualmente, existem dois anticorpos humanizados anti-CD3 sendo usados em testes clínicos de fase 3 em pacientes com Diabetes Mielitus Tipo I. O hOKT3  $\gamma$ 1 (Ala-Ala) ou Teplizumab, que é uma versão humanizada do anticorpo monoclonal OKT3 preservando a mesma região de ligação ao antígeno. Possui a porção Fc de IgG1 humana com aminoácidos alterados nas posições 234 e 235 para alanina, resultando na diminuição da ligação pela porção Fc (Alegre *et al.*, 1994; Herold *et al.*, 1992). O outro é o ChAglyCD3 ou Otelixizumab que é uma versão humanizada de um anticorpo monoclonal anti-CD3 de camundongo, com ausência de um sítio de glicosilação crucial na porção Fc, resultando numa redução de ligação pela porção Fc (Bolt *et al.*, 1993). Estes dois anticorpos parecem ter diminuído potencial de liberação de citocinas devido as alterações na porção Fc, mantendo seus efeitos imunomoduladores (Reichert, 2011).

Hoje, anticorpos CD3-específicos são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, que poderia fornecer a cura para autoimunidade estabelecida e permitir a sobrevivência por longo tempo, dos pacientes com órgãos transplantados (Swann. *et al.*, 2008). Doenças autoimunes surgem na sequência de uma ruptura do equilíbrio entre precursores imunológicos auto regulatórios e auto reatividade patogênica, o que leva o anticorpo apresentar reações dirigidas, mediadas por célula T, contra antígenos expressos pelos próprios tecidos. As doenças autoimunes são responsáveis por alta mortalidade pessoas em países subdesenvolvidos e desenvolvidos, perdendo somente para doenças cardiovasculares e câncer, sendo que a frequência destas doenças tem aumentado progressivamente ao longo das últimas três décadas. Os tratamentos atuais são substitutivos (administração de insulina para pacientes com diabetes tipo I, hormônios da tireoide em doentes com tireoidite ou vitamina B12) aos pacientes com anemia perniciosa ou paliativo (baseado no uso crônico de anti-inflamatórios e/ou agentes imunossupressores). Os tratamentos que muitas vezes são apenas parcialmente eficazes, podem se tornar potencialmente tóxicos. Na última década, uma maior ênfase tem sido dada no sentido de induzir tolerância imunológica, partindo-se dos múltiplos precursores imunes, que estão presentes na periferia das células para evitar a auto reatividade indesejada (Kevam *et al.*, 2005). Dessa forma, para atingir a tolerância imunológica é necessário o uso de uma terapia de curta duração que diminua a reatividade patogênica e também a produção de auto

antígenos. É importante também que o paciente mesmo depois da terapia tenha plena capacidade de montar uma resposta imune normal contra patógenos estranhos (Herold *et al.*, 2002).

Uma abordagem para induzir tolerância imunológica contra auto antígenos, vem sendo realizada para identificar em tecidos-alvos elementos, como, a insulina (no diabetes), receptor de acetilcolina (em miastenia grave) e a proteína básica da mielina (em esclerose múltipla), para criar vacinas terapêuticas que tolerize respostas imunes antígeno-específico. Embora esta abordagem tenha sido eficaz em experimentos científicos, não apresentou os mesmos resultados quando transferidos para pacientes em clinica (Kohm *et al.*, 2005). Esta falha é, possivelmente devido a vários fatores, incluindo: dificuldades em traduzir a dose e o tempo utilizado em modelos animais para aplicação em seres humanos; o atraso na administração da vacina contra a doença em processo, que podem resultar no aumento da resposta autoimune por meio da capacidade imunomodulatória de auto antígenos, como se observou em ensaio clínico durante o tratamento de pacientes com esclerose múltipla (Butler, 2005).

A falta de conhecimento dos epítomos patogênicos localizados em tecidos-alvo, em qualquer estágio da doença (*due to epitope spreading*) ou Haplótipos do HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) em humanos, é responsável pela completa falta de eficácia das vacinas, uma vez que é improvável saber se a auto resposta a todos os potenciais patogênico será eliminada pela terapia (Kamiya, *et al.*, 2002).

Uma segunda abordagem, pioneira no desenvolvimento do primeiro anticorpo monoclonal CD3 de camundongo, específico para humano (conhecido como orthoclone OKT3; Ortho Biotech; o primeiro anticorpo monoclonal aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), para tratamento de transplante) tira proveito de agentes biológicos que promovem a tolerância imunológica, tais como os anticorpos monoclonais e ligantes solúveis dirigidos funcionalmente para receptores em células imunes. De fato, o uso terapêutico de compostos biológicos se tornou a mais bem sucedida abordagem terapêutica disponível para modular o sistema imunitário nos dias de hoje, com múltiplas drogas aprovadas para tratamento de uma vasta gama de doenças, tais como doenças autoimunes (Chatenoud, 2003), alergias e rejeição a órgãos transplantados. Portanto, não é de estranhar que o primeiro sucesso terapêutico em tolerância gênica em ser humano foi com a utilização de um produto biológico. Em particular, esta análise centra-se no sucesso clínico dos receptores Fc (FCR) não ligantes de anticorpos monoclonais anti-CD3 específicos que foram utilizados para preservar a secreção de insulina endógena por células- $\beta$ , nos pacientes recentemente

diagnosticados com diabetes tipo I (Kevan *et al.*, 2005). Dos desafios citados acima, o maior deles são as diferenças espécie-específicas. Na sua natureza murina original, os AcMos (anticorpos monoclonais) são percebidos pelo organismo como uma proteína heteróloga, gerando sua rápida eliminação pela produção de anticorpos humanos contra os anticorpos murinos (Mirick *et al.*, 2004). Uma outra questão que não se refere à molécula de anticorpo, mas que se mostra importante para o futuro do mercado é o suprimento das altas e constantes doses usadas nos tratamentos terapêuticos; levando-se em consideração a capacidade de cultivo celular mundial por ano (500.000 litros) estima-se que a demanda de AcMos não conseguirá ser suprida. Este é o motivo pelo qual a área de P&D (Pesquisa & Desenvolvimento) investe seus esforços no desenvolvimento de linhagens celulares com crescimento e produtividade aprimoradas (Butler, 2005).

É notável que o uso clínico do OKT3 ocorreu muito antes das complexidades moleculares do complexo do receptor de células T-CD3 (TCR), serem descobertos, e o papel chave de sinalização do CD3 era indefinido (Clevers *et al.*, 1988; Davis & Chien, 1999). Embora OKT3 compartilhe de muitas propriedades biológicas linfocitárias com os anticorpos policlonais linfócito-específicos, (quando adicionado no início de uma cultura misturada do linfócito, inibe fortemente a proliferação de linfócitos aloreativo e a geração de efetores citotóxicos aloespecíficos) ele é muito mais fácil de produzir e padronizar. Consequentemente, a base racional naquele tempo era que o uso do OKT3 podia substituir o uso de anticorpos policlonais linfócito-específicos (Chatenoud, 2003).

#### **1.4 Mecanismo de Ação do Anticorpo anti-CD3**

Os estudos realizados em pacientes tratados com o OKT3 forneceu informações importantes sobre o modo de ação desse anticorpo, que foram fundamentais para o aprimoramento e refinamento viabilizando sua utilização em clínica. Entretanto, o uso clínico de OKT3 foi impedido, devido aos efeitos secundários produzidos, com relação ao seu potencial imunogênico e mitogênico, que limitaram seu uso em pacientes transplantados, assim como a extensão de seu uso em outros casos clínicos, como por exemplo, em pacientes portadores de doenças autoimunes (Chatenoud, 2003).

Dois desenvolvimentos recentes permitiram uso clínico de anticorpos de CD3-específico. Primeiramente, a produção de anticorpos humanizados (anticorpos recombinantes que possuem regiões hipervariáveis parentais de camundongos enxertadas em domínios de

cadeia leve (VL) e cadeia pesada (VH) de imunoglobulinas humanas) específicos para CD3 com mutações na região Fc e, em segundo, a demonstração de que o tratamento em curto prazo com os anticorpos monoclonais CD3 específicos, pode aumentar a tolerância (ação antígeno específica não reativa e ausência de imunossupressão crônica) no transplante e na auto-imunidade. Propõe-se que esta tolerância é em grande parte ativa, e que pôde ser mediada por um subconjunto das células T reguladoras CD4+, que controlam células T patogênicas (Herold *et al.*, 2002).

Anticorpos monoclonais terapêuticos específicos para células T podem atuar por quatro mecanismos distintos: revestimento celular, depleção das células T, regulação negativa do TCR e alteração na sinalização. O desencadeamento de determinado modo de ação dependerá da especificidade do anticorpo e também do seu isotipo.

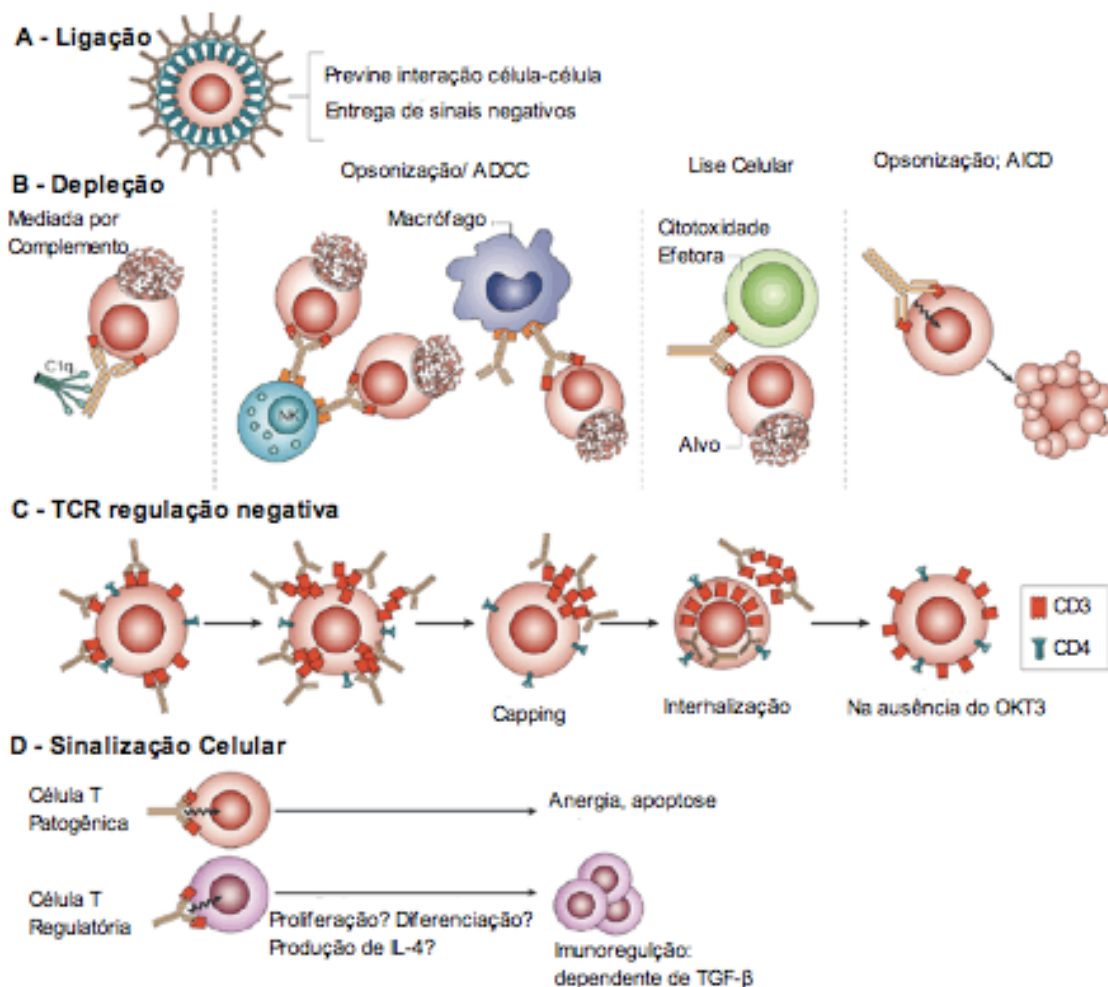
Estudos de cristalografia estrutural demonstraram que a ligação do OKT3 ao seu antígeno ocorre de forma oblíqua à cadeia CD3 $\epsilon$  (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004, Dunstone *et al.*, 2004) e altera os sinais de transdução das células T, tornando-as incapazes de reconhecer o antígeno a que está sendo apresentada.

Modelos animais demonstram que o anti-CD3 ao se ligar ao FcR induz uma depleção parcial (40-50%) dos linfócitos T presentes no sangue periférico, pela sua função efetora, que é capaz de mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC, do inglês, *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (Figura 3b).

Apesar dos mecanismos de revestimento e depleção poderem ser desencadeados pelos anticorpos CD3-específicos, os modos de ação mais comumente associados à ação desses anticorpos são a regulação negativa do TCR e a alteração da sinalização celular.

A regulação negativa do TCR é observada em células CD3+ que não são depletadas, mas perdem a expressão do TCR e das cadeias proteicas CD3. Isso ocorre como resultado de internalização do complexo proteico TCR-CD3 mediada por anticorpos anti-CD3 específicos, o que não afeta a expressão de outras moléculas da superfície celular, mas torna as células imunocompetentes (Figura 3c).

A sinalização celular é dependente da região variável da região de ligação ao antígeno da molécula de imunoglobulina, e ocorre com a ligação simultânea do anti-CD3 a uma célula alvo e uma célula T citotóxica, gerando uma transdução de sinal direta para a indução da apoptose celular (Figura 3d). Pode ocorrer também, um estado de anergia clonal, ou seja, incapacidade do organismo de reagir a um determinado patógeno (Chatenoud & Bluestone, 2007).

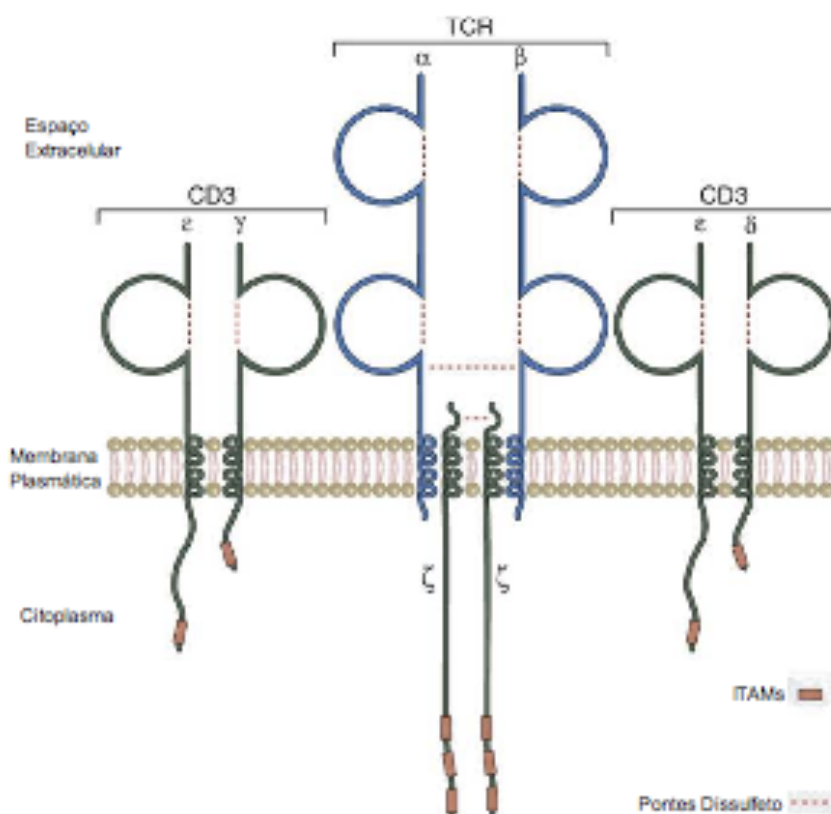


**Figura 3. Propostas de mecanismos de ação de anticorpos monoclonais terapêuticos.** A) Revestimento: principal modo de ação dos anticorpos monoclonais específicos para marcar o CD4, B) Depleção: para anticorpos CD3-específicos ocorre pelo ADCC, C) Regulação Negativa: internalização do complexo antígeno-anticorpo, o que gera imunocompetência celular, D) Ligação simultânea do anticorpo a uma célula alvo e uma célula T citotóxica, o que gera indução de apoptose celular. FONTE: Chatenoud, L., 2003.

A molécula alvo do OKT3, o CD3, faz parte de um complexo de fundamental importância para a resposta imune adaptativa, o complexo receptor de célula T (TCR, do inglês, *T Cell Receptor*). Esse complexo é formado pelo próprio TCR e pelas moléculas acessórias CD3 e cadeias  $\zeta$ . O TCR é responsável pelo reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados por moléculas chamadas Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, Major histocompatibility complex), presentes na superfície de todas as células animais. Após o reconhecimento do antígeno pelo TCR, ocorre a fosforilação dos domínios ITAMs presentes no CD3 e nas cadeias  $\zeta$ , sendo essas fosforilações o ponto de

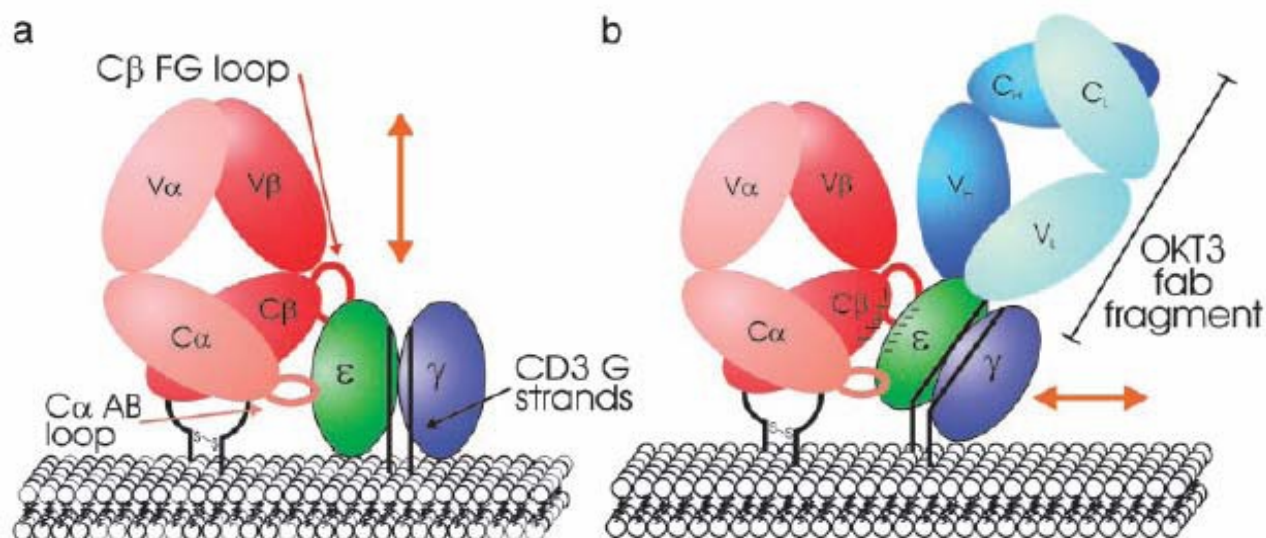


partida para o desencadeamento de uma cascata de transdução de sinal que pode acarretar na ativação e proliferação dessas células, e, assim, desempenhar as suas funções efetoras, como a produção de citocinas, por exemplo IL-2 e citotoxicidade celular (Figura 4) (Kindt *et al.*, 2002).



**Figura 4. Diagrama esquemático do complexo receptor de células T (TCR).** Ele é constituído pelo TCR, cadeias  $\zeta$  e pelo complexo CD3. As regiões carboxi-terminais das cadeias  $\zeta$  e do CD3 apresentam uma sequência comum chamada de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), o qual irá agir no processo de transdução de sinal. **FONTE:** Elsevier. Abbas *et al.* [www.studentconsult.com](http://www.studentconsult.com)

Estudos estruturais revelam uma ligação lateral oblíqua entre o OKT3 e a molécula CD3. De acordo com o modelo proposto, essa ligação promoveria um deslocamento molecular diferente do observado na correta estimulação do complexo TCR (Figura 5, setas laranja). Esse arranjo aumenta a possibilidade de uma mudança conformacional no complexo TCR-CD3, podendo ser o modo de iniciação da sinalização da célula T mediado por anticorpos anti-CD3 (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004).

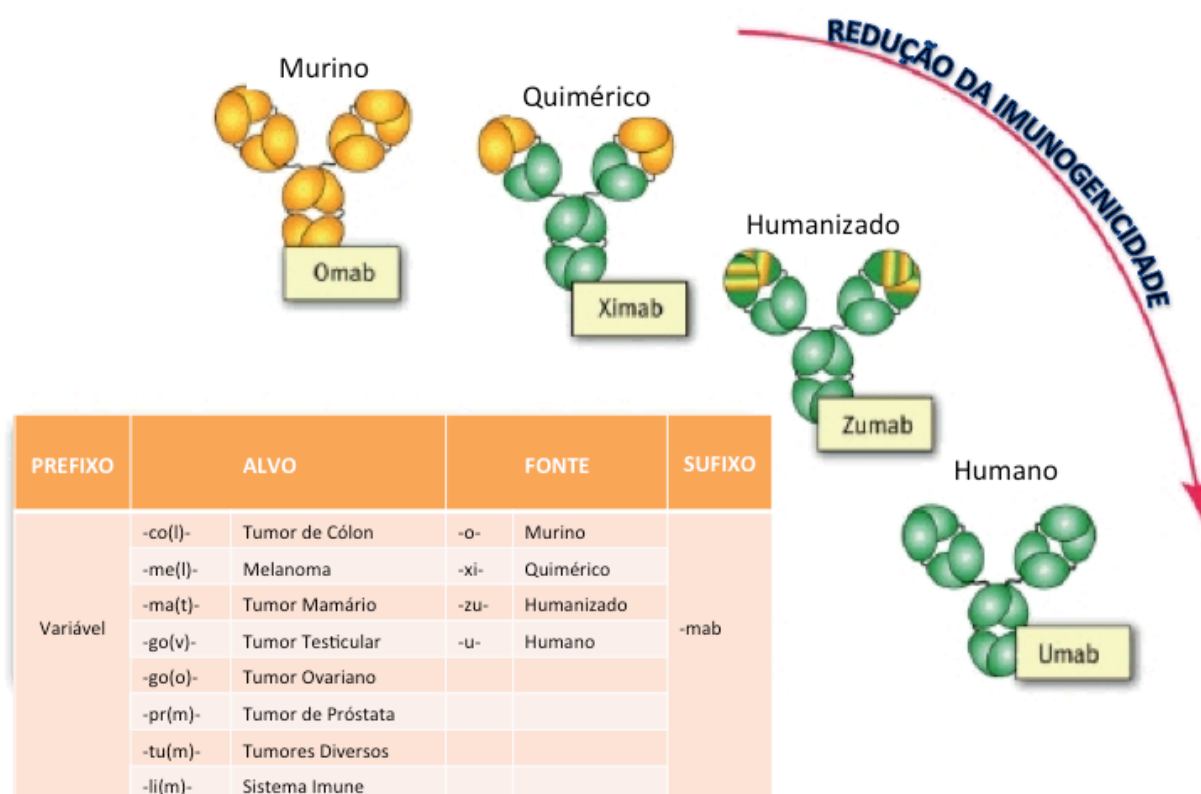


**Figura 5. Modelo proposto para sinalização precoce de células T mediante ligação do CD3 ao  $\alpha\beta$  TCR.** (a) Modelo de sinalização após a ligação de antígeno ao TCR, onde ocorre um deslocamento vertical do CD3 e assim desencadeando uma cascata de transdução de sinal. (b) Dinâmica de ligação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

Recentemente, uma visão mais sistêmica da ação dos anticorpos anti-CD3, envolvendo a sua capacidade de induzir um estado de tolerância imunológica, provavelmente pela sua capacidade de induzir células T reguladoras foi proposta. O mecanismo de ação desses anticorpos não envolve necessariamente a depleção de linfócitos T, mas sim a modificação da sua atividade funcional, em grande parte devido à forma com que o TCR transduz o sinal de ativação (Chatenoud, 2010). Nesse sentido, poderíamos utilizar o anticorpo anti-CD3 para produzir uma resposta imunorreguladora em um organismo que apresente uma resposta imune inflamatória patológica, como em doenças autoimunes, e também no transplante alogênico. Um exemplo extremo dessa abordagem foi o sucesso na redução dos sintomas de EAE (encefalite autoimune experimental, do inglês, *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) em camundongos (o modelo animal da Esclerose Múltipla em humanos), com a administração de anti-CD3 sublingual (Ochi *et al.*, 2006). Esse novo paradigma imputa ao antígeno CD3 um alvo especial e com grande potencial para explorar novos fármacos para doenças que demandem uma imunomodulação como as doenças autoimunes e o transplante de órgãos (Chatenoud, 2010).

## 1.5 Anticorpos Humanizados

A humanização de anticorpos de interesse clínico visa a produção de anticorpos recombinantes derivados de anticorpos monoclonais murinos com potencial terapêutico. Com a humanização de anticorpos objetiva-se produzir biofármacos menos imunogênico e com melhor função efetora. A estratégia de humanização de anticorpos envolve a substituição progressiva das sequências murinas por sequências homólogas humanas, visando obter uma molécula com menor número possível de resíduos humanos para preservar a afinidade de ligação ao antígeno (Morrison *et al.*, 1984). Estudos foram direcionados para aumentar a eficiência e diminuir a imunogenicidade causada pelos anticorpos monoclonais murinos. Inicialmente foram produzidos anticorpos monoclonais quiméricos, onde foi realizada a troca da região Fc murina por uma sequência de Fc humana correspondente (Morrison *et al.*, 1984), gerando uma molécula com 66% da sua sequência humana e 34% murina (Figura 6).



**Figura 6. Classificação de anticorpos terapêuticos.** A tabela de inserção explica a nomenclatura de anticorpos terapêuticos em indicações de câncer, de acordo com o Sistema de Nomes Internacionais.

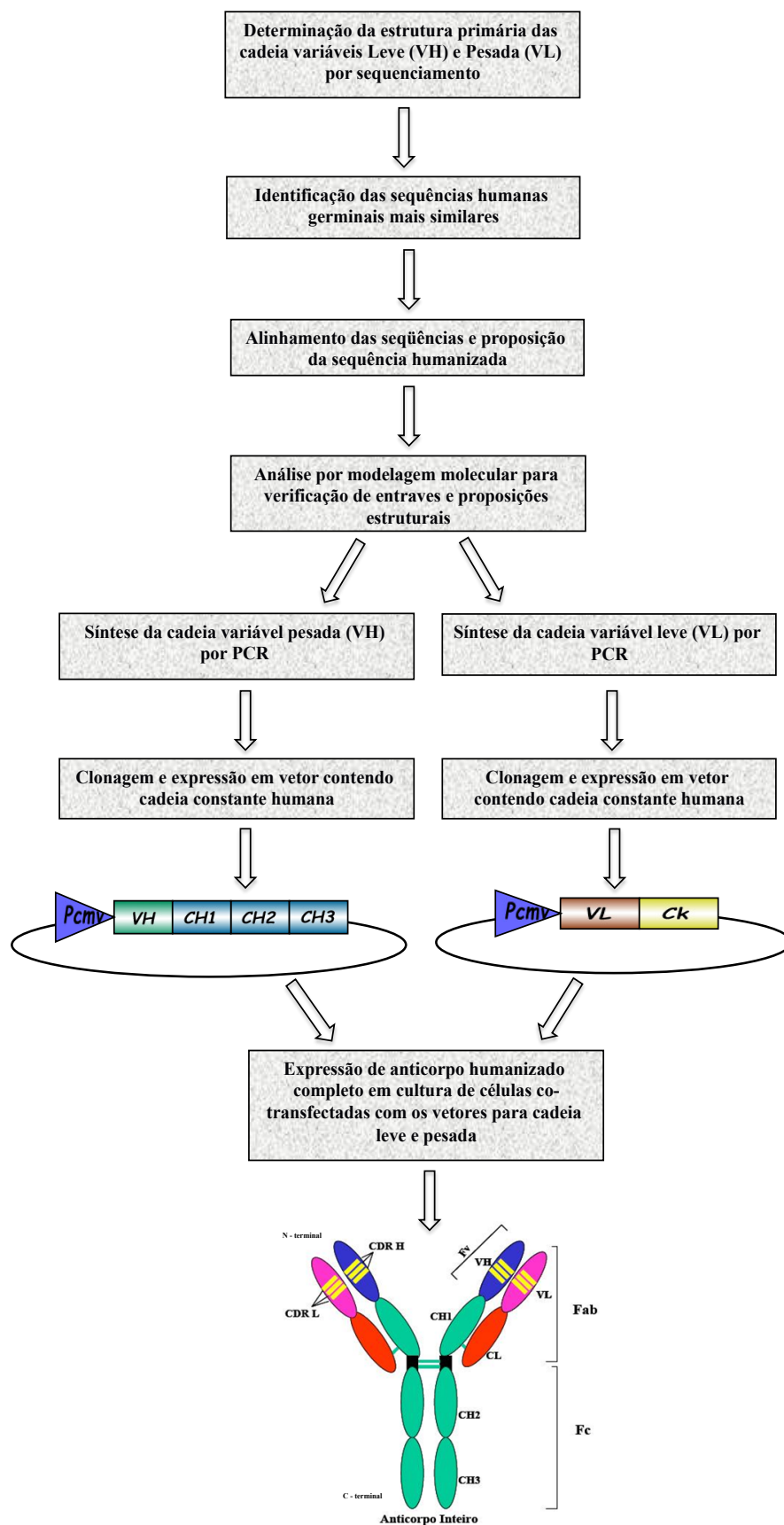
**FONTE:** Adaptada de Ruuls *et al.*, 2008.

Apesar de sua maior parte ser considerada humana, as sequências murinas ainda presentes podem causar respostas imunogênicas no organismo, com a geração de anticorpos humanos contra os anticorpos quiméricos, esta resposta é conhecida como HACA (do inglês, *Human Anti-Chimeric Antibody*) (Adair, 1992; Mirick *et al.*, 2004).

Com o advento de técnicas sofisticadas de engenharia genética, tornou-se possível a manipulação dos genes codificadores das cadeias do anticorpo gerando alterações na sua estrutura, mas mantendo a especificidade original advinda do anticorpo murino, neste processo são formados os anticorpos monoclonais humanizados (huAcMos). Existem diferentes metodologias para obtenção de anticorpos humanizados em laboratórios de pesquisa em muitos países. As metodologias utilizam técnicas de rearranjo e reprodução de sequências codificadoras humanas. Para isso utilizam sequências similares ao anticorpo murino na região de CDRs. Esta técnica é conhecida como a do “melhor encaixe” (do inglês, *best fit*) (Riechmann *et al.*, 1988, Co & Queen, 1991).

O método atualmente mais utilizado para obtenção de anticorpos humanizados é realizado pela união da região constante de uma imunoglobulina humana a uma região variável desenhada de forma que sua sequência seja a mais próxima possível de uma Fv de anticorpo humano. As cadeias pesada e leve variáveis são redesenhadas baseando-se em regiões variáveis leve e pesada da imunoglobulina humana homóloga à imunoglobulina murina. Uma fração variável, com atividade preservada, é conseguida pelo transplante das CDRs do anticorpo murino para o anticorpo humano (Maranhão & Brígido, 2001). Um dos desafios dessa técnica seria a preservação da ligação com o antígeno (Figura 7).

O primeiro anticorpo humanizado pela técnica de transplante de CDR foi aprovado para uso clínico em 1997 foi o IL2R Zenapax<sup>®</sup>, produzido pela PDL (do inglês, *Protein Design Labs*) (Kim *et al.*, 2005). No Brasil, o Instituto Butantan de São Paulo foi pioneiro na produção de anticorpos monoclonais com qualidade para utilização clínica. A utilização clínica desses anticorpos já é uma realidade no Brasil. No Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan os anticorpos murinos anti-CD3 e anti-CD18 foram produzidos pelo cultivo dos hibridomas em bioreatores de alta capacidade. As normas utilizadas para o processamento dos anticorpos permitem a obtenção de produtos com qualidade para uso injetável humano. O anticorpo anti-CD3 foi testado clinicamente, com êxito, na reversão da rejeição de transplante de rim, fígado e coração e vem sendo utilizado regularmente pelo Instituto do Coração - INCOR (Maranhão & Brígido, 2001).



**Figura 7. Organograma do processo de humanização de anticorpos.**  
**FONTE:** Adaptada de Maranhão & Brígido, 2001.

Atualmente, 290 anticorpos monoclonais estão em fase de estudos I, II ou III e 32 já possuem a aprovação dos órgãos competentes nos Estados Unidos e União Européia (Tabela1).

**Tabela 1: Anticorpos monoclonais terapêuticos aprovados pelos órgãos competentes (FDA) dos Estados Unidos e União Européia.**

Anticorpo	Molécula Alvo	Tipo	Indicação	Empresa	Ano de aprovação
OKT3 (Muromonab-CD3)	CD3	Murino	Rejeição a transplantes	Johnson & Johnson	1986
Reopro (Abciximab)	CA17-1 <sup>A</sup>	Quimérico	PTCA	Centocor	1994
Panorex (Edrecolomab)	GPIIb/IIIa	Quimérico	Câncer coloretal	Centocor	1995
Rituxan (Rituximab)	CD20	Quimérico	Linfoma Non-Hodgkin	Biogen IDEC	1997
Zenapax (Daclizumab)	IL2R	Humanizado	Rejeição a transplantes	Prot Design Labs	1997
Simulect (Basiliximab)	IL2R	Quimérico	Rejeição a transplantes	Novarts	1998
Synagis (Palivizumab)	RSV F	Humanizado	Profilaxia de RSV	MedImmune	1998
Remicade (Infliximab)	TNF- $\alpha$	Quimérico	Artrite reumatóide e doença de Crohn	Centocor	1998
Herceptin (Trastuzumab)	Her2/neu	Humanizado	Metástase de câncer de mama	Genentech	1998
Mylotarg (Gemtuzumab)	CD33	Humanizado	Leucemia mielóide	Wyeth	2000
Campath (Alemtuzumab)	CD52	Humanizado	Leucemia linfocítica	Millennium/ILEX	2001
Zevalin (Ibritumomab)	CD20	Murino	Linfoma Non-Hodgkins	Biogen IDEC	2002
Humira (Adalimumab)	TNF- $\alpha$	Humano	Artrite reumatóide, doença de Crohn	Abbott	2002
Xolair (Omalizumab)	IgE	Humanizado	Asma	Genentech	2003
Bexxar (Tositumomab-I131)	CD20	Murino	Linfoma Non-Hodgkins	Corixa	2003
Raptiva (Efalizumab)	CD11a	Humanizado	Psoríase	Genentech	2003
Erbix (Cetuximab)	EGFR	Quimérico	Câncer coloretal	Imclone Systems	2004
Avastin (Bevacizumab)	VEGF	Humanizado	Câncer coloretal, renal	Genentech	2004
Tysabri (Natalizumab)	Integrina A4	Humanizado	Doença de crohn, esclerose	Biogen IDEC	2004
Lucentis (Ranibizumab)	VEGF-A	Humanizado	Degeneração macular	Genentech	2006

Vectibix (Panitumomab)	EGFR	Humano	Câncer colorretal	Amgen	2006
Soliris (Eculizumab)	C5	Humanizado	Hemoglobinúria (PNH)	Alexion Pharm	2007
Milatumumab	CD74	Humanizado	Mieloma múltiplo, Linfoma Non- Hodgkin	Immunomedics	2008
Cimzia (Certolizumab)	Integrina	Humanizado	Doença de Crohn	Biogen IDEC	2008
Simponi (Golimumab)	TNF- $\alpha$	Humano	Artrite reumatóide	Johnson & Johnson	2009
Ilaris (Canakinumab)	IL-1 $\beta$	Humano	CAPS	Novartis	2009
Stelara (Ustekinumab)	IL-12 e IL-23	Humano	Psoríase	Johnson & Johnson	2009
Arzerra (Ofatumumab)	CD20	Humano	Leucemia linfocítica crônica	Genmab	2009
Raxibacumab	B. anthraxis PA	Humano	Antígeno protetor da toxina do antraz	Letha Healey, MD & Human Genome Sciences	2010
Prolia (Denosumab)	RANK-L	Humano	Osteoporose e Perda Óssea	Amgen Europe B.V.	2010
Actemra (Tocilizumab)	IL6R	Humanizado	Artrite Reumatóide	Hoffmann-La Roche e Chugai	2010
Yervoy™ (Ipilimumab)	CTLA-4	Humano	Melanoma Avançado	Bristol-Myers Squibb Company	2011
Benlysta™ (Belimumab)	Estimulador de linfócitos B	Humano	Lupus Eritrematoso Sistêmico	Human Genome Sciences and GlaxoSmithKlin e PLC (GSK)	2011

\*Adaptada de Pavlou & Reichert, 2004, Kim *et al.* 2005, Walsh, 2005, Cohen & Wilson, 2009, Beerli & Rader, 2010, Reichert, 2011.

## 1.6 Expressão Heteróloga de Anticorpos

Uma das grandes limitações no emprego de anticorpos terapêuticos é o seu complexo processo de produção. As limitações encontram-se principalmente na baixa quantidade produzida e no alto custo no processamento e purificação das proteínas, o que de certa forma dificulta o acesso ao medicamento por boa parte dos pacientes (Makrides, 1999).

Um sistema de expressão que tem se mostrado eficiente para a produção de anticorpos e seus fragmentos é a expressão em leveduras. As leveduras já são utilizadas na síntese de diversas proteínas recombinantes para uso terapêutico, como por exemplo, a insulina, glucagon, antígeno de superfície da hepatite B, dentre outras (Gerngross, 2004). Esse sistema combina o rápido crescimento e a facilidade de manipulação genética dos procariotos com

características típicas de sistemas eucarióticos, como a presença da maquinaria eucariótica de síntese de proteínas, a qual possibilita a produção de polipeptídeos que requerem modificações pós-traducionais, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Cereghino & Cregg, 2000). Além disso, as leveduras vêm sendo utilizadas para produzirem altas taxas de proteínas, incluindo proteínas de mamíferos, como por exemplo, foi relatada a produção de até 14,8 g/L de proteína em *Pichia pastoris* (Werten *et al.*, 1999).

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

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

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



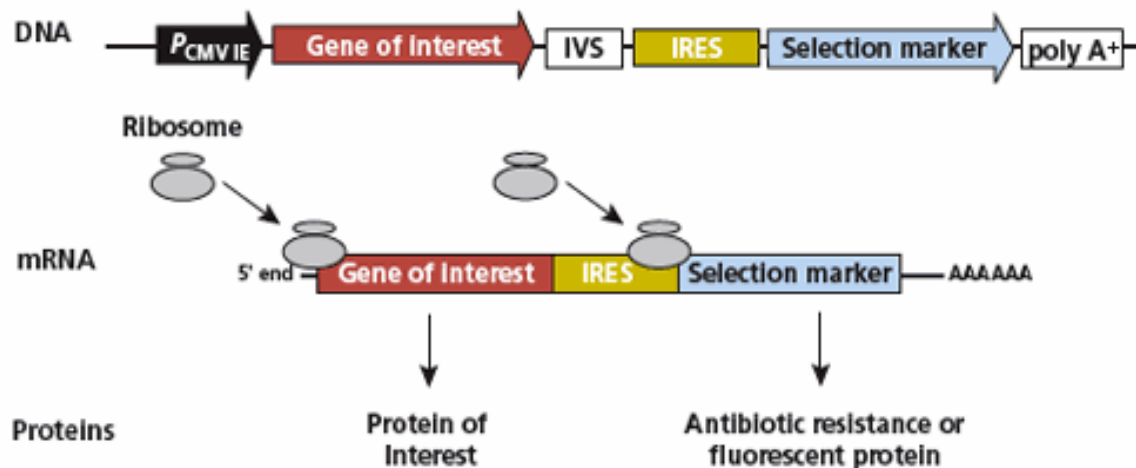
em 2004, foram alcançados níveis de expressão de anticorpos em torno de 4,7 g/L (Wurm, 2004).

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

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

A adição de uma marca seletiva na transfecção é interessante quando se pretende selecionar um clone altamente produtor e estável. Esses são parâmetros essenciais para a produção em larga escala de proteínas recombinantes. Após a transfecção, o transgene é transportado para o núcleo e integrado no genoma por recombinação não homóloga. O sítio de integração do transgene desempenha um papel importante na taxa de transcrição do gene recombinante. A integração em regiões de heterocromatina resulta em baixa expressão ou bloqueio da mesma, enquanto que a integração em regiões de eucromatina frequentemente permite a expressão do gene recombinante.

Entretanto, a integração em região de eucromatina pode não ser suficiente para permitir uma expressão por longo tempo (Figura 8).



**Figura 8. Mecanismo de ação do sítio interno de entrada ribossomal (IRES, do inglês, Internal Ribosome Entry Site) em um processo de tradução.** Pcmvie: promotor. Gene of interest: gene de interesse. Selection marker: marca seletiva. IVS: íntron sintético. Poly A: sinal de poliadenilação (Clontech).

Geralmente, a expressão do transgene é rapidamente silenciada, provavelmente devido à influência de regiões de cromatina condensada próximas ao sítio de integração ou ainda devido a efeitos epigenéticos como a acetilação e metilação de histonas e a metilação do DNA (Richards & Elgin, 2002; Mutskov & Felsenfeld, 2004).

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

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

A forma de cultivo possui papel chave na taxa de expressão de proteínas recombinantes. Dois formatos principais vêm sendo empregados em culturas de células de mamíferos: a cultura de células aderidas e as culturas em suspensão, sendo essa a mais comum. A cultura de células aderentes é uma técnica mais simples perto dos complexos processos de produção em suspensão existentes hoje, alcançando taxas de produção de proteínas em torno de 50 a 200 mg/L. A grande desvantagem desse processo é a impossibilidade de produção na escala de grama/litro devido à razão células/volume ser muito menor quando comparada a de um tanque otimizado (Wurm, 2004).

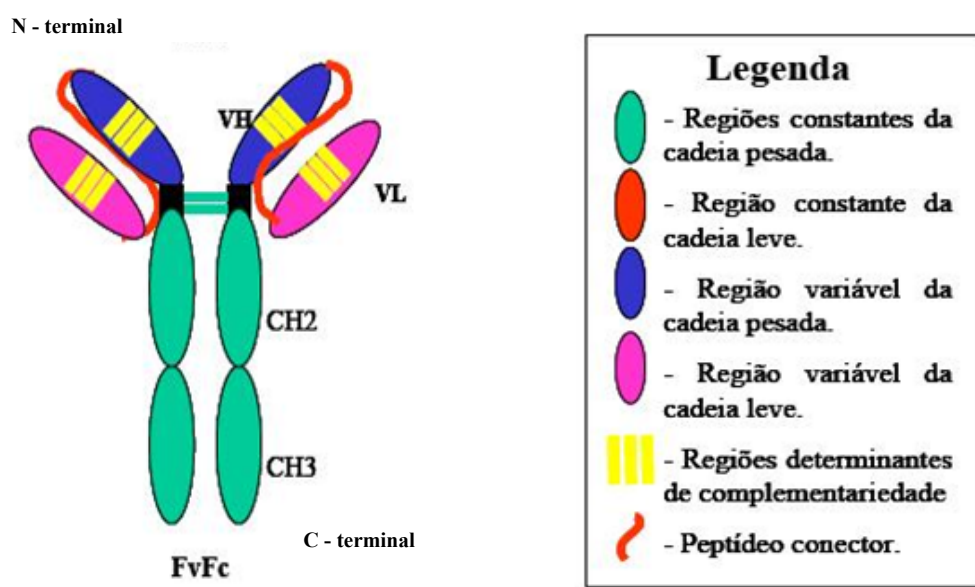
Atualmente a maioria dos processos otimizados de alta produção de proteínas envolve culturas em suspensão. Nesse cenário, as células CHO dominam a área de produção em massa de proteínas recombinantes devido à sua capacidade de crescimento em suspensão. Outras linhagens celulares que crescem bem em suspensão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

### **1.7 Anticorpos anti-CD3 e o Grupo de Imunologia Molecular da UnB - UnB**

O grupo de Imunologia Molecular da UnB desenvolve desde 1998 uma linha de pesquisa em produção de anticorpos humanizados para uso clínico juntamente com os grupos do Laboratório de Anticorpos Monoclonais do Instituto Butantan e do Laboratório de Transplantes do InCor. O projeto inicial visava a produção de anticorpos anti-CD3 humanizados para uso em transplantes, partindo da experiência do grupo do Instituto Butantan de produção de anticorpos monoclonais para uso clínico. Esse projeto foi em

seguida incluído nos projetos do Instituto de Investigação em Imunologia clínica (iii) que é amparado também pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) e de investigação clínica ([www.iii.org.br](http://www.iii.org.br)).

Durante os processos de humanização dos AcMos anti-CD3 pelo grupo, foram originados duas versões de anticorpos chamados FvFc (Fv de cadeia única fusionada a região Fc de IgG1) (Figura 9), baseados em um desenho humanizado do anticorpo OKT3 (Silva, 2008). Esse desenho que preserva um número reduzido de resíduos de aminoácidos originais do anticorpo murino mostrou-se capaz de se ligar a linfócitos humanos.



**Figura 9.** Estrutura do fragmento FvFc, a fração variável (Fv) de cadeia única é fusionada a fração constante (Fc) de uma IgG1. FONTE: Maranhão & Brígido, 2001.

As versões produzidas são capazes de se ligar especificamente ao antígeno CD3, porém com uma capacidade baixa de competir com o mAb OKT3 original. Apesar disso, induziram um padrão de resposta anti-inflamatória, *in vitro*, caracterizada pela indução de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$ . Com relação ao efeito do OKT3, observou-se uma inversão nesta razão (IL-10/IFN- $\gamma$ ), sugerindo uma atividade antagônica dos anticorpos humanizados e do OKT3 murino. Outra observação importante é que os anticorpos humanizados também se mostraram muito pouco mitogênicos (Silva *et al.*, 2009).

Esses resultados sugerem que os anticorpos produzidos têm propriedades imunorreguladoras, mas devido a baixa afinidade observada sugere também que os efeitos farmacológicos desses anticorpos dependerão de uma quantidade muito grande de imunoglobulina, talvez inviabilizando seu uso clínico. Assim, propomos nesse projeto tentar

recuperar parte da afinidade perdida no processo de humanização. Para isso nos baseamos no conhecimento da interação do OKT3 e seu antígeno, o CD3, sugerido pelos dados cristalográficos gerados por Kjer-Nielsen *et al.*, (2004). Esse trabalho que foi publicado depois da proposição das cadeias humanizadas, mostra com uma resolução de 2,1 Å, a estrutura do anticorpo OKT3 e um antígeno CD3 recombinante. O projeto se baseia em tentar identificar possíveis alterações introduzidas no processo de humanização que possam estar comprometendo a interação, reduzindo a energia livre de interação, e conseqüentemente a afinidade entre o anticorpo humanizado e o antígeno CD3. Identificados esses resíduos, propomos testar sua importância na interação anticorpo humanizado-antígeno pela análise de mutantes obtidos pela técnica de mutagênese sítio específico (Costa, 2004).

O interesse em otimizar a ligação de um anticorpo anti-CD3 recombinante humanizado, surgiu a partir da necessidade de melhorar a afinidade de ligação ao antígeno CD3 $\epsilon\gamma$ , em comparação ao anticorpo parental, preservando um baixo potencial imunogênico. A humanização deste anti-CD3 foi realizada por Fonseca (2000), pela técnica *CDR grafting*, sendo realizada por transplante de CDR. Para isto, foram escolhidos arcabouços humanos para cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) que possuíam maior similaridade com a sequência do anticorpo murino, para manter a especificidade de ligação característica do OKT3.

Para análise do impacto estrutural do transplante das CDRs do OKT3 nessa sequência germinal foram realizadas análises a partir da estrutura cristalográfica do anticorpo murino 1MRC depositada no banco de dados de proteína (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*). Foram também analisados quais os resíduos de aminoácidos descritos na literatura como importantes para a estrutura tridimensional. A partir dessa análise, o resíduo 86 (presente no arcabouço 3 [FR3, do inglês, *framework 3*]) da cadeia variável pesada foi considerado estruturalmente importante, pois se situa na base das CDRs 2 e 3. Essa análise possibilitou a criação de duas versões da cadeia variável pesada, uma com o resíduo murino treonina (hVH<sup>T86</sup>) e outra com o resíduo humano arginina (hVH<sup>R86</sup>) (Fonseca, 2000). Para verificação da manutenção da atividade ligante dos anticorpos humanizados foram construídas por Costa (2004), seis versões de scFvs recombinantes: duas humanizadas, uma com o hVH<sup>T86</sup> e outra com o hVH<sup>R86</sup>; três versões hemi-humanizadas, duas compostas das respectivas cadeias pesadas humanizadas em conjunto com a cadeia leve murina e outra contendo a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada; e por último, uma versão totalmente murina.

Foi possível observar que a humanização da cadeia pesada realizada pela técnica de “melhor encaixe”, onde se procura sequências similares ao anticorpo OKT3 inteiro, foi bem

sucedida. Porém, a humanização da cadeia leve, ocasionou perda de afinidade de ligação ao antígeno, mostrada pelos ensaios de bloqueio realizados, utilizando uma versão com a cadeia pesada murina e a cadeia leve humanizada que não conseguiu bloquear eficientemente a ligação do OKT3. A estratégia utilizada para a humanização da cadeia leve foi diferente da utilizada para humanização da cadeia pesada. Foi feita baseada no alinhamento da sequência do anticorpo murino OKT3 e de um anticorpo humano, escolhendo apenas sequências do arcabouço do OKT3 na busca e seleção do anticorpo humano mais similar.

Os ensaios de ligação direta utilizando citometria de fluxo, mostrou que todas as versões possuem capacidade de ligação ao antígeno, exceto a versão hemi-humanizada com o VH murino e o VL humanizado, sugerindo que a humanização do VL não foi bem sucedida (Costa, 2004). Com o objetivo de melhorar a capacidade e a especificidade de ligação ao antígeno CD3, foi realizado por Silva (2008), a re-humanização da cadeia leve, utilizando a técnica de “melhor encaixe” onde foi escolhida a sequência germinal mais similar à sequência da cadeia leve do OKT3 para doação do arcabouço onde seriam inseridas as CDRs murinas. Foram construídas duas versões humanizadas de anticorpos recombinantes no formato de FvFc. As versões possuem uma nova cadeia variável leve humanizada e por uma das duas cadeias variáveis pesadas humanizadas anteriormente (Fonseca, 2000), contendo o resíduo murino treonina ou humano arginina na posição 86.

Análises estruturais realizadas por Fonseca (2000), mostraram que essa posição possui grande relevância estrutural para o arranjo das CDR2 e 3, portanto uma mudança de aminoácido nessa posição pode impactar significativamente a capacidade de ligação do anticorpo. Apesar desses dados favoráveis, os experimentos realizados por Silva (2008), mostraram que os anticorpos humanizados não conseguiram bloquear eficientemente a ligação do OKT3 devido a uma provável perda de afinidade dessa versão e possivelmente estando novamente envolvida com humanização da cadeia leve. Além disso, as duas versões humanizadas foram capazes de induzir um padrão de resposta anti-inflamatória, *in vitro*, caracterizada pela indução de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$ . Com relação ao efeito do OKT3, observou-se uma inversão na razão IL-10/IFN- $\gamma$ , sugerindo uma atividade antagônica dos anticorpos humanizados e do OKT3 murino. Outra observação importante é que os anticorpos humanizados também se mostraram muito pouco mitogênicos (Silva *et al.*, 2009).

Os dados relacionados à análise estrutural da ligação do OKT3 ao CD3 por cristalografia de raio-X revelam que a interação entre o antígeno e o anticorpo é 69% garantida pelos resíduos presentes nas HCDRs 2 e 3 da cadeia pesada (Kjer-Nielsen *et al.*, 2004). Apesar de a cadeia pesada ser importante para a interação com o antígeno, não se pode descartar o papel da cadeia

leve na estabilização da cadeia pesada e de suas regiões hipervariáveis na ligação ao antígeno. Sendo essa provavelmente, uma das causas da perda de afinidade da versão humanizada. Desta forma foram necessárias novas análises com base na semelhança entre a sequência do anticorpo humanizado por Silva, (2008) (versão RVL) e do anticorpo murino OKT3.

Para isto foi utilizado o modelo predito por cristalografia entre o OKT3 e o antígeno CD3 $\epsilon$  $\gamma$  produzido por Kjer-Nielsen, (2004) para a análise estrutural. O arquivo 1SY6 foi obtido do banco de dados PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) e analisado com o programa Rasmol e scripts de Perl para detectar as distâncias entre cadeias e superfície de interação. Os resultados anteriores demonstram que os anticorpos humanizados devem manter suas cadeias leves e pesadas o mais próximo possível da sequência murina, preservando um baixo potencial imunogênico e mitogênico.

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo refinado por análises estruturais seguida de mutagênese sítio-dirigida para otimização da capacidade específica de ligação do anticorpo recombinante anti-CD3 humanizado.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar um estudo estrutural comparativo da estrutura do anticorpo anti-CD3 humanizado.
2. Realizar mutações sítio dirigidas utilizando o anticorpo anti-CD3 FvFv versão RVL como molde.
3. Clonar em vetor de expressão para células de mamíferos as versões mutadas de FvFc anti-CD3.
4. Expressar as versões humanizadas recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO).
5. Propor procedimento padronizado para purificação de anticorpos recombinantes provenientes do sobrenadante de cultura de célula de mamíferos.
6. Analisar a atividade de ligação das construções recombinantes ao antígeno CD3 *in vitro*.
7. Expressar e purificar as cadeias  $\gamma\epsilon$  do receptor CD3 humano em bactéria.

## **MATERIAIS e MÉTODOS**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Células

##### Linhagens Bacterianas

Tabela 2. Microrganismos utilizados.

Célula	Empresa	Genótipo	Nº Catálogo
XL1-Blue	Stratagene®	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	#200159
BL21 (DE3)	Stratagene®	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	#200131
BL21 (DE3) pLysE	Stratagene®	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysE (Cam<sup>R</sup>)</i>	#200132

##### Linhagem de Células de Mamíferos

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

##### Linfócitos humanos

Os Linfócitos humanos foram obtidos do sangue periférico de doador normal.

##### 3.1.2 Plasmídios Utilizados

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

- **pGFP/NEO** – 11,2 kb, Possui promotor de timidina quinase (pTK), NEO<sup>R</sup>, sítio múltiplo de clonagem, sinal de poliadenilação TkpA, promotor pRSV-LTR, sinal de

poliadenilação SV40polyA, origem de replicação ORI e gene da  $\beta$ -lactamase (bla). Utilizado em co-transfecções com o vetor pMAC PS CD18.

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

- **pGS-21a (GenScript)** – 6,69 kb, promotore T7, ori ColE1, ori f1, AmpR, múltiplos sítios de clonagem, origem de replicação ORI e gene da  $\beta$ -lactamase (bla). É utilizado para expressão e clonagem. Duas sequências de 6xHis foram introduzidas no vector para fácil detecção e purificação das proteínas. A primeira sequência de 6xHis está ligada gene que codifica a proteína glutathione S-transferase (GST) e pode ser clivada por enteroquinase. A segunda sequência de 6xHis pode ser utilizada para a detecção e purificação.

- **pGEX-2T (GST Gene fusion) (Amersham)** – 3,948 kb, promotor Tac, lac *I<sup>q</sup>*, possui sitio de clivagem para trombina e factor Xa para separar a proteína de interesse caso seja necessário. É utilizado para expressão da glutathione S-transferase (GST).

### 3.1.3 Soluções Estoques de Inibidores de Proteases

#### **PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) 0,1 M**

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

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

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

### 3.1.4 Iniciadores Utilizados para as Mutagêneses Sítio Dirigidas e Sequenciamento.

Os iniciadores foram fornecidos pela IDT® e solubilizados em água Milli-Q para concentração de uso de 10  $\mu$ moles/ $\mu$ L. A tabela 3 mostra as sequências de cada um dos oligonucleotídeos e a forma de utilização.

**Tabela 3. Relação dos iniciadores utilizados para as mutagêneses sítio dirigidas e sequenciamento.**

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência do Oligonucleotídeo</b>	<b>Utilização</b>
5' JDPVH1F (interno)	5' GTGGTTATACTTTTACCCGATATACTAT 3'	Inserir resíduo de arginina (R) na posição 31 da VH do FvFc hCD3
3' JDPVH1R (interno)	5' ATAGTATATCGGGTAAAAGTATAACCAC 3'	Reverso complementar do iniciador 5' JDPVH1F
5' JDPVH2F (interno)	5' GCGATAAGTCTACTTCCACCGTGT 3'	Inserir resíduo de lisina (L) na posição 74 da VH do FvFc hCD3
3' JDPVH2R (interno)	5' TACACGGTGGAAGTAGACTTATCGC 3'	Reverso complementar do iniciador 5' JDPVH2F
5' JDPVL1F (interno)	5' AGCTCCTCGTCGGCTGATCTAC 3'	Inserir resíduo de arginina (R) na posição 45 da VL do FvFc hCD3
3' JDPVL1R (interno)	5' GTAGATCAGCCGACGAGGAGCTT 3'	Reverso complementar do iniciador 5' JDPVL1F
5' JDPVL2F (interno)	5' TGGTACCGACTACACCTTGACTATTTC 3'	Inserir resíduo de tirosina (Y) na posição 70 da VL do FvFc hCD3
3' JDPVL2R (interno)	5' AATAGTCAAGGTGTAGTCGGTACCAG 3'	Reverso complementar do iniciador 5' JDPVL2F
5' JDP EXTERNOF (externo)	5' TGTTTCAGCACTGACAATATGAC 3'	Iniciador externo utilizado para gerar fragmento mutados de DNA dupla fita, quando combinados com os iniciadores internos. Para amplificação final dos Fab. Sequenciamento dos Fab mutados e clonados no vetor pMIREs hCD3
3' JDP EXTERNO R (externo)	5' CATGGTTAATCTCGAGTTTGG 3'	Reverso complementar do iniciador externo JDP EXTERNOF
SP6	5' CATGGTTAATCTCGAGTTTGG 3'	Sequenciamento dos Fab mutados e clonados no vetor pGEM®-T Easy
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Reverso complementar do iniciador SP6

### 3.1.5 Meios De Cultura E Soluções Para Bactérias

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

Peptona de caseína 1,0% (p/v)

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

NaCl 1,0% (p/v)

pH 7,0.

### **Meio LB ágar**

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

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

Peptona de caseína 3,0% (p/v)

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

MOPS 1,0% (p/v)

pH 7,0.

### **Meio SOB**

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

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

NaCl 0,06% (p/v)

KCl 0,002% (p/v)

pH 7,0.

### **Meio SOC**

Meio SOB 98 mL

Solução estoque de  $Mg^{2+}$  2 M 1 mL

Solução estoque de glicose 2 M 1 mL

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

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

### **Solução estoque de Mg 2 M**

$MgCl_2$  1 M

$MgSO_4$  1 M

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

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

### **3.1.6 Meios de Cultura e Soluções para Cultura de Células de Mamíferos Meio Ham-F12 com L-Glutamina a 2 mM (Invitrogen®, no cat 21700-075)**

#### **Meio Base 1 pacote**

NaHCO<sub>3</sub> 1,176 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p 1 L

pH 7,4

#### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen®, n.º catálogo: 12800-017)**

Meio Base 1 pacote

NaHCO<sub>3</sub> 3,7 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p 1 L

pH 7,4

#### **Meio de Congelamento de Células**

DMEM

Soro Fetal Bovino 20% (v/v)

DMSO 5% (v/v)

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

NaCl 8 g

KCl 0,4 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,048 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 g

Glicose 1 g

Vermelho de fenol 0,01 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L

pH 7,4 43

**Tripsina-EDTA** (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 27250-018)

Tripsina 2,5 g

EDTA 0,38 g

BSS.CMF qsp 1 L

pH 8,0

**Solução de aminoácidos não essenciais 10 mM 100X** (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 11140-050)

pH 0,6 a 1,7.

Estocar de 2 a 8 °C.

**Solução de Vitaminas 100X** (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 11120-052)

pH 5,4 a 7,7.

Estocar de -5 a -20 °C.

**Soro Fetal Bovino** (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 10438-026)

Estocar de -5 a -20 °C.

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

**Soro Fetal Bovino, Ultra low – IgG** (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 16250-086)

Estocar de -5 a -20 °C.

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

### **Azul de Tripán**

Corante Azul de Tripán 400 mg

PBS pH 7,2 q.s.p. 100 mL

**Reagente de transfecção JetPEI™** (Polyplus Transfection, n<sup>o</sup> de catálogo 101-01N)

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



### 3.1.7 Soluções e Tampões de Uso Geral

#### Azida Sódica – Solução estoque 100X

Azida sódica 5% (p/v)

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

#### Tampão TE

Tris-HCl pH 8,0 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

#### Glicerol – Solução estoque

Glicerol 50% (v/v)

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

NaCl 1,5 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M

NaN<sub>3</sub> 0,02% (p/v)

#### Tampão PBS-T 1X, pH 7,4

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

### 3.1.8 Soluções e Material para Preparo de Células Competentes e Transformação Bacteriana

#### Solução de CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 50 mM

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

#### Solução de CaCl<sub>2</sub> + 10% de Glicerol (v/v)

CaCl<sub>2</sub> 50 mM

Glicerol 10%

Esterilizada por filtração e estocada a 4°C

**Glicerol 50% (v/v)**

Esterilizado por filtração e estocada a 4°C

**Cubetas de eletroporação** (Gene Pulser/MicroPulser Cuvettes, Biorad<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: 165-2086)

**3.1.9 Soluções para Extração de DNA Plasmidial****Solução I**

Tris-HCl pH 8,0 25 mM

EDTA pH 8,0 10 mM

Glicose 50 mM

**Solução II**

NaOH 0,2 M

SDS 1,0% (p/v)

**Solução III**

Acetato de potássio 3 M

Ácido Acético 2 M

pH ajustado para 4,8 - 5,0

**RNase A**

RNase A (Invitrogen<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> de catálogo 12091-021).

**Clorofane**

Fenol equilibrado em pH 7,6 1 v

Clorofórmio 1 v

B-hidroxiquinilona 0,05% (p/v)

Equilibrado com 0,1v de Tris-HCl 100 mM pH 7,6

**Clorofil**

Clorofórmio 24 v

Álcool isoamílico 1 v

Equilibrado com 0,25 v de tampão TE

### **Acetato de Sódio 3 M, pH 4,8**

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de pequena escala.

### **Acetato de amônio 7,5 M**

Utilizada para precipitação de DNA em preparação de larga escala.

### **3.1.10 Tampões de Endonucleases de Restrição**

Os Tampões de enzimas de restrição empregados foram aqueles comercializados pela New England Biolabs<sup>®</sup> :

**NEB 1** (B7001S), **NEB 2** (B7002S), **NEB 3** (B7003S), **NEB 4** (B7004S)

### **3.1.11 Tampões de Outras Enzimas**

#### **Tampão de Reação 5X da T4 DNA ligase (Invitrogen<sup>®</sup>)**

Tris-HCl 250 mM

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

ATP 5 mM

DTT 5 mM

PEG-8000 25% (p/v)

pH 7,6

#### **Tampão de Reação 10X da T4 DNA ligase (Promega<sup>®</sup>)**

Tris-HCl pH 7,8 300 mM

MgCl<sub>2</sub> 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

### **3.1.12 Soluções e Reagentes para Eletroforese em Gel de Agarose e de Poliacrilamida**

#### **Tampão de Corrida TEB 10X**

Trizma base 0,89 M

Ácido Bórico 0,89 M

EDTA 0,02 M

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L

pH 8,0

#### **Tampão de corrida TAE 50X**

Tampão Tris-Acetato 2 M

Trizma-base 242 g

Ácido Acético Glacial 57,10 mL

EDTA pH 8,0 0,05 M

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L

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

Tampão de corrida TEB 20X 50% (v/v)

Glicerol 50% (v/v)

Azul de Bromofenol 0,1% (p/v)

Xileno Cianol 0,1% (p/v)

#### **Solução de brometo de etídeo 20.000X**

Brometo de etídeo 10 mg/mL

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

Trizma base 125 M

Glicina 125 mM

SDS 0,5% (p/v)

#### **Tampão de amostra 5X para SDS-PAGE**

Tris-HCl pH 6,8 250 mM

SDS 10% (p/v)

Glicerol 50% (v/v)

$\beta$ -mercaptoetanol 10% (v/v)

Azul de bromofenol 0,5% (p/v)

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

Acrilamida 145 g

Bis-acrilamida 5 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 500 mL

Estocar a 4°C ao abrigo da luz.

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

Tris 36,34 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 200 mL

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

Tris 12,11 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 200 mL

**SDS 10%**

SDS 10 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 100 mL

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

Persulfato de amônio 100 mg/mL de água

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

**Gel Concentrador SDS-PAGE**

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

Tris-HCl pH 6,8 125 mM

SDS 0,1% (p/v)

APS 0,1% (p/v)

TEMED 0,01% (p/v)

**Gel Separador SDS-PAGE**

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) 10% (p/v)

Tris-HCl pH 8,8 400 mM

SDS 0,1% (p/v)

APS 0,1% (p/v)

TEMED 0,01% (p/v)

**3.1.13 Soluções para Coloração de Gel de Poliacrilamida com *Comassie Brilliant Blue* (R-250).****Solução Fixadora para Coloração com Comassie**

Etanol 40% (v/v)

Ácido acético 10% (v/v)

**Solução Corante Comassie Brilliant Blue R-250**

Comassie brilliant blue R-250 1% (p/v)

Etanol 40% (v/v)

Ácido acético 10% (v/v)

**Solução Descorante para Coloração com Comassie**

Etanol 20% (v/v)

Ácido acético 5% (v/v)

**Solução Preservadora para Coloração com Comassie**

Ácido acético 5% (v/v)

**3.1.14 Soluções e materiais para os ensaios imunológicos (ELISA, *Western e Imuno Blot*)****Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)**

Tris-HCl pH 9,5 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 5 mM

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

Trizma-base 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,037% (p/v)

Metanol 20% (v/v)

### **Solução de Bloqueio**

Leite em pó desnatado 5% (p/v)

Dissolvido em PBS 1X

### **Solução Reveladora para ELISA**

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

Dissolvido em APB

### **Solução Reveladora para Western e Imuno Blot**

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

### **Membrana de Nitrocelulose**

Hybond-C Extra (Amersham<sup>®</sup> Bioscience n.º catálogo. RPN 303E)

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

Nunc<sup>®</sup>, Maxisorp e Polisorp, n.º catálogo: 456537 e 467320, respectivamente

#### **3.1.15 Coluna de cromatografia de afinidade**

HiTrap<sup>™</sup> Protein A HP 1mL (GE lifescience, n.º catálogo. 17-0402-01). Para purificação dos FvFc.

#### **3.1.16 Soluções para cromatografia de afinidade**

##### **Tampão de ligação HiTrap Protein A**

Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0

Filtrado em membrana com poros de 0,45 µm

### **Tampão de Eluição HiTrap Protein A**

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

Filtrados em membrana com poros de 0,45 µm

### **3.1.17 Materiais Utilizados para Concentração de Sobrenadantes de Cultura e Proteínas Purificadas e Diálise.**

#### **Concentradores Amicon<sup>®</sup> Bioseparations:**

- Centricon YM-30 (nº. catálogo. 4209)
- Centriprep YM-30 (nº. catálogo 4307)
- Concentrador: Stirred Ultrafiltration Cell Millipore, Modelo 8400 (nº. catálogo. 5124)
- Membrana: Ultrafiltration Membrane. NMWL: 10.000 (nº. catálogo 13642)

#### **Membrana para diálise, celulose de alta retenção em forma de tubos, sem costura**

(Sigma<sup>®</sup>, nº catálogo: D 0655)

Avg.flat width 40 mm (1.6 in.)

MWCO 12400

99.9% retenção

### **3.1.18 Marcadores Moleculares para DNA e Proteína**

**1 kb plus DNA Ladder** – (Invitrogen<sup>®</sup> nº. catálogo. 10787-026)

**1 kb DNA Ladder** – (Invitrogen<sup>®</sup> nº. catálogo. 15615-016)

**Low Mass DNA Ladder** (Invitrogen<sup>®</sup> nº. catálogo. 10068-013)

**High Mass DNA Ladder** (Invitrogen<sup>®</sup> nº. catálogo 10496-016)

**Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus** (Fermentas<sup>®</sup> nº. catálogo SM1811)

**Unstained Protein Molecular Weight Marker** (Fermentas<sup>®</sup> nº. catálogo SM0431)



### 3.1.19 Kits comerciais

**QIAGEN Plasmid Midi Kit 100** – Para preparação plasmidial em escala intermediária (Qiagen<sup>®</sup>, n.º. catálogo 12145).

**QIAGEN Plasmid Maxi Kit 25** – Para preparação plasmidial em larga escala (Qiagen<sup>®</sup>, n.º. catálogo 12163).

**QIAprep Spin Miniprep Kit (250)** - Para preparação plasmidial em pequena escala (Qiagen<sup>®</sup>, n.º. catálogo 27106).

**Qiaquick Gel Extraction kit 50** – Para extração de DNA de gel de agarose (Qiagen<sup>®</sup>, n.º. catálogo 28704).

**Qiaquick PCR purification kit 50** – Para purificação de DNA para seqüenciamento (Qiagen<sup>®</sup>, n.º. catálogo 28104).

**Colunas para extração de DNA de gel de agarose por Freeze Squeeze** – Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore<sup>®</sup>, n.º. catálogo 42600).

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

**Kit BCA Ácido Bicíntrico** - para quantificação de proteínas. Pierce<sup>®</sup> (n.º. catálogo 23225)

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

### 3.1.20 Soluções e Materiais para os Experimentos com Citometria de Fluxo

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

#### **Solução Salina 0,9%**

NaCl 9 g

dH<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L

#### **Tampão de Lavagem para Reação de FACS**

Soro fetal bovino 2% (v/v)

Ázida Sódica 0,02% (p/v)

Dissolvidos em PBS 1X

**Tampão do Citômetro de Fluxo (FACSflow)**

NaCl 162,4 g

KCl 5,6 g

 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  47,0 g (Anidro)

LiCl 8,6 g (dessecador)

EDTA-Na 7,2 g

**Azida 4,0 g (0,02%)** $\text{dH}_2\text{O}$  q.s.p. 20 L 55**Ficoll – Hypaque (d=1,077 g/L)**

Ficoll PM= 400.000 64 g

Diatrizoato de Sódio 99 g

NaCl 0,7 g

 $\text{dH}_2\text{O}$  q.s.p. 1 L

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

**Heparina Sódica (Liquemine™, Roche<sup>®</sup>)**

25.000 UI/5 mL

**3.1.21 Soluções para Purificação de Anticorpos por Precipitação com Sulfato de Amônio**

Solução de sulfato de amônio saturada 767g

 $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p 1L

Aquecer a solução a 50°C e acertar o pH para 7,2 com hidróxido de amônio

### 3.1.22 Anticorpos

Tabela 4. Relação dos Anticorpos utilizados nos ensaios de ELISA, *Western Blot*, *imuno Blot* e FACS.

Anticorpo	Produzido em:	Concentração	Titulação				Empresa catálogo
			<i>Imuno Blot</i>	<i>Western Blot</i>	ELISA	FACS	
Anti – IgG humana (H + L)	Cabra	1,8 mg/mL	1:1.000		1:1000		Pierce® 31119
Anti – Fc humano + Fosfatase Alcalina (AP)	Cabra	1 mg/mL	1:5.000	1:2.500	1:5000		Sigma® A9544
IgG humana	Humano	80 ng/mL			1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243		Sigma® K9001
Anti- CD3 humano (UCTH1) + R-PE	Camundongo	175 µg/mL				1:50	Dako® R810
Anti- CD3 humano (OKT3) + FITC	Camundongo	100 µg/mL				100ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	Dako® F818
Anti – IgG de camundongo + FITC	Cabra	1 mg/mL				100ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	Sigma® F8264
Anti – IgG humana + FITC	Cabra	1 mg/mL				150ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	Sigma® F1641
Anti – CD4 humano (RPA-T4) + R-PE	Camundongo	1 mg/mL				100ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	BD Pharmigen® 555347
Orthoclone OKT3®	Camundongo	1 mg/mL	1:1000	1:1000		(2.5ng/µL) 100ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	Orthobiotech
FvFc anti-CD3 mutados recombinante	CHO					(2.5ng/µL) 100ul/ 1.10 <sup>6</sup> células	

### 3.1.23 - Resinas Cromatográficas

HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare, n.º. cat. 17-5247-01). Para purificação do CD3 solúvel.

GSTrap™ HP 1mL (GE Healthcare, n.º. cat. 17-5281-01). Para purificação do GST solúvel.

Resina de Amilose de Fluxo Rápido (New England *BioLabs* #E8022). Para purificação do CD3 $\epsilon\gamma$

### 3.1.24 – Soluções para Cromatografia

Tampão de Ligação HisTrap FF

20 mM fosfato de sódio

0.5 M NaCl

30 mM imidazol

pH 7.4

**Tampão de Eluição HisTrap FF**

20 mM fosfato de sódio

0.5 M NaCl

500 mM imidazol

pH 7.4

**Tampão de Ligação GSTrap™ HP**

PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3)

**Tampão de Eluição GSTrap™ HP**

50 mM Tris-HCl

10 mM glutathiona reduzida

pH 8.0

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação de DNA plasmidial

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

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

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

- 1- Coletava-se 200 mL de cultura de células de *E. coli*, transformadas com os vetores de interesse, crescidas em meio LB/Amp (150 µg/mL) durante 16 horas a 37°C, por meio de centrifugação de 15 min a 3.000 x g, desprezando-se o sobrenadante.
- 2- Ressuspendia-se o sedimento em 5 mL de Solução I sob forte agitação. Incubavam-se as amostras no gelo por 10 min.

- 3- Adicionava-se 10 mL de Solução II e homogeneizavam-se as amostras, invertendo gentilmente o tubo várias vezes. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 min.
- 4- Adicionava-se 7,5 mL de Solução III, repetindo mesmo procedimento de homogeneização e incubou-se no gelo por 20 min.
- 5- Centrifugava-se a 10.000 x g por 30 min a 4°C.
- 6- O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e ao sobrenadante foram adicionados 0,6v de isopropanol. Após uma incubação de 5 min à temperatura ambiente centrifugava-se a 12.000 x g por 20 min a temperatura ambiente.
- 7- Desprezava-se o sobrenadante e, após a secagem por exposição ao ar, o sedimento foi ressuspensionado em 500 µL de TE ao qual foram adicionados 10 µL de RNase A. Incubou-se por 1 hora a 37°C.
- 8- Adicionava-se 1v de clorofane e, após forte homogeneização e centrifugação de 5 min a 5.000 x g à temperatura ambiente, a fase aquosa foicoletada para outro tubo.
- 9- Repetia-se o passo anterior mais uma vez.
- 10-Adicionava-se 1v de clorofil e repetia-se o mesmo procedimento anterior de homogeneização, centrifugação e coleta.
- 11- Adicionava-se 0,5v de acetato de amônio 7,5M e 2,0v de etanol 100% gelado seguido de incubação por, no mínimo 2 horas a -20°C.
- 12- Centrifugava-se a 12.000 rpm por 45 min a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante.
- 13- Adicionava-se 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugava-se novamente a 12.000 rpm por 15 min a 4°C.
- 14- Após secagem o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de TE, e as amostras foram conservadas a -20°C.

### **3.2.2 Recuperação dos Fragmentos de PCR Gerados Contendo os anti-CD3 Humanizados com suas Respectivas Mutações.**

Os fragmento gerados por PCR foram inicialmente clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy conforme protocolo de ligação listado abaixo. Este vetor foi introduzido em células XL1 Blue competentes que posteriormente foram selecionadas em meio LB com 100µg/ml/Xgal, 80 µg/ml IPTG 0,1mM e 100 µg/ml ampicilina. Para isto inicialmente:

- 1 - Preparou-se o mix para ligação dos fragmentos ao pGEM<sup>®</sup>-T Easy

Mix:

- 1µL de pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (50ng)
- 5µL de inserto digerido (200 ng)
- 5µL de Tampão T4 DNA Ligase 2X
- 1µL de T4 DNA Ligase (3U/µL)
- 3µL H<sub>2</sub>O

- 2 - Incubava-se durante a noite à temperatura ambiente.
- 3 - Misturava-se 5µL da reação de ligação com 100µL células XL1 Blue competente e incubou-se em gelo durante 30 minutos. Aqueceu-se até 42 °C durante 2 minutos.
- 4 - Adicionava-se 1 mL de LB e incubou-se a 37 °C durante 30 minutos. Espalhou-se sobre uma placa de LB contendo 100µg/ml/Xgal 80 µg/ml e IPTG 0,1mM. Incubou-se durante a noite a 37°C.
- 5 - Foi determinado o fenótipo Lac na placa Xgal e recuperados os clones "brancos".
- 6 - Escolhia-se colônias com um palito estéril e repicou-se em uma placa com LB/100 µg/ml ampicilina.
- 7 - Incubava-se a 37 °C durante a noite.
- 8 - Preparava-se miniprep com os clones recuperados e digeriu-se o DNA com as enzimas Xma I e Xho I para determinar a presença do inserto.
- 9 - Os clones positivos foram submetidos a sequenciamento automatizado e posteriormente realizou-se o mesmo procedimento para clonar os fragmento mutados no vetor pMires.

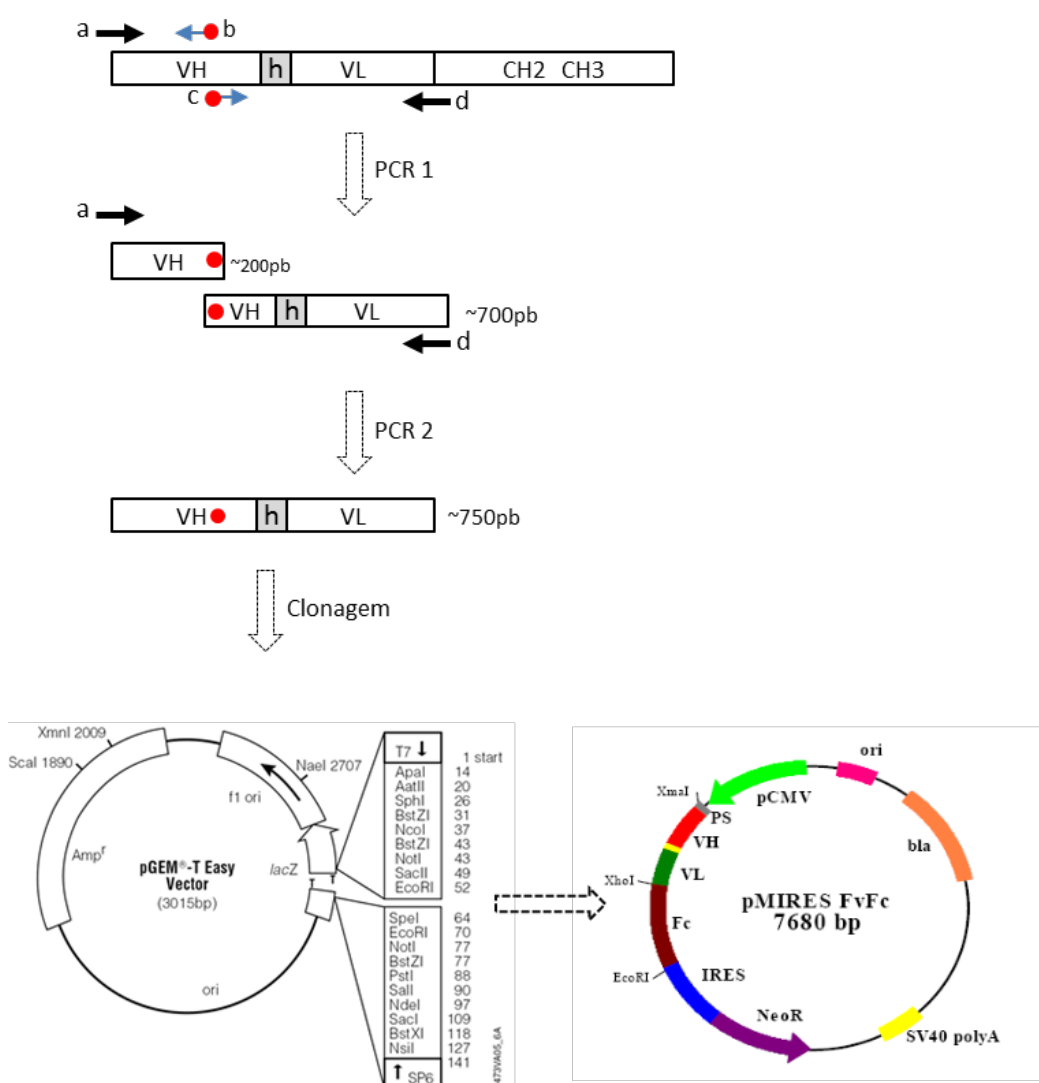
### 3.2.3 Mutagênese Sítio Dirigida por PCR *OverLap*.

A metodologia escolhida para a mutagênese sítio dirigida, foi baseada em PCR *OverLap* (Wu *et al.*, 2005; Angelaccio & Bonaccorsidi, 2002; Kammann *et al.*, 1989). Essa técnica é comumente usada para estudar as relações entre a função e estrutura das proteínas. Mutagêneses usando PCR de *OverLap* requerem combinações complexas de iniciadores para gerar dois ou mais fragmentos de DNA sobrepostos. O procedimento padrão demanda várias etapas de purificação dos produtos de DNA intermediários. Ao gerar sequências complementares nas regiões de sobreposição, os fragmentos de DNA podem funcionar como dois megaprimers permitindo uma extensão por DNA polimerases (Nabavi & Nazar, 2005; Tyagi *et al.*, 2004). A técnica é baseada em duas fases de ampliações por PCR, usando dois

diferentes iniciadores flanqueando nas regiões externas e dois iniciadores internos destinados a gerar as mutações desejadas (Tabela 2).

Durante a primeira fase da PCR, dois iniciadores mutagênicos interno (5' e 3') e dois reversos externos (3' e 5'), são usados para gerar dois fragmentos de DNA dupla fita. Durante a segunda fase, os fragmentos de DNA amplificados na primeira fase são submetido a uma nova reação de PCR flanqueados por dois iniciadores externos para gerar um produto mutado correspondente ao comprimento total da sequência alvo.

A figura 10 descreve o delineamento experimental para obter as mutações internas a partir da sequência original.



**Figura 10. Representação esquemática das mutagenese sítio dirigidas nos genes VH e VL do anticorpo FvFc RVL. Os pontos em vermelho ilustram o gene mutado.**



### 3.2.4 Digestão do DNA Plasmidial com Enzimas de Restrição

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

### 3.2.5 Análise de DNA Plasmidial em Gel de Agarose (Sambrook e Russel, 2001)

A agarose foi preparada de 0,7 a 1,0% em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. As amostras de DNA com tampão de amostra para gel de agarose foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X, como descrito por (Sambrook e Russel, 2001). Para visualização do DNA incidia-se luz ultravioleta no gel utilizando-se um transluminador (Pharmacia-LKB<sup>®</sup>) e a imagem foi digitalizada em aparato de fotodocumentação.

### 3.2.6 Eluição de Fragmentos de DNA de Gel de Agarose

Os fragmentos de DNA a serem eluídos foram cortados do gel de agarose após eletroforese. A eluição do DNA do gel foi feita de acordo com as instruções do fabricante do kit utilizado (Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen<sup>®</sup>) ou submetido ao *Freeze-Squeeze*:

1 - A banda do DNA cortada do gel foi transferida para uma bolsa feita utilizando um pedaço de Parafilm<sup>®</sup>. Duas extremidades da bolsa foram juntas e seladas com o auxílio da parte cônica de um microtubo de 1,5 mL. A banda foi inserida dentro da bolsa pela parte não selada.

2 - A bolsa contendo o fragmento foi então congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

3 - Após o total congelamento, a porção plana da tampa de um microtubo de 1,5 mL foi utilizada para macerar o fragmento até se liquefazer.

4 - O líquido e o gel foram transferidos para colunas Ultrafree DA Centrifugal Unit (Millipore<sup>®</sup>).

5 - O material foi centrifugado por 5 minutos a  $12.000 \times g$  a temperatura ambiente.

6 - Após a centrifugação o material foi precipitado com a adição de 0,1 v de acetato de sódio 3M, 60 µg de glicogênio e 2,5v etanol 100% gelado. Procedeu-se a uma incubação a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante a noite para um melhor rendimento da precipitação.

### 3.2.7 Ligação de Fragmentos de DNA

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

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

A reação de ligação foi realizada de acordo com instrução do fabricante da T4 DNA Ligase utilizada. Após incubação, em geral de 16 horas a 4°C, foram usados para transformar células de *E. coli*.

### 3.2.8 Preparação de Células Competentes e Transformação Bacteriana

#### 3.2.8.1 Por Choque Térmico CaCl<sub>2</sub>

- 1- Inoculava-se 500 µL de um pré-inóculo, feito a partir de uma colônia isolada da célula de interesse, em 50 mL de meio LB. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (OD<sub>600nm</sub>) de 0,1 a 0,3.
- 2- Centrifugava-se a 3.000 x g por 15 min a 4°C, desprezando-se o sobrenadante (Após essa etapa é importante que em todas as etapas subsequentes as células sejam mantidas resfriadas para evitar uma perda de eficiência).
- 3- O sedimento foi ressuspensionado em 10 mL 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 foi ressuspensionado em 1 mL 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 foram aliqüotadas e podiam ser usadas por um período máximo de 24 horas.
- 7- Incubava-se de 100 a 200 µL de célula competente com o plasmídeo de interesse a ser transformado em banho de água/gelo por 30 min.
- 8- Procedia-se o choque térmico incubando-se o sistema de transformação em banho a 42°C por 3 min.
- 9- Adicionava-se imediatamente 1 mL de meio LB e incubava-se por 1 h a 37°C.

10- Semeava-se quantidades variáveis do sistema de transformação em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina a 150 µg/mL. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

### 3.2.8.2 Por Eletroporação

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

2- Inoculava-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2M. Incubava-se a 37°C a 220 rpm até a cultura atingir uma  $OD_{600nm}$  de 0,7 a 0,9.

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

4- O sedimento foi ressuscitado em 25 mL de glicerol 10% estéril gelado e a seguir adicionava-se mais 75 mL de glicerol 10% gelado.

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

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

7- O sedimento final foi ressuscitado em 1 a 2 mL de glicerol 10% e as células foram alíquotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80°C.

8- Para a transformação, o plasmídeo, já em um tubo resfriado previamente, foi adicionado à célula competente e imediatamente colocado na cubeta de eletroporação (BioRad<sup>®</sup>) também já resfriadas.

9- A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O τ esperado nessa condições é de 4,0 a 5,0 milisegundos.

10- Imediatamente após o choque a cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC e o meio foi recolhido para um tubo de centrifugação de 50 mL.

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

### 3.2.9 Sequenciamento Automático de DNA e Análise de Sequências

Após ter sido realizada uma análise de restrição, para verificar a presença dos FvFc mutados no vetor pMIREs hCD3 (Figura 9) e no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega), os clones positivos foram sequenciados utilizando-se o sequenciador automático MegaBACE 500Plus (Molecular Dynamics<sup>®</sup>). Foram utilizadas de 150 a 200 ng do vetor, 10 picomoles do oligonucleotídeo apropriado e o kit “*DyeEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*”.

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

### 3.2.10 Cultura de Células de Mamíferos

Durante toda a manutenção da cultura, as células foram observadas em microscópio invertido de contraste de fase NIKON DIAPOH e incubadas em estufa a 37<sup>o</sup> C, 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade.

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

- 1 - As células em cultura aderente foram lavadas 3 vezes com BSS.CMF. Após esse procedimento, foram adicionados 5 mL de tripsina para que as células se soltassem da garrafa de cultura.
- 2 - A suspensão celular foi então transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL, ao qual se adicionava 5 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% de Soro fetal bovino (SFB), para a inativação da tripsina que é nociva as células.
- 3 - As células foram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.
- 4 - O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado no meio de cultura remanescente do tubo.

5 - As células foram distribuídas em alíquotas de 500 µL em criotubos, onde foram adicionados 500 µL de meio de congelamento.

6 - Os criotubos foram incubados a 4°C por 30 minutos, depois a – 20°C por 30 minutos e depois a –80°C durante a noite. As células poderiam permanecer estocadas a esta temperatura ou ser transferidas para a estocagem em nitrogênio líquido.

### **3.2.10.2 Descongelamento de Células CHO (Ruggiero, 2002).**

1 - Os criotubos foram transferidos para um banho de 37°C até o total descongelamento das células.

2 - As células foram plaqueadas em densidade de  $2 \times 10^2$  células por garrafa de  $25\text{cm}^2$  em meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB.

### **3.2.10.3 Tripsinização, Passagem das células e Formação de Monocama Celular (Ruggiero, 2002).**

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

1 - O meio de cultura da garrafa foi descartado.

2 - Foram adicionados 5 mL de tripsina a garrafa.

3 - Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células foi acompanhado por visualização a olho nu.

4 - A tripsina foi neutralizada com cerca de 5 mL de meio acrescido de 10% de SFB.

5 - A suspensão celular foi transferida para tubos falcon de 50 mL, e centrifugados a  $130 \times g$  por 8 minutos.

6 - O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 3 mL de meio acrescido de SFB.

7 - Foi transferida toda a população células por garrafas de  $75\text{cm}^2$  ou  $150\text{cm}^2$  contendo 10 mL ou 30 mL de meio acrescido de SFB.

### **3.2.10.4 Estimativa do Número de Células por Meio de Contagem em Câmara de Neubauer (adaptado de Spector *et al.*, 1998).**

1 - As células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1mL de meio de cultura.

2 - A câmara de Neubauer foi coberta com a lamínula e foram aplicados 10µL de suspensão de células em cada compartimento da Câmara. Caso alguma diluição tivesse sido necessária, o número de células contado foi multiplicado por esse fator de diluição.

3 - As células foram observadas em microscópio óptico (na objetiva com aumento de 40 vezes) e contadas nos quadrantes. Em seguida, foi utilizada a fórmula:

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

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

1 - As células foram tripsinizadas e transferidas para um tubo falcon de 15mL, ao qual adicionou-se 5 mL de meio com SFB.

2 - As células foram centrifugadas a 130 x g por 8 minutos.

3 - O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 3mL de meio de cultura remanescente.

4 - Vinte microlitros da suspensão celular foram incubados com 80µL da solução de Azul de Tripán (diluição de 5 vezes da cultura).

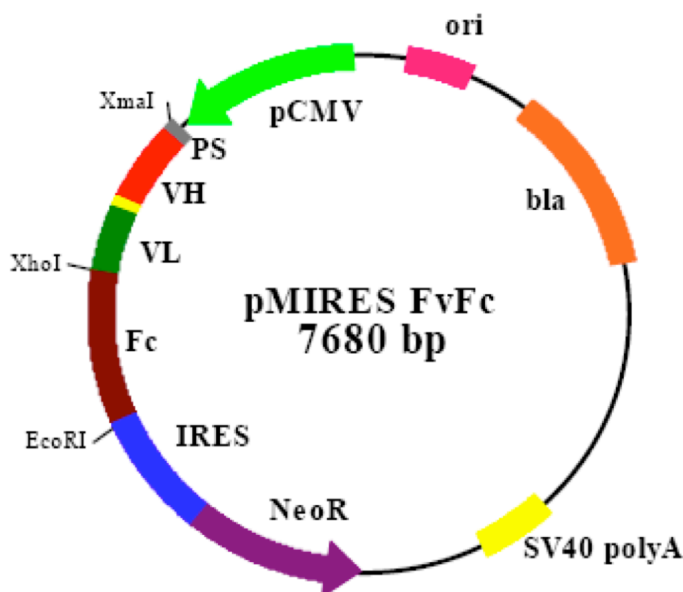
5 - A câmara de Neubauer foi montada, e nela aplicou-se um volume de 10µL da mistura.

6 - Foram contadas 200 células, entre viáveis (transparentes) e não-viáveis (azuis). A célula não-viável tem a membrana celular mais permeável, e por isso, o corante entra na célula, tornando-a azul. Após a contagem, foi estabelecida a porcentagem de células viáveis.

### **3.2.11 Expressão dos FvFc com as Mutações de Interesse em CHO**

Para a expressão dos FvFc de interesse em CHO foi escolhido o vetor pMIREs hCD3. Esse vetor foi escolhido com o objetivo de se alcançar taxas de produção das proteínas recombinantes significativas e estáveis em células de mamífero. Possui como características um promotor de citomegalovírus (pCMV), promotor largamente utilizado para expressão de bons níveis de proteínas recombinantes (Liew *et al.*, 2007). Apresenta também um sinal de poliadenilação eficiente do vírus 40 de macaco (SV40, do inglês, Simian Vírus 40) e uma sequência líder que quando traduzida origina um peptídeo sinal para direcionamento da proteína expressa para o aparato secretório da célula. Destaca-se nesse vetor a presença de um sítio de entrada ribossomal interna (IRES) interposto entre o final da região codificadora do anticorpo recombinante e o início da marca de resistência ao antibiótico geneticina, sequência

essa, obtida do vetor comercial pLXIN (Clontech). Essa construção permite a tradução, pelo ribossomo, da sequência do anticorpo clonado e do gene de resistência a partir de um único transcrito na forma policistrônica (Silva *et al.*, 2009) (Figura 11).



**Figura 11. Representação esquemática do Plasmídeo pMIREs hCD3.** Esse plasmídeo possui *pCMV*: promotor de citomegalovírus. *SV40 poly A*: Sinal de poliadenilação. *PS*: Sequência líder codificadora do peptídeo sinal. *Ori*: origem de replicação. *IRES*: sítio de entrada ribossomal interno. *Neo*: gene de resistência ao antibiótico geneticina.

A tradução da marca de resistência garante que durante o processo de seleção das células transfectadas somente aquelas produtoras da proteína de interesse vão ser selecionadas. Isso se dá porque a célula só adquire resistência a geneticina se estiver produzindo o transcrito que contém tanto a marca de resistência como o gene da proteína de interesse. Níveis estáveis de expressão do transgene utilizando-se esse vetor, já foram comprovados em resultados anteriores do nosso grupo (Silva, 2008).

### 3.2.11.1 Transfecção de Células CHO Utilizando o Reagente JetPEI™ (Polyplus Transfection, nº de catálogo 101-01N)

O reagente JetPEI é um polímero catiônico derivado de polietilenimina linear. Suas características inibem a formação de complexos de DNA. O complexo DNA/JetPEI possui a capacidade de se ligar a resíduos da superfície celular e adentrá-la por endocitose. Dentro do

endossomo, o JetPEI se torna uma “esponja” de prótons, tamponando o pH. Esse mecanismo permite o rompimento do endossomo e a liberação do complexo JetPEI/DNA no citoplasma, de onde será transportado para o núcleo.

1 - Em placa de cultura de 6 poços foram semeadas cerca de  $2 \times 10^4$  células por poço, adicionando-se em seguida 2 mL de meio acrescido de 10 % SFB e solução de antibiótico/antimicótico.

2 - As células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 70% de umidade durante a noite, até que se atingisse a confluência ideal de 50 a 60%.

3 - No dia seguinte, em microtubos de 1,5 mL estéreis, as soluções foram preparadas da seguinte maneira: na solução A, para cada transfecção foram diluídos 3 µg do vetor em 100 µL de NaCl 150mM. Na solução B, para cada transfecção foram diluídos 6 µL de JetPEI em 100 µL de NaCl 150mM. As duas soluções foram agitadas rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.

4 - A partir daí, foi adicionada a solução B sobre a solução A (não misturar na ordem inversa), imediatamente a mistura é agitada rapidamente e centrifugadas só para baixar os resíduos das paredes do tubo.

5 - Incubava-se a mistura à temperatura ambiente por 15 minutos.

6 - Adicionava-se 200 µL da mistura por transfecção delicadamente gota a gota, fazendo movimentos em forma de cruz no poço.

7 - Homogeneizar a placa mexendo-a gentilmente.

8 - Após 24 horas o sobrenadante de cultura foi coletado e verificado quanto a presença de proteínas recombinantes.

### **3.2.11.2 Seleção de Células Transfectadas Utilizando Geneticina**

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

1 - Após 48 h da transfecção o sobrenadante de cultura foi coletado para verificação da expressão de proteínas recombinantes e o meio foi repostado adicionado de geneticina a uma concentração final de 600 µg/mL em todos os poços transfectados com o plasmídeo e também no poço com as células não transfectadas, utilizadas como controle.



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

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

### **3.2.11.3 Propagação das Células Transfectadas Selecionadas para Aumento da Expressão**

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

1 – O meio de cultura do poço foi descartado.

2 – Foram adicionados 500 µL de tripsina ao poço.

3 – Após 3 minutos, as células começaram a se descolar da superfície da garrafa. O descolamento das células foi acompanhado por visualização a olho nu.

4 – A tripsina foi neutralizada com cerca de 1 mL de meio acrescido de 10% SFB.

5 – A suspensão celular foi transferida para tubos falcon de 15 mL, e centrifugados a 130 x g por 8 minutos.

6 – O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 3 mL de meio Ham-F12 suplementado com SFB.

7 – Transferia-se toda a população células para garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo 10 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina na concentração já citada.

8 – Quando as células chegavam novamente a uma confluência máxima as células foram então passadas para garrafas de 150 cm<sup>2</sup> contendo 30 mL de meio Ham-F12 acrescido de 10% SFB e geneticina. A partir de então, as células transfectadas foram mantidas nessas condições, trocando-se o meio a cada 48h nas mesmas condições e coletando-se o sobrenadante para acúmulo de quantidade suficiente para purificação dos anticorpos recombinantes e realização dos ensaios biológicos.

### 3.2.11.4 Adaptação da Cultura de Célula a Baixos Níveis de Soro Fetal Bovino

Com o intuito de melhorar a eficiência do processo de purificação dos anticorpos recombinantes e evitar a excessiva contaminação com proteínas presentes no soro fetal bovino, como, por exemplo, albumina e anticorpos bovinos, foi proposta a adaptação da cultura de células a baixos níveis de soro fetal bovino. Utilizamos essa alternativa visto que a total retirada do soro da cultura de células propicia uma mudança no fenótipo das células CHO de células aderentes para não aderentes. Essa mudança de certa forma compromete o trabalho diante a infra-estrutura disponível. Para tal procedimento seriam necessárias garrafas especiais com agitadores e a utilização de meios de custo relativamente elevado.

1 – Utilizava-se como partida as culturas de células transfectadas, já selecionadas com Geneticina ou cultura com os clones estáveis já estabelecidos, que estavam sendo mantidos em garrafas de 150 cm<sup>2</sup>.

2- Foi procedida a substituição do meio Ham-F12 com geneticina e 10% de SFB por meio acrescido de 5% de SFB.

3- A cada 48h foi procedida a troca do meio nas mesmas condições e a coleta do sobrenadante.

4- Após atingir 96h horas da modificação da composição do meio, foi observada a morfologia das células ao microscópio ótico com o intuito de visualizar a manutenção da forma elíptica apresentada por essa célula quando aderida. Estando aderida procedia-se a próxima etapa.

5 – Foi, então, realizada a substituição do meio Ham-F12 com geneticina e 5% de SFB por meio acrescido de 2,5% de SFB.

6 – Em paralelo, foram monitorados os níveis de expressão de proteína recombinante em função das alterações no meio. Os níveis expressos com o vetor utilizado nesse trabalho permaneciam inalterados.

7 – Repetia-se os passos 3, 4, 5 e 6 até que os níveis de soro fetal bovino chegassem a 1,25% no meio utilizado.

8 – A partir de então, a cultura de células foi mantida nessas condições, trocando o meio a cada 48h e coletando sobrenadante para acúmulo de anticorpos recombinantes e futura purificação.

### 3.2.12 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

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

1- Os poços de interesse na placa foram sensibilizados com 50 µL por poço com o anticorpo anti-IgG humana H+L feito em cabra, diluído em Tampão Carbonato pH. 9.6 1X 1:1.000, durante 2 horas a temperatura ambiente.

2- Lavava-se 3X com PBS - T 1X, 200 µL por poço.

3- Bloqueava-se com 200 µL por poço de solução de bloqueio, durante 2 horas a temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C.

4- Lavava-se 3X com PBS - T 1X e adicionava-se o sobrenadante de cultura das células transfectadas ou os FvFc purificados. Foram feitas diluições seriadas de fator comum 3 das proteínas em PBS, onde o volume final foi de 100 µL por poço e títulos de 1:1; 1:3; 1:9; 1:27; 1:81 e 1:243. A mesma diluição foi realizada para todas as amostras. Como padrão utilizava-se IgG humana purificada na concentração especificada no item 3.1.21 dos Materiais (diluída na mesma solução/meio que as proteínas recombinantes). As reações foram feitas em duplicatas. Incubava-se por 2 horas a temperatura ambiente.

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

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

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

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

### **3.2.13 Diálise do Sobrenadante de Cultura Utilizando Membrana para Diálise de Alta Retenção (Sigma<sup>®</sup>, n<sup>o</sup> catálogo: D 0655)**

Foi utilizada uma membrana de diálise com poro de 12400 kDa, a qual permite a passagem de proteínas com tamanho menor que 12400 kDa, e retém as proteínas com peso molecular superior a isso.

1 – 100 mL de sobrenadante foi adicionado ao saco de diálise e encubado em câmara fria, utilizando um recipiente com 10 vezes o volume do sobrenadante, sob agitação. O sistema foi mantido a 4 °C para preservação da membrana.

2 – Os sacos de diálise contendo os sobrenadantes foram dialisados em tampão Fosfato de Sódio 0,1 mM, pH 7.0.

3 – Trocava-se o Tampão de diálise duas vezes por dia, durante três dias.

### **3.2.14 Purificação dos FvFc Recombinados com as Mutações de Interesse por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Proteína A**

A purificação dos FvFc recombinantes foi realizada na coluna HiTrap<sup>TM</sup> Protein A HP 1mL (GE lifescience<sup>®</sup>).

1 – Preparavam-se os microtubos de coleta da eluição adicionando 200 µL de Tris-HCl 1M pH9,0 por mL de fração a ser coletado.

2 – Foi preparada a bomba peristáltica preenchendo-a de tampão de ligação. Retirava-se a tampa da parte superior da coluna e conectava-se a mangueira da bomba peristáltica a coluna cromatográfica gota a gota.

3 - Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação mantendo uma taxa de passagem do tampão pela coluna em 1 mL/min.

4 – Aplicava-se 10 ml de sobrenadante de cultura dialisado.

5 - Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação.

6 – Eluia-se os FvFc ligados com 10 volumes de tampão de eluição pH 3,5 coletando-se as amostras nos microtubos de coleta preparados com Tris-HCl.

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.

Imediatamente após o fim da coleta, 5µL de cada amostra foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose para análise por *Imuno Blot*, seguindo o protocolo do item 3.2.14 de métodos. As amostras onde se detectavam proteínas foram passadas na coluna Centriprep

ou Centricon YM-30 (Amicon<sup>®</sup>), com membrana de exclusão para proteínas maiores que 30 kDa para diálise e concentração.

### **3.2.15 Análise de Proteínas por *Imuno Blot* (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)**

- 1 - Adicionavam-se de 5  $\mu$ L das frações obtidas durante o processo de purificação diretamente a uma membrana de nitrocelulose.
- 2 - Com a membrana seca, contendo as proteínas ligadas, foi procedido o bloqueio utilizando solução de bloqueio por 2h a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C.
- 3 - Após essa etapa a membrana foi lavada 3X com PBST 1X..
- 4 - Incubava-se com o anticorpo Anti-Fc humano (H+L) com Fosfatase Alcalina na diluição de 1:5000 por 2 horas a temperatura ambiente.
- 5 - Após essa etapa a membrana foi lavada 3X com PBST 1X e uma vez com APB.
- 6 - Adicionava-se a solução reveladora (NBT/BCIP). O aparecimento das bandas coloridas foi controlado visualmente. Após a reação, lavava-se a membrana com água destilada até retirar o excesso da solução reveladora e interromper a reação da enzima. Preservava-se a membrana seca, sobre papel filtro.

### **3.2.16 Análise de Proteínas em SDS-PAGE (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)**

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

- 1 - Inicialmente preparava-se o gel separador em concentração de 10% (p/v), sendo a polimerização catalisada pela adição de 0,045% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 2 - Uma vez polimerizado o gel separador, introduzia-se o pente para permitir a formação dos poços.
- 3 - A partir daí, vertia-se o gel concentrador preparado em concentração de 4% (p/v), tendo a sua polimerização catalisada por 0,12% (p/v) de APS e 0,2% (v/v) de TEMED.
- 4 - Uma vez polimerizado o gel, acoplava-o ao aparato de eletroforese. Antes da aplicação das amostras os poços foram lavados com tampão de corrida.
- 5 - Imediatamente antes da aplicação das amostras (já preparadas com o tampão de amostra), procedia-se à fervura das mesmas em banho-maria a 100°C por 10 minutos.
- 6 - Procedia-se a aplicação das amostras e iniciava – se a corrida do gel a 20 mA por gel.

7 - Após a corrida do gel, realizava-se os procedimentos de coloração com *Comassie Brilliant Blue* (R-250) ou prata, especificados respectivamente no item 3.2.14 de métodos. E a realização de *Western Blot*, onde o gel foi submetido à transferência para membrana de nitrocelulose, especificada no item 3.2.12 de métodos.

### **3.2.17 Coloração do SDS-PAGE**

#### **3.2.17.1 Com Comassie Brillant Blue R-250.**

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

#### **3.2.17.2 Com Prata**

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

### **3.2.18 Análise de Proteínas por *Western Blot* (adaptado de Sambrook e Russel, 2001)**

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

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

4 - Removia-se a solução de bloqueio e lavava-se a membrana 3X com PBS-T 1X a temperatura ambiente.

5 - Incubava-se com o anticorpo Anti-Fc humano (H+L) com Fosfatase Alcalina na diluição de 1:5000 por 2 horas a temperatura ambiente.

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

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

### **3.2.19 Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) (Boyum, 1968)**

A separação de CMSP é feita por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque, que se baseia nas diferenças de densidade entre as células mononucleares e os outros elementos do sangue. Após a centrifugação, as CMSP e plaquetas, por serem menos densas que a solução de Ficoll ( $d < 1,077$  g/L), ficam localizadas acima da solução de Ficoll-Hypaque, enquanto as hemácias e as células polimorfonucleares (granulócitos), que têm maior densidade, ficam localizadas abaixo. O sangue obtido de doador normal deve render  $1-2 \times 10^6$  células/mL. Aproximadamente 60 a 70% das células são linfócitos com viabilidade de 95%. Todas as soluções e materiais que entraram em contato com as células estavam estéreis. Se a separação visava somente o ensaio de FACS a separação podia ser realizada fora do fluxo. De outra forma, todos os procedimentos foram realizados em ambiente estéril. Para retirada de sangue de doador normal utilizava-se heparina sódica para evitar a coagulação do sangue. Utilizava-se 100 UI de heparina para cada mL de sangue coletado, previamente adicionados à seringa. Todas as centrifugações devem ser realizadas em rotores *swing*.

1 - Diluía-se o sangue heparinizado 1:2 com solução salina 0,9% estéril.

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

3 - Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 30 min a 19 °C.

4 - Após a centrifugação formava-se 3 fases, na interface da 1<sup>o</sup> (plasma) com a 2<sup>o</sup> (Ficoll) encontrava-se uma nuvem com as células mononucleares. Procedia-se a coleta dessa nuvem com uma pipeta pasteur transferindo-as para outro tubo de 50 mL.

5 - Completava-se o volume do tubo com as células com solução salina 0,9% para diluir o Ficoll que é agressivo para as células

6 - Centrifugava-se a 1800 rpm (400 g) por 10 min a 19<sup>o</sup> C.

7 - Descartava-se o sobrenadante e ressuspensava-se o botão celular com 10 mL de solução salina 0,9% para a reação de FACS. Para outros ensaios ressuspensava-se em meio RPMI 1640 suplementado.

8 - Procedia-se a contagem das células na câmara de Neubauer.

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

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

1 - Adicionava-se de  $3 \times 10^5$  CMSP por reação, em poços de placa de microtitulação de 96 poços com fundo em U.

2 - Centrifugava-se a 1.800 rpm a 4<sup>o</sup> C por 6 min.

3 - Descartava-se o sobrenadante por inversão rápida e depois se encostava a placa em folha de papel toalha para retirar o excesso de tampão.

4 - Ressuspensavam-se as células por forte agitação (vortex) com o tampão remanescente nos poços.

5 - Adicionavam-se 30 µL dos anticorpos ou dos FvFc mutados recombinantes diluídos em tampão de lavagem de FACS (de acordo com o item 3.1.22 de materiais).

6 - Incubava-se no gelo por 30 min ao abrigo da luz.

7 - Adicionavam-se 150 µL de tampão de lavagem de FACS e centrifugava-se nas condições já descritas.

8 - Repetia-se os passos 3, 4 e 7.



9 - Repetia-se os passos 5, 6, 7 e 8 quantas vezes mais ligações com anticorpos fossem necessárias.

10 - Ressuspendiam-se as células em 400 µL de tampão de lavagem de FACS e as transferiam para tubos apropriados para o aparelho de FACS.

11 - A leitura da reação no citômetro de fluxo foi realizada no dia da reação para evitar a morte celular.

### 3.2.21 Leitura da Reação de FACS no Citômetro de Fluxo

1 - O citômetro de fluxo utilizado foi o cyFlow® Space (PARTEC). O programa utilizado para análise dos dados foi o *FlowJo*.

2 - As células foram adquiridas e selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade de maneira a analisar a população de linfócitos

3 - Os dados foram obtidos a partir da análise dos histogramas ou gráficos de pontos fornecidos pelo programa. Os resultados foram expressos em percentagem de células positivas para cada proteínas em estudo. O parâmetro considerado foi a mediana de intensidade de fluorescência.

### 3.2.22 Precipitação dos Anticorpos com Sulfato de Amônio

1 - Descongelava-se o sobrenadante de cultura à temperatura ambiente.

2 - Centrifugava-se por 20 min, 4°C, 1000 rpm.

3 - Coletava-se o sobrenadante, e colocava-se num tubo novo, deixando-se no gelo.

4 - Calculava-se o volume de sulfato de amônio saturado (SAS) que seria adicionado ao líquido para deixá-lo a 45% de saturação:

$$\frac{\text{Volume SAS}}{\text{Volume sobrenadante}} = \frac{1(\text{SF}-\text{Si})}{1 - \text{SF}}$$

SF: saturação final (no primeiro caso = 0,45)

Si: Saturação inicial (no caso = 0)

- 5 - Colocava-se o sobrenadante num béquer, e o béquer num recipiente com gelo. Sob agitação com agitador magnético, colocava-se lentamente o volume calculado de SAS (gota a gota).
- 6 - Deixava-se agitando por 30 minutos na câmara fria a 4°C.
- 7 - Colocava-se o sobrenadante num tubo novo, e guardava-se a 4°C durante a noite.
- 8 - Retirava-se da geladeira, homogeneizava-se e centrifugava-se por 30 min, 2500 rpm, 4°C.
- 9 - Retirava-se o sobrenadante e armazenava-se o precipitado e o sobrenadante a 4°C.
- 10 - Ao sobrenadante, acrescentava-se novamente SAS, porém, num volume que deixasse a solução a 40% de saturação
- 11 - Calculava-se de acordo com o volume de sobrenadante adquirido.
- 12 - Centrifugava-se por 30 min, 2500 rpm, 4°C
- 13 - Desprezavam-se o sobrenadante e diluía-se o pellet com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, pH 7.0 (18 a 20 mL).
- 14 - Lavava-se o saco de diálise com água milli-Q em abundância, dava-se um nó bem forte nas extremidades do saco.
- 15 - Colocava-se o conteúdo do tubo com sobrenadante no saco, amarrava-se a outra extremidade com nó e barbante.
- 16 - Prendia-se o saco de diálise dentro de um béquer de volume grande (2 L ou mais).
- 17 - Completava-se o volume com NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM, pH 7.0 1 , trocava-se vezes ao dia.
- 18 - Mantinha-se sob agitação na câmara fria a 4°C, por 3 dias.
- 19 - Em seguida retirava-se o volume dos sacos, colocando-se em tubos falcon novos.
- 20 - Centrifugava-se por 30 min a 2500 rpm, 4°C.
- 21 - Coletava-se o sobrenadante e filtrava-se com filtro comum e seringa.
- 22 - Guardava-se o volume recolhido e armazenava-se a - 20°C.

### **3.2.23 Expressão da Proteína Recombinante CD3εγ em BL21 (DE3) e BL21 (DE3) pLysE (Stratagene®)**

- 1 - Inoculava-se 500 mL de meio LB contendo 75µg/mL de ampicilina e 25µg/mL de clorafenicol com 500µL do pré-inóculo e incubava-se a 37°C a 250 rpm.
- 2 - Monitorava-se periodicamente a OD<sub>600nm</sub> da cultura até que atingisse a OD de 0,5 – 0,6.
- 3 - Separava-se 1mL da cultura como o controle não-induzido.
- 4 - Induzia-se a cultura com IPTG na concentração final de 1mM.

5 - Crescia-se a cultura a 37°C por 2 horas, retirava-se uma alíquota e para observar a expressão e as células eram mantidas em agitação em 250 rpm a 37°C durante 14–16 horas expressando a proteína de interesse.

6 - Coletava-se as células por centrifugação a 3000 x g a 4°C por 10 min, removiase e descartava-se o sobrenadante. Ressuspendiam-se as células em 15 mL de PBS+NP-40 1% gelado e centrifugava-se a 3000 x g a 4°C por 10 min. Removia-se e descartava-se o sobrenadante.

7 - Ressuspendia-se as células novamente em 15mL de PBS+NP40 1% e mantinha-se as células em gelo.

8 - Lisava-se as células por breves pulsos (pulsos de 10 segundos com intervalos de 15 segundos a amplitude de 60%) de sonicação durante 40 minutos no gelo até que a amostra perdesse a viscosidade.

9 - Centrifugava-se a 12.000 x g a 4°C por 10 min e cuidadosamente transferia-se o sobrenadante (fração solúvel) para um tubo e o sedimento (fração insolúvel) foi guardado a -20°C.

### **3.2.24 Purificação das Proteínas Recombinantes – CD3εγ por Cromatografia de Afinidade com HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®)**

1 - Lavava-se a coluna com 5 volumes de coluna com água destilada.

2 - Equilibrava-se a coluna com 5 volumes de tampão de ligação. As taxas de fluxo recomendados foram de 1 ml/min.

3 - Adicionava-se tampão de ligação da coluna ao sobrenadante na proporção de 1:1.

4 - Filtrava-se o sobrenadante em filtro Millex-HA Filter, 0.45 µm, 33 mm antes de aplicar na coluna.

5 - Aplicava-se o sobrenadante na coluna com o auxílio de bomba peristáltica.

6 - Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação até a absorbância atingir um linha de base estável.

7 - Eluia-se o CD3 com 10 volumes de tampão de eluição de 1 em 1 mL, coletados em tubos de 1,5 mL.

### **3.2.25 Purificação das Proteínas Recombinantes – CD3εγ por Cromatografia de Afinidade com GStrap™ HP 1mL (GE Healthcare®)**

1 - Lavava-se a coluna com 5 volumes de coluna com água destilada.

- 2 - Equilibrava-se a coluna com 5 volumes de tampão de ligação.
- 3 - Adicionava-se tampão de ligação da coluna ao sobrenadante na proporção de 1:1.
- 4 - Filtrava-se o sobrenadante em filtro Millex-HA Filter, 0.45  $\mu$ m, 33 mm antes de aplicar na coluna.
- 5 - Aplicava-se o sobrenadante na coluna com o auxílio de bomba peristáltica. O fluxo recomendado foi de 1 ml/min.
- 6 - Lavava-se a coluna com 10 volumes de tampão de ligação até a absorbância atingir um linha de base estável. O fluxo recomendado foi de 1ml/min.
- 7 - Eluia-se a GST com 10 volumes de tampão de eluição de 1 em 1mL, coletados em tubos de 1,5 mL. O fluxo recomendado foi de 1ml/min
- 8 - A quantificação das proteínas eluídas foi realizada conforme o item 3.2.12.

### **3.2.26 Detecção de Proteínas com Reagente Bradford (1-800-4BioRad)**

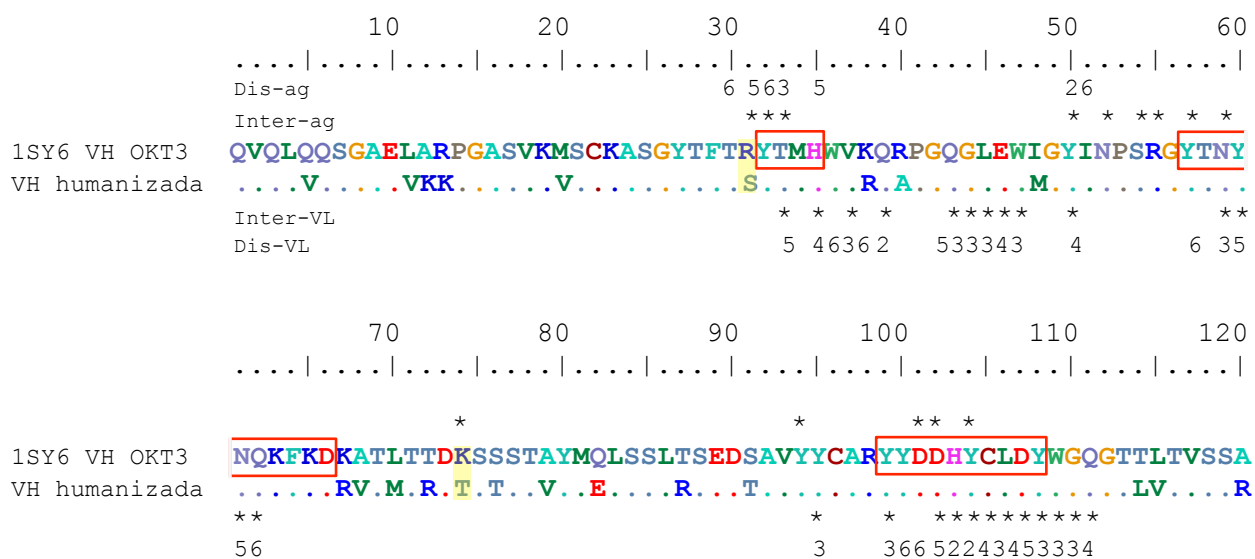
1. Misturar 10  $\mu$ l do extrato cru de proteínas com 790  $\mu$ l de água e 200  $\mu$ l do reagente de Bradford. Pode-se também usar Concentrado BioRad Dye Reagent Concentrate. Deixar em repouso por 5 min;
2. Ler a absorbância a 595 nm. Como controle, fazer uma curva padrão usando várias concentrações de BSA [1 mg/ml-500 mg/ml]. Usar estoque de 1 mg/ml de BSA para preparar a curva padrão.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Estudo Comparativo do Complexo OKT3-CD3

O modelo estrutural 1SY6 foi analisado focando três aspectos: interface de interação fab-antígeno; interface de interação entre os domínios variável leve e pesado (VH-VL); e interações das CDR com os resíduos circunvizinhos. Nessas duas interfaces foram analisadas as conservações em nível de sequência dos resíduos de aminoácidos presentes sendo que o critério para ser considerado um resíduo de interface é que ele deveria estar a menos de 5Å de qualquer outro resíduo na outra interface e deveria ter perdido superfície de acesso ao solvente durante a interação entre moléculas (resíduos enterrados na interface). Na figuras 12 e 13 estão representados, respectivamente, o alinhamento do VH e do VL do anticorpo humanizado, e do OKT3, mostrando resíduos conservados, resíduos enterrados na interface e resíduos com distância menor que 6 Å.



Dis-ag: distância em Å (valor redondo) ao átomo mais próximo a cadeia do antígeno CD3εγ  
 Inter-ag: Resíduos enterrados na interface com o antígeno CD3εγ  
 Inter-VL: Resíduos enterrados na interface com a cadeia variável leve (VL)  
 Dis-VL: distância em Å (valor redondo) ao átomo mais próximo a cadeia variável leve (VL)

**Figura 12. Alinhamento comparativo das cadeias VH do anticorpo OKT3 1SY6 e do anticorpo humanizado.** Os pontos representam resíduos idênticos, acima e abaixo estão listados os resíduos enterrados na interface (\*) e a distância da outra face da interface. Os numerais representam a distância dos resíduos em Å. Os resíduos em destaque amarelo foram selecionados para mutagênese. Os retângulos em vermelho representam as CDRs.



No caso da cadeia leve, os resíduos de contato com o antígeno (CDRs) também estão totalmente conservados nos anticorpos. Mas, são duas situações que envolvem as interações intra e intercadeia chamam a atenção:

1) A localização espacial do resíduo R45 do OKT3. Esse resíduo faz contato intercadeia com a cadeia pesada por meio dos resíduos histidina (H) 103 e ácido aspártico (D) 107, que estão na HCDR3 e no FRW4, respectivamente. Em relação ao resíduo H103 é bem possível que a interação seja feita mediante uma ponte de hidrogênio, já que a distância entre o nitrogênio do grupamento guanidium do resíduo R45 e o nitrogênio do grupamento imidazol da histidina é de 2,42 Å, compatível com uma ponte de hidrogênio entre dois resíduos de aminoácidos. Por sua vez, a H103 faz parte da HCDR3 do OKT3, que faz contato direto com o antígeno. No anticorpo humanizado o resíduo 45 é uma leucina (L). A diferença de resíduos nesta posição pode ter rompido essa interação, prejudicando a aproximação das cadeias, o posicionamento da HCDR3 e consequentemente a interação com o antígeno.

2) O resíduo tirosina (Y) na posição 70. Ao observar o cristal é possível perceber no OKT3 uma interação intracadeia. O grupamento hidroxila da cadeia lateral do resíduo Y70 está a 2,66 Å do resíduo valina (V) 29 e a 4,32 Å do resíduo S30, presentes dentro da LCDR1. Estes dados sugerem que a tirosina na posição 70 pode contribuir para a estabilização da LCDR1. No desenho da VL do anticorpo humanizado foi mantido o resíduo de fenilalanina (F) na posição 70 podendo alterar e comprometer a estabilidade da LCDR1 e consequentemente a ligação ao antígeno (Silva, 2008). Assim as mutações para a cadeia leve do anticorpo humanizado foram resumidas aos resíduos localizados nas posições L45→R45 e F70 →Y70.

#### **4.2 Mutagênese Sítio Dirigida por PCR *OverLap***

Conforme descrito no item 3.2.3, o método de PCR *OverLap* é simples, versátil, e pode ser aplicado para gerar uma única ou múltiplas mutações. Também pode ser usado para criar fragmentos de DNA híbridos, deleções e adição de nucleotídeos internos, com ligeiras modificações (Nelson & Fitch, 2011). Com base na análise estrutural do complexo CD3/OKT3, em comparação com a proteína humanizada deduzida, (Silva *et al.*, 2009; Kjer-Nielsen *et al.*, 2004), foram propostas quatro mutagêneses, sendo duas para o domínio VH e duas para o VL.



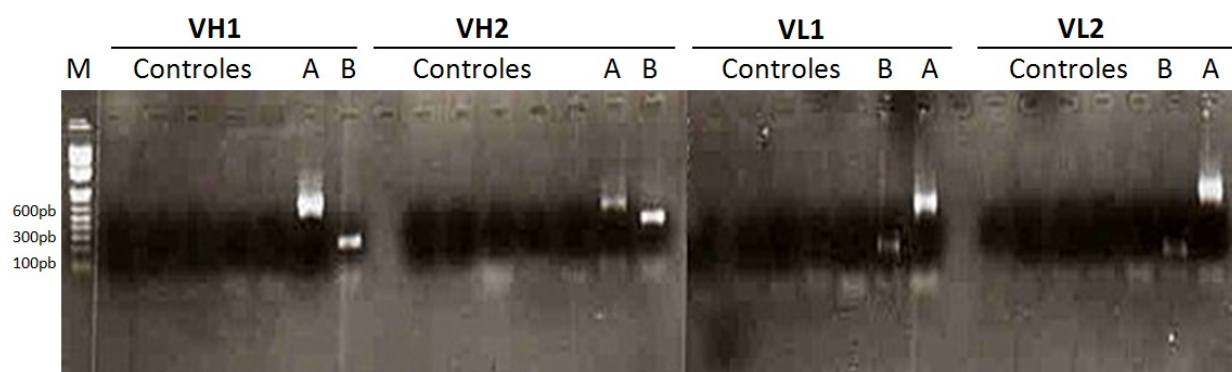
As mutações propostas para o domínio VL foram:

- 1) VL L45R, substituindo o aminoácido leucina 45 pelo aminoácido arginina 45.
- 2) VL F70Y, substituindo o aminoácido fenilalanina 70 pelo aminoácido tirosina 70.

As mutações propostas para o domínio VH foram:

- 1) VH S31R, substituindo o aminoácido serina 31 pelo aminoácido arginina 31.
- 2) VH T74K, substituindo o aminoácido treonina 74 pelo aminoácido lisina 74.

Para a primeira rodada de PCR foi utilizado como DNA molde, o cassete do anticorpo humanizado anti-CD3 FvFc versão R (RVL), clonado no vetor pMIREs hCD3 (Figura 11) (Silva *et al.*, 2009). Cada combinação de iniciadores apropriados, gerou um fragmento de DNA contendo as mutações específicas (item 3.1.4). Estes foram nomeados: VH1A e VH1B, VL1A e VL1B (Figura 14). Estes amplicons foram coletados diretamente do gel com auxílio de pipeta e transferidos para a segunda reação de PCR.



**Figura 14. Amplificação dos VH e VL mutados por reação de PCR de *overlap*, na primeira fase. M: 1 kb Plus ladder Invitrogen®. Controle:** reações de PCR, sem DNA, com DNA e somente um primer. A: **VH1A** (JDPVH1F e JDP EXTERNO REV). B: **VH1B** (JDPVH1R e JDP EXTERNO FOW). A: **VH2A** (JDPVH2F e JDP EXTERNO REV). B: **VH2B** (JDPVH2R e JDP EXTERNO FOW). B: **VL1A** (JDPVL1F e JDP EXTERNO REV). A: **VL1B** (JDPVL1R e JDP EXTERNO FOW). B: **VL2A** (JDPVL2F e JDP EXTERNO REV). B: **VL2B** (JDPVL2R e JDP EXTERNO FOW).

Para a segunda reação, os amplicons A e B de cada reação foram misturados e nomeados da seguinte forma: VH1AB, VH2AB, VL1AB, VL2AB. Foram retirados 5µL de cada mistura para a amplificação com os iniciadores externos flanqueadores, seguindo o passo final da PCR realizado para amplificar os scFvs mutantes completos. Como produto final, foram obtidos fragmentos de DNA com as mutagêneses de aproximadamente 750 pb (Figura 15).



**Figura 15. Amplificação final dos VH e VL mutados por reação de PCR *OverLap*, na segunda fase. M: 1 kb Plus ladder Invitrogen®. Controles: reações de PCR, sem DNA, com DNA e somente um iniciador.**

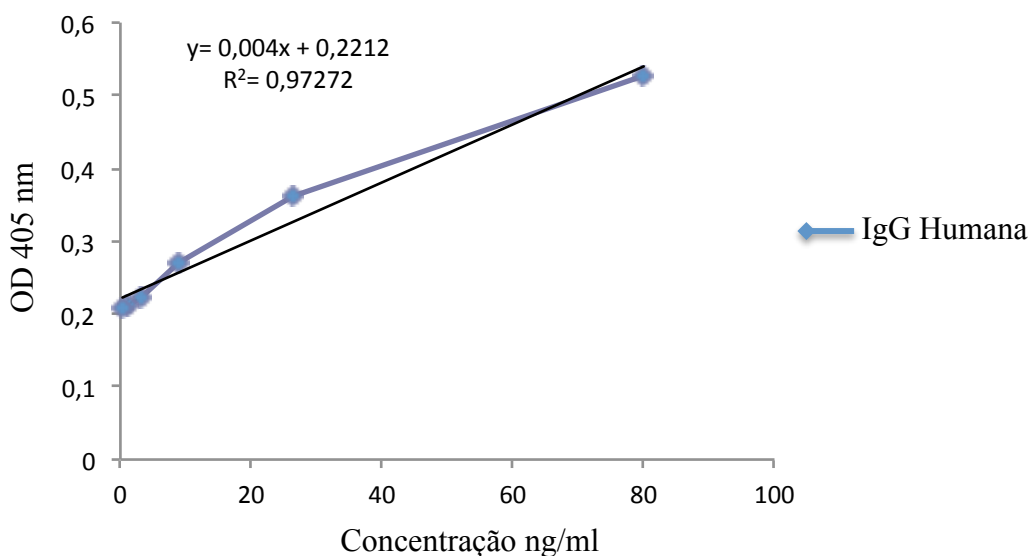
Os fragmentos foram clonados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega) que foi utilizado para transformação bacteriana conforme metodologia descrita no item 3.2.8, com o objetivo de produzir DNA plasmidial suficiente para as análises posteriores. Para o isolamento plasmidial foram realizadas mini preparações de DNA conforme item 3.2.1.1. Para confirmar a inserção das mutagêneses sítio dirigidas, os plasmídios com padrões positivos nas digestões foram selecionados para sequenciamento conforme item 3.2.9. O sequenciamento dos fragmentos gênicos revelou que os clones analisados apresentavam as mutações desejadas. Para retirar os fragmento de DNA de interesse do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems (Promega) e clonar no vetor de expressão em células de mamífero pMIREs hCD3 versão R, foram realizadas digestões com as endonucleases Xma I e Xho I nos dois vetores conforme item 3.2.4. Para a clonagem dos fragmentos de DNA com as mutações de interesse no vetor pMIREs hCD3, foi necessária a retirada do scFv (VH e VL) parental do vetor com as enzimas de restrição Xma I e Xho I para posterior ligação dos fragmentos obtidos por mutagênese. A confirmação da clonagem dos fragmento de DNA com as mutações de interesse no vetor de expressão em células de mamíferos pMIREs hCD3, foi realizada por meio de análise de restrição com as endonucleases Xma I e Xho I. Os clones com padrão positivo de digestão foram submetidos novamente à análise de sequenciamento automático para validar o resultado e analisar se o inserto estava em fase no vetor, bem como se as clonagens tinham sido bem sucedidas. Desta forma, foram realizadas preparações de DNA em larga escala conforme item 3.2.1.2, para obtenção de material para transfecção que foi realizada conforme item 3.2.10.

A linhagem celular escolhida para a expressão dos FvFc mutados foi a CHO. Essa linhagem tem-se mostrado como a mais favorável para a produção de biofarmacêuticos. Cerca de 60 a 70% dos biofármacos disponíveis no mercado são produzidos nestas células (Wurm, 2004). A linhagem usada para transfecção foi a CHO K1 Invitrogen<sup>®</sup> (ATCC 9618) (Li *et al.*, 2007; Butler, 2005) que foi transfectada com o vetor de expressão pMIREs hCD3 contendo os FvFc com as mutações desejadas. Para observar a eficiência de transfecção (item 3.2.11.1) também foram transfectadas células com o vetor pGFP/NEO (Invitrogen<sup>®</sup>). Esse vetor possui o gene repórter da proteína verde fluorescente GFP (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*) de 27 kDa proveniente do cnidário *Aequorea victoria*. Além deste gene também possui o gene (Neo) que confere resistência ao antibiótico geneticina. Baseado na observação da fluorescência das células pode ser observado uma eficiência de transfecção de aproximadamente, 60% a 70%. Depois de 24 horas do início da transfecção, as células foram submetidas ao meio seletivo com geneticina por uma semana (item 3.2.11.2). Após esse período, as células foram expandidas em garrafas de cultura. Com o intuito de verificar a expressão das proteínas recombinantes e comparar a eficiência das transfecções, os sobrenadantes das culturas foram coletados e submetidos a ensaios de ELISA conforme o item 3.2.12.

#### **4.3 Detecção da Expressão e Secreção dos Anticorpos FvFc anti-CD3 Mutados no Sobrenadante de Cultura de CHO, em Diferentes Concentrações de Geneticina**

A geneticina é um antibiótico aminoglicósido semelhante em estrutura à gentamicina B1, produzido por *Micromonospora rhodorangea*. O antibiótico bloqueia a síntese de polipeptídios, inibindo o alongamento tanto em células procarióticas como eucarióticas. A resistência a geneticina é conferida pelo gene Neo de Tn5, que codifica um aminoglicósido 3'-fosfotransferase, APH 3 'II (Goffic *et al.*, 1977). A seleção em células de mamíferos é geralmente conseguida de três a sete dias com concentrações que variam de 400-1000 µg/mL. Segundo Christopher Adam & Ivan Svendsen (2001), células de mamífero resistentes ao antibiótico aumentam seu tempo de duplicação, mas melhoram substantivamente a capacidade de expressão em meio com 1000 µg/mL. As células CHO transfectadas com o vetor pMIREs hCD3 que possui os FvFc mutados e o gene Neo, foram submetidas a ensaio de pressão seletiva em diferentes concentrações de geneticina no intuito de obtermos quantidades de proteínas suficientes para a realização dos ensaios biológicos. A adição de agente seletivo promove a morte celular das células não transfectadas e permite a

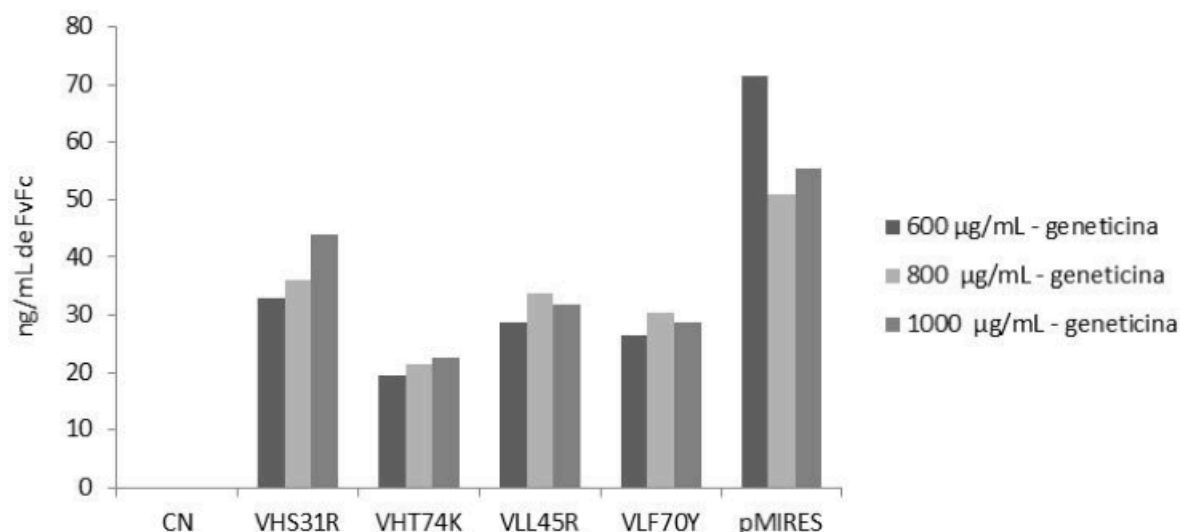
sobrevivência das células produtoras de proteína recombinante, visto que, o plasmídeo utilizado possui a marca de resistência ao agente seletivo citado. Além disso, após a morte celular de todas as células não transfectadas, as células resistentes passam a ter a capacidade de expressar os FvFc de interesse e proliferar até atingir a confluência máxima nos poços das placas de cultura. As células resistentes a pressão seletiva nas placas de cultura foram expandidas e mantidas em garrafas de cultura celular com área de 175 cm<sup>2</sup> em diferentes concentrações de geneticina. Após 48 horas os sobrenadantes de cultura foram analisados por ELISA, para a detecção da presença de anticorpos. A quantificação teve com base a curva padrão de IgG humana, purificada na concentração especificada no item 3.1.22. A equação da reta foi utilizada para os cálculos de concentração dos FvFc nos sobrenadantes (Figura 16).



**Figura 16. Curva padrão IgG humana.** IgG Humana (Sigma® no catálogo: K9001) utilizada como padrão nos experimentos de ELISA para quantificação de anticorpos humanizados no sobrenadante de cultura tratado com geneticina nas diferentes concentrações. A equação da reta obtida, onde  $y = OD$  e  $x =$  Concentrações, foi utilizada para cálculo da concentração aproximada de anticorpos humanizados no sobrenadante .

Como controles negativos foi utilizado o sobrenadante de células não transfectadas, com o intuito de verificar alguma reação cruzada do anticorpo com o meio utilizado ou com alguma proteína produzida pela célula; e tampão PBS, para verificar se o anticorpo conjugado (anti – IgG humano (Fc específico) feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina (Sigma® no catálogo: A9544)) possui alguma afinidade de ligação ao anticorpo primário (anti – IgG humano (H + L) feito em cabra (Pierce® no catálogo: 31119)) e assim podendo gerar falsos positivos. Foi possível observar a expressão dos anticorpos, podendo-se inferir que os níveis de proteínas no sobrenadante variam de acordo com o FvFc mutado (Figura 17). Devido as

diferenças encontradas, inicialmente o cultivo das células expressando os FvFc foi mantido em concentrações distintas de geneticina, levando em consideração os dados obtidos nos ensaios de ELISA. Posteriormente, houve a necessidade de otimização do processo de produção e todas as culturas celulares expressando os diferentes FvFc foram mantidas em meio seletivo com 800 µg/mL de geneticina.



**Figura 17. Expressão de anticorpos FvFc anti-CD3 mutados em CHO.** Imunodeteção por ELISA dos anticorpos recombinantes expressos em sobrenadante de cultura de CHO, coletado após 48h de transfecção. CN: sobrenadante de células não transfectadas.

Segundo Liew *et al.*, (2007), os níveis de expressão em células de mamíferos estão intimamente relacionadas ao vetor e ao promotor usado para produzir os transcritos. Os quatro FvFc mutados foram clonados no mesmo vetor de expressão, o pMIREs hCD3, possibilitando, dessa forma, a produção dos dois genes de forma policistrônica. Outro dado interessante é que apesar do IRES permitir o início da tradução da seqüência do gene de resistência no mesmo transcrito onde se encontra a seqüência do anticorpo, a eficiência desse processo é significativamente inferior aquele apresentado para o gene amontante ao IRES (no caso o anticorpo; Fernandes *et al.*, 2005; Zeenco *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato que a iniciação da tradução via IRES não conta com diversos fatores em trans que contribuem para estabilização do ribossomo junto ao sítio de iniciação da tradução, assim, diminuindo a eficiência do processo (Bergamini *et al.*, 2000). Outro aspecto relevante que devemos levar em consideração é que o metabolismo de células CHO é caracterizado por altos níveis de glicólise e glutaminólise (Quek *et al.*, 2010). Como resultado, grandes quantidades de lactato e de amônio são acumuladas durante a cultura a partir da conversão de glicose em lactato e do

metabolismo de decomposição da glutamina (Altamirano *et al.*, 2000; Ozturk e Palsson, 1991). Estes subprodutos podem inibir o crescimento celular e a produção protéica, podendo prejudicar também a glicosilação das proteínas (Chen e Harcum, 2005; Hossler *et al.*, 2009). Para aumentar a produtividade e adquirir proteína suficiente, os parâmetros do processo, como pH, temperatura e CO<sub>2</sub>, devem ser trabalhados para que as células não entrem em processo de estresse, diminuindo assim a produção de lactato (Ahn *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2008, Clark *et al.*, 2004 e Trummer *et al.*, 2006). Apesar do aumento dos níveis de expressão nas versões recombinantes do anti-CD3 por meio de pressão seletiva com geneticina, os níveis de produção ainda continuavam aquém do que precisávamos para realização dos ensaios de ligação ao antígeno. A quantidade de proteína produzida nas melhores condições de seleção foi em torno de 30 a 40 ng/mL e a quantidade requerida para os ensaios posteriores é da ordem de µg sendo necessário o aumento da produção de sobrenadante de cultura contendo os anticorpos recombinantes. O protocolo de expressão em de células de mamíferos utilizado pelo grupo ainda requer ajustes nas condições de expressão dos produtos recombinantes. Dessa forma, para esse projeto utilizamos com estratégia o acúmulo de sobrenadante das células produtoras durante um longo período, para atingir os níveis necessários de anticorpos recombinantes para realização dos ensaios propostos.

#### **4.4 Padronização da Cromatografia de Afinidade em Coluna de Proteína A, para Purificação dos FvFc Mutados**

Com um volume de sobrenadante de cultura com quantidade de proteínas recombinantes consideradas suficientes para realização dos ensaios de ligação ao antígeno, partiu-se para cromatografia dos FvFc recombinantes. Desta forma, a purificação foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap Protein A FF 1 mL (GE Lifescience). A proteína A é uma proteína produzida pela bactéria *Staphylococcus aureus* que possui capacidade de ligação à região Fc de IgGs de diferentes espécies. Essa coluna foi escolhida devido à proteína A apresentar uma alta afinidade por Fc de IgGs humanas, (os fragmentos FvFc dos anticorpos humanizados utilizados nesse trabalho apresentam tal domínio) e uma baixa afinidade por Fc de IgG de origem bovina. Como o soro fetal bovino é usado para suplementar o meio de cultura onde as células são mantidas e este contém altas concentrações de IgG bovina que podem se ligar, mesmo com baixa afinidade, à proteína A foi necessário reduzir a quantidade dessas moléculas no sobrenadante de cultura. Para tal redução utilizou-se soro fetal bovino depletado de IgG (*Low IgG*) e em concentrações abaixo

da que normalmente é utilizada. Assim, a suplementação foi diminuída gradativamente (10%, 5%, 2,5%, 1,25%) até a concentração final de 1,25% conforme item 3.2.10.9. Essa concentração é baixa em comparação aos protocolos normalmente usados para este fim mas necessária para a manutenção do crescimento e adesão das células a garrafa (Silva, 2008). Outra estratégia adotada durante a purificação para reduzir a contaminação com IgGs bovinas, foi a adoção de pHs distintos para eluição das IgGs bovinas e dos FvFc mutados recombinantes. As IgGs bovinas possuem como característica um pH de eluição ideal da resina de proteína A em torno de 2,0 enquanto que as IgGs humanas são facilmente eluídas dessa resina em pHs variando entre 3,5 e 4,5. Dessa forma procederam-se duas eluições, uma com o tampão Citrato de Sódio 0,1 M em pH 3,5 para eluir as versões mutadas e posteriormente passava-se o tampão Citrato de Sódio 0,1 M em pH 2,0 para eluição das IgGs bovinas e limpeza geral da coluna.

Uma vez que a eficiência de purificação dos anticorpos humanizados encontrava-se baixa nos ensaios previamente feitos no laboratório foi necessária uma re-padronização da técnica de purificação. Nesse sentido foram realizadas seis cromatografias, conforme item 3.2.14, com o intuito de purificar os FvFc recombinantes com maior eficiência para realização dos ensaios propostos. Os protocolos variavam a composição do tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH, 7.0 de ligação com ou sem adição de 3M NaCl pois, segundo o fabricante da coluna a adição de NaCl a este tampão aumenta a afinidade de ligação de anticorpos pela região Fc de IgG I humana. Para padronizar a amostra usada para purificação em todas as cromatografias, foi selecionado 60 mL de sobrenadante de cultura das células que expressaram o FvFc VLL45R recombinante. Vale ressaltar que sempre foram respeitados os limites de carga da coluna conforme especificados no manual. Sendo assim, os 60 mL do sobrenadante acima citado foi dividido em seis partes iguais, ou seja, para cada cromatografia proposta foram utilizados 10 mL do mesmo sobrenadante. Foi necessário o uso da bomba peristáltica e o fluxo de coleta das frações foi de 1 mL/min para a coluna HiTrap Protein A FF 1 mL (GE Lifescience).

Para as cromatografias 1, 2, foram adicionados em cada um dos 10 mL de amostra de sobrenadante usados para purificação, 10 mL do tampão de ligação  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH, 7.0 (1:1) e somente a amostra da cromatografia 2 foi submetida a diálise com o mesmo tampão, conforme o item 3.2.13. Aos 10 mL das amostras das cromatografia 3 e 4 foram adicionados 10 mL de tampão de ligação  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH, 7.0 com 3M NaCl (1:1) e somente a amostra 4 foi dialisada com o mesmo tampão. Para as cromatografias 5 e 6 foram precipitadas as proteínas

que estavam nos 10 mL dos sobrenadantes conforme o item 3.2.22. Ao final desse processo cada amostra foi ressuspensa em 10 mL de PBS e sendo que na amostra 5 foram adicionados mais 10 mL de tampão de ligação  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH, 7.0 (1:1) e na amostra 6, 10 mL de tampão de ligação  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH, 7.0 com 3M NaCl (1:1). Neste caso somente a amostra da cromatografia 5 foi dialisada. Após essas preparações as amostras foram purificadas e as frações coletadas durante as cromatografias foram analisadas quanto à presença de FvFc recombinante por ensaios de *Imuno Blot* conforme o item 3.2.15. Para avaliar a eficiência da purificação foram realizados ensaios de ELISA quantitativo.

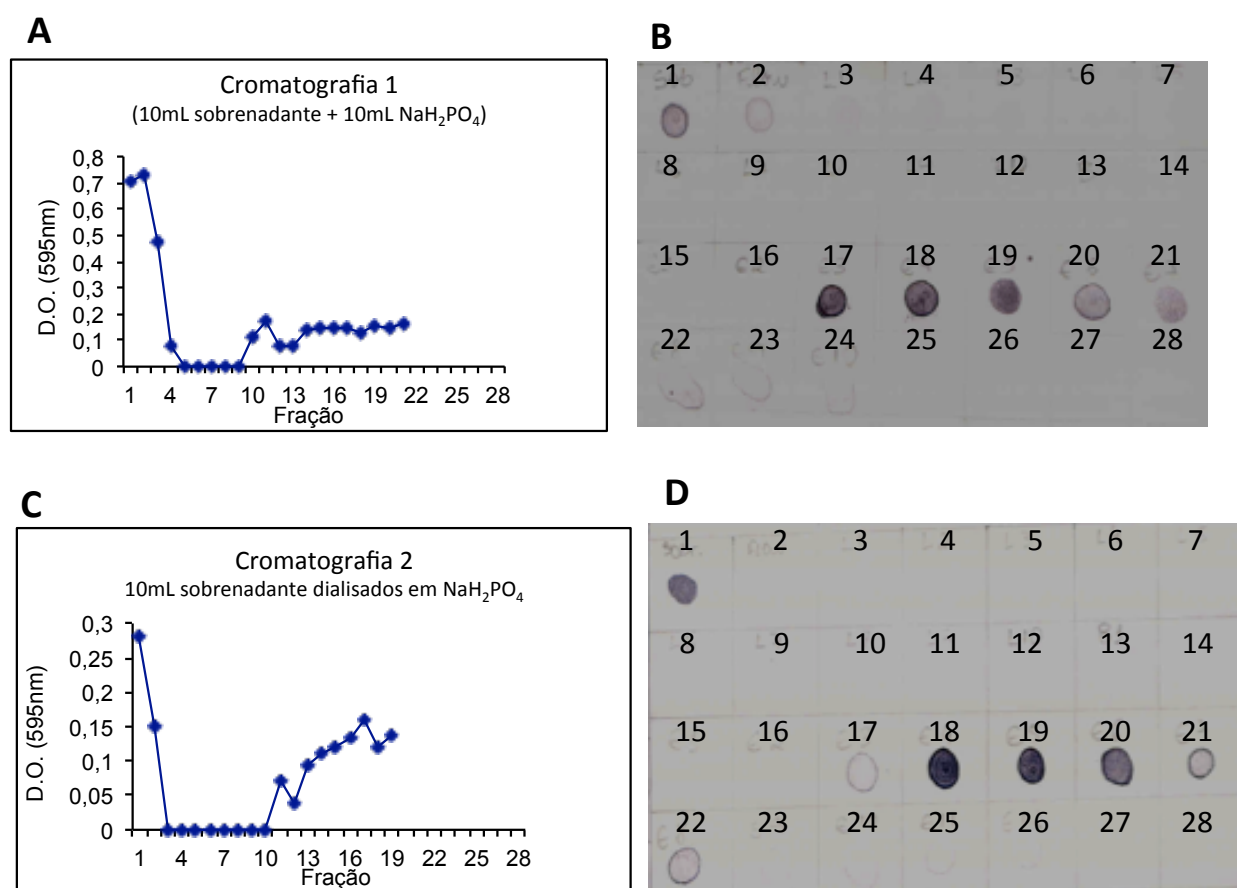
Os dados mostrados na Tabela 5 demonstram que houve diferenças consideráveis nas 6 cromatografias realizadas. Comparando as cromatografias 1, 2, 3 e 4, observa-se que as amostras submetidas a diálise apresentam um rendimento maior do que as amostras que foram somente diluídas em tampão de ligação e passadas na coluna. Os dados de quantificação inicial do total de anticorpos nos sobrenadantes purificados mostram que quando submetidos a diálise apresentam perfil quantitativo diferente. A cultura de células de hibridoma requer suplementos de crescimento composto de proteínas, aminoácidos, vitaminas, vários fatores de crescimento e inibidores de proteases como EDTA e PMSF usados para garantir a produção e estabilidade dos anticorpos produzidos. Esses aditivos no sobrenadante de cultura de células pode interferir na detecção dos anticorpos recombinantes de interesse no ELISA (Azevedo *et al.*, 2009; Shukla & Thömmes, 2010) o que explica as diferenças encontradas na quantificação inicial de anticorpos presente no sobrenadante antes da purificação uma vez que estes provieram de uma mesma amostragem. Durante a diálise parte desses componentes podem ter sido liberados melhorando a ligação dos anticorpos a coluna e também a detecção no ELISA. Nos sobrenadantes das cromatografias 5 e 6 que foram previamente precipitados com sulfato de amônia também é possível notar essa diferença. O processo proporciona a precipitação de todas as proteínas presentes no sobrenadante por meio da alta concentração salina. Para a retirada do sulfato de amônio após a precipitação é essencialmente necessário que as amostras sejam submetidas a um longo processo de diálise conforme descrito no item 3.2.22. As quantificações para estas cromatografias atestam a importância da diálise como pode ser visto nos dados obtidos. Também foi observado que a adição de 3 M de NaCl ao tampão de ligação nas cromatografias 2, 4 e 6, diminuiu a retenção dos FvFc na coluna. Segundo Timassheff (1995), determinadas concentrações de sais além de contribuir com força iônica em solventes, podem afetar a estabilidade, conformação e a dinâmica de proteínas.



**Tabela 5. Representação dos dados obtidos durante a padronização das cromatografias.**

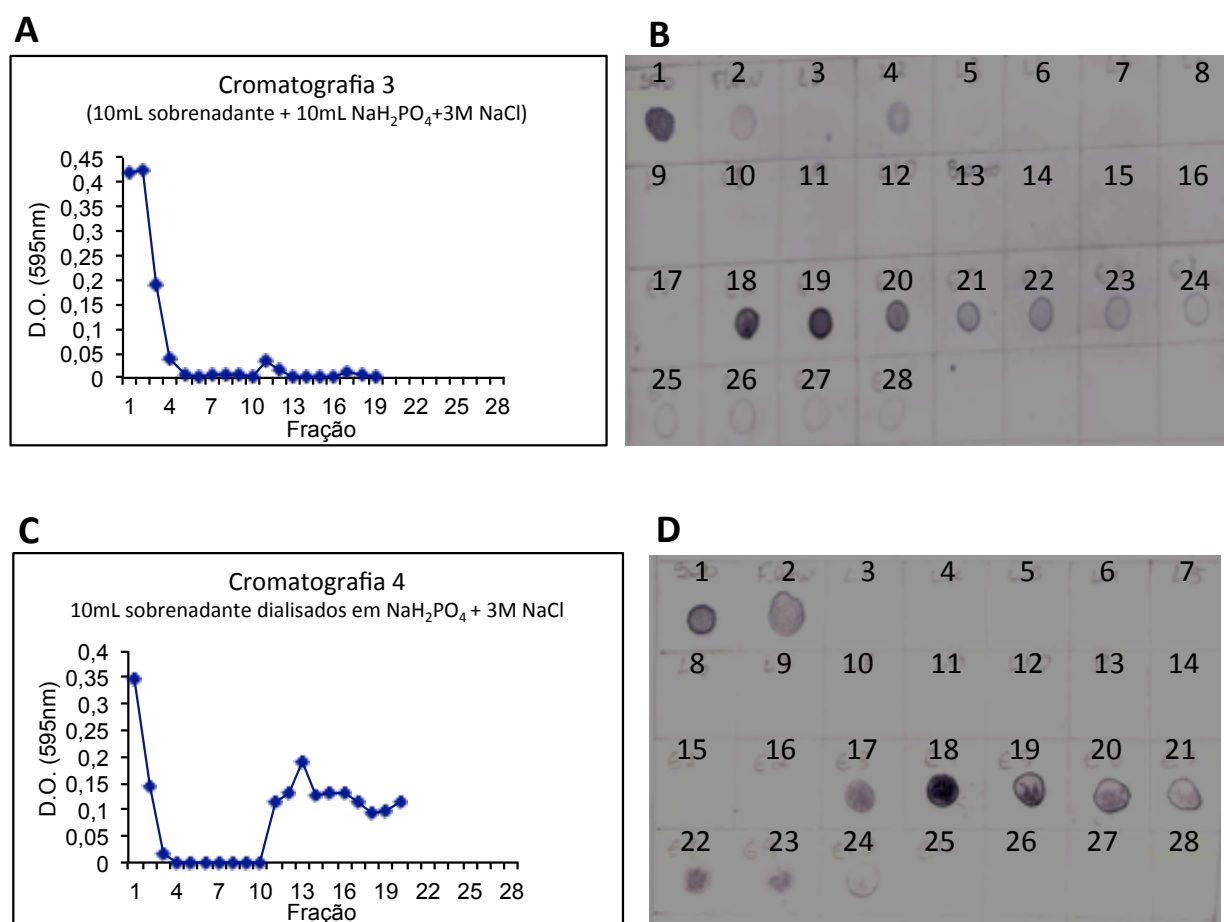
<b>Cromatografia</b>	<b>Tampão de Ligação</b>	<b>Tampão de Diálise</b>	<b>Total de FvFc Aplicado na Coluna (ng)</b>	<b>Total de FvFc não Retido na Coluna (flowthrough) (ng)</b>	<b>Total de FvFc Eluído (ng)</b>	<b>Perdas de FvFc (%)</b>	<b>Eficiência de Recuperação de FvFc (%)</b>
1	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 7,0	-	788	31	86,76	3,93	11
2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 7,0	1.110	493,2	435,39	44,32	39,2
3	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM + 3 M NaCl pH 7,0	-	861,8	150,7	12,21	17,49	1,41
4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM + 3 M NaCl pH 7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM + 3 M NaCl pH 7,0	1.033	753,53	166,14	72,95	16
5	Sulfato de amônio + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 7,0	453,8	3,78	416,25	0,83	91,7
6	Sulfato de amônio + NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM + 3 M NaCl pH 7,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM + 3 M NaCl pH 7,0	504,92	2,8	242,4	0,5	48

A figura 18, mostra a análise por Bradford e *Imuno Blot*, das frações coletadas durante as cromatografias 1 e 2 que foram realizados conforme o item 3.2.26 e 3.2.15, respectivamente. Estas cromatografias foram realizadas com tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  sem a adição de 3M de  $\text{NaCl}$ , sendo somente a cromatografia 2 submetida a diálise com o mesmo tampão. Como é possível observar nos *Imuno Blot*, na cromatografia 1, não foi detectado anticorpos na fração não retida na coluna (*flowthrough*) e na cromatografia 2, ocorreram perdas no *flowthrough* e nas primeiras lavagens (Figura 18 B). Percebe-se também na cromatografia 2, que o FvFc continuam sendo eluídos em várias frações diminuindo assim a eficiência de recuperação. A eficiência da cromatografia 1 foi aproximadamente 11 % e da cromatografia 2 de aproximadamente 39,2 %. Os dados comprovam que processo de diálise além de ser importante para a quantificação das amostras em sobrenadante de cultura, também influencia na recuperação dos anticorpos eluídos da coluna.



**Figura 18.** Análise das frações obtidas durante as cromatografias 1 e 2. Nas figuras B e D os números correspondem, 1: Amostra inicial. 2: Fração não retida. 3 a 8: Frações de lavagem. 9 a 28: Frações de eluição. A e C: Detecção da presença de proteínas por Bradford. B: *Imuno Blot* da cromatografia 1 em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . D: *Imuno Blot* da cromatografia 2 com amostra dialisada em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

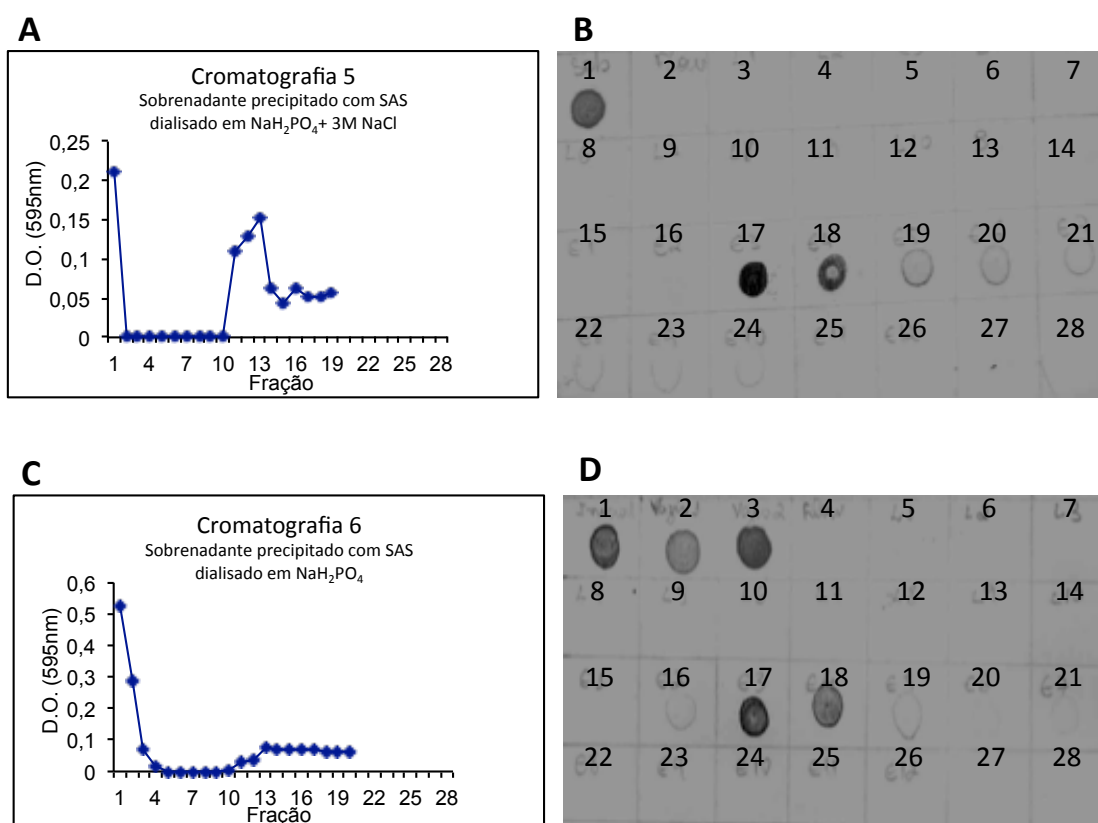
A figura 19, mostra a análise por Bradford e *Imuno Blot*, das frações coletadas durante as cromatografias 3 e 4. Estas cromatografias foram realizadas com tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  com a adição de 3M de NaCl, sendo somente a cromatografia 4 submetida a diálise com o mesmo tampão. Como é possível observar nos *Imuno Blot*, na cromatografia 3, foi detectado anticorpos na fração não retida na coluna e também nas frações de lavagem coletadas. Outro dado relevante é a presença de proteínas em todas as frações de eluição. Na cromatografia 4, ocorreram perdas significativas no *flowthrough*. Percebe-se também que os FvFc continuam sendo eluídos em várias frações diminuindo assim a eficiência de recuperação. A eficiência da cromatografia 3 foi aproximadamente 1,41 % e da cromatografia 4 de aproximadamente 16 %. Comparando os resultados pode-se perceber que a adição de 3m de NaCl prejudica a interação dos anticorpos com a coluna.



**Figura 19.** Análise das frações obtidas durante as cromatografias 3 e 4. Nas figuras B e D os números correspondem, 1: Amostra inicial. 2: Fração não retida. 3 a 8: Frações de lavagem. 9 a 28: Frações de eluição. A e C: Detecção da presença de proteínas por Bradford. B: *Imuno Blot* da cromatografia 1 em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 3M NaCl. D: *Imuno Blot* da cromatografia 2 com amostra dialisada em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 3M NaCl.

Isto pode ser comprovado pelos dados da Tabela 5, relacionados ao que não ficou retido na coluna. No caso da cromatografia 3 em que a amostra foi somente adicionada de tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3\text{M NaCl}$  (1:1), a perda de anticorpos no *flowthrough* e nas lavagem corresponde a aproximadamente 17,5 %. Já na cromatografia 4 em que a amostra foi dialisada no tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3\text{M NaCl}$ , a perda de eficiência foi de aproximadamente 72,9 %, ou seja, bem maior em relação as cromatografias anteriores.

Para as cromatografias 5 e 6 adotou-se um procedimento diferente das anteriores. 10 mL de sobrenadante foram precipitados com uma solução de Sulfato de Amônio saturada para cada cromatografia. Para a retirada do sal utilizado na precipitação as amostras foram realizadas diálises em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para a cromatografia 5 e em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3\text{M NaCl}$  para a cromatografia 6. Na figura 20 pode-se observar que na cromatografia 5 não ocorreram perdas significativas no *flowthrough*, mas em duas etapas do processo de precipitação ocorreram perdas consideráveis nas duas cromatografias.



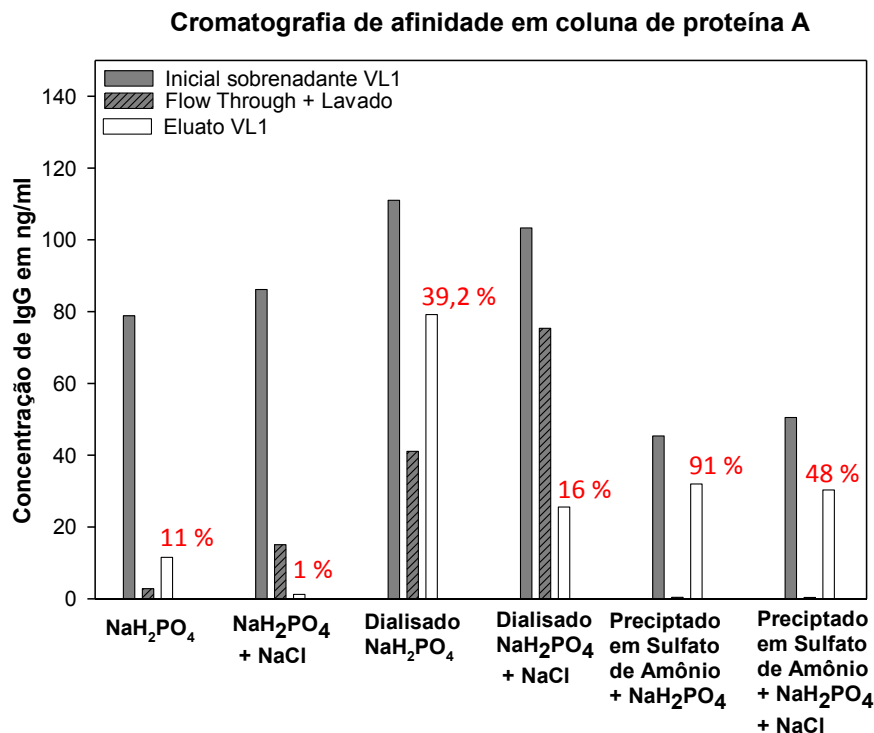
**Figura 20.** Análise das frações obtidas durante as cromatografias 5 e 6. Nas figuras B e D os números correspondem, 1: Amostra inicial. 2: Fração não retida. 3 a 8: Frações de lavagem. 9 a 28: Frações de eluição. A e C: Detecção da presença de proteínas por Bradford. B: *Imuno Blot* da cromatografia 1 em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3\text{M NaCl}$ . D: *Imuno Blot* da cromatografia 2 com amostra dialisada em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 3\text{M NaCl}$ .

Como podemos observar na Tabela 5 os dados de quantificação total dos FvFc nas amostras precipitadas é bem inferior que a quantidade encontrada nas amostras das outras cromatografias. Levando em consideração que partimos do mesmo sobrenadante para a realização de todas as cromatografias, o processo de precipitação ocasionou perdas de mais de 50 % das proteínas do sobrenadante de cultura. Por outro lado, as cromatografias das amostras precipitadas apresentaram uma perda de eficiência bem menor quando comparadas com as anteriores. Para a cromatografia 5 a perda foi de aproximadamente 0,83 % e para a cromatografia 6, foi de aproximadamente 0,5 %. Comparando as cromatografias 5 e 6 com as demais realizadas, percebe-se que estas tiveram rendimento melhor. Para a cromatografia 5 o rendimento foi de aproximadamente 91,7% e para a cromatografia 6 de aproximadamente 48 %. A grande limitação para estas cromatografias é processo de precipitação. Além de requerer um longo período para realização do protocolo, ainda devemos levar em consideração os custos do processo que demandam uma grande quantidade de sulfato de amônio e de tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  para a realização de lonas diálises.

Mirica, *et al.* (2012), realizou estudos de precipitação de um fragmento de Fab com sulfato de amônio e obteve sucesso. O autor fez um gradiente variando a concentração de sulfato de amônio e também de pH. O melhor resultado para precipitação dos Fab foi obtido usando um pH baixo e uma concentração de sulfato de amônio alta (3M). Estes dados são interessantes e mostram a necessidade de padronização do protocolo de precipitação de anticorpos utilizado pelo grupo. Sendo assim, mudanças no protocolo partindo de um gradiente de concentração, seria o ideal para atingir a melhor concentração de SAS para precipitação de FvFc, minimizando assim as perdas do processo.

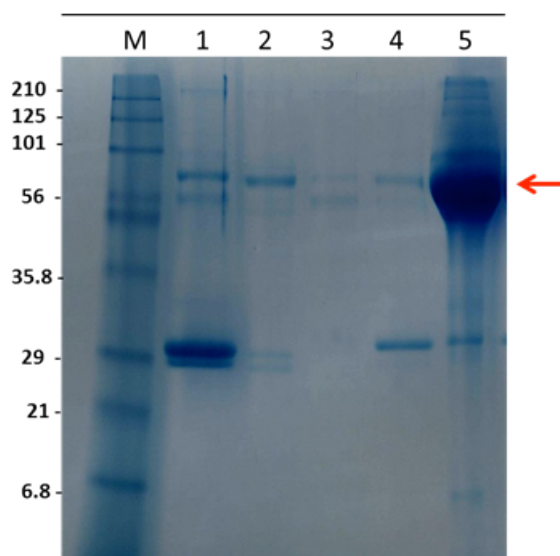
Com base nos dados obtidos durante esta padronização, fica claro que o uso de NaCl 3M no Tampão de Ligação diminuiu a eficiência de ligação dos anticorpos a coluna em todas as situações testadas. Considerando as perdas geradas e os ganhos na eficiência de purificação dos FvFc, vemos que a cromatografia 2 foi a que teve melhor rendimento. Apesar de ter uma eficiência menor do que as cromatografias 5 e 6, por outro lado apresenta condições mais rápidas e menos onerosas de preparação e processamento das amostras, com eficiência de purificação significativa.

A Figura 21 mostra uma análise comparativa de todas as cromatografias realizadas e também as diferenças de eficiência de recuperação em cada uma delas.



**Figura 21.** Análise comparativa das cromatografias realizadas em tampão de ligação NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,0, com e sem adição de NaCl e precipitadas com SAS.

Para observar os FvFc purificados conforme a cromatografia 2, foi realizada a análise por SDS-PAGE conforme o item 2.2.16, sendo o gel corado com *Comassie Blue*, conforme item 3.2.17 (Figura 22).



**Figura 22.** SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*. Setas indicando as bandas correspondentes aos FvFc de aproximadamente 56 kDa. **M:** Prestained SDS-PAGE Standards #161-0318. **1:** VHS35R, **2:** VHT74K, **3:** VLL45R, **4:** VLF70Y, **5:** FvFc humanizado anti-CD3 versão arginina.

O resultado observado no SDS-PAGE, mostra bandas correspondentes aos FvFc de aproximadamente 56 kDa. Entretanto, é possível observar duas bandas de aproximadamente 29 kDa, que somadas correspondem ao peso do FvFc sugerindo a ocorrência de degradação. É importante ressaltar que ainda não existe análise quanto a estabilidade de FvFc em condições desnaturantes. Este resultado sugere que o processo de padronização das cromatografias devem ser continuados.

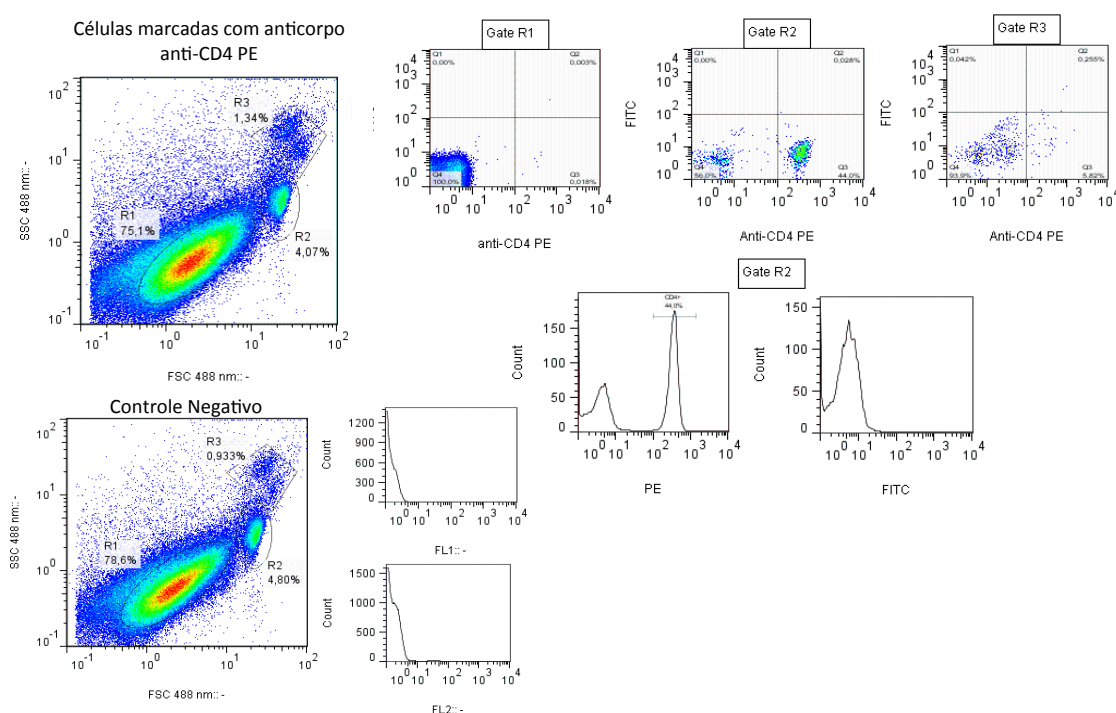
Seldon *et al.*, (2011), tentaram purificar fragmentos Fab por afinidade a proteína A usando a HiTrap column (GE Healthcare) e o resultado não foram satisfatórios. A partir de 1mg de anticorpo digerido foi recuperado somente 0,04 mg de Fab. Os Fabs e Fcs se ligavam a proteína A, mas apenas quantidades mínimas de Fabs permaneciam na fração de fluxo contínua. O meio de cultura onde as células foram cultivadas também pode ter tido uma grande influência na qualidade da cromatografia. Neste ensaio também foi utilizado outra coluna para purificação de anticorpos a MabSelectSuRe (GE Healthcare). Com esta coluna o rendimento foi um pouco melhor, a partir de 1mg de anticorpo digerido foi recuperado 0,4 mg. Hahn *et al.*, (2006), também compararam a capacidade de ligação da MabSelectSuRe (GE Healthcare) e também observaram que esta coluna exibe uma capacidade elevada de purificação de anticorpos (IgG 1 Humana). Esta coluna é composta por uma resina altamente reticulada, ligada a uma proteína A modificada por engenharia genética. Esta modificação garantiu o aumento da estabilidade da proteína A em soluções alcalinas, quando comparada com a proteína original. Atualmente esta coluna vem sendo amplamente utilizada e seria uma opção para purificação de FvFc.

Mahajan *et al.*, (2012), mostraram em um estudo que a eficiência de cromatografia de afinidade por proteína A, pode ser melhorada utilizando uma combinação de colunas de cromatografia para a purificação de anticorpos. Inicialmente o sobrenadante deve ser passado em uma pré-coluna ou coluna para troca de tampão ou meio de cultura, para posteriormente a amostra de interesse ser passada na coluna de afinidade. A cromatografia em multi-colunas diminui em 40% os custos de purificação, por diminuir a quantidade do tampão necessário para as lavagens da coluna e otimização do tempo.

Após a purificação, as proteínas de interesse foram passadas em uma uma coluna Centriprep 30 (Amicon®), com membrana de poro de 30 kDa, para concentração e troca do tampão de eluição por PBS para realização dos ensaios de ligação.

#### 4.5 Ensaios de Ligação para Verificar a Atividade dos Anticorpos Humanizados Anti-CD3 Mutados, nas Células Monocleares de Sangue Periférico Humano

Para verificar se os anticorpos humanizados e mutados se ligam ao CD3 presente na superfície de linfócitos T humanos fizemos ensaios de citometria de fluxo no qual, basicamente, as construções foram incubadas com as células isoladas por gradiente de Ficoll conforme já descrito no item 3.2.18. Inicialmente as células foram marcadas com um anticorpo anti-CD4 humano conjugado com R-PE para localizar a população de linfócitos positiva (Figura 23).

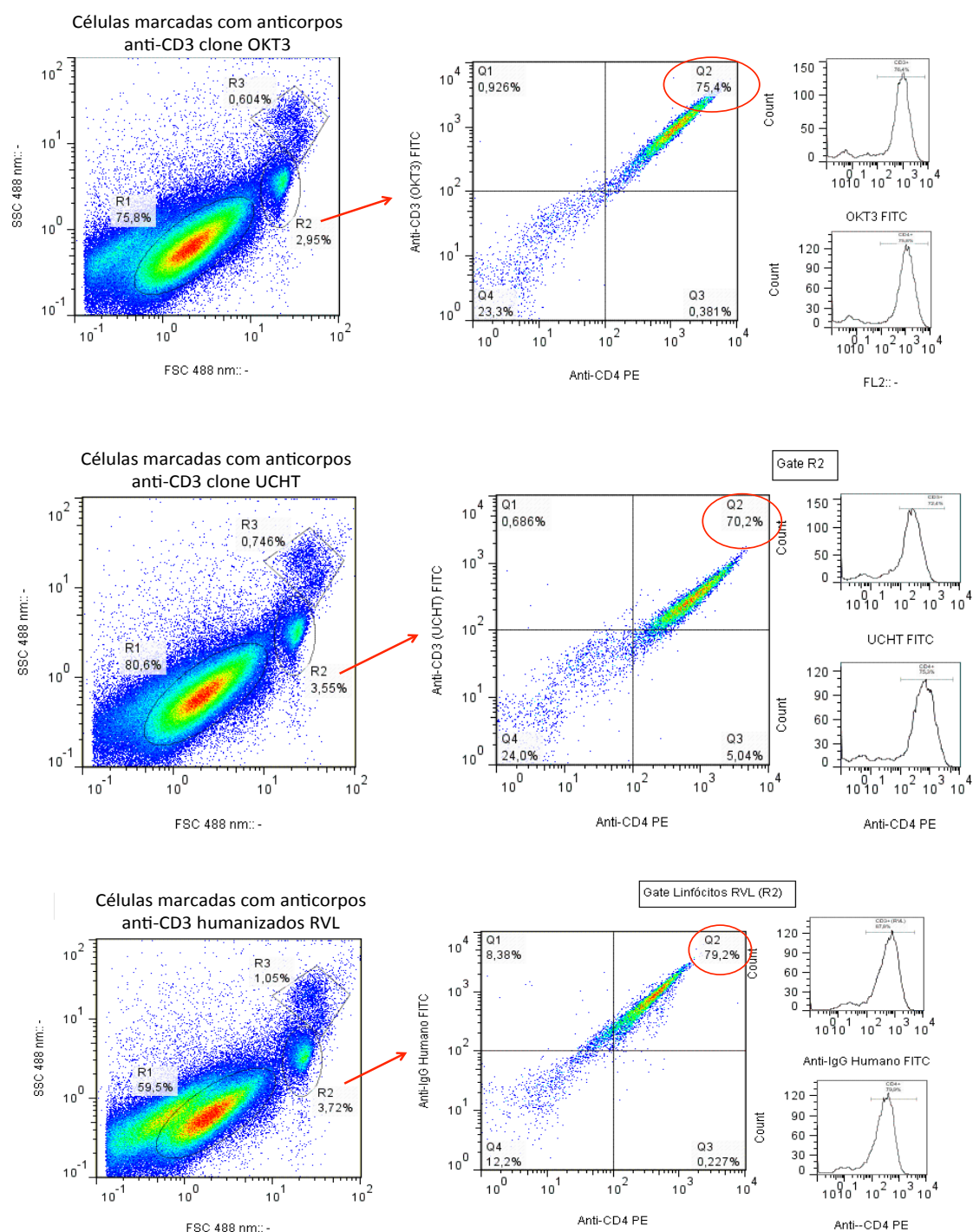


**Figura 23. Ensaios de ligação para localização da população de linfócitos T CD4+, sobre células monocleares de sangue periférico humano.** Pode-se verificar, através dos histogramas, que a população de linfócitos CD4+ encontra-se na gate R2, utilizada para análise nos demais gráficos.

Após incubação com as diferentes construções de anticorpos humanizados foram utilizados anticorpos anti-IgG humano conjugado com FITC e anti-CD4 humano conjugado com R-PE para co-marcação de linfócitos TCD4. Nesse caso o aparecimento de células duplo positivas indicam que as construções estão se ligando especificamente ao CD3 presente em células T CD4. De acordo com as análises da aquisição de células podemos observar que todas as construções são capazes de se ligar ao CD3 presente na superfície de linfócitos. Todos os anticorpos utilizados nos ensaios de ligação foram dosados e incubados na mesma



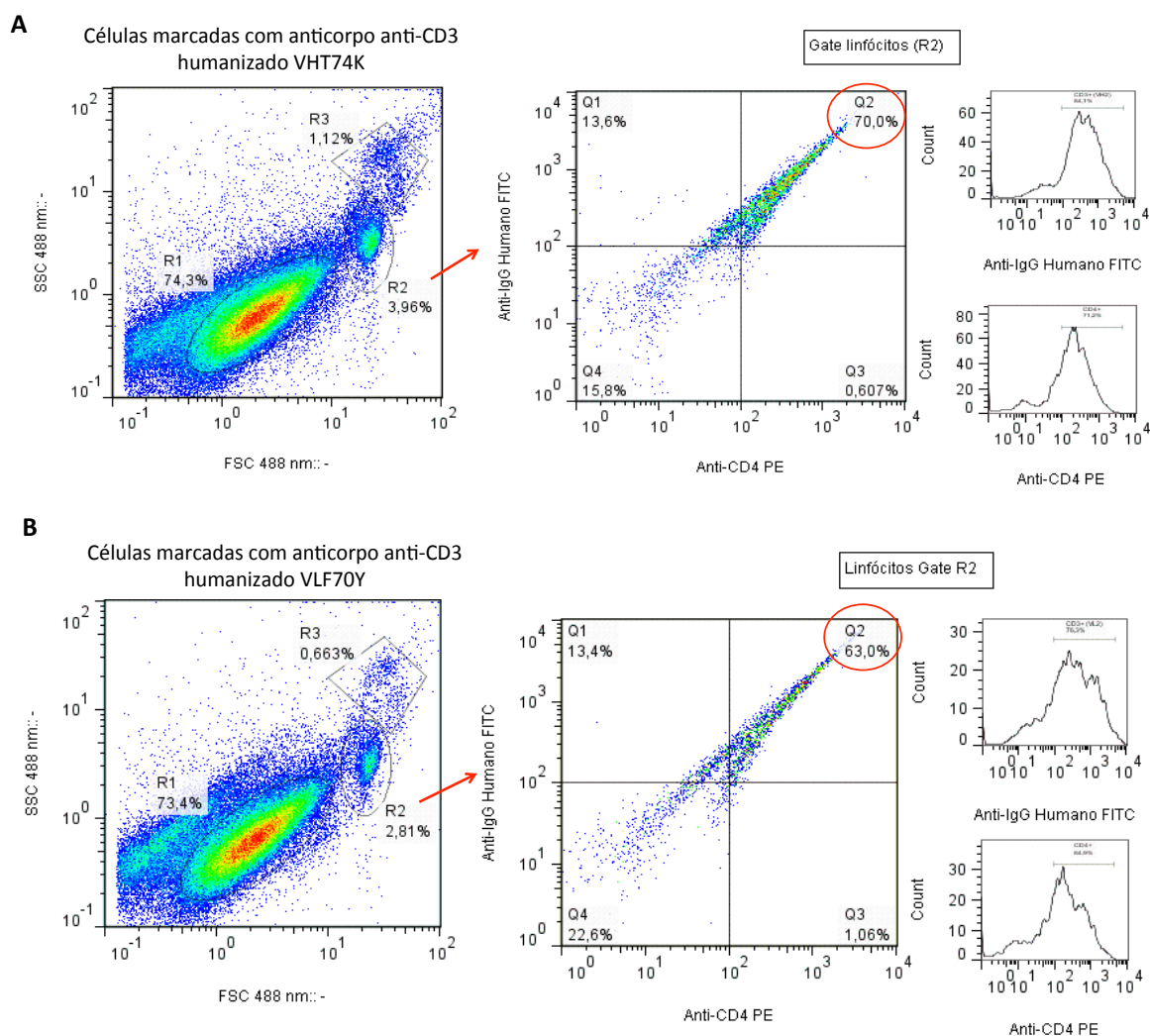
concentração ( $250\text{ng}/3 \times 10^5$  células) que os controles positivos de ligação ao CD3 (OKT3, UCHT e RVL) (Figura 24).



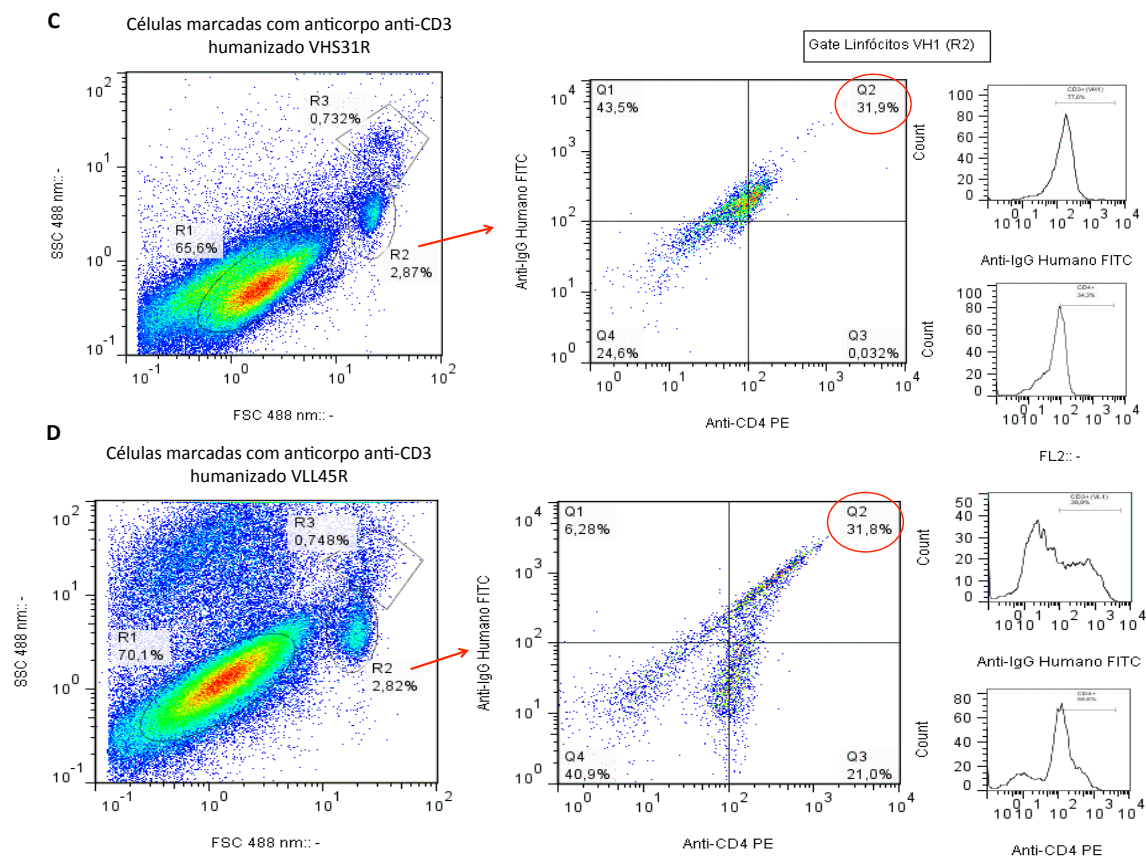
**Figura 24. Ensaios de ligação para verificar atividade de anticorpos UCHT, OKT3 e RVL usados como controle positivos, sobre células mononucleares de sangue periférico humano. CD4 PE. Células incubadas com os anticorpos destacando a dupla marcação obtida na gate R2 e os histogramas para cada marcação.**

Os resultados demonstram que ocorre uma diminuição aproximada de 21,29% da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) do FvFc RVL em relação ao OKT3 (Figura

24). Como as demais construções de anticorpos anti-CD3 foram feitas baseadas no anticorpo FvFc RVL, podemos observar uma diminuição de 70.25%, 90.71%, 37.27% e 46.05% no MFI dos anticorpos VHT74K, VLF70Y, VHS31R e VLL45R, respectivamente, quando comparados ao FvFc RVL (Figuras 25 e 26).



**Figura 25. Ensaios de ligação para verificar atividade de anticorpos humanizados sobre células mononucleares de sangue periférico humano. CD4 PE.** Em A e B: Células incubadas com os anticorpos anti-CD3 humanizados FvFc VHT7K e VLF70Y, respectivamente, destacando a dupla marcação obtida na gate R2 e os histogramas para cada marcação.



**Figura 26. Ensaios de ligação para verificar atividade de anticorpos humanizados sobre células mononucleares de sangue periférico humano. CD4 PE. Em C e D: Células incubadas com os anticorpos anti-CD3 humanizados FvFc VHS31R e VLL45R, respectivamente, destacando a dupla marcação obtida na gate R2 e os histogramas para cada marcação.**

Essa variação no MFI sugere que pode haver uma diferença na afinidade de ligação entre as diferentes construções propostas no qual as construções VHT74K e VLF70Y parecem estar se ligando melhor devido a menor variação do MFI e a construção VLL45R ser a que menos se liga (Tabela 6). É extremamente válido levar em consideração nos histogramas apresentados que, nitidamente, apresenta um efeito biológico, que se repetiu em três ensaios de ligação consecutivos, e que podem influenciar diretamente nas MFIs obtidas. Ocorre o aparecimento de uma população de granulosidade média à alta e menor tamanho após incubação tanto com o OKT3 quanto com as demais construções de anticorpos humanizados, sendo esse efeito provocado com maior nitidez nas células incubadas com o mutante VL1 cuja MFI é a menor apresentada. Durante o processo de apoptose celular ocorre um aumento da granulosidade e diminuição do tamanho da célula (Chen G & Goeddel 2002).

**Tabela 6. Intensidade Média de Fluorescência (MIF) em Ensaios de Ligação com as Diferentes Construções de Anticorpos AntiCD3**

Construção	Intensidade Média de Fluorescência MIF; FITC	% de Diminuição Intensidade Média de Fluorescência MIF; FITC		
		OKT3 x FvFc RVL	FvFc RVL x FvFc Mutados	OKT3 x FvFc Mutados
OKT3	709	-	-	-
FvFc RVL	558	21,29	-	-
FvFc VHS31R	166	-	70,25	76,59
FvFc VHT74K	350	-	37,27	50,63
FvFc VLL45R	51,8	-	90,71	709,0
FvFc VLF70Y	301	-	46,05	57,55

De acordo com diversas publicações, sabe-se que o anticorpo OKT3 é capaz de ativar vias pró-apoptóticas sendo esse um dos principais mecanismos de ação proposto para essa molécula (Chatenoud L & Bluestone JA., 2007) como a morte celular, internalização e vias de degradação de moléculas presentes na membrana da célula dependem da sinalização intracelular desencadeada e, isso, conseqüentemente, pode influenciar no MFI obtido podemos afirmar que as diversas mutações são capazes de se ligar especificamente à células TCD4+ com MFI diferentes o que sugere que as construções são ativas e específicas para o CD3, porém outros ensaios deverão ser feitos no sentido de verificar as constantes de associação desses anticorpos e correlacioná-las com efeitos biológicos tais quais atividade pró-apoptótica e mitogênica.

#### **4.6 Expressão do CD3 $\epsilon\gamma$ no Vetor pGS21aCD3 $\epsilon\gamma$ em *E. Coli* e Purificação do Antígeno por Cromatografia de Afinidade**

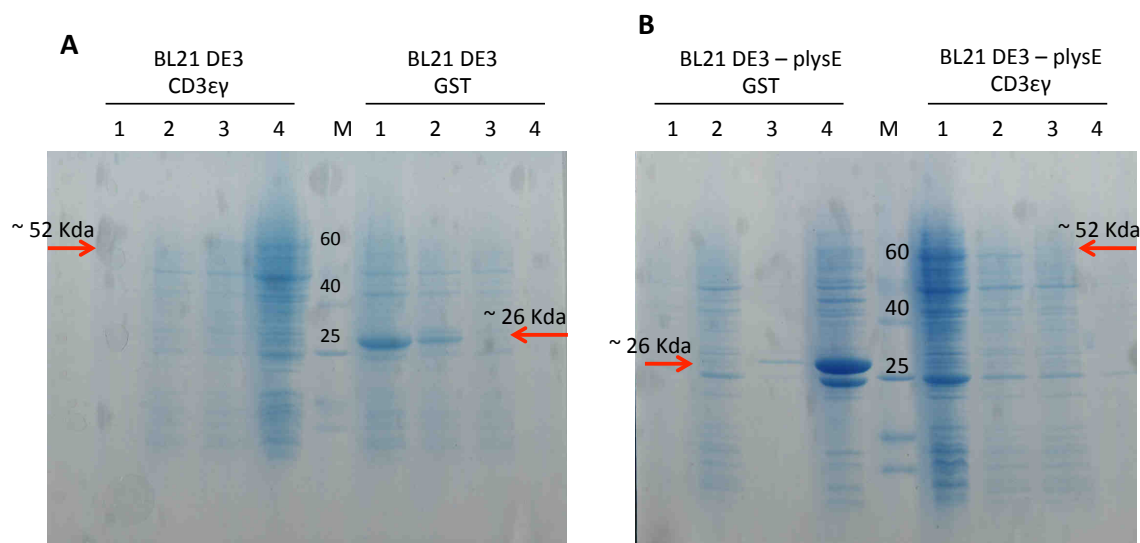
A produção de proteínas em *E. coli* geneticamente engenheiradas tem permitido a obtenção de proteínas para caracterização bioquímica, produção de anticorpos, determinação de estruturas tridimensional, entre outros (Rücker *et al.*, 2001). Em adição, a expressão de proteínas heterólogas em fusão com cauda de histidina (His Tag) tem possibilitado a obtenção de proteínas com grau de pureza adequado para ensaios cristalográficos, necessários para compreensão da estrutura e função da proteína alvo. Geralmente as proteínas recombinantes são expressas em *E. coli* como agregados insolúveis, denominados de corpos de inclusão, ou

são prematuramente degradadas e/ou desnaturadas (Sambrook & Russel, 2001). Segundo Stevens (2000), de 15 a 20% dos genes humanos expressos em *E. coli* geram proteínas solúveis, de 20 a 40% formam corpos de inclusão e os 60% remanescentes não são significativamente expressos ou são degradados. O baixo rendimento de polipeptídios expressos *in vivo* é geralmente devido á síntese intracelular ineficiente e/ou degradação de tais peptídeos (Skosyrev *et al.*, 2003). Tem sido sugerido que proteínas bacterianas são mais facilmente expressas em bactérias e proteínas tipicamente de eucariotos são incorretamente enoveladas e endereçadas para degradação (Baneyx & Geordiou, 1992). Apesar dessas limitações, *E. coli* é o sistema procariótico mais frequentemente usado para expressão de proteínas heterólogas por ser um método barato, mais rápido de ser obtido do que em sistemas eucarióticos e não gerar heterogeneidade do produto devido a ausência de modificação pós-traducional, fator fundamental caso a proteína super expressa seja utilizada em estudos estruturais.

Para continuar dando andamento ao projeto era indispensável a expressão do antígeno CD3, nesse trabalho expresso na forma de CD3 $\epsilon\gamma$ . Decidiu-se então fazer síntese do gene. A sequência de nucleotídeos codificadores do antígeno recombinante foi escolhida com base no trabalho publicado por Kjer-Nielsen *et al.*, em 2004. A sequência codifica um polipeptídeo de cadeia única onde as subunidades  $\epsilon$  e  $\gamma$  estão ligadas por um conector polipeptídico com 26 resíduos de aminoácidos. Este conector faz a junção da extremidade carboxi-terminal do CD3 $\epsilon$  à extremidade amino-terminal do CD3 $\gamma$  (Kim *et al.*, 2000). Esta sequência gênica foi clonada no vetor de expressão pGS21 ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)) que possui 6.169 kb, gene de resistência para ampicilina e é utilizado para expressão em bactéria. O produto de expressão é um polipeptídeo de 56 kDa fusionado a GST e flanqueado por duas caudas de histidina (cada uma com 6 resíduos). Como controle foram transformadas células com o vetor pGEX 2T que expressa apenas GST.

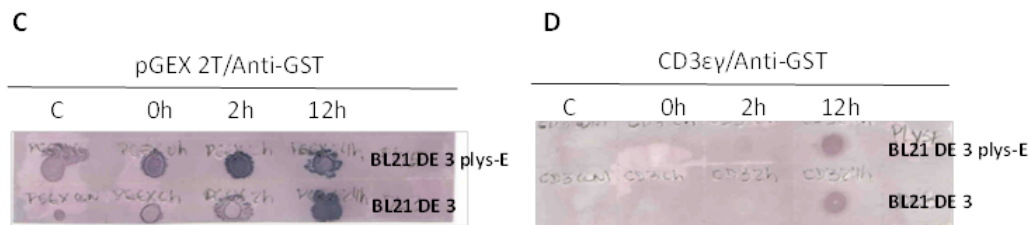
Na literatura observa-se que as proteínas parceiras (proteínas de fusão) amplamente usadas para fusão com proteínas heterólogas são a Tioredoxina (Trx), *maltose-binding-protein* (MBP), *glutathione S-transferase* (GST), *calmodulin binding protein* (CBP), NusA e *celulose-associated protein* (CAP). Em adição o aumento da solubilidade, freqüentemente, tem sido associado ao tamanho da proteína parceira, por exemplo, NusA (54 kDa), MBP (42 kDa) e GST (26 kDa), contribuíram para aumentar a solubilidade respectivamente em, 60%, 60%, e 38% dos casos testados por Shih *et al.*, 2002. As expressões foram realizadas em duas diferentes linhagens celulares de *E. coli*, a BL21 DE3 e BL21 DE3-pLysE visando o estabelecimento do melhor sistema de expressão conforme o item 3.2.23. As células BL21

DE3 são de uma estirpe de alto nível da expressão de proteínas heterólogas, capazes de dirigir a transcrição de transgene sob controle do promotor viral T7, visto que apresentam em seu genoma o gene codificador da RNA polimerase deste bacteriófago. Este gene (DE3) está clonado no genoma das células BL21 sob controle do promotor lac UV5, sendo por tanto induzido pela adição de IPTG. Que é utilizado para produzir a proteína recombinante. As células BL21 DE3-pLysE, apresentam as mesmas características descritas anteriormente e, adicionalmente um plasmídeo (pLys E) que codifica o gene da lisozima do fago T7. Essa proteína tem a capacidade de regular a atividade da RNA polimerase do fago T7, desta forma proporciona um controle mais seguro da expressão proteica (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990). Para decidir o sistema para expressão em larga escala levou-se em consideração o rendimento e o tempo para expressão. Como podemos observar (Figura 27 B), as células BL21 DE3-pLysE apresentaram melhor rendimento tanto para expressão de GST (~26 kDa) quanto para a fusão GST-CD3 $\epsilon\gamma$  (~52 kDa). Esses dados mostram que um controle mais fino da atividade da RNA polimerase do fago T7 deve ser importante para minimizar os efeitos deletérios da expressão heteróloga.



**Figura 27. A e B: Análise da expressão antígeno CD3 $\epsilon\gamma$  e GST em SDS-PAGE 12%, e purificação a partir da fração solúvel, em GStap™ HP 1mL (GE Healthcare®). A: Células BL21 DE03. B: BL21 DE3-pLysE induzidas com IPTG 1mM. M: Marcador BenchMark™Prestained. Cat. N. 10748-010. Células induzidas com 1M de IPTG a 37°C. 1. Controle, células não transformadas. 2. Células não induzidas. 3. Células com 2h de indução. 4. Células com 24h de indução.**

Após a confirmação da expressão por *ImunoBlot* (Figura 28 C e D), as células bacterianas foram lisadas por sonicação, centrifugadas e as frações solúvel e insolúvel foram separadas.



**Figura 28. C e D: Análise por *Imuno Blot* das frações obtidas durante o processo de expressão do CD3 $\epsilon\gamma$  e GST. Células induzidas com 1M de IPTG a 37°C.**

Pode-se perceber também este resultado na análise por *Imuno Blot*, onde as frações das amostras recolhidas durante o processo de expressão, foram sondadas com anticorpo anti-GST e o anti-CD3 clone OKT3. Assim, nestas células, as proteínas heterólogas podem ter sido degradadas, conforme descrição no manual de procedimentos do fabricante. O baixo rendimento de polipeptídios expressos *in vivo* é geralmente devido á síntese intracelular ineficiente e/ou degradação de tais peptídeos (Skosyrev *et al.*, 2003).

Apesar das células BL21 DE3-pLysE terem um desempenho de expressão melhor do que a BL21 DE3, não foi suficiente para a observação de uma banda nítida das duas proteínas de interesse em gel de SDS-PAGE 12%. Diante deste resultado foi deduzido que algo deveria ser feito para melhorar a expressão. Como as proteínas são expressas na forma de corpos de inclusão a maioria delas poderia está na fração insolúvel. Foi feita uma análise da fração insolúvel em gel SDS-PAGE 12% e percebeu-se uma grande quantidade de proteínas no pellet nas células de BL21 DE3-pLysE. Assim uma das abordagens mais utilizadas e talvez a primeira opção testada para aumentar a solubilidade das proteínas é diminuir a temperatura de indução visando reduzir a taxa de tradução (Schein *et al.*, 1988).

Como os testes iniciais indicavam que a fusão (GST-CD3 $\epsilon\gamma$ ) estava insolúvel, após a indução da expressão a temperatura foi reduzida para 30°C e a concentração de IPTG foi diminuída para 0,5 mM. Com base nestes dados, decidiu-se então pela expressão em BL21 DE3-pLysE em larga escala. As modificações foram benéficas e melhoraram o protocolo. No entanto as alterações nas condições de cultivo não foram suficientes para a obtenção de um protocolo definitivo para produção de CD3 $\epsilon\gamma$  em bactéria. Como bem lembrado por Sambrook e Russel (2001) a ausência de um motivo único ou de um guia prático que resolva

todos os problemas torna cada caso de expressão um caso ímpar que deve ser resolvido impiricamente.

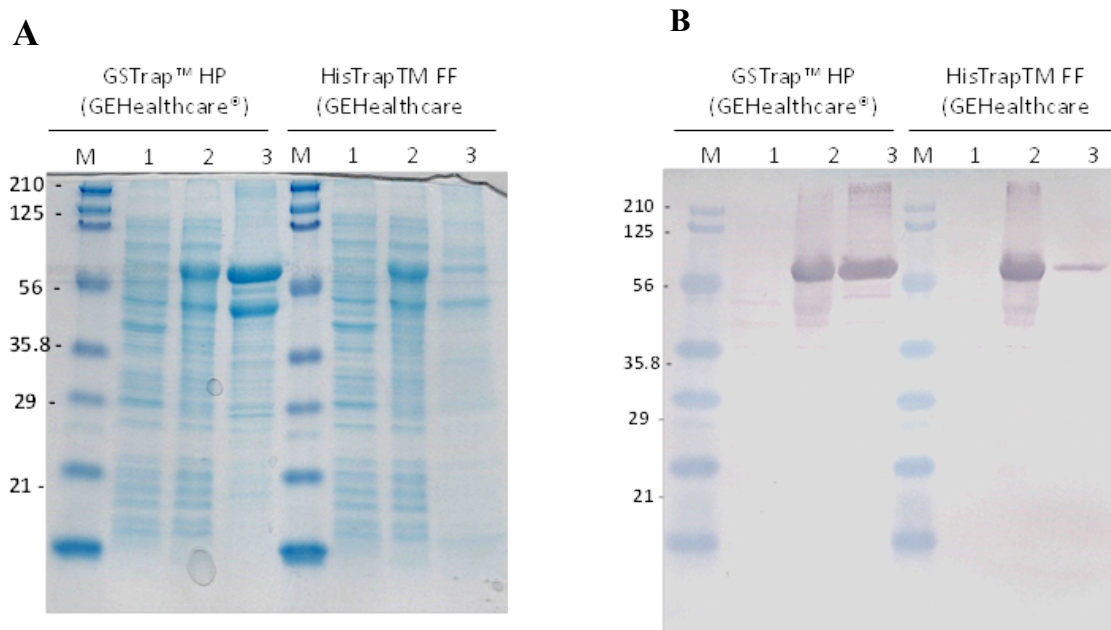
Para purificação do CD3 $\epsilon\gamma$  expresso anteriormente utilizou-se a coluna de afinidade GSTrap™ HP 1mL (GE Healthcare®) e HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®) conforme o item 3.2.24. Para avaliar a pureza das amostras, elas foram submetidas à análise por SDS-PAGE, sendo o gel corado com *Comassie Blue*, seguida de imunodeteção com anti-CD3 OKT3 por *Western Blot*, para confirmar a presença da proteína recombinante conforme o item 3.2.18. O perfil eletroforético das proteínas, mostra que o processo de purificação em coluna GSTrap™ HP 1mL (GE Healthcare®) e de Ni<sup>+</sup> HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®) não foram satisfatórias, apresentando contaminações inespecíficas, sendo que na coluna de Ni<sup>+</sup> o padrão de purificação ficou um pouco melhor, porém ocorreram perdas durante o processo de eluição. No *Western Blot* só foi detectada uma banda única de aproximadamente 56 kDa, corroborando com tamanho do CD3 $\epsilon\gamma$ GST.

As frações eluídas da coluna HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®) foram reunidas dando um volume total de aproximadamente 15 mL em seguida foram concentradas e dialisadas com o centriprep YM-10 (Amicon) segundo instruções do fabricante, ao final do procedimento obteve-se 2 mL de solução. Com o intuito de retirar da amostra possíveis artefatos da purificação, foi realizada outra diálise com o auxílio do centricon YM-30 (Amicon) após este procedimento foram obtidos 1mL de solução. Em seguida 20  $\mu$ L desta solução foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida para análise.

O resultado observado no gel corado com *Comassie Blue* (Figura 29 A), mostra que as proteínas apresentaram grau de pureza relevante, apresentando bandas pequenas, podendo ser parte do processo de degradação, por meio de proteases produzidas pela própria bactéria. Este processo poderia ser minimizado se tivéssemos usado inibidores de proteases como, por exemplo, EDTA e PMSF.

No entanto optou-se por não utilizar estes inibidores, pois em um ensaio piloto de purificação nos dois sistemas utilizados, foi observado perdas consideráveis de proteína no *flowthrough* da amostra aplicada na coluna.





**Figura 29.** Análise em SDS-PAGE 12% da expressão do CD3 $\epsilon\gamma$  em BL21 DE03 plysE e purificação em coluna GSTrap™ HP 1mL (GE Healthcare®) e HisTrap™ FF 1mL (GE Healthcare®). A: Análise da expressão e purificação do CD3 $\epsilon\gamma$ . B: Análise de imunodeteção do CD3 $\epsilon\gamma$  por *Western Blot*. M: Prestained SDS-PAGE Standards #161-0318. Foi realizada análise para separação das proteínas purificadas as quais foram transferidas para membrana de nitrocelulose. O ensaio de imunodeteção foi realizado com anti-CD3 OKT3. 1: Células não induzidas. 2: Células induzidas com 0.5M de IPTG a 30°C. 3: CD3 $\epsilon\gamma$  purificado.

De alguma forma os inibidores alteraram a ligação do CD3 $\epsilon\gamma$  a coluna. O resultado do *Western Blot* (Figura 29 B) confirma a presença CD3 $\epsilon\gamma$  na sua forma monomérica (56kDa), em poços com tampão redutor. Para este experimento foram utilizados anticorpos anti-CD3, OKT3, para sondar a presença do CD3 $\epsilon\gamma$  recombinante. A quantidade de proteína nas amostras foi de 1 mg/mL de CD3 $\epsilon\gamma$  e de 3 mg/mL de GST. Este resultado corrobora com os obtidos por Jyrki *et al.* (2005), quando também expressaram 2.9 mg/mL de GST com o vetor pGEX. A quantificação proteica foi determinada por uma análise conjunta dos géis de proteína, pela realização de ELISA e pela análise de proteína total pelo kit BCA (Pierce®). As proteínas de interesse purificadas, foram passadas em uma uma coluna Centriprep 30 (Amicon®), com membrana de poro de 30 kDa, para concentração e troca do tampão de eluição por PBS que propicia condições melhores de armazenamento. Esta proteína purificada será utilizada em futuros ensaios de competição e ligação por ELISA além de estabelecimento de constantes de afinidade por ressonância plasmônica de superfície.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

## 5 Conclusão e Perspectivas

### 5.1 Conclusão

O desenvolvimento de biofármacos baseados em anticorpos teve início com a aprovação do primeiro anticorpo monoclonal OKT3. Por ser de origem murina, o OKT3 estimula o desenvolvimento de anticorpos humanos anti-OKT3, o que faz com que ocorra uma rápida depuração quando injetado, reduzindo sua eficácia. Com o advento da produção de versões humanizadas de anticorpos CD3 específicos com regiões Fc mutadas e a demonstração que o tratamento de curto prazo com anticorpos monoclonais murinos CD3 específicos podem induzir um estado de tolerância, novas aplicações clínicas têm emergido para essa molécula. Hoje, anticorpos CD3-específicos são representantes de uma nova categoria de agentes imunoterapêuticos, que poderia fornecer a cura para autoimunidade estabelecida e permitir a sobrevivência por longo tempo, dos pacientes com órgãos transplantados. Outro fator importante para o crescimento do mercado de anticorpos monoclonais é que podem ser utilizados para uma extensa variedade de doenças, especialmente nas áreas oncológicas e imunológicas.

Para tentar recuperar parte da capacidade de ligação do FvFc versão RVL anti-CD3 perdida durante processo de humanização realizado pelo grupo, neste projeto foram realizadas mutagêneses sítio dirigidas nos domínios VH e VL. Podemos considerar que, pelos resultados encontrados nos ensaios de ligação todos os FvFc anti-CD3 com as mutações de interesse, são capazes de se ligar ao CD3 presente na superfície de linfócitos. Isto indica que as mutagêneses foram realizadas com sucesso baseada na metodologia proposta.

Com a utilização do método de transfecção otimizado foi possível obtermos clones produtores da proteína recombinante de interesse. A expressão de proteínas recombinantes em células de mamíferos é um processo laborioso e que demanda tempo. Em se tratando de moléculas complexas como os anticorpos, diversos reveses surgem durante este desenvolvimento, o que não foi diferente durante a realização deste projeto. Esperamos que os dados aqui apresentados sirvam como exemplo para a expressão em células de mamíferos de novas proteínas recombinantes de aplicação terapêutica.

Os ensaios de ligação dos FvFc ao antígeno CD3, demonstraram uma capacidade de ligação ao alvo, com porcentagens de células positivas de, 21,29% para o RVL, 70,25% para o VHS31R, 90,71% para o VLL45R, 37,27% para o VLF70Y e 75,4% para o anti-CD3 murino OKT3. Pelas análises de ligação ao antígeno, podemos concluir que os FvFc com as mutações de interesse, possuem menor capacidade de ligação ao alvo comparado a molécula murina original. Este fato pode ser justificado pelo processo de humanização do anticorpo que teve alguns resíduos murinos, importantes para a manutenção da afinidade, substituídos por aminoácidos não conservados. Estes dados corroboram o fato de que as versões humanizadas de anticorpos apresentam, de forma geral, menor afinidade pelo alvo do que o anticorpo murino, o que é justificado pelo processo de humanização e também pela não otimização da região de framework.

## **5.2 Perspectivas**

Serão feitas análises do potencial mitogênico das células por ensaio de proliferação de células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo.

Ensaio de bloqueio de ligação e competição do OKT3 com as versões de FvFc mutadas por Elisa.

Deverão ser feitos ensaios no sentido de verificar as constantes de associação desses anticorpos ao CD3 $\epsilon\gamma$  por ressonância plasmônica de superfície

Com este conjunto de dados experimentais, será possível avaliar o potencial dessas moléculas recombinantes como futuros imunoterápicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 6 Referências Bibliográficas

- Abbas, A. K., Lichtman A. H., Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro. Editora Elsevier. 4 Ed, 2008.
- Abramowicz, D., Schandene, L., Goldman, M., *et al.* Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation*; 47:606–608. 1989.
- Adair, J. R. Engineering antibodies for therapy. *Immunol. Rev.*, v.10, n.1p.5, 1992.
- Ahn, W. S., Antoniewicz, M. R. Metabolic flux analysis of CHO cells at growth and non-growth phases using isotopic tracers and mass spectrometry. *Metabolic Engineering*. Volume 13, Issue 5, P. 598–609. 2011.
- Ahn, W.S. Jeon, J. J., Jeong, Y. R., Lee, S. J., Yoon, S. K. Effect of culture temperature on erythropoietin production and glycosylation in a perfusion culture of recombinant CHO cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 101 pp. 1234–1244. 2008.
- Alegre, M, Peterson, L., Xu, D., Sattar, H., Jeyarajah, D., Kowalkowski, K., Thistlethwaite, J., Zivin, R., Jolliffe, L., Bluestone, J. A non-activating “humanized” anti-CD3 monoclonal antibody retains immunosuppressive properties in vivo. *Transplantation* 57: 1537-1543, 1994.
- Altamirano, C., Paredes, C., Cairo, J. J., Godia, F. Improvement of CHO cell culture medium formulation: simultaneous substitution of glucose and glutamine. *Biotechnology Progress*, 16, pp. 69–75. 2000.
- Angelaccio, S., and Bonaccorsi di Patti, M. C. Site-directed mutagenesis by the megaprimer PCR method: variations on a theme for simultaneous introduction of multiple mutations. *Analytical Biochemistry* 306: 346-349. 2002.
- antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. *J Immunol* 1989;142:737–743.
- Azevedo, A. M., Rosa, P. A., Ferreira, I. F., de Vries, J., Visser, T. J., Aires-Barros, M. R. Downstream processing of human antibodies integrating an extraction capture step and cation exchange chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*1;877(1-2):50-8. 2009.
- Balland, A., Faure, T., Carvalho, D., Cordier, P., Ulrich, P., Fournet, B., *et al.* Characterisation of two differently processed forms of human recombinant factor IX synthesised in

- CHO cells transformed with a polycistronic vector. *Eur J Biochem*, v.172, n.3, Mar 15, p.565-572. 1988.
- Baneyx, F. and Georgiou, G. Degradation of secreted proteins in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci*.13;665:301-8. 1992
- Barnes, L. M., Bentley, C. M. e Dickson, A. J. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology*, v.32, p.109-123. 2000.
- Beerli, R. R., Rader, C. Mining human antibody repertoires. *MAbs*. Jul 27;2(4). 2010.
- Belmar, N. A., Lombardo, J. R., Chao, D. T., Li, O., Ma, X., Pong-Afar, M., Law, D. A., Starling, G. C. Dissociation of efficacy and cytokine release mediated by an Fc-modified anti-CD3 mAb in a chronic experimental autoimmune encephalomyelitis model. *Journal of Neuroimmunology*. V. 212, Issues 1–2. P. 65–73. 2009.
- Bergamini, G., Preiss, T., Hentze, M. W. Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA*, 6, pp. 1781–1790. 2000.
- Bödecker, B. G. D., Newcomb, R., Yuan, P., Braufman, A. e Kelsey, W. Production of recombinant Factor VIII from perfusion cultures: I. Large Scale Fermentation. Em: *Animal cell technology, products of today, prospects for tomorrow*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994. p.580-590
- Bolt, S., Routledge, E., Lloyd, I., *et al.* The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *Eur.J Immunol*;23:403–411. 1993.
- Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian journal of clinical laboratory investigation*, v.21, p.97. 1968.
- Butler, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 68, n.3, p. 283-91. 2005.
- Caldas, C., Coelho, V. P., Rigden, D. J., Neschich, G., Moro, A. M. e Brigido, M. M. Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. *Protein Eng*, v.13, n.5, May, p.353-360. 2000.
- Caldas, C.; Coelho, V.; Kalil, J.; Moro, A. M.; Maranhão, A. Q. e Brígido, M. M. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. *Mol Immunol*, v.39, n.15, May, p.941-952. 2003.
- Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.*, v.6, n.5, p.343-57, maio, 2006.

- Cereghino, J. L. e Cregg, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, v.24, n.1, Jan, p.45-66. 2000.
- Chatenoud, L. and Bluestone, J. A. CD3 Especific antibody: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat.Rev. Immunol.*, v.7, n.8, p.622-32, ago., 2007.
- Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol*. 3:123-32. 2003.
- Chatenoud, L. Immune therapy for type 1 diabetes mellitus – what is unique about anti-CD3 antibodies? . *Nat Rev Endocrinol*. 6:149-57. 2010.
- Chen, G., Goeddel, D. V. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science* 296(5573): 1634–5. 2002.
- Chen, P. Harcum, S.W. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *Journal of Biotechnology*. 117 pp. 277–286. 2005.
- Christopher, A. and Ivan S. The effects of G418 on the growth and metabolism of recombinant mammalian cell lines. *Cytotechnology* 35: 101–114, 2001.
- Clark,, K. J. R., Chaplin, F.W.R. Harcum S.W. Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnology Progress.*, 20, pp. 1888–1892. 2004.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. The T-cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol*. 6, 629–662.1988.
- Co, M. S. e Queen, C. Humanized antibodies for therapy. *Nature*, v.351, n.6326, Jun 6, p.501-502. 1991.
- Cohen J, Wilson A. New challenges to medicare beneficiary access to mAbs. *MAbs*. Jan-Feb;1(1):56-66. 2009.
- Cohen, I. R. Biomarkers, self-antigens and the immunological homunculus. *J Autoimmun*, Sep 19. 2007.
- Cosimi, A., Burton, R., Colvin, R., Goldstein, G., Delmonico, F., Laquaglia, M., Tolkoff-Rubin, N., Rubin, R., Herrin, J., Russell, P. Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 32(6):535-9, 1981.
- Cosimi, A., Cho, S., Delmonico, F., Kaplan, M., Rohrer, R., Jenkins, R. A randomized clinical trial comparing OKT3 and steroids for treatment of hepatic allograft rejection. *Transplantation* 43:91–5, 1987.
- Costa, P. Caracterização da Atividade Ligante de Domínios Variáveis Humanizados de um Anticorpo Anti-CD3 Humano. Universidade de Brasília, 2004.



- Davis, M. M. & Chien, Y. H. in *Fundamental Immunology* (ed. Paul, W. E.) 341–366. Raven Press, New York, 1999.
- Derouazi, M., Girard, P., Van Tilborgh, F., Iglesias, K., Muller, N., Bertschinger, M., *et al.* Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells. *Biotechnol Bioeng*, v.87, n.4, Aug 20, p.537-545. 2004.
- Dunstone, M. A., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Purcell, A. W., Brooks, A. G., Rossjohn, J., McCluskey, J. The production and purification of the human T-cell receptors, the CD3epsilon-gamma and CD3epsilon-delta heterodimers: complex formation and crystallization with OKT3, a therapeutic monoclonal antibody. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Aug;60(Pt 8):1425-8. 2004.
- Fernandez, J., Yaman, I., Huang, C., Liu, H., Lopez, A. B., Komar, A. A., Caprara, M. G., Merrick, W. C., Snider, M. D., Kaufman, R. J., Lamers, W. H., Hatzoglou, M. Ribosome stalling regulates IRES-mediated translation in eukaryotes, a parallel to prokaryotic attenuation. *Mol Cell*. 4;17(3):405-16. 2005.
- Fonseca, A. S. D. Construção e expressão de duas versões humanizadas scFv de um anticorpo Anti-CD3 Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2000. 106 p.
- Gerngross, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, v.22, n.11, Nov, p.1409-1414. 2004.
- Goffic, F. L., Moreau, N., Siegrist, S., Goldstein, F. W., Acar, J. C. Plasmidic resistance of "Haemophilus sp." to aminoglycoside antibiotics: isolation and study of a new phosphotransferase. *Ann Microbiol (Paris)*. May-Jun;128A(4):383-91. 1977.
- Gopalkrishnan, R. V., Christiansen, K. A., Goldstein, N. I., Depinho, R. A. e Fisher, P. B. Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline- inducible system in human cancer cells. *Nucleic Acids Res*, v.27, n.24, Dec 15, p.4775-4782. 1999.
- Gura T. Therapeutic antibodies: Magic bullets hit the target. *Nature* 417: 584-586, 2002.
- Hahn, R., Shimahara, K., Steindl, F., Jungbauer, A. Comparison of protein A affinity sorbents III. Life time study. *Journal of Chromatography A*. V. 1102, Issues 1–2, P. 224–2. 2006
- Herold, K. C., Bluestone, J. A., Montag, A. G., *et al.* Prevention of autoimmune diabetes with nonactivating anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes* V. 41:385–391. 1992.

- Herold, K. C., Gitelman, S. E., Masharani, U., Hagopian, W., Bisikirska, B., Donaldson, D., et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3 $\gamma$ 1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes*, v.54, n.6, Jun, p.1763-1769. 2005.
- Herold, K., Hagopian, W., Auger, J., Poumian-Ruiz, E., Taylor, L., Donaldson, D., Gitelman, S., Harlan, D., Xu, D., Zivin, R., Bluestone, J. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 346(22): 1692-1698, 2002.
- Hirsch, R., Gress, R. E., Pluznik, D. H. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal. 1989.
- Hossler, P. Khattak, S.F. Li, Z.J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology*, 19, pp. 936–949. 2009.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. e Shlomchik, M. *Immunobiology*. New York and London: Garland Publishing. 2001.
- Johnson, B. D., McCabe, C., Hanke, C. A., Truitt, R. L. Use of anti-CD3 epsilon F(ab')<sub>2</sub> fragments in vivo to modulate graft-versus-host disease without loss of graft-versus-leukemia reactivity after MHC-matched bone marrow transplantation. *J Immunol.* 15;154(10):5542-54. 1995.
- Jyrki, T., Hannu, J., Rajaniemi. An alternative use of basic pGEX vectors for producing both N- and C-terminal fusion proteins for production and affinity purification of antibodies. *Protein Expression and Purification.* 40 287–291. 2005.
- Kamiya, H., Yamazaki, J., Harashima, H. Size and topology of exogenous DNA as determinant factors of transgene transcription in mammalian cells. *Gene Ther.*, v.9, n.22, p 1500-7, nov., 2002.
- Kammann, M., Laufs, J., Schell, J., and Gronenborn, B. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Research* 17: 5404. 1989.
- Kevan, C., Herold, S. E., Umesh, M., William, H., Brygida, B., David, D., Kristina, R., Beverly, D., David, M., Harlan, J., Bluestone, A. A Single Course of Anti-CD3 Monoclonal Antibody hOKT3 1 (Ala-Ala) Results in Improvement in C-Peptide Responses and Clinical Parameters for at Least 2 Years After Onset of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, VOL.54, JUNE, 2005.
- Kim, K. S., Sun, Z. Y., Wagner, G., Reinherz, E. L. Heterodimeric CD3epsilon gamma extracellular domain fragments: production, purification and structural analysis. *J Mol Biol.* 302(4):899-916. 2000.

- Kim, S. J., Park, Y. e Hong, H. J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*, v.20, n.1, Aug 31, p.17-29. 2005.
- Kimball, J., Norman, D., Shield, C., Schroeder, T., Garovoy, M., O'Connell, J., Stuart, F., McDiarmid, S., Wall, W. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transplant Immunology* 3: 212-221, 1995.
- Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Goldsby, R. A. *Kuby Immunology*: W.H. Freeman. 2002. 574 p.
- Kjer-Nielsen, L., Dunstone, A., Kostenko, L., *et al.* Crystal structure of the human T cell receptor CD3 heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101(20) 7675–7680. 2004.
- Kohler, G. e Milstein, G. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.7, n.256, p. 495-7, ago, 1975.
- Kohm, A. P., Williams, J. S., Bickford, A. L., McMahon, J. S., Chatenoud, L., Bach, J. F., *et al.* Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, v.174, n.8, Apr 15, p.4525-4534. 2005.
- köhm, M., Behrens, F. Diagnosis and therapy of early psoriatic arthritis. *Z Rheumatol. Jan*; 71(1):46-52. 2012.
- Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T-cell surface antigens. *Science* 206, 347–349. 1979.
- Le Hir, H., Nott, A. e Moore, M. J. How Introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemistry*, p.215-220. 2004.
- Li, J., Menzel, C., Meier, D., Zhang, C., Dubel, S. e Jostock, T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies. *J Immunol Methods*, v.318, n.1-2, Jan 10, p.113-124. 2007.
- Li, N., Chen, Y., He, W., Yi, T., Zhao, D., Zhang, C., Lin, C., Todorov, I., Kandeel, F., Forman, S., Zeng, D. Anti-CD3 preconditioning separates GVL from GVHD via modulating host dendritic cell and donor T-cell migration in recipients conditioned with TBI. *Blood*. V. 113(4): P. 953–962. 2009.
- Liew, C. G., Draper, J. S., Walsh, J. Moore H. Peter W. Andrews. Transient and Stable Transgene Expression in Human Emryonic. *STEMCELLS*. 25:1521–1528. 2007
- Loertscher, R. The Utility of Monoclonal Antibody Therapy in Renal Transplantation. *Transplantation Proceedings* 34: 797–800, 2002.

- Ludviksson, B. R., Ehrhardt, R. O. e Strober, W. TGF-beta production regulates the development of the 2,4,6-trinitrophenol-conjugated keyhole limpet hemocyanin-induced colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol*, v.159, n.7, Oct 1, p.3622-3628. 1997.
- Mahajan, E., George, A., Wolk, B. Improving affinity chromatography resin efficiency using semi-continuous chromatography. *Journal of Chromatography A*. Volume 1227, Pages 154–162. 2012.
- Makrides, S. C. Components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif*. Nov;17(2):183-202. 1999.
- Maranhão, A. Q.; Brigido, M. M. Anticorpos Humanizados. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 23: 38-43. 2002.
- Maranhão, A.Q e Brigido, M.M. Articorpos Humanizados. *Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento*. v.23, p. 38-43. 2001.
- Mather, J. P. Laboratory scaleup of cell cultures (0.5-50 liters). *Methods Cell Biol*, v.57, p.219-227. 1998.
- Mirica, K A., Lockett, M. R., Snyder, P. W., Shapiro, N. D., Mack, E. T., Nam, S. and Whitesides, G. M. Selective Precipitation and Purification of Monovalent Proteins Using Oligovalent Ligands and Ammonium Sulfate. *Bioconjugate Chem*. V 23, 293–299. 2012.
- Mirick, G. R. Bradt, B. M., Denardo, S. J., Denardo, G.L. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, v.48, n.4, p.251-7, dez., 2004.
- Mistry, P. K., Wraight, E. P. and Cox, T. M. Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, v. 348, n.9041, Dec 7, p.1555-1559. 1996.
- Morrison, S. L., Johnson, M.J., Herzenberg, L. A., Oi, V. T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*v.81, n.21, p. 6851-5, nov. 1984.
- Mutskov, V. and Felsenfeld, G. Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *Embo J*, v.23, n.1, Jan 14, p.138-149. 2004.
- Nabavi, S. and Nazar, R. N. Simplified one-tube “megaprimer” polymerase chain reaction mutagenesis. *Analytical Biochemistry* 345: 346-348. 2005.

- Nelson, A. L. and Reichert, J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol.*, v.27, n.4, p.331-7, abr., 2009.
- Nelson, M. D. and Fitch, D. H. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction. *Methods Mol Biol.* 772:459-70. 2011.
- O'Brien S., Jones T. Humanization of monoclonal antibodies by CDR grafting. *Methods of Molecular Biology* 207:81-100, 2003.
- Ochi, H., Abraham, M., Ishikawa, H., Frenkel, D., Yang, K., Basso, A. S., Wu, H., Chen, M. L., Gandhi, R., Miller, A., Maron, R., Weiner, H. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> LAP<sup>+</sup> T cells. *Nat. Med.*, v.12, n.6, p.627-35, jun., 2006.
- Oliveira, Y. S. Evolução in vitro de anticorpos anti-cd3 pela seleção de cadeias leve (VL) humanas por Phage Display. Fevereiro de 2009.
- Ozturk, S. S. Palsson, B.O. Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors. *Biotechnology Progress*, 7. pp. 471–480. 1991.
- Pavlou, A. K, Reichert, J. M. Recombinant protein therapeutics--success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol.* Dec;22(12):1513-9. 2004.
- Plain, K. M., Chen, J., Merten, S., He, X. Y. e Hall, B. M. Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. *Transplantation*, v.67, n.4, Feb 27, p.605-613. 1999.
- Powelson, J., Cosimi, A., Wee, S. Monoclonal antibodies in organ transplantation. *Biotechnology Advantages* 11: 725-740, 1993.
- Presta, L. G. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev*, v.58, n.5-6, Aug 7, p.640-656. 2006.
- Quek, L. E. Dietmair, S. Kromer, J. O. Nielsen, L. K. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12, pp. 161–171. 2010.
- Reichert, J. M. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *Landes Bioscienc.* Volume 3. Issue 1, p. 76-99. 2011.
- Renlund, D., O'Connell, J., Gilbert, E. A prospective comparison of murine monoclonal CD-3 (OKT3) antibody based and equine antithymocyte globulin-based rejection prophylaxis in cardiac transplantation. *Transplantation* 47:599–610; 1989.
- Richards, E. J. e Elgin, S. C. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, v.108, n.4, Feb 22, p.489-500. 2002.

- Richards, J., Auger, J., Peace, D., Gale, D., Michel, J., Koons, A., Haverty, T., Zivin, R., Jolliffe, L. and Bluestone J. Phase I Evaluation of Humanized OKT3: Toxicity and Immunomodulatory Effects of hOKT3g4. *Cancer Research* 59: 2096–2101, 1999.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H., Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332:323–327. 1988.
- Rücker, E., Schneider, G., Steinhäuser, K., Löwer, R., Hauber, J., Stauber, R. H. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. *Protein Expr Purif.* 21(1):220-3. 2001.
- Ruggiero, L. A. Clonagem e expressão de anticorpos recombinantes em células de ovário de hamster chinês (CHO) em cultura. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2002. 137 p.
- Ruuls, S. R, Lammerts van Bueren J. J, Van de Winkel J. G, Parren P. W. Novel human antibody therapeutics: the age of the Umabs. *Biotechnol J.* Oct;3(9-10):1157-71. 2008.
- Sambrook, J. e Russel, D. W. *Molecular Cloning - a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor. 2001
- Schein, C. H., Marthien, H. M., Noteborn. H. N. Formation of Soluble Recombinate protein in *E. coli* is favored by lower growth temperature. *Biotechnology* 6. 291-294. 1988.
- Seldon, T. A., Karen, E., Hughes, D. J., Munster, David Y. Chin, and Martina Jones L. Improved Protein-A separation of VH3 Fab from Fc after Papain Digestion of Antibodies. *Journal of Biomolecular Techniques.* 22:50–52 ©. 2011
- Sgro, C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology* 105: 23-29, 1995.
- Shih, Y. P., Kung, W. M., Chen, J. C., Yeh, C. H., Wang, A. H., Wang, T. F. High-throughput screening of soluble recombinant protein. *Protein Science* 11. P. 1714-1719. 2002.
- Shukla, A. A., Thömmes, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* 28(5):253-61. 2010.
- 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. 145 p.
- Silva, H. M., Vieira, P. M.; Costa, P. L., Pimentel, B. M.; Moro, A. M., Kalil, J. E.; Maranhão, A. Q.; Coelho V., Brigido, M. M. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunol. Lett.* 125 : 129–136. 2009.

- Sinacore, M. S., Drapeau, D. e Adamson, S. R. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol*, v.15, n.3, Jul, p.249-257. 2000.
- Skosyrev, V. S., Kuleskiy, E. A., Yakhnin, A. V., Temirov, Y. V., Vinokurov, L. M. Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif.* 28(2):350-6. 2003.
- Spector, D. L., R.D., G. e Leinwand, L. A. *Cells: a laboratory manual*. New York: CSHL press. 1998. 1.1-2.13 p.
- Stevens, R. C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*.15;8(9):R177-85. 2000.
- Stratta, R., Sollinger, H., D'Alessandro, A., Kalayoglu, J., Belzer, F. OKT3 rescue therapy in pancreas allograft rejection. *Diabetes* 38 (1):74–78, 1989.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189, pp. 113–130. 1986.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H. J. J., Dunn, J. W., Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned gene. *Methods Enzymol.*, 185, pp. 60–89. 1990.
- Suntharalingam, G., Perry M. R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M. D., Panoskaltsis, N. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):1018-28. 2006.
- Swann, P. G. Tolnay, M., Muthukkumar, S., Shapiro, M. A., Rellahan, B. L., Clouse, K. A. Considerations for the development of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 20, n. 4, p. 493-9, ago., 2008.
- Thistlethwaite, J. R., Stuart, J. K., Mayes, J. T., Gaber, A. O., Woodle, S., Buckingham, M. R., Stuart, F. P. Complications and monitoring of OKT3 therapy. *Am.J Kidney Dis*; 11:112–119. 1988.
- Timasheff, S. N. Solvent stabilization of protein structure. *Methods Mol Biol*.40:253-69. 1995.
- Trummer, E., Fauland, K., Seidinger, S., Schriebl, K., Lattenmayer, C., Kunert, R., Vorauer-Uhl, K., Weik, R., Borth, N., Katinger, H., Müller D. Process parameter shifting: part I. Effect of DOT, pH, and temperature on the performance of Epo-Fc expressing CHO cells cultivated in controlled batch bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 94 pp. 1033–1044. 2006.
- Tyagi, R., Lai, R., and Duggleby, R. G. A new approach to ‘megaprimer’ polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnology* 4: 2. 2004.

- Utset, T., Auger, J., Peace, D., Zivin, R., Xu, D., Jolliffe, L., Alegre, M., Bluestone, J., Clark, M. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *Journal of Rheumatology* 29(9):1907-1913, 2002.
- Van Waune, J. P., De Mey, J. R. E., Goossens, J. G. OKT3: a monoclonal anti-human T-lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J. Immunol.*, v. 124, p. 2708-13, 1980.
- Vigeral, P., Chkoff, N., Chatenoud, L., Campos, H., Lacombe, M., Droz, D., Goldstein, G., Bach, J. F., Kreis, H. Prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney recipients. Utilization of OKT3 as the sole immunosuppressive agent. *Transplantation* ;41:730–733. 1986.
- Wain, J., Wright, C., Ryan, D., Zorb, S., Mathisen, D., Ginns, L. Induction Immunosuppression for Lung Transplantation With OKT3. *Anatomical Thoracic Surgical* 67:187–193, 1999.
- Walsh, G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *TRENDS in Biotechnology* 23(11):553-558. 2005.
- Werten, M. W. T., Van Den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H. e De Wolf, F. A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, v.15, p.1087-1096. 1999.
- Woodle, E., Thistlethwaite, J., Jolliffe, L., Fucello, A., Stuart, F., Bluestone, J. Anti-CD3 monoclonal antibody therapy. *Transplantation* 52: 361-368, 1991.
- Wu H., Nie, Y., Huse, D., Watkins, J. Humanization of a Murine Monoclonal Antibody by Simultaneous Optimization of Framework and CDR Residues. *Journal of Molecular Biology*. 294: 151 -162, 1999.
- Wu, H. Y., Maron, R., Tukpah, A. M. and Weiner, H. L. Mucosal Anti-CD3 Monoclonal Antibody Attenuates Collagen-Induced Arthritis That Is Associated with Induction of LAP+ Regulatory T Cells and Is Enhanced by Administration of an Emulsome-Based Th2-Skewing Adjuvant. *J Immunol*. V 185(6): P. 3401–3407. 2010.
- Wu, W., Jia, Z., Liu, P., Xie, Z., and Wei, Q. A novel PCR strategy for high-efficiency, automated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research* 33:110. 2005
- Wurm, F. e Bernard, A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*, v.10, n.2, Apr, p.156-159. 1999.
- Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, v.22, n.11, Nov, p.1393-1398. 2004.



Zeenko, V. V., Wang, C., Majumder, M., Komar, A. A., Snider, M. D., Merrick, W. C., Kaufman, R. J., Hatzoglou, M. An efficient in vitro translation system from mammalian cells lacking the translational inhibition caused by e IF2 phosphorylation. *RNA*. 14(3): 593–602. 2008.