**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CARLOS HENRIQUE RODRIGUES GOMES

**Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv
Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular
(VEGF)**

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
10/04/2013

CARLOS HENRIQUE RODRIGUES GOMES

**Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv
Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular
(VEGF)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo
2013

Carlos Henrique Rodrigues Gomes

Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular (VEGF)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais Carlos Gomes e Maria Helena Gomes (in memoriam) por
escolherem a mim para dar uma vida*

AGRADECIMENTOS

São poucas as oportunidades que temos para agradecer, na forma escrita, às pessoas que contribuíram com este trabalho, portanto, aproveito estas poucas páginas para expressar meu agradecimento pela ajuda no desenvolvimento desta dissertação.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Ricardo Giordano por ter dado a oportunidade de realizar o mestrado, pela orientação, pela assistência intelectual e técnica, pela paciência em corrigir os relatórios, pelo apoio e estímulo em persistir na pesquisa.

Não tenho como deixar de agradecer à toda minha família, tios e primos por fazerem parte em todos os momentos, em especial, pai e mãe, pelo amor e dedicação. Embora tenham partido cedo, foram exemplos de simplicidade e bondade e transmitiram ensinamentos que levarei sempre comigo. Aos meus tios Wilson e Regina pelo apoio e acolhimento nos momentos bons e momentos difíceis.

Acredito que este trabalho não é somente fruto de quem subscreveu, então, deixo aqui os meus agradecimentos a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma a chegar até aqui:

Aos amigos do laboratório de Biologia Vascular: Jussara por me ajudar na construção da biblioteca e pela disponibilidade em ajudar mesmo sem tempo; Leila por fornecer o VEGF e pela amizade; Fenny pela amizade e por aguentar piadas sem graça; Renato pelas conversas diárias e conselhos e venda de cerveja às quintas; André pelo convívio ("D man" high glucose); Laura e Arthur pelos conselhos e dicas e Alinne "meme" Le Fosse pela "egípcia".

Aos amigos do laboratório de Bioquímica da Sinalização Celular: Professora Deborah, Darlene, Matheus (gonna fly now), Gabi pela amizade, risadas e convivência *trans* bancada.

À Mariana pela amizade sincera, conselhos dentro e fora da bancada, broncas, conversas e pela alta culinária. À Denisera pelos bons momentos e pelo apoio nos momentos de fossa sempre ajudando com conselhos e dividindo experiências. Ao laboratório de Bioquímica de Parasitas: Professora Maria Júlia, Professor Colli, Chris, Mayara, Eliciane e Rubens pela amizade e convivência e Professor Ivan pelos conselhos gastronômicos.

Aos técnicos do laboratório Maria Luiza, Celinha por me ajudar com a produção de antissoros desde a minha iniciação científica e Robertinho pelo santo café de cada dia.

À Luci Navarro pelo sequenciamento.

À Professora Carla Columbano pela orientação na Iniciação Científica e aos antigos membros do laboratório: Juliana, Marcela, Sheiloka, Mauricio e Raphaela. À Márcia pela amizade especial e conselhos mesmo em terras texanas. À Camila pela amizade e pelas "corridas" no parque.

Aos amigos do bloco 0: Valdir, Valquiria e Rafael.

Aos amigos do bloco 12: Mariana, Senpai Gilberto, Gabi, Santiago, Ana Ayupe e Lauren pela ajuda no BioAnalyzer.

Aos membros do bloco 9: Luiza (kekanteira), Batata e Eliezer pela amizade e boas conversas.

À Talita pela paciência em me aguentar no fotodocumentador.

Aos amigos membros do LSSB: Juliana, Thompson e Alex.

À Gisele por todos os momentos que passamos. Ao seu José, Dona Maria, Anelisa, Danilo, Cláudia e Rodrigo por terem me recebido e me tratado com muito carinho.

Agradeço especialmente à família Callari: Tia, Vitão, Gabi, Alê, Paulo, Samanta (Shar), Ângela por todos os anos de amizade e serem minha família.

À Adriana de Araújo pelas sessões de terapia que me ajudaram a terminar estas páginas.

À banda Rolling Histones: Pererê, Paulo, Bisson, Otto, Thibério e Rodrigo pelos momentos de descontração sempre com um bom Rock'n'Roll.

Às professoras Luciana e Sandra que me incentivaram a começar a iniciação científica. Ao quarteto fantástico pelos bons momentos durante a faculdade.

Ao mestre Eric Clapton (Music will always find its way to us).

À Mari pelos bons momentos, pelas conversas do Walking Dead, por me ensinar sobre psicologia canina e pelo dia da Esbórnia.

À família de campeões Kyokushin Pinheiros, em especial, Senpai Sasaki, Kimura, Arnaldo e Barbieri pelos treinos e ensinamentos dentro e fora do dojo. Ossu!

Aos funcionários do IQ.

À FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

“A essência do espírito é: inclina sua cabeça, levanta teus olhos, fecha teus lábios e abre tua mente, sirva os demais com humildade final como ponto de partida”.
Masutatsu Oyama

“Ninguém baterá tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada”.
Rocky Balboa

RESUMO

(Gomes, C.H.R) **Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular (VEGF)**. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes e é importante em processos fisiológicos, que em adultos é restrita ao reparo tecidual e ao ciclo reprodutivo feminino. Entretanto, doenças, como câncer ou retinopatias, induzem a formação da angiogênese patológica, necessária para a progressão destas patologias. Anticorpos monoclonais constituem uma das classes de biofármacos que mais cresce e com impacto importante nas doenças dependentes de angiogênese. Entre as diversas metodologias para a identificação de anticorpos monoclonais contra alvos terapêuticos, está o phage display. Por causa do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ser o principal fator responsável pela formação de novos vasos, o principal biofármaco anti-angiogênico disponível na clínica atualmente é um anticorpo monoclonal (bevacizumab) direcionadas contra o VEGF. Embora terapias anti-VEGF sejam eficazes, ainda não são ideais devido a efeitos colaterais indesejados e a resistência medicamentosa. Novas alternativas são necessárias a fim de aperfeiçoar as terapias angiogênicas. O objetivo do nosso estudo é identificar novos alvos moleculares e desenvolver novos agentes terapêuticos para doenças dependentes de angiogênese. Para atingirmos nossa meta escolhemos o sistema de *phage display* para selecionarmos anticorpos com propriedades angiogênicas. Uma biblioteca de anticorpos foi desenvolvida em nosso laboratório, dirigida contra a molécula VEGF, em particular uma de suas isoformas. Os animais imunizados desenvolveram anticorpos específicos, detectados por ELISA e *Western-blot*. A amplificação do *pool* de genes das cadeias leve e pesada de imunoglobulinas foi realizada para produzir os fragmentos *single-chain* (ScFv) que foram então clonados no vetor para a construção da biblioteca. A biblioteca de *display* de anticorpos ScFv será, portanto, analisada em plataformas angiogênicas para isolar anticorpos específicos contra isoformas de VEGF e novos marcadores moleculares de superfície celular expressos por células endoteliais ativadas.

Palavras-chave: Phage Display; Anticorpos monoclonais; VEGF

ABSTRACT

(Gomes, C.H.R.) **ScFv Antibodies Library Construction Directed Against the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**. 2013. 99p. Masters Thesis-GraduateProgram in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing ones and is an important physiological process, which in adults is mostly restricted to wound healing or the female reproductive cycle. However, different illnesses, such as cancer or retinopathies, induce the formation of pathological angiogenesis, necessary for disease progression. Monoclonal antibodies are one of the fastest growing class of biopharmaceuticals with important implications in angiogenesis dependent diseases. Among various methods for the identification of monoclonal antibodies against therapeutic targets is phage display technology. Because the vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main molecular factor responsible for the formation of new blood vessels, the major anti-angiogenic drug available in the clinic today is a monoclonal antibody (bevacizumab) directed against VEGF. However, although anti-VEGF therapies are effective, they are not yet ideal due to undesirable side effects and drug resistance. Novel alternatives are necessary to improve on angiogenic therapies. The aim of our study is to identify novel molecular targets and to develop new therapeutic agents for angiogenic dependent diseases. To achieve our goal we have chosen the phage display system in order to select for antibodies with angiogenic properties. An antibody phage library has been developed in our laboratory, directed against VEGF molecule, particularly one of its isoforms. The animals were immunized and developed specific antibodies, detected by ELISA and Western-blot. Amplification of the pool of light and heavy chain Ig genes was performed to produce the single chain (ScFv) fragments for library construction. The ScFv antibody display libraries will be then screened in angiogenic settings to isolate antibodies against specific VEGF isoforms and novel cell surface molecular markers expressed by activated human endothelial cells.

Keywords: Phage Display; Monoclonal antibodies; VEGF

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRASIL	Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands
Cadeia κ	Cadeia Kappa
Cadeia λ	Cadeia Lambda
CD	Domínio do <i>cluster</i>
cDNA	DNA complementar
CDR	Regiões Determinantes de Complementariedade
Células NK	Células Natural Killer
C _H	Região constante da cadeia pesada
C _L	Região constante da cadeia leve
D _H	Região de Diversidade da cadeia pesada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA-PKc's	Subunidade catalítica da proteína quinase dependente de DNA
dNTP	desoxi-ribonucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP)
Fc	Fragmento cristalizável
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
FDA	Food and Drug Administration
FR	Regiões <i>Framework</i>
Fv	Domínio Fragmento variável
HAMA	Anticorpo anti-camundongo humano
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2
HN	Amino-terminal da cadeia pesada
Ig	Imunoglobulina
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
ISA	Amplificação de fitas independentes
J _H	Região de Junção da cadeia pesada
J _L	Região de Junção da cadeia leve
kDa	Quilodáton
LN	Amino-terminal da cadeia leve
mAB	Anticorpo monoclonal
mRNA	RNA mensageiro
NRP	Neuropilina

DO	Densidade óptica
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIGF	Fator de crescimento placentário
RAG1 e 2	Gene ativador de recombinação 1 e 2
RSS	Sequencia de sinalização para recombinação
RIN	Número de integridade do RNA
rRNA	RNA ribossomal
ScFv	Single-chain variable fragment
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SOE	Splicing Overlap Extension
S	Svedberg, coeficiente de sedimentação
T _c	Linfócitos T citotóxicos
TdT	Desoxinucleotidiltransferase terminal
TE	Tampão contendo tris e EDTA
T _h	Linfócitos T auxiliares
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento vascular epitelial
VEGFR	Receptor de VEGF
V _H	Região variável da cadeia pesada
V _L	Região variável da cadeia leve
VSR	Vírus sincicial respiratório
U	Unidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunoglobulinas são formadas por cadeias leve e pesada dispostas em heterodímeros.....	17
Figura 2. Regiões variáveis e constantes de imunoglobulinas.....	20
Figura 3. Sítio de ligação ao antígeno	20
Figura 4. Organização dos clusters gênicos das imunoglobulinas	23
Figura 5. Recombinação V(D)J	24
Figura 6. O processo de tornar os monoclonais menos imunogênicos marcou a evolução da engenharia de anticorpos.....	28
Figura 7. Phage Display com o sistema Phagemid	32
Figura 8. Estrutura de um anticorpo e suas variantes produzidas por Phage Display	33
Figura 9. Estratégia de seleção com antígeno adsorvido em placa de microtitulação	35
Figura 10. Método “BRASIL”	36
Figura 11. Estrutura do gene de VEGF.....	39
Figura 12. VEGF e seus receptores.....	40
Figura 13. Detecção de anticorpos anti-VEGF	57
Figura 14. VEGF é um homodímero unido por pontes dissulfeto	57
Figura 15. Reatividade dos anticorpos anti-VEGF por Western-blot	58
Figura 16. Reatividade por ELISA do soro imune e pre-imune contra VEGF ₁₆₄ comercial ...	58
Figura 17. RNA total purificado do baço de animais imunizados com VEGF ₁₈₈	61
Figura 18. Amplificação das regiões variáveis dos genes de imunoglobulina cadeia leve (VL) e pesada (VH).....	64
Figura 19. Padronização da reação de PCR dos genes das cadeias leve e pesada.....	67
Figura 20. Padronização da amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH).	68
Figura 21. Construção do amplicon <i>single-chain</i> (ScFv).....	70
Figura 22. Amplicons de ScFv obtidos com diferentes temperatura de anelamento (Tm)....	72
Figura 23. Purificação dos amplicons de cadeias leve e pesada.....	73
Figura 24. Extensão <i>Overlap</i> pelo método <i>ISA-PCR</i>	74
Figura 25. Purificação dos amplicons <i>single-chain</i>	76
Figura 26. Preparação do vetor pCOMB3XSS.	77
Figura 27. Perfil dos clones de ScFv obtidos da primeira biblioteca gerada.	79
Figura 28. Os fragmentos de ScFv apresentam homologia com imunoglobulinas murinas.	80
Figura 29. Perfil dos clones de ScFv obtidos com a segunda biblioteca gerada.....	81
Figura 30. Alinhamento da sequência do VEGF ₁₈₈ de camundongo e VEGF ₁₈₉ humano.	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Sistema imune e imunoglobulinas	15
1.2. Organização de imunoglobulinas	18
1.3. Rearranjo gênico	21
1.4. Anticorpos monoclonais	25
1.5. Produção de anticorpos monoclonais	26
1.6. Phage Display	29
1.6.1 Detalhes técnicos	30
1.6.2. Métodos de seleção de ligantes	33
1.7. Angiogênese	36
1.7.1. Terapia anti-VEGF	40
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Clonagem de VEGF	45
3.1.2. Expressão de VEGF em E.coli	45
3.2. Imunizações dos camundongos com VEGF	46
3.2.1. Ensaio de ELISA	46
3.2.2. Western-blot	47
3.3. Extração de RNA total de baço imunizado e preparo do cDNA	47
3.3.1. Amplificação das cadeias leve e pesada (Round 1)	48
3.3.2. Obtenção de amplicons de ScFv (Round 2)	48
3.3.3. Obtenção de amplicons de ScFv pelo método ISA-PCR	49
3.4. Preparação do vetor	51
3.4.1. Purificação do vetor em gradiente de Cloreto de cério	51
3.5. Preparação de bactérias eletrocompetentes	51
3.6. Construção da biblioteca de ScFv	52
3.6.1. Transformação de células competentes XL1-BLUE	52
3.7. Sequenciamento dos clones	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Produção e detecção de anticorpos anti-VEGF	54
4.2. Obtenção dos amplicons de imunoglobulina	59
4.3. Amplificação dos genes de imunoglobulina	62
4.3.1. Padronização da amplificação das cadeias leve e pesada	65

4.4. Construção dos amplicons <i>single-chain</i>	69
4.4.1. Padronização da amplificação do fragmento <i>single-chain</i>	71
4.4.2. Padronização da amplificação do fragmento <i>single-chain</i> (protocolo 2)	72
4.4.3. Método ISA-PCR	73
4.5. Purificação dos fragmentos <i>single-chain</i> e preparação do vetor	75
4.6. Construção da biblioteca	78
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS	90
8. SÚMULA CURRICULAR	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA IMUNE E IMUNOGLOBULINAS

O sistema imune dos organismos vertebrados dispõem de dois mecanismos para combater a presença de organismos ou materiais exógenos: imunidade natural e imunidade adquirida (FLAJNIK e PASQUIER, 2004). A resposta natural, também chamada resposta inata constitui a primeira defesa contra microrganismos, agindo imediatamente ao processo de invasão por meio de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células com propriedades citotóxicas, tais como células NK (*natural killer*) e proteínas do sangue, como frações do sistema complemento e outros mediadores como, citocinas que regulam e coordenam atividades da imunidade natural (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002).

Em contraste com a imunidade natural, existe outra resposta imune cuja capacidade defensiva aumenta com a exposição posterior do mesmo microrganismo. Como essa resposta se adapta às infecções, é chamada de imunidade adaptativa ou adquirida. Podemos dividir esta resposta imune em dois tipos: resposta adquirida celular e resposta adquirida humoral que são mediadas por diferentes componentes do sistema imune.

Na imunidade adquirida celular participam os linfócitos T auxiliares (T_h) que reconhecem peptídeos antigênicos ligados a proteínas de células hospedeiras, liberando citocinas e desencadeando resposta efetora onde os microrganismos invasores serão destruídos. Além de linfócitos auxiliares, também fazem parte da resposta celular os linfócitos T citotóxicos(T_c) que reconhecem e destroem diretamente células infectadas (BOEHM, 2012).

A imunidade humoral é mediada pelos linfócitos B e pelos produtos secretados por eles, os anticorpos. Ao sofrerem ativação pelos linfócitos T auxiliares, os linfócitos B proliferam e se diferenciam em células secretoras (plasmócitos) de diferentes classes de anticorpos com funções distintas. Inicialmente os plasmócitos secretam anticorpos da classe IgM. Com a exposição prolongada ao antígeno e a ação das células T auxiliares, plasmócitos são induzidos a produzir anticorpos de diferentes classes (IgG, IgA, IgE) com o intuito de melhorar a qualidade da resposta humoral em um processo chamado de maturação da afinidade (MAUL e GEARHART, 2010).

A função dos anticorpos é neutralizar microrganismos por meio de ligações específicas anticorpo-antígeno facilitando a fagocitose, uma vez que, neutrófilos e macrófagos expressam receptores para as caudas de IgG (domínio denominado de Fc, que será detalhado mais abaixo) em um processo chamado opsonização. IgG e IgM ativam o sistema complemento, que consiste em uma série de proteínas séricas e de superfície celular que são ativadas em uma cascata de enzimas proteolíticas para gerar produtos que eliminem os microrganismos (CARROLL e ISENMAN, 2012). Por exemplo, a ativação do sistema complemento, resulta na formação de um complexo proteico que tem a propriedade de se intercalar a membranas, formando um poro, e afetando a integridade da célula invasora.

Imunoglobulinas são proteínas heterodiméricas do sistema imune secretadas pelos linfócitos B, compostas por duas cadeias leves e duas pesadas, na qual a cadeia leve pode ser composta por uma cadeia κ ou λ . Ambas as cadeias, leve e pesada, são constituídas uma região variável, que se liga especificamente ao antígeno, e regiões constantes, com propriedades específicas de respostas efetoras, como por exemplo, ativação do complemento e ligação e ativação de receptores Fc

em células T (Figura 1) (SCHROEDER e CAVACINI, 2010). Devido a essas características anticorpos recombinantes com especificidade pré-definida ao antígeno se tornaram a classe de agentes terapêuticos muito interessante, e uma das que mais cresce nos últimos anos, com 30 anticorpos sendo aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para as mais diversas terapias em 2011 (REICHERT e DHIMOLEA, 2012).

Figura 1. Imunoglobulinas são formadas por cadeias leve e pesada dispostas em heterodímeros. Na porção N-terminal de cada cadeia pesada (HN) e leve (LN) localiza-se o domínio Fab que contém as três regiões CDR (Regiões Determinantes de Complementariedade), importantes para a variabilidade das proteínas, e quatro regiões FR (*Framework*). A região CDR é composta ainda pela junção das regiões variáveis das cadeias leves (V_L, J_L) e pesada (V_H, D_H, J_H). O domínio Fc localizado na porção C-terminal constitui a região de resposta efetora e é formado por duas porções constantes (C_H2, C_H3). A digestão de uma imunoglobulina com papaína cliva a região da dobradiça (*Hinge*) no lado N-terminal antes da ligação dissulfeto intercadeias pesadas – desdobrando a imunoglobulina em três fragmentos (2 segmentos Fab, fragmentos de ligação do antígeno, idênticos e um fragmento Fc).

1.2. ORGANIZAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

Como mencionado, imunoglobulinas são compostas por regiões constantes e variáveis. As cadeias leves e pesadas diferem no número de regiões constantes: uma para a cadeia leve e 3 para a pesada. O conjunto dos domínios constantes 2 e 3 (C_{H2} e C_{H3}) forma a chamada região Fc (fragment crystalizable region) de um anticorpo, devido a sua capacidade de formar cristais ao ser liberada da imunoglobulina por digestão enzimática com papaína. Como mencionado anteriormente, os anticorpos podem ainda ser classificados em diferentes classes (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE) (SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

A principal classe encontrada no soro é a IgG, seguida por IgA e IgM. IgG além de estar presente no soro é a única classe com capacidade de atravessar a barreira placentária. Isso é possível devido a presença de receptores Fc específicos para IgG em células da placenta (PALMEIRA et al, 2012). IgA é a principal classe presente em secreções, por exemplo, lágrimas, saliva, colostro, muco, e dessa maneira é importante na imunidade de mucosas (CERUTTI, 2011). IgE está envolvida em reações alérgicas e doenças parasitárias como consequência de sua capacidade de ligação e ativação de basófilos e eosinófilos (COOPER, 2009). O papel de IgD no organismo, que é encontrada em baixos níveis no soro, ainda é uma questão em aberto.

IgM é a primeira classe de anticorpos a serem produzidos na resposta primária a um antígeno. Através da troca de classes ocorre, a medida que os anticorpos maturam (Figura 2), um anticorpo do tipo IgM é convertido em um anticorpo IgG, mantendo-se o domínio variável que está envolvido no reconhecimento do antígeno. É possível ressaltar ainda que, no caso das

imunoglobulinas G, é possível dividir as cadeias leves e pesadas em subgrupos (ex: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com base em diferenças na estrutura da porção constante das cadeias pesadas (ESSER e RADBRUCH, 1990; STHOEGER et al, 2012). Consequentemente, essas subclasses se ligam a diferentes receptores Fc expressos em diferentes células do sistema imune e vascular, alterando o desempenho e as diversas funções efetoras destas diferentes IgGs. Isto é importante, também, no caso de anticorpos terapêuticos, onde a classe e subclasse do mesmo podem alterar a resposta do pacientes. Por exemplo, a maioria dos anticorpos monoclonais desenvolvidos pela farmacêutica Bristol-Meyers para o tratamento de câncer e doenças inflamatórias são do isótipo IgG1(NELSON et al, 2010) por se ligarem a receptores que exercem propriedades anti-inflamatórias e anti-proliferativas (KARSTEN et al, 2012).

A região variável do anticorpo é a responsável pelo reconhecimento do antígeno e é constituída por 3 domínios hipervariáveis, chamados de Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR) intercaladas a 4 regiões menos variáveis, denominadas de *Framework* (Figura 2). A combinação das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas determinam a especificidade dos anticorpos e da interação com o antígeno. O sítio de ligação ao antígeno é formado pela justaposição dos 3 CDR's da cadeia pesada e os 3 CDR's da cadeia leve. A terceira região determinante (CDR3) é a mais importante na especificidade pelo antígeno por determinar a região de maior variabilidade em um anticorpo (Figura 3) (SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

Figura 2. Regiões variáveis e constantes de imunoglobulinas. Representação de uma subunidade de imunoglobulina contendo uma cadeia leve e uma pesada, unidas por pontes dissulfeto (indicado por -S-), constituindo os domínios variáveis (branco) e constantes (azul claro, cadeia pesada e azul escuro, cadeia leve). Na figura estão indicadas ainda as regiões de "framework" (FR1-4) que intercalam as regiões de reconhecimento ao antígeno (CDR1-3). As letras N e C indicam o grupo amino e carboxila terminais.

Figura 3. Sítio de ligação ao antígeno. Representação no espaço do domínio variável de uma imunoglobulina, formado pela justaposição dos 3 CDR's da cadeia pesada e dos 3 CDR's da cadeia leve. A região formada por CDR 3 da cadeia pesada (CDR-H3) e CDR 3 da cadeia leve (CDR-L3) perfazem a região mais importante na especificidade pelo antígeno destacadas em **vermelho** e **roxo**. As regiões Framework estão representadas em tons de verde: FR-L para a cadeia leve e FR-H para a pesada.

1.3. REARRANJO GÊNICO

Apesar de uma imunoglobulina individual ligar a uma série limitada e definida de ligantes, imunoglobulinas como uma população podem ligar-se a uma quase ilimitada matriz de antígenos compartilhando pouca ou nenhuma similaridade. Esta propriedade é dependente de um mecanismo complexo de rearranjos que alteram o DNA da região variável das imunoglobulinas dos linfócitos B (TONEGAWA, 1983) (Figura 4). Isto ocorre em etapas, onde o DNA germinativo sofre uma série de rearranjos combinando diferentes segmentos denominados de V, D, J e C. Na figura 4 estão ilustrados os loci de cadeias leve e pesadas das imunoglobulinas humanas.

O segmento V contém as regiões FR1, FR2 e FR3 (Framework), além das regiões CDR1, CDR2 e a porção amino-terminal da região CDR3. O elemento gênico D corresponde ao centro da região CDR3 e segmento J contém a porção carboxi-terminal da região CDR3 além da região FR4 completa (DUDLEY et al, 2005).

A formação de um domínio variável completo é feita por recombinação gênica e regida por sequências de sinalização para recombinação denominadas de RSS (do inglês, *recombination signal sequence*) que flanqueiam os segmentos gênicos V, D e J. Cada região RSS contém uma sequência de 7 bases conservadas (CACAGTG – 7-RSS) separada de outra de 9 bases (ACAAAACCC – 9-RSS) por um espaçador de 12 ou 23 bases (12-RSS ou 23-RSS). Esses espaçadores vão determinar a recombinação entre os grupos de segmentos gênicos (V recombina com D e D recombina com J) uma vez que 12-RSS bases reconhece somente o 23-RSS. O processo de recombinação necessita de duas enzimas RAG1 e RAG2 (*recombination-activating genes*), expressas somente em linfócitos. O evento tem

início com o reconhecimento da sequência 12-RSS do segmento D pelo dímero RAG1-RAG2; um segundo dímero RAG1-RAG2 se liga à sequência 23-RSS do segmento J (Figura 5). Após a formação do chamado complexo sináptico promovido pela interação dos 2 dímeros de RAG1-RAG2, o DNA se dobra e é clivado na região 7-RSS e 9-RSS, resultando na junção do segmento D e J, com a liberação do sinal de junção circularizado, que é descartado. As estruturas *hairpin* são ainda clivadas pela nuclease Artemis e DNA-PKc's. Essa clivagem gera em cada região 3' da dupla fita extremidades *overhang* nas quais são corrigidas com DNA polimerase μ ou com a enzima TdT (*deoxinucleotidiltransferase terminal*) que adiciona outros nucleotídeos aleatórios como forma de reparo (Figura 5). Essa correção, no entanto, não é exata e acaba alterando os frames de leitura das cadeias de imunoglobulina, contribuindo para o aumento da diversidade. A recombinação das cadeias aliada a ação da enzima TdT são as responsáveis pela diversidade dos anticorpos, além da combinação entre as cadeias leve e pesada. Calcula-se que, ao todo, o repertório pré-imune teórico pode alcançar uma diversidade na ordem de 10^{16} imunoglobulinas diferentes (DUDLEY et al, 2005; SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

As fitas processadas são, então unidas pelas enzimas ligase 4 e XRCC4. As sequências que foram excluídas do gene recombinado (sinais de junção) são descartadas pela célula.

Figura 4. Organização dos clusters gênicos das imunoglobulinas. (A) Representação do locus de cadeia pesada de imunoglobulina com seus segmentos gênicos funcionais: V_H (variável), D_H (diversidade), J_H (junção) e C_H (constante). Já a cadeia leve de imunoglobulina possui dois clusters gênicos. (B) Cluster gênico da cadeia leve κ , V_κ (variável), J_κ (junção) e C_κ (constante). Note que o locus gênico de cadeia leve κ não possui genes D e possui apenas um cluster C, além de apresentar o elemento de deleção (κde) necessário para células que expressam cadeias λ . (C) Já o locus λ apresenta um gene $J\lambda$ para cada gene $C\lambda$ além dos genes $V\lambda$ (SCHROEDER e CAVACINI, 2010).

Figura 5. Recombinação V(D)J. Representação do processo de recombinação dos genes de imunoglobulina. Os dois segmentos a serem unidos estão indicados por A e B. O segmento azul é flanqueado por 12-RSS e o segmento B por 23-RSS. As sequências de 7 bases, os espaçadores e a sequência de 9 bases estão indicadas por 7, 12/23 e 9, respectivamente. O primeiro passo da recombinação é a ligação do complexo RAG1/2 ao RSS. A formação do complexo sináptico ocorre após a dobra do DNA e junção dos dois segmentos. RAG1/2 cliva o DNA dentro do complexo sináptico formando o complexo de sinal clivado. As estruturas *hairpin* são clivadas por enzimas Artemis (Art) e DNA-PKc's, seguida por adição de nucleotídeos pelas enzimas TdT e ligação dos segmentos pelo complexo XRCC4-ligase IV (Lig IV). O sinal de junção é circularizado pelo mesmo complexo e descartado (Adaptado de Bassing et al, 2002).

1.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS

O conceito de utilização de anticorpos para atacar seletivamente tumores foi proposto há mais de um século por Paul Ehrlich. Sua “*Teoria da cadeia lateral*” propôs que células no sangue expressam uma variedade de receptores, que denominou “*receptores de cadeia lateral*” que podem reagir com agentes infecciosos. Ehrlich sugeriu que a interação entre um agente infeccioso e um destes receptores induziria a célula a produzir e liberar mais receptores com a mesma especificidade. De acordo com a teoria de Ehrlich, a especificidade do receptor foi determinada antes da sua exposição ao antígeno (revisto por SHCWARTZ, 2004; STREBHARDT e ULRICH, 2008). Suas ideias abriram o campo da medicina moderna, onde encontrar moléculas específicas para neutralizar antígenos infecciosos ou tumorais garantam o sucesso de terapias. Em 1908, Paul Ehrlich foi laureado com o Nobel de Fisiologia ou Medicina pelos trabalhos com imunologia.

Desde a sua descoberta, os anticorpos tem sido utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas, especialmente bacterianas, como observado inicialmente por von Behring e Kitasato em seus estudos com a difteria. A partir daí, inúmeros trabalhos foram realizados com outras bactérias (revisto por CASADEVALL e SCHARFF, 1994). Estes anticorpos usados em soroterapia eram, inicialmente, anticorpos policlonais.

Apesar da sua eficiência na marcação e eliminação de alvos específicos, os anticorpos não eram economicamente atrativos para a indústria farmacêutica, principalmente devido ao elevado custo de produção, a sua dificuldade em ser produzido em larga escala, aos efeitos indesejáveis ocasionados pelo constante uso e pela múltipla especificidade de diferentes isotipos existentes no soro. Além disso,

soro hiperimune apresenta uma grande variação na eficácia e efeitos indesejados causados por variações entre lotes, tais como baixa especificidade e riscos na transmissão de doenças infecciosas (SLADE, 1994).

Uma estratégia-chave para realizar a visão de Ehrlich que anticorpos são de alguma forma “balas mágicas” que identificam seus alvos sem prejudicar o organismo foi o desenvolvimento da tecnologia do hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais. De fato, em 1984, KÖHLER e MILSTEIN receberam o Nobel de Fisiologia ou Medicina por desenvolver culturas contínuas de células formadoras de anticorpos monoclonais por meio de uma fusão de linfócitos e células de tumores de mieloma (KÖHLER e MILSTEIN, 1975). Os anticorpos monoclonais (mAbs) diferem dos policlonais em vários aspectos, sendo gerados *in vitro* pela técnica de hibridoma ou de DNA recombinante. Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas homogêneas que, por definição, reconhecem um epítipo único e tem atividade específica mais elevada do que anticorpos policlonais. Em geral, anticorpos monoclonais são superiores aos policlonais em relação à homogeneidade, especificidade e segurança (CASADEVALL e SCHARFF, 1994).

1.5. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os primeiros anticorpos monoclonais aprovados para uso na clínica surgiram na década de 80. No entanto, por serem de origem murina, essa primeira geração de anticorpos monoclonais (por exemplo, OKT3, dirigido contra o complexo proteico CD3 para uso em rejeição de transplantes) tiveram suas aplicações limitadas por induzir o sistema imune dos pacientes a produzir anticorpos contra a imunoglobulina administrada. Esses anticorpos são conhecidos como HAMA (HumanAnti-Mouse

Antibody) e podem causar sérias complicações ao paciente, inclusive a morte (por exemplo, por falência renal) (HWANG e FOOTE, 2005).

Para superar essas limitações de anticorpos murinos, uma nova abordagem foi criada substituindo-se o domínio constante imunogênico Fc murino pelo domínio humano, mantendo-se o domínio variável murino responsável pelo reconhecimento do antígeno (Fv) (BOULIANNE et al, 1984; MORRISON et al, 1984). Esses anticorpos são chamados de anticorpos quiméricos e, em alguns casos, não apresentam ou têm baixa resposta HAMA; é o caso do Infliximab (Remicade®). Porém, outros continuaram imunogênicos, principalmente, devido a presença de epítopos murinos no domínio variável (Fv) (KHAZAELI, et al, 1994).

Como alternativa aos anticorpos quiméricos, foi desenvolvida a tecnologia da transferência (*grafting*) das regiões determinantes de complementariedade (CDR) entre anticorpos. Por esta metodologia, os diferentes loops de CDR (principalmente o CDR3) são transferidos do anticorpo murino para o *framework* de um anticorpo humano. Desta forma, a especificidade de ligação ao antígeno de um anticorpo murino, que é conferida pelos loops de CDR, é transferida para o anticorpo humano (JONES et al, 1986). Enquanto os anticorpos quiméricos apresentam 75% de sequências proteicas humanas em sua composição, anticorpos humanizados pela metodologia da transferência de CDRs podem apresentar até 95% de similaridade. Desse modo, anticorpos humanizados apresentam uma imunogenicidade muito baixa, têm um alto potencial para uso terapêutico e representam a segunda geração de anticorpos monoclonais que incluem medicamentos como Trastuzumab-Herceptin® (câncer de mama), Palivizumab-Synagis® (infecção viral) e Bevacizumab-Avastin® (câncer colorretal) (VASWANI e HAMILTON, 1998). Porém, nem sempre a transposição da região variável resulta em anticorpos ativos, dada as diferenças

entre os diversos *frameworks* murinos e humanos. Por isso, uma terceira geração de anticorpos monoclonais foi desenvolvida.

Essa versão de imunoglobulina recombinante possui a vantagem de não apresentar imunogenicidade por ser uma molécula completamente humana. Tais anticorpos podem ser produzidos por métodos *in vivo* ou *in vitro*. O método *in vivo* consiste em utilizar camundongos transgênicos, no qual, os genes de imunoglobulinas dos camundongos são substituídos pelos genes humanos (LONBERG; GREEN, 1994). Já, para desenvolver anticorpos humanos por métodos *in vitro*, uma técnica muito utilizada é o *Phage Display* de anticorpos (McCAFFERTY, et al, 1990) (Figura 6).

Figura 6. O processo de tornar os monoclonais menos imunogênicos marcou a evolução da engenharia de anticorpos. Anticorpos quiméricos são obtidos quando a região constante murina do anticorpo é substituída pela humana. Anticorpos humanizados podem ser obtidos inserindo-se apenas a regiões determinante de complementariedade (CDR) murina numa anticorpo humano. Já anticorpos humanos podem ser gerados pela seleção *in vitro* de bibliotecas de anticorpos clonados a partir de células de doadores e hibridomas ou por meio de camundongos transgênicos (BREKKE e SANDLIE, 2003).

1.6. PHAGE DISPLAY

A técnica do *Phage Display* consiste em expressar pequenos peptídios ou proteínas na superfície de bacteriófagos filamentosos em fusão com proteínas do capsídeo do vírus, para formar grandes coleções ou bibliotecas de peptídios (SMITH, 1985). Essas bibliotecas podem, então, ser utilizadas para varrer a superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares. Em 1990, McCafferty e colaboradores mostraram pela primeira vez, que anticorpos funcionais podiam ser expressos e apresentados no capsídeo de fagos filamentosos, dando início ao campo do *Phage Display* de anticorpos (McCafferty, et al, 1990). Desde então, essa metodologia tem facilitado o desenvolvimento de anticorpos humanos para uso em pesquisa e com valores terapêuticos.

Bacteriófagos filamentosos (gênero *Inovirus*) pertencem a um grupo de vírus de genoma circular de DNA de fitas simples que são envolvidos por longo capsídeo cilíndrico. A classe Ff, da qual fazem parte os fagos Fd e M13, têm sido amplamente estudados. Como o nome sugere, fagos Ff utilizam a estrutura conjugativa do F-pilus como receptor para infecção e são, portanto, específicos para E.coli. Esses fagos não matam a bactéria hospedeira durante o processo replicativo. O genoma do bacteriófago é sintetizado a partir de um intermediário dupla-fita, enquanto as proteínas do capsídeo são produzidas no citoplasma e transportadas para a região periplásmica da membrana celular. Novas partículas virais são então montadas e secretadas a partir dessas regiões específicas da membrana. A bactéria tolera muito bem esse processo e continua a crescer e se dividir. Inicialmente há uma produção de cerca de 1000 partículas virais por célula durante a primeira geração e então 100-

200 partículas virais por célula nas gerações seguintes, sendo possível a obtenção de mais de 10^9 partículas virais por mililitro de cultura. A estrutura e o modo de replicação dos fagos filamentosos o tornaram uma importante ferramenta de laboratório. Podem ser utilizados como vetores de clonagem, já que há um limite para o tamanho dos fragmentos de DNA inserido em regiões não essenciais do genoma do fago, resultando em partículas virais mais longas contendo uma cópia do inserto de DNA na forma de fita simples (BARBAS et al, 2001).

Entre os exemplos de anticorpos monoclonais desenvolvidos pela metodologia do *Phage Display*, e em uso na clínica, estão o Adalimumab-Humira® (contra TNF-alfa) que foi o primeiro anticorpo humano aprovado pelo FDA e o Raxibacumab (contra) e Belimumab (contra), em revisão pelo FDA.

1.6.1 DETALHES TÉCNICOS

A fusão das proteínas de interesse ocorre geralmente com duas proteínas do capsídeo do fago: pIII ou pVIII. Esta fusão pode ocorrer em mais de um tipo de vetor e cada vetor é classificado com as seguintes características:

- A proteína do capsídeo usada para o Display
- Quantidade de cópias da proteína fusionada a pIII ou pVIII
- A fusão recombinante é codificada no genoma do fago ou em um plasmídeo separado (Phagemid) (BARBAS et al, 2001).

No caso de Display de anticorpos o tipo utilizado é o Phagemid, no qual, o genoma do fago, chamado de helper phage, é separado da fusão recombinante, codificada em outro plasmídeo (Phagemid). Isto porque a pIII recombinante fusionada ao anticorpo perde a capacidade de ligar-se ao F-pili, resultando, portanto,

em fagos não viáveis. Por isso, o helper phage é necessário para codificar todas as proteínas do capsídeo e o resultado final é a produção de fagos híbridos, que expressam tanto a proteína pIII selvagem como a fusão recombinante (Figura 7). Estes fagos híbridos são, então, capazes de infectar bactérias e, ao mesmo tempo, apresentar o anticorpo. Interessante ainda observar, que na metodologia do phagemid, o helper phage apresenta uma sequência de empacotamento mutada, o que resulta na produção de particular virais carregando preferencialmente o DNA plasmidial (phagemid) contendo o pIII recombinante fusionada ao anticorpo (Figura 7).

Anticorpos produzidos por *Phage Display* podem apresentar duas estruturas possíveis: anticorpos Fab e anticorpos *single-chain* (ScFv). Anticorpos Fab são formados por duas cadeias, leve e pesada, cada cadeia composta por uma região variável (VL ou VH) e uma região constante (CL ou CH1). Já anticorpos *single-chain* são formados pela junção das regiões variáveis das cadeias leve e pesada numa única cadeia, sem regiões constantes (Figura 8). As diferenças estruturais de cada molécula influenciam diretamente as propriedades bioquímicas dos anticorpos e trazem vantagens e desvantagens ao produzir bibliotecas em formato Fab ou *single-chain*. Uma vantagem em produzir bibliotecas *single-chain* é a simplificação pela amplificação do PCR de *overlap* que reduz o número de etapas necessárias a construção da biblioteca. Outra vantagem é a habilidade do ScFv em multimerizar, o que pode aumentar a avidéz pelo antígeno e facilitar a seleção (BRADBURY e MARKS, 2004). Porém, fragmentos ScFv nem sempre mantêm suas propriedades de reconhecimento do antígeno quando transportadas para um anticorpo funcional. Nestes casos, bibliotecas de Fab seriam mais recomendadas.

Figura 7. Phage Display com o sistema Phagemid. E.coli são transformadas com o phagemid contendo a fusão ScFv-pIII. Para a produção de particular virais, as células são co-transfectadas com um fago auxiliar (helper phage) contendo todos genes necessários para a produção viral, mas deficiente na sua sequência de empacotamento. Desta forma, particular virais contendo pIII selvagem e pIII recombinantes, carregando o DNA simples fita do phagemid são produzidas.

Figura 8. Estrutura de um anticorpo e suas variantes produzidas por Phage Display. (A) Representação de um anticorpo com suas duas cadeias leves e duas pesadas formando os domínios variáveis que ligam ao antígeno e domínios constantes responsáveis pela resposta efetora. (B) Fragmento Fab são divididos em duas regiões: uma porção Fv composta pelos domínios variáveis das cadeias leve e pesada e um fragmento constante composto pelas regiões C_{H1} e C_L . (C) Anticorpos single-chainScFv contendo apenas asporções Fv unidas por um linker formado por serina e glicina (Adaptado de BARBAS et al, 2001).

1.6.2. MÉTODOS DE SELEÇÃO DE LIGANTES

A seleção dos ligantes pode ser feita com proteínas recombinantes ou purificadas, células ou *in vivo*. Na metodologia *in vitro*, o antígeno é imobilizado e incubado com a biblioteca de fagos expressando anticorpos em sua superfície. Após remoção dos fagos não-ligantes por lavagens, os fagos com afinidade pelo antígeno são resgatados por infecção em células de *E.coli* e amplificados, iniciando um novo ciclo de seleção. Um enriquecimento de até 100 vezes é esperado depois de 3 ou 4 ciclos (Figura 9) (BARBAS et al, 2001).

A técnica “BRASIL” (Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands) desenvolvida por GIORDANO e colaboradores em 2001 consiste na seleção de fagos ligantes a células por meio de uma única centrifugação, no qual complexos fago-células passam de uma fase aquosa para uma fase orgânica não-miscível (Figura 10). A fase orgânica permite a passagem dos fagos ligados à superfície da célula, porém, exclui os fagos não ligantes, que permanecem na fase aquosa superior. Esta abordagem, que foi utilizada com sucesso para isolar peptídios ligantes de receptores de VEGF, possui ainda a vantagem de eliminar lavagens excessivas e da inclusão de uma etapa de pré-seleção (GIORDANO et al, 2001). Já o método de seleção *in vivo* consiste em selecionar moléculas ligantes com a capacidade de se dirigir para diferentes leitos vasculares após a administração de uma biblioteca de fagos com moléculas aleatórias em um organismo. Neste procedimento, fagos com a capacidade de se dirigirem a órgãos ou tumores após injeção intravenosa são selecionados a partir destas bibliotecas (PASQUALINI e RUOSLAHTI, 1996).

Figura 9. Estratégia de seleção com antígeno adsorvido em placa de microtitulação. Fagos expressando anticorpos em sua superfície são incubados com antígenos imobilizados. O enriquecimento de fagos ligantes se dá pela infecção com E.coli dos fagos que não foram removidos por lavagem e posterior amplificação. Os fagos com maior afinidade pelo antígeno são re-incubados em um novo ciclo de seleção.

Figura 10. Método “BRASIL”. Esta técnica consiste em duas etapas: uma pré-seleção onde são eliminados os anticorpos não-específicos para um determinado antígeno e uma seleção onde os anticorpos incubados com células estimuladas são centrifugados passando de uma fase hidrofílica para uma hidrofóbica (GIORDANO et al, 2001).

1.7. ANGIOGÊNESE

Durante a fase embrionária dos organismos vertebrados, o sistema circulatório é um dos primeiros órgãos formados e seus vasos sanguíneos são criados por dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese. A diferenciação de células com origem no mesoderma, os angioblastos, dá origem aos primeiros vasos sanguíneos no embrião, em um processo chamado vasculogênese (RISAU e FLAMME, 1995). O sistema vascular inicial, então, evolui a partir de um plexo capilar primário sofrendo reorganização dos angioblastos e formação de novas células endoteliais, em um processo chamado angiogênese (FERRARA, 2002).

A observação de que o crescimento de tumores pode ser acompanhado por aumento da vascularidade tem sido reportada por muito tempo por muitos patologistas, incluindo Rudolph Virchow (VIRCHOW, 1867, revisto por FERRARA,

2002; STAPLETON, 2009). Desde então, foi proposto a existência de fatores estimulantes de crescimento de vasos derivados de tumores e que esses novos vasos são necessários para o crescimento tumoral (IDE et al, 1939; ALGIRE et al, 1945). Em 1971, Dr. Judah Folkman propôs que a inibição da angiogênese poderia ser uma estratégia válida e importante para o tratamento do câncer humano, dando início à procura de reguladores angiogênicos como potenciais alvos terapêuticos (FOLKMAN, 1971).

O fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) é o principal fator molecular na angiogênese, tanto na fisiológica como na patológica. Esse fator pertence a uma família multigênica constituída de 5 membros, VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e PlGF (placental growth factor). Cada membro da família do VEGF contém ainda isoformas, geradas por *splicing* alternativo de seus mRNAs e processamento proteolítico, por exemplo, VEGF humano é produzido como proteínas de 121, 145, 165, 189 ou 205 aminoácidos, sendo que a diferença entre elas encontra-se principalmente no domínio de ligação com a heparina presente na porção carboxila terminal (Figura 11). (No caso de camundongos, todas as isoformas apresentam 1 aminoácido a menos, tendo portanto, 120, 164 e 188 aminoácidos). Esse domínio determina a avidéz por heparina e também a interação com os co-receptores neuropilina 1 e 2 (NRP) (HARPER e BATES, 2008).

A expressão de VEGF é altamente regulada; de fato, a perda de um único alelo do gene de VEGF-A resulta em morte embrionária devido à ausência de vasos sanguíneos (CARMELIET et al, 1996). Os diferentes membros da família e suas correspondentes isoformas, apresentam propriedades distintas com relação à ligação a seus receptores e interação com a matriz extracelular (heparan sulfatos),

porém, o VEGF₁₆₅ é a principal isoforma produzida pelo endotélio em condições quiescentes (FERRARA, 2009). Modelos animais sugerem ainda que as diferentes isoformas de VEGF-A contribuem de maneira distinta para a vascularização do tumor e que a expressão de VEGF₁₈₈ produz vasos mais robustos (TOZER et al, 2008). Até o presente momento, dentro de nosso conhecimento, ainda não foram descritos na literatura, anticorpos monoclonais seletivos para as diferentes isoforma de VEGF.

Existem 3 receptores tirosina quinase para o VEGF e os diferentes membros da família: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, e cada membro liga-se a um ou mais receptores. VEGFR-1 liga VEGF-A, VEGF-B e PlGF. VEGFR-2 é ativado principalmente por VEGF-A e VEGFR-3 é ativado somente por VEGF-C e VEGF-D e está relacionado a angiogênese linfática (KOWANETZ e FERRARA, 2006).

A molécula de VEGF promove a homodimerização e ativação dos receptores, seguida pela autofosforilação dos resíduos de tirosina, localizados no domínio justamembrana, que por sua vez, dispara uma cascata de sinalização intracelular resultando na proliferação e diferenciação de células endoteliais (Figura 12).

Apesar dos receptores possuírem uma grande homologia dos domínios quinase, as propriedades de sinalização são muito diferentes entre os receptores. A atividade do VEGF é mediada principalmente pela ligação ao receptor VEGFR-2 e contra-balanceada pelo seu outro receptor, o VEGFR-1, que apesar de ser o receptor com mais alta afinidade por VEGF, apresenta baixa atividade de tirosina quinase; porém, camundongos que não produzem o VEGFR-1 morrem durante os primeiros dias da fase embrionária por má formação vascular devida à proliferação exacerbada das células endoteliais (FONG et al, 1995). Isso sugere que o VEGFR-1

é essencial para a formação de novos vasos sanguíneos, possivelmente, sequestrando VEGF e diminuindo sua disponibilidade para ativar o VEGFR-2.

Em adultos, a angiogênese mediada por VEGF ocorre raramente (exceto na cicatrização ou durante o ciclo reprodutivo feminino). Por esse motivo não é esperado um efeito severo em processos fisiológicos ao se utilizar VEGF como alvo terapêutico (KOWANETZ e FERRARA, 2006).

Figura 11. Estrutura do gene de VEGF. (A) Estrutura do gene humano do VEGF-A. Este gene possui 16.272pb distribuídos em 8 exons. O splicing alternativo dos exons 6, 7 e 8 gera múltiplas isoformas. Regiões de início da transcrição (TSS) e início da tradução (ATG) no exon 1 estão indicadas. Stop codons alternativos (TGA1-2) estão representados no exon 8. (B) Estrutura proteica do VEGF-A. A sequência sinal na porção N-terminal sofre processamento pós-traducional. Os sítios de dimerização e de ligação aos receptores estão presentes em todas as isoformas. O domínio de ligação a heparina está representada na porção C-terminal, correspondente aos exons 6 e 7 do gene. Fonte: Adaptado de HARPER e BATES, 2008.

Figura 12. VEGF e seus receptores. (A) Diferentes isoformas de VEGF e dos membros de sua família são produzidos através de splicing alternativo. (B) Os VEGF e seus membros são constituídos de homodímeros que promovem a dimerização de seus respectivos receptores. A ativação do dímero é seguida pela autofosforilação dos resíduos de tirosina disparando uma cascata de sinalização intracelular resultando em vários processos como, proliferação, migração e sobrevivência celular. Fonte: Adaptado de GIORDANO et al, 2010.

1.7.1. TERAPIA ANTI-VEGF

O primeiro anticorpo monoclonal anti-VEGF desenvolvido e aprovado pelo FDA foi o Bevacizumab (Avastin) (PRESTA et al., 1997). Em 2004, Bevacizumab foi aprovado para o tratamento de metástase de câncer colo-retal em combinação com quimioterapia (HURWITZ et al., 2004). Bevacizumab foi aprovado também para tratamento de câncer de pulmão. Este anticorpo bloqueia a ligação do fator VEGF nos receptores VEGFRs e aumenta a sensibilidade dos tumores para a quimioterapia (ADAMS e WEINER, 2005; RANKIN e GIACCIA, 2008). Outro anticorpo importante e também aprovado pelo FDA é o Ranibizumab (Lucentis). Trata-se do fragmento Fab de 48kDa do Bevacizumab e, portanto, também um anti-VEGF aprovado para o tratamento da degeneração macular. A diferença de peso

molecular entre as duas moléculas pode afetar o tempo de distribuição e ação do fármaco, ou de sua permanência no globo ocular (FOLKMAN, 2007).

Porém, terapias anti-VEGF apresentam efeitos não desejado ou antecipados, tais como hipertensão e proteinúria (HURWITZ et al., 2004). Bevacizumab causa ainda a destruição de veias imaturas dependentes de VEGF (BENJAMIN et al., 1999). Outros efeitos foram relatados também, como trombose e hemorragia (CARDONES e BAÑEZ, 2006). Isso se deve ao fato do VEGF (em particular, a isoforma VEGF165) ser, também, um fator de sobrevivência endotelial (FERRARA, 2009). Além desses efeitos, estudos realizados em camundongos transgênicos mostram que a deleção de VEGF em células mielóides embora apresente uma redução da vascularização, promove uma aceleração da progressão de tumores de mama (STOCKMANN et al, 2008).

Além dos efeitos citados, terapias anti-angiogênicas enfrentam um desafio mais grave. Modelos pré-clínicos recentes indicam que agentes anti-angiogênicos podem aumentar a invasão e metástase tumoral. Tratamento com inibidores de VEGF em modelos de glioblastoma e carcinoma pancreático aumenta a invasão em tumores primários e metástase no fígado e linfonodos (PÀEZ-RIBES et al, 2009). O tratamento com Sunitinib® (Pfizer) em modelos de câncer de mama provocou um aumento metastático significativo após a remoção do tumor (SHOJAEI et al, 2012). Hipóxia e respostas inflamatórias parecem estar entre as maiores razões para a aceleração de metástase durante o tratamento com inibidores angiogênicos. O papel da hipóxia na progressão tumoral e metástase está bem estabelecido e terapias anti-angiogênicas podem induzir a formação de um microambiente hipóxico provocando a seleção de células tumorais capazes de sobreviver e crescer em um ambiente com pouca oferta de oxigênio (RAPISARDA e MELILLO, 2009).

Porém a inibição de VEGF-A e seu principal receptor sinalizador na célula, o VEGFR-2, não é o único meio de interromper a angiogênese. Anticorpos monoclonais dirigidos contra outros membros da família representam uma estratégia adicional para inibir a sinalização de VEGF. Estudos recentes com anticorpos e peptidiomiméticos dirigidos contra o anti-VEGFR-1 mostraram a habilidade de ambos em diminuir o crescimento de metástase em modelos de camundongos (WU et al, 2006; GIORDANO et al, 2010). Também, ainda em estudos experimentais com animais, anticorpos anti-VEGFR-3 e PlGF se mostraram muito efetivos para inibir a angiogênese (FISCHER et al., 2007; TAMMELA et al., 2008). É interessante observar que animais knock-out para o gene de PlGF ou de Δ VEGFR-1, que produzem apenas a forma solúvel de VEGFR-1 e que não contém o domínio tirosina quinase, são viáveis, e apresentam formação de vasos sanguíneos fisiológicos normais (KOWANETZ e FERRARA, 2006). Porém, quando desafiados com tumores ou situações onde há a formação de vasos sanguíneos patológicos, estes animais produzem muito menos vasos. Isto sugere que a angiogênese fisiológica e patológica podem utilizar diferentes mecanismos moleculares e que anticorpos contra PlGF e VEGFR-1, por exemplo, poderão ter um papel importante na clínica.

Portanto, a identificação de fatores moleculares importantes na formação de novos vasos sanguíneos, mas não essenciais para a sobrevivência do endotélio, é uma etapa importante para o sucesso das terapias anti-angiogênicas (CARDONES e BAÑEZ, 2006; FISCHER et al., 2007; GIORDANO et al., 2010; MURRUKESH et al, 2010). Nossa expectativa é que anticorpos seletivos para as diferentes isoformas de VEGF possam ser uma alternativa importante para terapias angiogênicas. Por exemplo, em modelos tumorais, a superexpressão de VEGF₁₈₈ contribui para o crescimento tumoral (TOZER et al, 2008). Nossa hipótese é que anticorpos

específicos para as isoformas de VEGF possam ser importantes agentes terapêuticos. Se obtivermos sucesso, anticorpos anti-VEGF₁₈₈ poderão ser inibidores da formação de vasos em condições patológicas, sem os efeitos colaterais associados à inibição do VEGF_{165/164}.

2. OBJETIVOS

Terapias anti-angiogênese são promissoras, porém, ainda são limitadas por apresentarem efeitos colaterais indesejados, uma vez que a grande maioria dos compostos em uso na clínica afeta, também, vias ligadas ao VEGF-A (em particular, a isoforma 165) importantes para a sobrevivência das células endoteliais. O objetivo deste projeto é identificar e desenvolver novos agentes terapêuticos para doenças dependentes de angiogênese. Usaremos o sistema de *Phage Display* a fim de selecionar anticorpos dirigidos contra outras isoformas do VEGF-A, em particular, a isoforma de 188 aminoácidos. Para isso, vamos:

a) Construir uma biblioteca imune de display de anticorpos murinos. Em primeiro lugar, iremos padronizar a técnica construindo uma biblioteca *single-chain* de anticorpos murinos utilizando mRNA e seu cDNA obtido do baço de um animal imunizado com VEGF₁₈₈ ou células endoteliais humanas. A biblioteca gerada servirá ainda para padronização da metodologia para, no futuro, construirmos uma biblioteca de anticorpos humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CLONAGEM DE VEGF

A clonagem e expressão de VEGF₁₈₈ foi realizada pela aluna de doutorado do laboratório Leila da Silva Magalhães. RNA total do pulmão de camundongo C57BL/6, extraído com a utilização de TRIzol e procedimentos de acordo instruções do fabricante (Invitrogen), foi utilizado em uma reação de PCR para a amplificação e produção do cDNA de VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈ com a utilização dos *primers* Senso 5-ACAGAATTCATATGGCACCAACGACAGAAGG-3 e Reverso 5-ACACTCGAGTCACCGCCTTGGCTTGTCACAT-3 (sítios de reconhecimento para enzimas de restrição em destaque). Os produtos foram ligados ao vetor pBSII KS (ambos previamente digeridos com EcoRI e XhoI) e o vetor recombinante utilizado para transformar cepas XL1 da bactéria *Escherichia coli*. Após amplificação de tal vetor por MiniPrep (QIAGEN), o mesmo foi submetido à digestão com as enzimas de restrição NdeI e XhoI e o inserto liberado, subclonado em pET21a.

3.1.2. EXPRESSÃO DE VEGF EM E.coli

Para expressar VEGF₁₈₈ em *E. coli*, vetor recombinante pET-VEGF₁₈₈ foi utilizado para transformar cepas BL21(Rosetta DE3, Rosetta DE3 pLysS) pelo método de Cloreto de Cálcio (HANAHAN, 1983). Várias colônias das transformações foram inoculadas em 10 mL de meio LB (carbenicilina 50 µg/mL) e incubadas a 37°C, 300RPM. Após 2 horas, a cultura saturada foi adicionada a novo meio LB (1:100) e mantida nas condições especificadas até a densidade ótica (600nm) de 0,7. A indução foi realizada na presença de IPTG 0,8mM, a 220 rpm, durante 6

horas, a 28°C. Após indução, proteínas presentes nos corpos de inclusão foram purificadas e solubilizadas respectivamente em Tris 50mM, Triton X-100 1%, Deoxicolato de Sódio 1%, NaCl 100mM, pH8,0, em Uréia 8M, β -Mercaptoetanol 20mM e em PBS, sendo analisadas por SDS-PAGE e por *Western Blot*.

3.2. IMUNIZAÇÕES DOS CAMUNDONGOS COM VEGF

O protocolo de manipulação animal foi aprovado pelo Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Camundongos Balb/c (N=5) foram imunizados com VEGF₁₈₈ (50 μ g) junto com adjuvante Freund completo ou incompleto (SIGMA). Ao total quatro imunizações foram realizadas com 15 dias de intervalo. Os soros foram obtidos por punção cardíaca após a administração de Avertina (1,5g/ml).

3.2.1 ENSAIO DE ELISA

VEGF (1ng/ μ l) foi adsorvido *overnight* em placa multiwell. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com BSA 1% em PBS (Tampão Fosfato-Salino) por 2 horas a 37°C. Após lavagem com PBS com Tween 0,05% (PBST) o soro imunizado com VEGF de 5 animais (anticorpo primário) foi adicionado à placa em diluições crescentes por 1 hora a 37°C. Seguido por nova lavagem com PBST foi adicionada imunoglobulina anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (Sigma) e a revelação realizada com TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina- BD Biosciences) como substrato. A reatividade dos anticorpos foi então quantificada por leitura da absorbância em 655nm.

3.2.2 WESTERN-BLOT

O VEGF recombinante foi analisado por meio de eletroforese SDS-PAGE e transferido para membrana de nitrocelulose na presença de solução com metanol 20% por 2 horas a 100V. A membrana foi bloqueada por 2 horas a temperatura ambiente com ODYSSEY Blocking buffer®, seguido por lavagem com PBST 0,1% (Tampão Fosfato-Salino com Tween-20). Soro de camundongos imunizados ou não-imunizados foram incubados individualmente na membrana por 1 hora a temperatura ambiente seguido de incubação com imunoglobulina anti-IgG de camundongo conjugada com IRDye800 (LiCor) na diluição de 1:10.000. Após lavagem com PBST, a leitura da membrana foi realizada no aparelho Odyssey Infrared Imaging System, no qual se utiliza detecção de sinal na faixa do infravermelho próximo.

3.3. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE BAÇO IMUNIZADO E PREPARO DO CDNA

O baço dos camundongos imunizados com VEGF foram homogeneizados com Trizol® (1ml para cada 50mg de tecido), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente seguido de adição de 200 µl de clorofórmio. Após 3 minutos de incubação, o RNA foi precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol e centrifugação a 11.000g. O excesso de sais foi removido do precipitado de RNA por lavagem com etanol 75% seguido de centrifugação a 7.000g. A conversão do RNA a cDNA foi feita utilizando a enzima Superscript III® Kit (INVITROGEN), no qual 20 µg de RNA total foi transcrito com oligo (dT) e 1.600 unidades de Transcriptase reversa por 1 hora a 42°C.

3.3.1 AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA (ROUND 1)

Os genes de imunoglobulina G foram amplificados utilizando primers senso (MSCVK-1 ao 17) e reverso (MSCJK12-BI, MSCJK4-BI, MSCJK5-BI) da cadeia leve e senso (MSCVH-1 ao 19) e reverso (MSCG1ab-B, MSCG3-B, MSCM-B) da cadeia pesada como descritos por BARBAS et al, 2001 (Tabela 1). A reação foi realizada com 1µl de cDNA; 60pmol de primer senso e reverso; PCR buffer (200mM Tris-HCl, 500mM KCl); 2mM MgCl₂; 2,5mM dNTP; 5 unidades de Taq Polimerase (FERMENTAS) ou Taq platinum *high fidelity* (INVITROGEN). Ao todo foram 30 ciclos de: 15s a 94°C; 30s a 56°C e 90s a 72°C. O produto do PCR foi isolado do gel de agarose e purificado com Gel Extraction Kit da QIAGEN.

3.3.2 OBTENÇÃO DE AMPLICONS DE ScFv (ROUND 2)

Os amplicons de ScFv foram produzidos por PCR de Overlap utilizando-se os primers senso (RSCF) e reverso (RSCB) que contém sítios de restrição para a enzima SfiI, como descritos em BARBAS et al, 2001. Para o PCR de overlap foram realizados 20 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 50°C, 2min a 72°C. Os produtos obtidos foram purificados utilizando o Gel Extractioc Kit QIAGEN®.

3.3.3 OBTENÇÃO DE AMPLICONS DE ScFv PELO MÉTODO ISA-PCR

O método ISA-PCR (SOTELO et al, 2012) é composto por duas reações independentes: amplificação de fita simples de DNA e a montagem do gene ScFv. Para a amplificação de fitas simples 50ng do produto de PCR das cadeias leves ou pesadas foram incubadas com 0,4 μ M do *primer* correspondente (MSCJK12, MSCJK4, MSCJK5 para a cadeia leve e MSCVH1-19 para a cadeia pesada) e 1U de Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN) em uma reação de 25 μ l. A reação foi realizada com o seguinte ciclo: 30 ciclos a 95°C por 45 segundos, 54°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e uma extensão final de 1 minuto a 72°C. Os produtos desta reação foram misturados e foram adicionados 10 μ M de dNTP e 5U de Platinum Taq polimerase. A reação foi concluída nas condições: 30 ciclos a 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final por 10 minutos a 72°C.

Tabela 1| Os primers MSCVK-1 ao 17, MSCJK12-BL, MSCJK4-BL e MSCJK5-BL foram utilizados para amplificar os genes da cadeia leve. Os primers MSCVH-1 ao 19, MSCG1ab-B, MSCG3-B, MSCM-B foram empregados na amplificação dos genes da cadeia pesada. Já os primers RSC-F e RSC-B amplificaram os genes de cadeia única ScFv. Fonte: BARBAS et al, 2001.

MSCVK-1	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATCCAGCTGACTCAGCC
MSCVK-2	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTTCTCWCCAGTC
MSCVK-3	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGMTACTCAGTC
MSCVK-4	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGYTRACACAGTC
MSCVK-5	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTRATGACMCAGTC
MSCVK-6	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTMAGATRAMCCAGTC
MSCVK-7	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTCAGATGAYDCAGTC
MSCVK-8	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATYCAGATGACACAGAC
MSCVK-9	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTTCTCAWCCAGTC
MSCVK-10	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGWGCTSACCCAATC
MSCVK-11	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTSTRATGACCCARTC
MSCVK-12	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYRTTKTGATGACCCARAC
MSCVK-13	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACBCAGKC
MSCVK-14	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATAACYCAGGA
MSCVK-15	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACCCAGWT
MSCVK-16	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAACC
MSCVK-17	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGAYATTTTGCTGACTCAGTC
Cadeia Pesada Senso	Sequencia
MSCVH-1	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTRMAGCTTCAGGAGTC
MSCVH-2	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTBCAGCTBCAGCAGTC
MSCVH-3	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAGCTGAAGSASTC
MSCVH-4	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCARCTGCAACARTC
MSCVH-5	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTTCAGCTBCAGCARTC
MSCVH-6	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTTCARCTGCAGCAGTC
MSCVH-7	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCACGTGAAGCAGTC
MSCVH-8	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAASSTGGTGGAATC
MSCVH-9	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAWGYTGGTGAGTC
MSCVH-10	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAGSKGGTGAGTC
MSCVH-11	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAMCTGGTGAGTC
MSCVH-12	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGCTGATGGARTC
MSCVH-13	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCARCTTGTTGAGTC
MSCVH-14	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGCTTCTCGAGTC
MSCVH-15	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAARSTTGAGGAGTC
MSCVH-16	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTACTCTRAAAGWGTTSTG
MSCVH-17	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTCCAACCTVCAGCARCC
MSCVH-18	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAACCTGGAAGTGTC
MSCVH-19	GGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGGTCATCGAGTC
Cadeia Leve Reverso	Sequencia
MSCJK12-BL	GGAAGATCTAGAGGAACCAACCCCAACCGCCGAGCCACCGCCACCA GAGGATTTKATTTCCAGYTTGGTC
MSCJK4-BL	GGAAGATCTAGAGGAACCAACCCCAACCGCCGAGCCACCGCCACCA GAGGATTTTATTTCCAACTTTGTCC
MSCJK5-BL	GGAAGATCTAGAGGAACCAACCCCAACCGCCGAGCCACCGCCACCA GAGGATTTGAGCTCCAGCTTGGTC
Cadeia Pesada Reverso	Sequencia
MSCG1ab-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACAGATGGGGSTGTYGTTTTGGC
MSCG3-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACAGATGGGGCTGTTGTTGT
MSCM-B	CCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTGACATTTGGGAAGGACTGACTCTC
Extensão Overlap	Sequencia
RSC-F	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC
RSC-B	GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTG

3.4. PREPARAÇÃO DO VETOR

O vetor utilizado para as clonagens foi pCOMB3XSS fornecido por Carlos Barbas III do *Scripps Research Institute*, La Jolla, CA. Este vetor possui um cassete flanqueado por sítios de enzima Sfil para a clonagem de anticorpos *single-chain*. O vetor foi preparado com o Kit Maxiprep QIAGEN®. 100µg de vetor foi digerido com enzima de restrição Sfil (6 unidades/µg por 24 horas a 50°C) e purificado com Gel Purification kit QIAGEN®.

3.4.1 PURIFICAÇÃO DO VETOR EM GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO

A uma solução de vetor preparada junto com TE foi adicionado Cloreto de cézio e 10mg/ml de Brometo de etídio. Os complexos formados de Brometo e proteínas bacterianas foram removidos por centrifugação (8000 rpm). A purificação do vetor em gradiente de CsCl foi então realizada em ultracentrífuga Beckman, rotor VTi80 a 60.000 rpm por 20 horas a 25°C. O DNA (supercoiled) foi visualizado com luz UV e coletado com o auxílio de uma seringa. O Brometo de etídio foi removido por extração com butanol e os sais por diálise contra TE.

3.5. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES

Uma colônia isolada de *E. coli* XL1-Blue foi inoculada em 50mL de meio SOB e a cultura foi incubada por 16 horas a 37°C. No dia seguinte a cultura foi diluída (20mL da cultura inicial em 2000mL de meio) e incubada a 37°C até atingir

OD₆₀₀=0,5. A suspensão de células foi resfriada em banho de gelo e água por 5 minutos e centrifugada a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 1000mL de água gelada estéril e novamente centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O processo de lavagem com água foi repetido, mais 3 vezes. A suspensão de células competentes foi então ressuspensa em 1ml de água estéril e utilizada imediatamente na eletroporação.

3.6. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE SCFV

A biblioteca foi construída pela ligação de vetor e inserto na proporção de 2:1 (2µg de vetor para 1µg de inserto). Foi utilizada 5U da enzima T4DNA ligase (FERMENTAS) em um volume total de 200µl. A reação foi incubada por 20 horas a 16°C e em seguida o DNA foi precipitado com etanol 100%, centrifugada a 20.000rpm por 1 hora a 4°C, lavado com etanol 70% e utilizado para transformar as bactérias por eletroporação.

3.6.1 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES XL1-BLUE

A 200µL de células competentes foram adicionados 10µg de DNA plasmidial e a suspensão foi incubada por 5 minutos no gelo. As células foram submetidas a choque elétrico de 2,5kV seguida da adição de 1 mL de meio LB. A cultura foi então incubada por 1 hora a 37°C. As células foram coletadas e plaqueadas em meio seletivo ou cultivadas em meio líquido.

3.7. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

DNA plasmidial extraído de *E. coli* empregando o *kit QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, purificação do DNA por imobilização em coluna de troca iônica) foi sequenciado utilizando o *Kit BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing* da Applied Biosystems, segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 2,5 pmol de *primer* e 100 a 200ng de vetor como molde em reação em 35 ciclos de: desnaturação a 96°C por 20 segundos, hibridização a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O DNA foi precipitado pela adição de etanol 100% gelado, 10% de Acetato de sódio e 10% de glicogênio 20mg/ml e após centrifugação a 4000rpm por 20 minutos a 4°C o material foi lavado com etanol 70% e em seguida centrifugado a 4000rpm por 20 minutos a 4°C e o etanol foi removido por incubação por 1 minuto a 95°C.

4. RESULTADOS

4.1. PRODUÇÃO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VEGF

A primeira etapa para a produção de uma biblioteca enriquecida em anticorpos contra VEGF, em particular, anticorpos dirigidos contra a isoforma de 188 aminoácidos, foi a imunização de camundongos com a proteína recombinante do VEGF₁₈₈ (Figura 13A). A proteína recombinante foi produzida em *E.coli* e purificada a partir de corpos de inclusão e gentilmente cedido para este estudo pela estudante de doutorado Leila da Silva Magalhães. A proteína utilizada apresentou pureza >95%, quando analisada por gel de SDS-PAGE.

Para confirmar que a proteína utilizada para a imunização é realmente VEGF, realizamos um ensaio de Western-blot com um anticorpo comercial que reconhece o VEGF murino. Como esperado, o anticorpo comercial reconheceu a proteína de 25 kDa (Figura 13B). Apesar do elevado grau de pureza do VEGF obtido, para minimizar as chances de produção de anticorpos contra contaminantes presentes na nossa preparação de VEGF, a proteína recombinante obtida de corpos de inclusão de bactérias *E.coli* foi analisada por SDS-PAGE e a banda correspondente ao VEGF₁₈₈ foi excisada do gel. O material obtido foi processado então utilizado para imunizar os camundongos. As imunizações de reforço foram feitas apenas utilizando-se o material isolado do gel em tampão PBS (tampão fosfato salino). A presença de anticorpos anti-VEGF produzidos pelos camundongos imunizados foram, então, confirmadas por ELISA e Western-blot. Por ELISA, observamos uma forte reatividade do soro dos camundongos contra VEGF₁₈₈ recombinante (Figura 14). O soro dos mesmos animais coletados antes do início das imunizações (soro pré-imune) não mostrou reatividade significativa com a proteína recombinante.

Para confirmar que a reatividade em ELISA é mesmo contra VEGF, e não contra contaminantes bacterianos presentes na nossa preparação, visto que o VEGF administrado foi produzido em bactéria, utilizamos a técnica de Western-blot. Neste ensaio testamos a reatividade do soro hiperimune contra proteínas presentes em um extrato de bactérias utilizadas para expressar o VEGF₁₈₈, induzido ou não com IPTG. Como esperado, apenas a proteína de 25 kDa, correspondente ao VEGF₁₈₈, foi reconhecida fortemente pelo soro dos camundongos imunizados (Figura 15A e B). Não foi observada nenhuma reatividade dos soros pré-ímmes, assim como não foi observada reatividade significativa dos soros hiperímmes contra outras proteínas presentes no extrato bacteriano. Podemos observar ainda a imunoreatividade do soro hiperimune contra VEGF₁₈₈ purificado (Figura 15C). Não foi detectado a reatividade do soro pré-ímmes contra a proteína purificada. Estes resultados indicam que nosso protocolo de imunização foi bastante eficaz e, resultou na produção de anticorpos anti-VEGF₁₈₈.

É importante observar, porém, que o VEGF é um homodímero com várias pontes de dissulfeto. Como o VEGF utilizado para imunizar os camundongos foi isolado a partir de corpos de inclusão e em condições denaturantes, achamos importante testar também se houve a produção de anticorpos anti-VEGF capazes de reconhecer a proteína em condições nativas. Como não dispomos de VEGF₁₈₈ produzido em condições nativas, testamos a reatividade dos soros dos camundongos imunizados contra VEGF₁₆₅ comercial (R&D Systems) produzido em condições nativas que se encontra em sua conformação ativa. VEGF₁₈₈ e VEGF₁₆₄ compartilham 88% de identidade, sendo a diferença restrita a 24 aminoácidos adicionais encontrados na isoforma mais longa. Assim, é esperado que boa parte dos anticorpos produzidos pelos animais imunizados como VEGF₁₈₈, também

reconheçam a sua isoforma mais curta de 164 aminoácidos. Foi o que observamos, o soro dos animais imunizados reagiu com o VEGF₁₆₄ comercial (Figura 16) confirmando a presença de anticorpos anti-VEGF que reconhecem a proteína nativa. É importante, porém, notar que o nível de reatividade pelo ELISA foi significativamente menor se comparado ao ELISA do contra VEGF₁₈₈ recombinante e denaturado (Figura14), levando-se em conta a DO_{600nm} (densidade óptica a 600nm). Isto sugere que uma parte dos anticorpos produzidos são dirigidos contra VEGF denaturado e apenas uma fração, talvez menor, dos anticorpos seja contra o VEGF nativo. Em resumo, nossos resultados mostram que os camundongos produziram uma resposta imune contra VEGF e que podemos utilizar o material dos mesmos para a produção da nossa biblioteca de anticorpos.

Figura 14. VEGF é um homodímero unido por pontes dissulfeto. (A) VEGF₁₈₈ recombinante e purificado de corpos de inclusão. Após indução, proteínas presentes nos corpos de inclusão foram purificadas, solubilizadas e analisadas por SDS-PAGE. (B) Immunoreatividade de um anticorpo comercial anti-VEGF contra o VEGF₁₈₈ recombinante.

Figura 13. Detecção de anticorpos anti-VEGF. Reatividade por ELISA do soro imune e pré-imune contra VEGF₁₈₈ recombinante e mediana da curva da reatividade dos camundongos imunizados.

Figura 15. Reatividade dos anticorpos anti-VEGF por Western-blot. (A) Coloração por coomassie do extrato bacteriano induzido e não induzido para expressar VEGF₁₈₈ recombinante. (B) Reatividade do soro hiperimune de camundongos imunizados com VEGF contra o extrato bacteriano induzido ou não com IPTG para expressão de VEGF. (C) Imunoreatividade do soro pré-imune ou imune contra VEGF₁₈₈ purificado.

Figura 16. Reatividade por ELISA do soro imune e pre-imune contra VEGF₁₆₄ comercial. VEGF de camundongo (isoforma de 164 aminoácidos) foi imobilizado em placa. A reatividade dos soros imune e pre-imune dos camundongos imunizados com VEGF₁₈₈ recombinante está indicada.

4.2. OBTENÇÃO DOS AMPLICONS DE IMUNOGLOBULINA

Confirmado o estímulo do sistema imunológico e correspondente presença de anticorpos anti-VEGF nos camundongos imunizados, o próximo passo foi o isolamento do RNA e produção de cDNA para amplificação dos genes de imunoglobulina. Para isso, RNA total foi extraído do baço dos animais por ser o órgão de maturação de linfócitos B, células produtoras de anticorpos. Foi utilizado o camundongo 5 por ter apresentado a melhor resposta imune (Figura 14).

O RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL®, por ser a metodologia indicada para a construção de bibliotecas de anticorpos (BARBAS et al, 2001). Entretanto, outros protocolos poderiam ser utilizados, desde que devidamente padronizados. A análise do RNA obtido foi feita por eletroforese em gel de agarose e mostrou, como esperada, a presença das bandas 28S e 18S correspondentes ao RNA ribossômico (rRNA) íntegras, sugerindo que o material obtido é de boa qualidade (Figura 17A). É importante obter um RNA de qualidade, sem sinais significativos de degradação, para preservar ao máximo a diversidade dos genes de imunoglobulina expressos para a construção de biblioteca representativa. Para certificarmos da integridade do RNA obtido, as amostras foram ainda analisadas no BioAnalyzer. Esta plataforma utiliza eletroforese capilar e um marcador que intercala em moléculas de ácidos nucleicos. Esses complexos são detectados por fluorescência induzida por laser e os dados obtidos são traduzidos em um gel virtual (bandas) e em eletroferogramas (picos). Com a ajuda de um marcador que contém fragmentos de tamanhos e concentrações conhecidas, o sistema é capaz de traçar uma curva padrão de tempo de migração versus tamanho de fragmento. O tamanho é calculado pela medida do tempo de migração para cada fragmento na amostra.

A integridade do RNA é, então, estimada pelo BioAnalyzer pela determinação da razão entre a intensidade dos picos de rRNA 28S e 18S, traduzindo-se um número de 1 a 10 (RNA *integrity number*, RIN) (Figura 17B). Nosso RNA isolado do baço de camundongos imunizados com VEGF, teve um RIN de 8.4, o que indica um RNA de muito boa qualidade. Os RNA por nós isolados dos baço dos camundongos imunizados com VEGF e utilizados ao longo deste estudos, apresentaram número de integridade RIN médio de 8.6 (variando entre 8.4 e 9.2), o que indica RNA de muito boa qualidade.

Figura 17. RNA total purificado do baço de animais imunizados com VEGF₁₈₈. (A) O RNA total obtido apresenta as bandas 28S e 18S correspondentes ao RNA ribossômico (rRNA) intactas. (B) Gel virtual e eletroferograma gerado no BioAnalyzer de uma das amostras de RNA total.

4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE IMUNOGLOBULINA

Após a extração do RNA e confirmação da integridade do mesmo, foi feita a reação de transcrição reversa, em que os RNA mensageiros presente no RNA total são transcritos em DNA (cDNA) utilizando-se oligo (dT), que pareia com a cauda de poli-A+ presente na região 3' do mRNA. Como controle inicial de qualidade da produção do cDNA, utilizamos o gene da β -actina. Como esperado, o amplicon de transcritos da β -actina foi obtido com sucesso a partir do cDNA produzido. Porém, esse gene não é necessariamente um bom controle da diversidade do número de transcritos presentes em nosso cDNA pelo fato de ser expresso constitutivamente e seus transcritos serem abundantes. Desta forma, a amplificação de amplicons de β -actina não garante que a transcriptase reversa tenha funcionado eficientemente transcrevendo todas as mensagens de nosso RNA. Desse modo, incluímos outro controle, o p53. Como o p53 é um transcrito raro de baixa cópia (MATLASHEWSKI et al, 1984), sua detecção indica que mesmos transcritos raros foram eficientemente convertidos em cDNA pela transcriptase reversa. De fato, fomos capazes de detectar amplicons de p53 em todas as nossas amostras de cDNA, indicando que nosso protocolo foi eficiente. Mais ainda, este resultado sugere que os cDNA produzidos são de boa qualidade, representantes da maioria das cadeias de imunoglobulinas presentes em nosso RNA original (Figura 18).

O passo seguinte para a construção da biblioteca de anticorpos anti-VEGF foi a amplificação das cadeias de imunoglobulinas presentes no nosso cDNA. Anticorpos são compostos por cadeias leves e pesadas, cujos amplicons precisam ser amplificados individualmente. A amplificação dessas cadeias é realizada utilizando conjuntos de oligonucleotídeos que reconheçam as regiões constantes da

cadeia pesada e leve (C_{H1} e C_L , respectivamente), e regiões variáveis da cadeia pesada e leve (V_H e V_L , respectivamente) presentes nas diferentes variações de cada uma das cadeias (Figura 18).

Figura 18. Amplificação das regiões variáveis dos genes de imunoglobulina cadeia leve (VL) e pesada (VH). (A) Representação dos primers utilizados para amplificar as cadeias leve e pesadas de imunoglobulina. Estão indicados na figura o sítios para a enzima de restrição Sfil (circulo preto) e o linker Gly-Ser (amarelo). (B) Gel de eletroforese em agarose mostrando os produtos de PCR obtidos para a amplificação dos genes de cadeia leve (VL) e pesada (VH) (aproximadamente 350pb). Também estão indicados os controles usados na reação: β -Actina (β -Ac) e p53.

4.3.1 PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DAS CADEIAS LEVE E PESADA

Para a construção dos amplicons *single-chain*, é necessário que o protocolo de amplificação das duas cadeias de imunoglobulina, leve e pesada, esteja bem padronizado, minimizando a amplificação de produtos indesejados. Inicialmente, ambas as cadeias leves e pesadas foram amplificadas com sucesso. Porém, em ambos os casos produtos inespecíficos de maior peso foram detectados (Figura 18). Para contornar esse problema, o protocolo da reação de PCR foi então testado em várias condições. Inicialmente, testamos gradientes de temperatura na fase de anelamento da nossa reação de PCR (Figura 19). Notamos que a temperatura de anelamento de 65°C reduziu significativamente a formação de produtos indesejados na amplificação dos produtos de cadeia leve de imunoglobulina. Entretanto, no caso dos genes de cadeia pesada, não observamos alteração no padrão obtido e a temperatura sugerida no protocolo original de 56°C foi mantida.

Em seguida, testamos se a presença de DMSO (4%), melhoraria nossas reações de amplificação. A função do DMSO é inibir estruturas secundárias do DNA, tanto molde como primers, minimizando reações interferentes. Não observamos melhora significativa em ambas as reações (cadeia leve ou pesada) na presença de DMSO e este reagente foi então abandonado.

No protocolo original de Barbas e colaboradores (protocolo 1) utiliza-se uma mistura de oligonucleotídeos específico para cada uma das variantes de cadeias leves ou pesadas de imunoglobulinas. São 17 oligonucleotídeos senso e 3 reversos para as cadeias leves, e 19 oligonucleotídeos senso e 3 reversos para as cadeias pesadas. A mistura é preparada com quantidades equimolares de primers. Partindo

dessa observação levantamos a hipótese de que alguns primers específicos estariam produzindo os produtos indesejados em nossas reações de amplificação do conjunto de imunoglobulinas, principalmente, de cadeia pesada. Para confirmar essa hipótese, realizamos as reações individuais utilizando diferentes combinações dos primers senso e anti-senso, (Figura 20).

Notamos que nem todos os oligos senso, quando utilizados com os respectivos oligos reversos, resultam em amplicons. Mais importante, porém, é que as reações utilizando primers senso individuais se mostraram mais específicas, sugerindo que utilizar o “pool” de primers como sugerido pode ser um agravante para a especificidade da reação. Desta forma, realizamos a amplificação das cadeias leve e pesadas de imunoglobulina anti-VEGF presentes em nosso cDNA utilizando a temperatura otimizada e primers senso individuais, ao invés do pool sugerido no protocolo inicial. Como este protocolo otimizado, obtivemos os produtos de amplificação de cadeia leves e pesadas com o tamanho esperado e a qualidade necessária para a produção dos amplicons de *single-chain* para a produção da biblioteca de anticorpos anti-VEGF.

Figura 19. Padronização da reação de PCR dos genes das cadeias leve e pesada. Diferentes condições para amplificação dos genes de cadeia leve VL (A e B) e pesada VH (C e D) de imunoglobulina na presença (A e C) ou ausência de DMSO (B e D).

Figura 20. Padronização da amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH). Eletroforese em gel de agarose mostrando os produtos das diferentes reações realizadas utilizando-se diferentes combinações de primers senso e reverso. Os primers senso estão indicados pelos números de 1 a 19, que correspondem as primers MSCVK1 a 17 (cadeia leve) ou MSCVH1 a 19 (cadeia pesada). Estes primers foram combinados individualmente com os primers reversos MSCJK12-BL, MSCJK4-BL ou MSCJK5-BL (cadeia leve) e MSCG1ab-B, MSCG3-B ou MSCM3-B (cadeia pesada).

4.4. CONSTRUÇÃO DOS AMPLICONS *SINGLE-CHAIN*

O formato de anticorpo que escolhemos para a produção da biblioteca foi a de *single-chain*, em que, as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas são ligadas por um linker formado por 18 aminoácidos com repetições de glicina e serina (Gly₄Ser)₃, formando uma única cadeia (Figura 8). Para juntar os amplicons de cadeia leve e pesada num único produto de PCR, contendo a região codificante para o linker de Gly-Ser, utilizamos o chamado *Splicing Overlap Extension* (SOE-PCR) (HORTON et al, 1989; BARBAS, 2001). Esta construção ocorre em duas etapas. Na primeira etapa é feita a amplificação das duas cadeias, na segunda etapa, a junção das cadeias por PCR de *overlap*.

A junção das cadeias pelo processo SOE-PCR é possível porque o primer reverso da cadeia leve possuir uma sequência complementar ao primer senso da cadeia pesada (Figura 21A). Ao amplificar as duas cadeias, a região 3' da cadeia leve será complementar à região 3' da cadeia pesada. Para completar a reação do SOE-PCR, dois primers senso e anti-senso complementares a região 5' da cadeia leve e 3' da cadeia pesada são utilizados para unir os produtos de PCR (Figura 21B).

Em seguida, vamos descrever os diferentes protocolos que testamos para obter os amplicons de *single-chain* pelo PCR de *overlap*.

Figura 21. Construção do amplicon *single-chain* (ScFv). (A) O primer reverso da cadeia leve e o primer senso da cadeia pesada possuem *linkers* com sequências complementares que possibilitam a junção das duas cadeias em uma reação de amplificação (PCR de *Overlap*). (B) As cadeias leve (VL) e pesada (VH) foram purificadas e amplificadas em PCR de *Overlap*. O produto gerado do amplicon de ScFv possui cerca de 750 pb. Foram incluídos os controles da reação β -Actina e p53.

4.4.1 PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO *SINGLE-CHAIN*

Quantidades equimolares de cada amplicon de cadeia leve e pesada foram então adicionados à reação de PCR de *overlap* e o produto obtido (~750 pb) purificado de gel. Em primeiro lugar realizamos a construção do *single-chain* a partir das cadeias amplificadas pelo protocolo original (utilizando o pool de primers).

Observamos que, embora o gene ScFv possua o tamanho esperado (~750pb) a reação não foi ideal, apresentando bandas inespecíficas e um forte arraste no gel (Figura 21). Para tornar a reação mais eficiente, repetimos a reação de *Overlap* em um gradiente de temperatura de anelamento e na presença ou ausência de DMSO (Figura 22). Porém, a mudança de temperatura de anelamento dos primers não contribuiu para a diminuição do arraste gerado e ainda há a presença de algumas bandas inespecíficas. Percebemos, no entanto, que a presença de DMSO parece ter aumentado o rendimento da reação. Notamos também que, apesar de isoladas por purificação em gel de agarose, as cadeias leve e pesada utilizadas na amplificação de *Overlap* (Figura 21) ainda apresentam bandas inespecíficas, e que estas poderiam estar contribuindo para o arraste que observamos em nossas reações de PCR de overlap.

Figura 22. Amplicons de ScFv obtidos com diferentes temperatura de anelamento (T_m). Amplicons de ScFv obtidos pela reação do PCR de overlap realizado com temperaturas de anelamento variando entre 55°C a 65°C sem (A) ou com a adição de DMSO 4% (B).

4.4.2 PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO SINGLE-CHAIN (PROTOCOLO 2)

Em seguida, testamos se alterando-se o protocolo de produção dos amplicons de cadeia leve e pesada teriam um efeito positivo no PCR de overlap. Nossas primeiras tentativas de produzir amplicons de single-chain foram feitos utilizando-se produtos de PCR de cadeias leve e pesadas feitos a partir da mistura de primers senso e anti-senso. Testamos, então, se utilizando-se amplicons produzidos com os

primers individuais resultaria numa reação de PCR de overlap mais específica e eficiente. De fato a reação mostrou-se mais específica e foi, então, utilizada para a produção da biblioteca de anticorpos (Figura 23).

Figura 23. Purificação dos amplicons de cadeias leve e pesada. (A) Os genes da cadeia leve (VL) ou da cadeia pesada (VH) amplificados com *primers* separados foram unidos em um único “pool” e purificados. (B) Reação de *Overlap* realizada com as cadeias purificadas.

4.4.3 MÉTODO ISA-PCR

Com o objetivo de tornar a reação de *Overlap* mais eficiente, testamos o protocolo ISA-PCR (*Independent strand amplification*) (SOTELO et al, 2012), no qual, o gene ScFv é construído em duas etapas: primeiro, cada região variável de imunoglobulina é amplificada independentemente utilizando um *primer* único produzindo uma fita simples de DNA. Segundo: as fitas são unidas e amplificadas em um único fragmento ScFv (Figura 23). O método foi desenvolvido seguindo a hipótese que a presença de cDNA em produtos de PCR podem competir com fitas

simples de DNA necessárias para a montagem do fragmento ScFv, diminuindo a eficiência do SOE-PCR. Para contornar esse problema, as fitas utilizadas na construção do ScFv são enriquecidas na primeira etapa minimizando possíveis efeitos inibitórios provocados por fitas inespecíficas.

Apesar de teoricamente interessante, os resultados do ISA-PCR em nossas condições não foram satisfatórios e não obtivemos uma banda bem definida correspondente ao gene amplificado, nem o tamanho esperado, além de apresentar um forte arraste no gel (Figura 24). Este protocolo foi então abandonado.

Figura 24. Extensão *Overlap* pelo método *ISA-PCR*. (A) A reação é feita em duas etapas: primeiro, ocorre a amplificação somente das fitas simples que participam da reação de *Overlap*, e segundo, a junção das duas fitas e amplificação do gene ScFv. (B) Resultados obtidos com insertos de cadeia leve e pesada de Ig anti-VEGF utilizando o protocolo ISA.

4.5. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SINGLE-CHAIN E PREPARAÇÃO DO VETOR

Após a obtenção dos amplicons de ScFv, ou seja, os genes formados pelas cadeias leve e pesada em única cadeia, o próximo passo foi purificá-los e prepará-los para a ligação no vetor (Figura 25). Os genes obtidos pelos dois protocolos apresentados (1 e 2) foram purificados e clonados separadamente.

O vetor utilizado foi o pCOMB3XSS fornecido pelo Dr. Carlos Barbas do *Scripps Research Institute*, La Jolla, CA. Este vetor possui um *stuffer* de 1.600pb flanqueados por dois conjuntos de enzimas de restrição que servem para a clonagem tanto de anticorpos Fab como anticorpos *single-chain*, e permite que os amplicons clonados neste vetor resultem em produtos de expressão em fusão com a porção C-terminal da proteína pIII do fago. Outro aspecto interessante é que vetor e inserto foram digeridos com a enzima Sfil, que, por gerar extremidades desiguais, não permite a religação do vetor nem a inserção incorreta do gene (clonagem direcional). Nessa preparação, o *stuffer* é removido e o vetor é purificado de gel de agarose.

Para obtermos um plasmídeo mais puro realizamos a técnica de purificação por Cloreto de Césio, na qual, o vetor é submetido a uma ultracentrifugação (60.000g) na presença de Césio e resgatamos posteriormente, somente o DNA da fração *supercoiled*, evitando a contaminação por proteínas, RNA e DNA genômico. Desta forma, temos pComb3XSS com alto grau de pureza para a construção da biblioteca de ScFv anti-VEGF (Figura 26).

Figura 25. Purificação dos amplicons *single-chain*. (A) ScFv produzido a partir das cadeias leve e pesada amplificadas pelo “pool” de primers conforme o protocolo 1. (B) Amplicon *single-chain* gerado pelo protocolo 2, no qual as cadeias leve e pesada são amplificadas com *primers* separados.

Figura 26. Preparação do vetor pCOMB3XSS. (A) Purificação de DNA em gradiente de densidade de cloreto de cério. O DNA supercoiled é separado do genômico, do DNA semicircular, das proteínas e do RNA por meio de uma gradiente de densidade de cloreto de cério gerado por ultracentrifugação. (B) O vetor purificado tem aproximadamente 5.000pb. (C) O *stuffer* de 1.600pb foi removido com a enzima *SfiI* para a clonagem dos genes ScFv.

4.6. CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA

Para produzir a biblioteca de anticorpos anti-VEGF, realizamos primeiro ensaios de ligação com o vetor pComb e os insertos de ScFv preparados. Diferentes relações equimolares vetor:inserto foram incubadas com T4 DNA ligase em tampão apropriado e transformadas em E.coli XL-1blue. A eficiência de transformação foi então avaliada por contagem de colônia. Observamos que a relação inserto:vetor de 2:1 (molar) foi consistentemente a mais eficiente e foi utilizada ao longo deste trabalho. Os insertos deverão ainda conter a sequência de imunoglobulina cadeia leve e cadeia pesada, unidas pelo espaçador de Gly-Ser e flanqueado por sítios de enzima de restrição Sfil, no mesmo passo de leitura do gene III codificado pelo vetor. 10 clones bacterianos foram selecionados aleatoriamente para sequenciamento da extremidade 5' e 3' dos insertos ligados ao vetor. Observamos que todos os clones analisados continham o inserto do tamanho esperado (~750 pb) (Figura 27). Além disso, a análise do sequenciamento confirmou que os insertos liberados correspondem a fragmentos completos de ScFv (Figura 28) e que suas sequências alinham corretamente com sequências de imunoglobulinas de camundongos presentes em bancos de dados. Em todos os casos, a similaridade foi de 90% ou mais, correspondente as cadeias leves e pesadas.

Um dos clones foi completamente sequenciado e, como esperado, sua sequência apresentou passo-de-leitura aberto a partir da metionina inicial, até o final do gene III contido no vetor. Assim, tendo estabelecidas as condições de clonagem e confirmado a qualidade dos insertos, partimos para a construção das bibliotecas.

Utilizando as condições predeterminadas de 1:2 (vetor:inserto), construímos a nossa primeira biblioteca a partir de 1 µg de ScFv e 2 µg do vetor pComb3XSS,

ambos digeridos com a enzima de restrição SfiI. O produto da ligação foi então transformado em *E.coli* cepa XL-1blue eletrocompetente, sendo que ao final, obtivemos 10^5 transformantes, um número razoável para uma biblioteca imune.

Em seguida, uma segunda biblioteca foi desenvolvida em condições semelhantes, porém, aumentando a quantidade de vetor e inserto. Foram utilizados um total de 8µg de inserto e 19µg de vetor. Com essa biblioteca obtivemos um total de 10^6 transformantes, dos quais, 70% dos clones apresentaram padrão correspondentes a genes ScFv, um número significativamente maior que a primeira biblioteca (Figura 29).

Figura 27. Perfil dos clones de ScFv obtidos da primeira biblioteca gerada. Colônias bacterianas foram selecionadas aleatoriamente após a ligação, o DNA plasmidial purificado e analisados por digestão com enzima de restrição (SfiI) para liberar o inserto de ScFv. Dos 10 clones analisados, 10 apresentam insertos com o tamanho esperado (~750pb).

Mus musculus ZA1H7 ANA immunoglobulin kappa light chain gene,partial cds				
Length=335				
Identities = 303/307 (99%)				
Clone	27	TGATGACCCAGACTCCATCCTCCATGTATGCATCGCTGGGAGAGAGAGTCACTATCACTT	86	
IgG	1	TGATGACCCAGACTCCATCCTCCATGTATGCATCGCTGGGAGAGAGAGTCACTATCACTT	60	
Clone	87	GCAAGGCGAGTCAGGACGTT-AAAGCTATTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCATGGAAAT	145	
IgG	61	GCAAGGCGAGTCAGGACATTAAAGCTATTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCATGGAAAT	120	
Clone	146	CTCCTAAGACCCTGATCTATTATGCAACAAGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATTCA	205	
IgG	121	CTCCTAAGACCCTGATCTATTATGCAACAAGCTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATTCA	180	
Clone	206	GTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTAACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATA	265	
IgG	181	GTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTAACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATA	240	
Clone	266	CAGCAACTTATTACTGTCTACAGCATGGTGAGAGCCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACCA	325	
IgG	241	CAGCAACTTATTACTGTCTACAGCATGGTGAGAGCCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAA	300	
Mus musculus immunoglobulin heavy chain V(D)J region mRNA,partial cds				
Length=370				
Identities = 346/372 (93%)				
Clone	397	GAGGTCCACG-TGAAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGAT	455	
IgG	2	GAGGTGCA-GCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGAT	60	
Clone	456	TTCCTGCAAAGCTTCTGGCTACGCATTTCAGTAGCTCTTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAG	515	
IgG	61	TTCCTGCAAAGGCTTCTGGCTACGCATTTCAGTAGCTCCTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAG	120	
Clone	516	GCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACGGATTATCCTGGAGATGGAGATACTAACTA	575	
IgG	121	GCCTGGAAAGGGTCTTGAGTGGATTGGACGGATTATCCTGGAGATGGAGATACTAACTA	180	
Clone	576	CAATGGGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCANANAA-TCCTCCAGCACAGCCTA	634	
IgG	181	CAATGGGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTA	240	
Clone	635	CATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTA-TTACTGTGCAAG-GCCC	692	
IgG	241	CATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTACTT-CTGTGCAAGAGATG	299	
Clone	693	TTTATTACTACGGTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGAGAGT	752	
IgG	300	ATGGTTACTTTT-TTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGAGAGT	358	
Clone	753	CAGTCCTTCCCA	764	
IgG	359	CAGTCCTTCCCA	370	

Figura 28. Os fragmentos de ScFv apresentam homologia com imunoglobulinas murinas. Na figura está indicada a similaridade do clone 10 de ScFv com um anticorpo murino presente em bancos de dados (similaridade variando entre 93 e 99% de identidade). Todas as sequências analisadas mostraram mais de 90% de similaridade com anticorpos murinos.

Figura 29. Perfil dos clones de ScFv obtidos com a segunda biblioteca gerada. Colônias bacterianas foram selecionadas aleatoriamente após a ligação, o DNA plasmidial purificado e analisados por digestão com enzima de restrição (*Sfi*I) para liberar o inserto de ScFv. Dos 10 clones analisados, 7 apresentam insertos com o tamanho esperado (~750pb).

5. DISCUSSÃO

Anticorpos monoclonais constituem uma das classe de agentes terapêuticos que mais cresce nos últimos anos, com a aprovação pelo FDA de mais de 20 anticorpos para diferentes terapias e diagnósticos, e mais de 100 outros anticorpos em desenvolvimento clínico para uma série de doenças (HAGEMEYER et al., 2009; CHAN e CARTER, 2010; BECK et al., 2010). Entre estas, estão incluídas doenças onde a angiogênese tem um papel importante, como, degeneração macular, retinopatia diabética, neovascularização da córnea, glaucoma, artrite reumatóide e o próprio câncer. De fato, um dos primeiros medicamentos aprovados pelo FDA para inibir a angiogênese foi um anticorpo monoclonal dirigido contra o VEGF.

O bevacizumab (Avastin) é um anticorpo monoclonal murino humanizado que reconhece todas as isoformas de VEGF (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ e VEGF₁₈₈). Foi inicialmente aprovado para o tratamento de câncer de cólon metastático, mas também têm demonstrado eficácia no tratamento de algumas doenças oculares. Ranibizumab (Lucentis), que é o fragmento Fab do bevacizumab, e se liga ao VEGF com maior afinidade, é o tratamento indicado para doenças oculares com um componente angiogênico. Avastin tem sido, também, utilizada em doenças oculares *off-label* (CHANG et al, 2012), uma vez que o ranibizumab e o bevacizumab parecem ter perfis semelhantes de eficácia no tratamento de degeneração macular (CHANG et al, 2012).

Apesar da eficácia comprovada do bevacizumab, terapias anti-VEGF apresentam efeitos colaterais inesperados, incluindo, aumento da progressão metastática (PÀEZ-RIBES et al, 2009). A expectativa inicial era a de que terapias anti-VEGF fossem bastante seguras dada os baixos índices de proliferação das células endoteliais da vasculatura normal, comparada a angiogênica. Porém, apesar

de expresso em baixos níveis, o VEGF é importante para sinalização da sobrevivência das células endoteliais (TOZER et al, 2008; revisto por ELLIS e HICKLIN, 2008). Aliado a isto, observou-se ainda o inesperado desenvolvimento de resistência a terapia anti-VEGF (ELLIS e HICKLIN, 2008; KIERAN et al, 2012). Os mecanismos desta resistência ainda são pouco compreendidos (KIERAN et al, 2012). Essas observações levaram a conclusão de que as terapias anti-VEGF ainda não são ideais. Bevacizumab, por exemplo, teve sua licença revogada para o tratamento de câncer de mama por não promover benefício significativo em comparação com a toxicidade apresentada (LAMBRECHTS et al, 2013).

Uma alternativa para superar estas dificuldades com as terapias anti-VEGF é melhor determinarmos qual paciente pode ou não se beneficiar da Avastina. Para isso, buscam-se marcadores que possam guiar a seleção de pacientes que respondem melhor a terapia com Bevacizumab. Entre as moléculas estudadas estão o próprio VEGF (polimorfismos de nucleotídeo único) e seu receptor VEGFR-1 (LAMBRECHTS et al, 2013).

Outra possibilidade, por nós aventada, é o desenvolvimento de uma terapia anti-VEGF isoforma específica. Os anticorpos anti-VEGF disponíveis atualmente (Bevacizumab e Ranibizumab) reconhecem todas as isoformas do VEGF. Isso pode ser um agravante para o sucesso da terapia uma vez que as diferentes isoformas de VEGF (120/121, 164/165 e 188/189) apresentam diferentes efeitos no organismo. Estudos de deleção gênica mostraram que camundongos que não produzem o VEGF₁₆₄, apresentam sérios problemas de viabilidade e mal formação. Por exemplo, camundongos que expressam exclusivamente VEGF₁₂₀ apresentam vasos alargados e pouco ramificados, e cardiomiopatia causada pela ausência de angiogênese; estes animais morrem algumas horas após o nascimento

(CARMELIET et al, 1999). De forma semelhante, camundongos que expressam apenas VEGF₁₈₈ também apresentam alterações vasculares importantes, tais como vasos excessivamente finos com muitas ramificações, e mal formação óssea (RUHRBERG et al, 2002; MAES et al, 2004; revisto por CHUNG e FERRARA, 2011). É importante ressaltar que camundongos que produzem apenas o VEGF₁₆₄ são viáveis e saudáveis, sem alteração significativa na formação de vasos por angiogênese (MAES et al, 2004; revisto por CHUNG e FERRARA, 2011). Portanto, desenvolver anticorpos que sejam seletivos e específicos para o VEGF_{120/121} e VEGF_{188/189} pode ser uma alternativa importante para o sucesso da terapia anti-angiogênica com anticorpos monoclonais.

Como mencionado, a tecnologia do *phage display* é uma metodologia bastante poderosa para a seleção e identificação de anticorpos bioativos com potencial terapêutico. Como nosso laboratório domina a tecnologia do phage display de peptídios, escolhemos a produção de uma biblioteca de anticorpos murinos contra VEGF como início para estabelecermos esta nova plataforma tecnológica em nosso laboratório. Para estabelecermos o sistema de *phage display* de anticorpos em nosso laboratório, optamos por produzir uma biblioteca de anticorpos murinos dirigidos contra o VEGF, em particular, o VEGF₁₈₈. Dois tipos de bibliotecas podem ser produzidas por phage display: bibliotecas hiperimunes e bibliotecas *naïves*. As hiperimunes são bibliotecas construídas a partir do repertório imune de animais imunizados com o antígeno que se deseja obter anticorpos. Já as bibliotecas *naïve* são produzidas a partir do repertório imune de animais ou indivíduos saudáveis, por exemplo. A diferença está na diversidade dos anticorpos presentes na biblioteca. As bibliotecas hiperimunes apresentam uma menor diversidade global, mas são

enriquecidas e anticorpos de alta afinidade contra o alvo desejado. Já as bibliotecas naïve, podem conter anticorpos contra virtualmente qualquer ligantes.

A escolha de fazermos primeiro uma biblioteca hiperimune anti-VEGF é porque a diversidade das bibliotecas hiperimunes não precisa ser tão alta (entre 10^6 - 10^7) comparada a bibliotecas naïve (geralmente, com diversidade $>10^9$). Desta forma, escolhendo a biblioteca anti-VEGF murina, a produção da nossa primeira biblioteca seria facilitada, uma vez que uma das grandes dificuldades é a ligação do inserto ao vetor e eletroporação em alta eficiência. O número de transformantes necessário seria de 100 a 1.000 vezes menor, comparado com o número de transformantes necessários para a produção de uma biblioteca naïve. Entretanto, se tivermos sucesso com nossa biblioteca murina hiperimune, o anticorpo obtido terá que ser humanizado para uso na clínica.

Outra escolha importante é o tipo de biblioteca. No início do projeto optamos por construir uma biblioteca de anticorpos *single-chain* por ser um formato de anticorpo mais simples de produzir em relação às etapas de amplificação dos amplicons das cadeias leve e pesada. Tanto o formato Fab como *single-chain* apresentam vantagens e desvantagens quanto a produção e estabilidade da molécula. Por exemplo, anticorpos *single-chain* são melhores tolerados pela bactéria, tem menor probabilidade de ser degradado, são compostos por uma única cadeia e, finalmente, são mais fáceis de produzir, com apenas duas etapas de PCR e uma clonagem no vetor. Porém, são menos estável e uma fração dos anticorpos ScFv expressos pode ser não funcional. No caso de anticorpos Fab, eles são mais estáveis, tendem a ser mais funcionais. No entanto, são mais difíceis de serem produzidos pela bactéria, podem ser degradados mais facilmente e, por serem

formados por duas cadeias, requerem mais uma etapas de clonagem para a produção da biblioteca (BRADBURY e MARKS, 2004).

Obtivemos sucesso na primeira parte do projeto que consiste na imunização dos camundongos. Apesar de termos utilizado VEGF₁₈₈ homólogo e o mesmo ser expresso em condições fisiológicas, os camundongos apresentaram uma boa resposta imunológica. Isto porque parte dos anticorpos produzidos parecem reconhecer a proteína denaturada. É importante ainda observar que VEGF₁₈₈ (murino) e VEGF₁₈₉ (humano) apresentam similaridade de 100% na região que diferencia as isoformas de 164/165 e 188/189, com alteração de apenas um aminoácido (Phe no camundongo para Tyr em humanos) (Figura 30). Isto é importante, porque se tivermos sucesso, há uma grande possibilidade que os anticorpos identificados poderão reconhecer também o VEGF₁₈₉ humano.

VEGF ₁₈₈ Camundongo	VEGF ₁₈₉ humano			
VEGF ₁₈₈	1	APTTEGE-QKSHEVIKFMVDVYQSYCRPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCAGC	59	
		AP EG Q HEV+KFMDVYQSYC PIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRC GC		
VEGF ₁₈₉	207	APMAEGGGQNHHEVVKFMVDVYQSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGC	266	
VEGF ₁₈₈	60	CNDEALECVPTSESNITMQIMRIKPHQSQHIGEMSFLQHSRCECRPKKDRTKPEK	119	
		CNDE LECVPT ESNITMQIMRIKPHQ QHIGEMSFLQH++CECRPKKDR + EK		
VEGF ₁₈₉	267	CNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEK	326	
VEGF ₁₈₈	120	KGKGQKRKRKKSFRKSWSVHCEPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNER	179	
		KGKGQKRKRKKS+KSWSV C PCSEERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNER		
VEGF ₁₈₉	327	KGKGQKRKRKKSRYKSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNER	386	
VEGF ₁₈₈	180	TCRCDKPRR	188	
		TCRCDKPRR		
VEGF ₁₈₉	387	TCRCDKPRR	395	

Figura 30. Alinhamento da sequência do VEGF₁₈₈ de camundongo e VEGF₁₈₉ humano. Em amarelo, está indicada a região presente apenas na isoforma de 188/189 aminoácidos do VEGF e ausente no VEGF_{164/165}.

O RNA foi isolado do baço pelo método do TRIZOL, que se mostrou muito eficiente para o isolamento de RNA total. Além disso, este protocolo garantiu um bom rendimento de RNA, fundamental para representar a diversidade de anticorpos produzidos pelos linfócitos B para a produção da biblioteca. Isto pode ser constatado ainda pela nossa boa detecção de p53, sugerindo que transcritos de baixa cópia estão presentes em nosso cDNA. Assim, acreditamos que mesmos anticorpos expressos em baixos níveis foram amplificados com sucesso e estão representados em nossa biblioteca.

Durante o desenvolvimento do projeto tivemos dificuldades para a obtenção dos amplicons de ScFv produzidos pelo PCR de overlap. Após cuidadosa análise, observamos que produtos indesejados formados durante a amplificação dos amplicons de cadeia leve ou pesada eram os responsáveis pela falha no PCR de overlap. Assim, foram testados diversos protocolos de amplificação das cadeias leve e pesada e da construção do fragmento *single-chain*. Observamos que o melhor resultado foi uma alteração do protocolo descrito por Barbas et al, 2001. Ao invés de utilizar a mistura dos *primers* para amplificar todo o repertório de imunoglobulinas numa única reação, observamos que quando as cadeias leves e pesadas eram amplificadas individualmente, a reação do PCR de overlap era mais eficiente. Em particular, a remoção de alguns conjuntos de primers que falharam na amplificação da cadeia leve ou pesada (e, provavelmente, resultavam em acúmulo de produtos inespecíficos) parecem ter aumentado bastante a eficiência da produção dos amplicons de ScFv.

Em resumo, atingimos nosso objetivo inicial que era a produção de uma biblioteca de anticorpos do tipo ScFv murinos dirigidos contra o fator angiogênico VEGF. As bibliotecas produzidas apresentaram um número total de clones dentro do

esperado para uma biblioteca imune ($\sim 10^6$), uma vez que numa biblioteca hiperimune boa parte dos anticorpos são direcionados contra a molécula de interesse. A biblioteca de anticorpos murinos, portanto, está pronta ser expressa em fagos para a varredura e seleção de moléculas com afinidade ao fator VEGF₁₈₈. Isto será realizado pelo método BRASIL (GIORDANO et al, 2001) utilizando-se células transfectadas que expressam o VEGF₁₈₈. Os anticorpos obtidos serão então validados em modelos animais de doenças com um componente angiogênico.

6. CONCLUSÕES

O mercado de biofármacos vem ganhando destaque devido aos grandes avanços científicos e ao elevado volume de investimentos na área médica. No Brasil não é diferente e há uma crescente preocupação por parte dos Ministérios da Saúde e da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI) com a produção de imunobiológicos e biofármacos. A tecnologia do phage display é uma ferramenta importante neste processo, pois possibilita a identificação e o isolamento de anticorpos monoclonais com potencial terapêutico contra virtualmente qualquer alvo molecular. O trabalho apresentado nesta tese mostra nossos esforços para implantar esta importante metodologia num laboratório de pesquisa da Universidade de São Paulo. Para isto, padronizamos todo o processo de produção das bibliotecas e produzimos uma biblioteca hiperimune, contra um importante alvo terapêutico envolvido da progressão de diversas doenças, tais como o câncer e a retinopatia. Esta plataforma poderá, agora, ser estendida para a produção de biblioteca de anticorpos humanos para o desenvolvimento de biofármacos nacionais.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, G; WEINER, L. Monoclonal antibody therapy of câncer.**Nature Biotechnology**. V. 23, n. 9, p. 1147-1157, 2005.

ALGIRE, G. H. et al. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants.**Journal of the National Cancer Institute**, V.6, 1945.

BARBAS, CF. et al. Phage Display: a laboratory manual. CSHL Press. 2001.

BASSING, C.H; SWAT, W; ALT, F. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. **Cell**. V. 109, N. 2, Apr, 2002.

BECK, A et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic Antibodies. **Nature Reviews**. V. 10, Mai, p. 345-352, 2010.

BENJAMIN, et al. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 159-165, 1999.

BOEHM, T. Evolution of vertebrate immunity. **Current Biology**. V.22, p. R722-R732, Sep, 2012.

BOULIANNE,G; et al. Production of functional chimeric mouse/human antibodies. **Nature**, v.312, 1984.

BRADBURY, A; MARKS, J. Antibodies from phage antibody libraries.**Journal of Immunological Methods**.V.290, p. 29-49, 2004.

CARDONES, A; BAÑEZ, L. VEGF inhibitors in cancer therapy.**Current Pharmaceutical Design**, v.12, n.3, 2006.

CARMELIET, P. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**. V.380, Apr, 1996.

CARROL, M.; ISENMAN, D. Regulation of humoral immunity by complement. **Immunity**. V.37, Aug, 2012.

CASADEVALL, A; SCHARFF, MD. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. P. 1695-1702, Aug, 1994.

CERUTTI, A; CHEN, K; CHORNY, A. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. **Annual Reviews of Immunology**. V.29, p. 273-293, 2011.

CHAN, A; CARTER, C. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nature Reviews**. V. 10, Mai, p.301-316, 2010.

CHANG, J, et al. Corneal neovascularization: An anti-VEGF therapy review. **Survey of Ophthalmology**. V.57, N.5, Sep-Oct, 2012.

COOPER, P. Interactions between helminth parasites and allergy. **Current Opinions in Allergy and Clinical Immunology**. V.9, N.1, p. 29-37, Feb, 2009.

DUDLEY, D. et al. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. **Advances in Immunology**. V. 86, 2005.

ESSER, C.; RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annual Reviews of Immunology**. V. 8, p. 717-735, 1990.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. V. 29, p.789-791, 2009.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews in Cancer**, v.2, 2002.

FISCHER et al. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 463-475, 2007.

FLAJNIK, MF; Du PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **Trends in Immunology**. V.25, N.12, p. 640-644, Dec, 2004.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature**, v. 6, Apr., p. 273-286, 2007.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England of Journal Medicine**, v.285, 1971.

FONG, G. H., et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v. 376, 1995.

GIORDANO, RJ. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nature Medicine**. V.7, p. 1249-1253, 2001.

GIORDANO, RJ. et al. Mecanismos de angiogênese e metástase. **Oncologia Molecular Ed. Atheneu**. 2º Edição, 2010.

GREEN, LL. et al. Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig Heavy and light chain YACs. **Nature Genetics**, V.7, N.1, p. 13-21, May, 1994.

HAGEMEYER, C.E et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. **Intravascular Biology Meeting 2008**, p.1012- 1019.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**. V.166, p. 557-580, 1983.

HARPER, S; BATES, D. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? **Nature Reviews in Cancer**, v.8, n.11, Nov, 2008.

HORTON, R. et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**. V.77, p. 61-68, 1989.

HURWITZ, H. et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**. V. 350, n. 23, p. 2335-2342, 2004.

HWANG, W; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**, v.36, 2005.

IDE, A. G., et al. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. **American Journal of Roentgenology**, v.42, 1939.

JANEWAY, C.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Reviews of Immunology**. V.20, p. 197-216, 2002.

JONES, P et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, v.312, 1986.

KARTSEN, C. et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. **Nature Medicine**. V.18, N.9, p. 1401-06, Sep, 2012.

KHAZAELI, M, et al. Human immune response to monoclonal antibodies. **JIWETI**, v.15, n.1, Jan., 1994.

KÖHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, Aug., 1975.

KOWANETZ, M; FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. **Clinical Cancer Research**. V. 12, n. 17, p. 518-522, Set, 2006.

LAMBRECHTS, D. et al. Markers of response for the antiangiogenic agent Bevacizumab. **Journal of Clinical Oncology**.V.31, 2013.

LONBERG, N. et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four genetic modifications. **Nature**. V.368, N.6474, p. 856-9, Apr, 1994.

MATLASHEWSKI, G. et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **EMBO**. V.3, N.13, p. 3257-62, Dec, 1984.

MAUL, R; GEARHART, P. Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions. **Immunological Research**. V. 47, p. 113-122, Jul, 2010.

McCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**. V. 348, p. 552-554, 1990.

MORRISON, SL.; JOHNSON, MJ.; HERZENBERG, LA. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Proceedings of National Academy of Sciences**.V.81, N.21, p. 6851-5, 1984.

MURUKESH et al. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 8-18, 2010.

NELSON, A; DHIMOLEA, E; REICHERT, J. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**. V. 9, Oct, 2010.

PÀEZ-RIBES, M. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. **CancerCell**. V.15, N.3, p. 220-231, Mar. 2009.

PALMEIRA, P. et al. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**. 2012.

PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries. **Nature**. V.380, Mar, 1996.

PRESTA, L. et al. Humanization of an Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. **Cancer Research**. V. 57, 4593-4599, 1997.

RANKIN EB, GIACCIA AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death and Differentiation**. V. 15, p. 678-85, 2008.

RAPISARDA, A.; MELILLO, G. Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. **Drug Resistance Update**. V.12, N.3, p. 74-80, Jun, 2009.

REICHERT, J.; DHIMOLEA, E. Foundation review: the future of antibodies as cancer drugs. **Drug Discovery Today. Annual Reviews of Immunology**. V.17, N.17/18, Sep, 2012.

REICHERT, J; VALGE-ARCHER, V. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**. V.6, May, 2007.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annual Reviews of Cell Developmental Biology**. V.11, p. 73-91, 1995.

SCHROEDER, H.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy in Clinical Immunology**. Feb, 2010.

SCHWARTZ, R. Paul Erlich's Magic Bullets. **New England Journal of Medicine**. Mar, 2004.

SHOJAEI, F. et al. HGF/c-Met pathway is one of the mediators of sunitinib-induced tumor cell type-dependent metastasis. **Cancer Letters**. V. 320, p. 48-55, 2012.

SLADE, H. Human immunoglobulins for intravenous use and hepatitis C viral transmission. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V.1, N.6, p. 613-19, Nov, 1994.

SMITH, G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p.1315-1316, 1985.

SOTELO, P, et. al. An efficient method for variable region assembly in the construction of ScFv phage display libraries using independent strand amplification. **mABs**, v. 4, n.4, 2012.

STAPLETON, S. The history of tumour angiogenesis as therapeutic target. **UTMJ**. V.87, N.1, Dec, 2009.

STHOEGER, Z. et al. Immunoglobulin G4 and related diseases. **IMAJ**. V.14, Oct, 2012.

STOCKMANN, C. et al. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. **Nature**, V. 456, Dec, 2008.

STREBHARDT, K.; ULLRICH, A. Paul Erlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature Reviews Cancer**. V.8, Jun, 2008.

TAMMELA, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. **Nature**, v. 454, p.656-660, 2008.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**. V. 302, Apr, 1983.

TOZER, GM. Et al. Tumour vascular disrupting agents: combating treatment resistance. **The British Journal of Radiology**. V.81, 2008.

VASWANI, S; HAMILTON, R. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. **Annual Allergy Asthma Immunology**, v.81, 1998.

VIRCHOW, RLK. Pathologie des tumeurs. **Cours profess I Université de Berlin**. V.1, p. 20-23; 102-109, V.2; V.4, p. 2-5, 1867.

WEINTRAUB, M; RAYMOND, S. Antiserums prepared with acrylamide gel used as adjuvants. **Science**. Sep, 1963.

WU,Y; HOOPERAT; ZHONG Z, et al.The vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) supports growth and survival of human breast carcinoma. **International Journal of Cancer**. v. 119, p. 1519-1529, 2006.

8. SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Carlos Henrique Rodrigues Gomes

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Paulo, SP.

Data de nascimento: 21/06/1984

2. FORMAÇÃO

2.1 Pós-graduação

2010-2013 Mestrado em Bioquímica
Universidade de São Paulo
Instituto de Química – Departamento de Bioquímica
São Paulo, SP

Título: Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular (VEGF).

Orientador: Ricardo José Giordano
Bolsista FAPESP

2.2 Ensino Superior

2006– 2019 Graduação em Biomedicina.
Universidade Bandeirante de São Paulo, Brasil.

3. MONITORIAS

2011 - 2011 Estágio-Monitoria em Biologia Molecular (Curso: Farmácia-Bioquímica)
Universidade de São Paulo

4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Development of an Antibodies Phage Display System for Studying Angiogenesis. 2012. (Congresso). (Autores: Gomes, C.H.R., Magalhães, L.S., Giordano, R.J.)

10º Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina. 2009. (Simpósio).

17º Simpósio internacional de Iniciação Científica. Sdo1p, a proteína ortóloga de levedura da síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond liga RNA e interage com fatores de processamento de rRNA nuclear.. 2009. (Simpósio). (Autores: Gomes, C.H.R., Georg, R.C., Oliveira, C.C.)

5. Artigos

Luz, Juliana S. ; Georg, Raphaela C. ; **Gomes, Carlos H.** ; Machado-Santelli, Gláucia M. ; Oliveira, Carla C. . Sdo1p, the yeast orthologue of Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein, binds RNA and interacts with nuclear rRNA-processing factors. Yeast (Chichester)

6. Prêmios

2012. SBBq Best Poster Award, Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.