UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

CARLOS HENRIQUE RODRIGUES GOMES

Desenvolvimento de Novos Vetores para a Produção de Bibliotecas de Anticorpos pelo Sistema do Phage Display

Versão original da tese defendida

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
31/07/2018

CARLOS HENRIQUE RODRIGUES GOMES

Desenvolvimento de Novos Vetores para a Produção de Bibliotecas de Anticorpos pelo Sistema do Phage Display

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo

2018

Carlos Henrique Rodrigues Gomes

Desenvolvimento de Novos Vetores para a Produção de Bibliotecas de Anticorpos pelo Sistema do Phage Display

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

*Assinatura:*_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Ao meu avô Henrique Gomes (*in memoriam*) por me acompanhar ao longo da 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 tese.

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.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Combinatorial.

A todos os amigos do IQ: Cícero, Valdir, pessoal do IQ chorume. Diorge pela ajuda no final da tese.

A todos os amigos que levarei pra vida.

A Adriana, amor, pelo carinho e companheirismo em caminhar junto comigo no enfrentamento de nossas cicatrizes.

À FAPESP e Capes pelo auxílio financeiro.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

RESUMO

(Gomes, C.H.R) **Desenvolvimento de um Sistema de Biblioteca de Display de Anticorpos Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular**. 2018. 73p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Anticorpos são moléculas de grande interesse científico e farmacêutico, principalmente, devido a sua alta especificidade contra antígenos determinados. Atualmente, anticorpos monoclonais estão entre os medicamentos (biofármacos) mais vendidos do mundo. São utilizados para o tratamento das mais diversas doenças, como câncer, retinopatias, doenças inflamatórias e do sistema imune, entre outras. Nos últimos 30 anos, as tecnologias para a obtenção de anticorpos monoclonais evoluíram muito, desde a tecnologia do hibridoma, até os processos de humanização de anticorpos murinos. Entre os métodos mais utilizados para a produção de anticorpos humanos, destaca-se a tecnologia do *Phage Display*. Nesta técnica, os genes que codificam as regiões variáveis de imunoglobulinas são inseridos no genoma de um bacteriófago, resultando na produção de partículas virais híbridas que contém fragmentos de anticorpos em fusão com uma das proteínas do capsídeo viral. Neste trabalho, desenvolvemos novos vetores para a apresentação de fragmentos ScFv em fusão com duas proteínas das proteínas do capsídeo viral, a pIII e pVIII. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar os genes de imunoglobulinas foram redesenhados e para minimizar a perda do repertório durante a produção da biblioteca, avaliamos em bancos de dados enzimas de restrição que não apresentam sítios de restrição nas sequencias gênicas. Esses sítios de restrição foram utilizados para construir as regiões de clonagem do vetor *Phagemid*. Outra etapa crítica na produção de bibliotecas de anticorpos é a reação do PCR de *overlap*, que pode restringir a diversidade de anticorpos e resultar na produção de amplicons codificando anticorpos truncados. Por isso, nossos vetores foram desenhados para permitir a clonagem direta das regiões variáveis das imunoglobulinas humanas ou murinas, sem a necessidade do PCR de *overlap*. Nossa expectativa, é que estes novos reagentes serão mais efetivos para a produção de novas bibliotecas de anticorpos pelo sistema do *Phage Display*.

Palavras-chave: Phage Display; Anticorpos monoclonais; Biofármacos, Imunoglobulinas, PCR de overlap, Single-Chain.

ABSTRACT

(Gomes, C.H.R) **Development of a Antibody Display Library System Targeted Against Vascular Growth Factor**. 2018. 73p. Doctoral Thesis – Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Antibodies are molecules of great scientific and pharmaceutical interest, mainly because of their high specificity against certain antigens. Currently, monoclonal antibodies are among the best selling drugs (biopharmaceuticals) in the world. They are used for the treatment of the most diverse disorders, such as cancer, retinopathies, inflammatory and immune system diseases, among others. In the past 30 years, technologies for obtaining monoclonal antibodies has greatly evolved from hybridoma technology to the humanization processes of murine antibodies. Among the methods used for the production of human antibodies, the technology of Phage Display stands out. In this technique, the genes encoding the immunoglobulin variable regions are inserted into the genome of a bacteriophage, resulting in the production of hybrid virus particles which contain fragments of antibodies in fusion with one of the viral capsid proteins. In this work, we developed new vectors for the presentation of ScFv fragments in fusion with two proteins of viral capsid proteins, pIII and pVIII. The oligonucleotides used to amplify the immunoglobulin genes were redesigned and to minimize repertory loss during library production, we evaluated restriction enzymes in databases that lack restriction sites in the gene sequences. These restriction sites were used to construct the cloning regions of the Phagemid vector. Another critical step in the production of antibody libraries is the overlap PCR reaction, which may restrict the diversity of antibodies and result in the production of amplicons encoding truncated antibodies. Therefore, our vectors were designed to allow the direct cloning of human or murine Immunoglobulins variable regions without the need for overlap PCR. Our expectation is that these new reagents will be more effective for the production of new antibody libraries by the Phage Display system.

Keywords: Phage Display; Monoclonal antibodies; Biopharmaceuticals, Immunoglobulins, Overlap PCR, Single-Chain.

SUMÁRIO

1. Introdução 10
   1.1. Imunoglobulinas 11
   1.2. Anticorpos como Biofármacos 16
   1.3. Phage Display 19
   1.4. Anticorpos monoclonais na terapia 28
   1.5. Limitações do sistema de Phage Display de anticorpos. 29
2. Objetivos 31
3. Materiais e Métodos 32
4. Resultados 39
   4.1. Construção dos vetores. 39
   4.2. Construção dos Primers 42
   4.3. Enzimas de restrição são importantes para manter o repertório de sequências amplificadas 48
   4.4. Todos os *primers* desenvolvidos amplificam sequências de IgG 51
   4.5. As sequências analisadas estão no frame correto de leitura 54
   4.6. Construção do vetor pG8SAET 56
   4.7. O anticorpo testado Trastuzumab é uma molécula funcionalmente ativa 58
   4.8. Construção da biblioteca da biblioteca de ScFv anti-VEGF 59
5. Discussão 61
6. Conclusões 65
7. Referências 66

1. Introdução

O conceito de utilização de anticorpos para atacar seletivamente tumores foi proposto há mais de um século por Paul Ehrlich. Em 1900, o cientista descreveu sua famosa teoria da formação de anticorpos, propondo que antígenos se ligam a “cadeias laterais” pré-existentes na superfície de células, estimulando a síntese de cadeias adicionais que são secretadas para o meio extracelular com a função de neutralizar o antígeno. Ele denominou as tais cadeias laterais como “balas mágicas” (*magic bullets*). Para propor essa teoria, tomou como inspiração o modelo de “Chave e fechadura” do substrato e enzima proposto por Emil Fisher. Ehrlich foi além, incluindo a capacidade das células de produzir receptores antes, e não depois, do contato com proteínas exógenas.

Embora o conhecimento atual sobre o sistema imune nos mostra que o espectro total de receptores não esteja presente em todas as células (TAN e GRIMES, 2010; revisto por SCHWARTZ, 2004; STREBHARDT e ULRICH, 2008) suas ideias abriram o campo da medicina moderna, onde encontrar moléculas específicas para neutralizar antígenos infecciosos ou tumorais garanta 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 têm 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; TAN e GRIMES, 2010). 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; STIEHM, 2015).

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 (mABs). 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).

1.1. Imunoglobulinas

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas homogêneas que, por definição, se originam a partir de uma única célula B, reconhecem um epítopo único e tem atividade específica mais elevada do que anticorpos policlonais. Diferem dos policlonais em vários aspectos, sendo gerados *in vitro* pela técnica de hibridoma ou de DNA recombinante. Em geral, anticorpos monoclonais são superiores aos policlonais em relação à homogeneidade, especificidade e segurança (CASADEVALL e SCHARFF, 1994).

Anticorpos, também conhecidos como 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 (kappa) ou λ (lambda). Ambas as cadeias leve e pesada são constituídas por 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 (SCHROEDER E CAVACINI, 2010).

A função dos anticorpos é neutralizar microrganismos por meio de ligações específicas anticorpo-antígeno facilitando a fagocitose, em um processo chamado opsonização, uma vez que neutrófilos e macrófagos expressam receptores para as caudas de IgG (domínio denominado de Fc). 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, afetando a integridade da célula invasora.

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 três 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, assim denominada por formar cristais ao ser liberada da imunoglobulina por digestão enzimática com papaína (Figura 1). 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

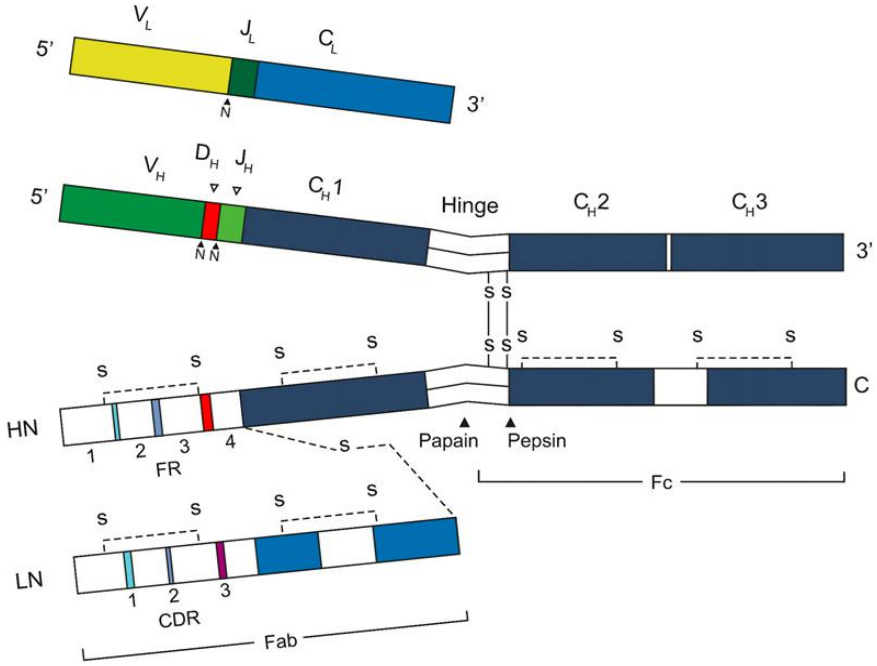


Figura 1. Imunoglobulinas são formadas por cadeias leve e pesada dispostas em heterodímeros. Na porção N-terminal de cada cadeia pesada (HN) e leve (LN) localiza-se o domínio Fab que contem as três regiões CDR (Regiões Determinantes de Complementariedade), importantes para a variabilidade das proteínas, 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, DH, 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).

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, à medida que os anticorpos maturam, 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 dos mesmos 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 três domínios hipervariáveis, chamados de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDR) intercaladas a quatro regiões menos variáveis, denominadas de *Framework* (Figura 2).

As combinações das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas determinam a especificidade dos anticorpos e da interação com o antígeno. O

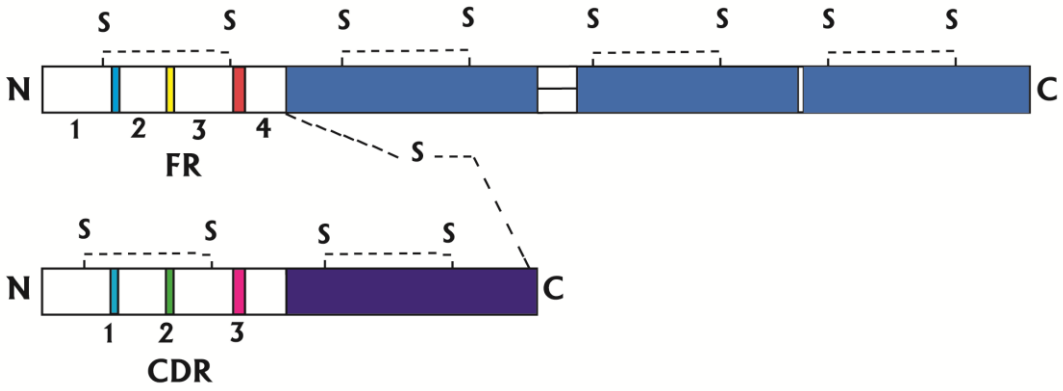


Figura 2. Regiões variáveis e constantes de imunoglobulinas. Representação de uma subunidade de imunoglobulina contendo uma cadeia leve e uma pesada, unidas por pontes dissulfeto (indicado por -S-), constituindo os domínios variáveis (branco) e constantes (azul claro, cadeia pesada e azul escuro, cadeia 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.

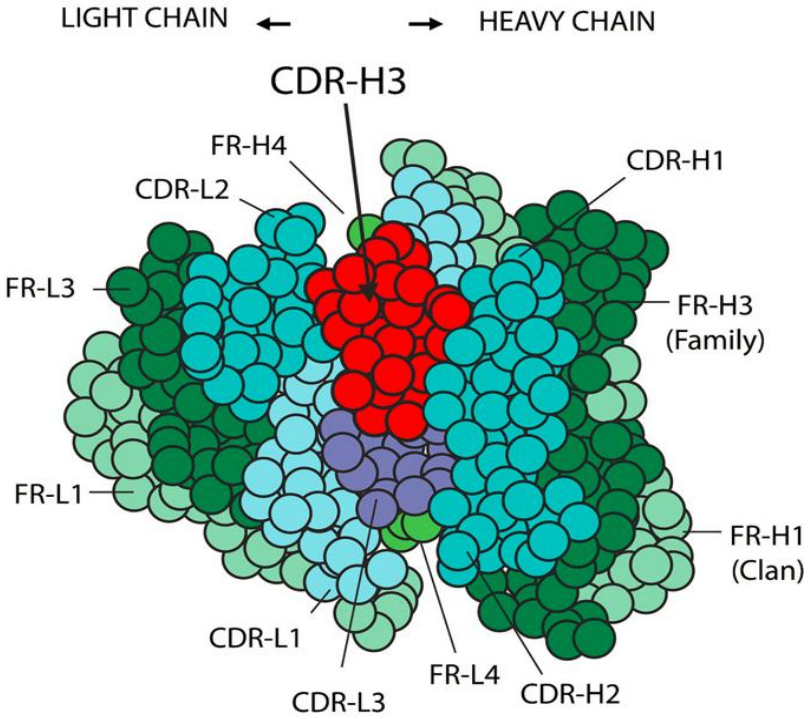


Figura 3. Sítio de ligação ao antígeno. Representação no espaço do domínio variável de uma imunoglobulina, formado pela justaposição dos 3 CDR´s da cadeia pesada e dos 3 CDR´s da cadeia leve. A região formada por CDR 3 da cadeia pesada (CDR-H3) e CDR 3 da cadeia leve (CDR-L3) perfazem a região mais importante 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.

sítio de ligação ao antígeno é formado pela justaposição dos três CDRs da cadeia pesada e os três CDRs 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).

1.2. Anticorpos como biofármacos

O desenvolvimento comercial dos anticorpos monoclonais começou na década de 1980 com a aprovação do Orthoclone® OKT3 para a prevenção de rejeição em transplante renal. A partir daí, anticorpos monoclonais terapêuticos e fragmentos de anticorpos cresceram para se tornar a classe de produtos dominante no mercado biofarmacêutico. Atualmente, os produtos de anticorpos monoclonais são aprovados para o tratamento de uma variedade de doenças, desde doenças de incidência menor como hemoglobinúria paroxística noturna até câncer e artrite reumatóide. Após a aprovação do OKT3 em 1986, o crescimento das vendas e aprovação de produtos adicionais foi lento até o final da década de 1990, quando os primeiros anticorpos monoclonais quiméricos foram aprovados (ECKER, et al. 2015).

Apesar da revolução no desenvolvimento de anticorpos, por ser de origem murina, essa primeira geração de anticorpos monoclonais (por exemplo, 3F8, dirigido contra o gangliosídeo GD2, utilizado em diagnóstico e tratamento de Neuroblastoma) tiveram suas aplicações limitadas por induzir o sistema imune dos pacientes a produzir anticorpos contra a imunoglobulina administrada (KUSHNER, et al, 2007). Esses anticorpos são conhecidos como HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) e podem reduzir a eficiência anticorpo administrado, até reações

adversas, como processos alérgicos, choques anafiláticos e até complicações mais sérias ao paciente, como falência renal (HWANG e FOOTE, 2005; NAGY, Z. 2013).

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®), Rituximab (Rituxan®) e Abciximab (ReoPro®). Porém, outros continuaram imunogênicos, principalmente, devido à 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 complementaridade (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 e são denominados anticorpos humanizados (PELAT, T. et al, 2008; ROBERT, R. et al, 2010).

Enquanto os anticorpos quiméricos apresentam 80% de sequências proteicas humanas em sua composição, anticorpos humanizados pela metodologia da transferência de CDRs podem apresentam até 95% de similaridade (JONES, T. et al, 2016). Desse modo, anticorpos humanizados apresentam uma imunogenicidade muito baixa, têm um alto potencial para uso terapêutico e representam a terceira geração de anticorpos monoclonais que incluem medicamentos como Trastuzumab-

Herceptin® (câncer de mama), Palivizumab-Synagis® (infecção viral) e Bevacizumab-Avastin® (câncer colo retal) (VASWANI e HAMILTON, 1998; HWANG, W. et al, 2005).

Apesar do sucesso dos anticorpos humanizados, o ápice da evolução da engenharia de anticorpos se deu por meio da produção de anticorpos totalmente humanos. A primeira técnica foi a construção de camundongos transgênicos que carregam fragmentos de DNA genômico, chamados miniloci, contendo genes de cadeia leve e pesada de imunoglobulinas humanas. Desse modo, camundongos podem ser imunizados com o antígeno de interesse e anticorpos humanos são secretados por linfócitos B murinos (TAYLOR, LD. et al, 1992; LONBERG, N. et al, 1994; GREEN, LL. et al, 1994). Para desenvolver anticorpos humanos por métodos *in vitro*, uma técnica muito utilizada é o *Phage Display* de anticorpos (Figura 4) (McCAFFERTY, et al, 1990).

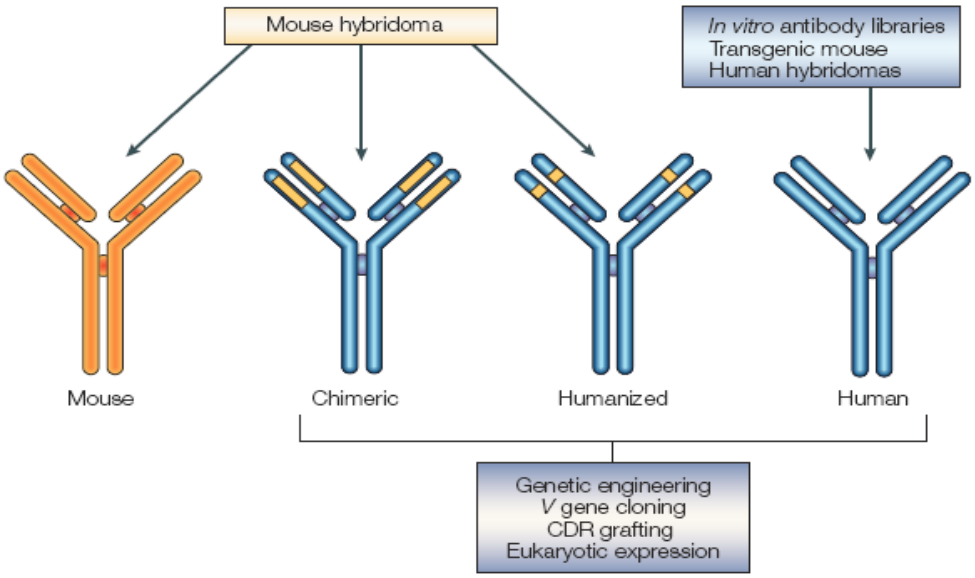


Figura 4. O processo de tornar os monoclonais menos imunogênicos marcou a evolução da engenharia de anticorpos. Anticorpos quiméricos são obtidos quando a região constante murina do anticorpo é substituída pela humana. Anticorpos humanizados podem ser obtidos inserindo-se apenas a regiões determinante de complementaridade (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).

1.3. Phage Display

A técnica do *Phage Display* consiste em clonar sequências gênicas de pequenos peptídeos ou proteínas no genoma de bacteriófagos e expressar essas proteínas na superfície dos fagos em fusão com proteínas de seu capsídeo, para formar grandes coleções ou bibliotecas de peptídeos (SMITH, 1985). Em 1990, John McCafferty e colaboradores mostraram pela primeira vez que fragmentos funcionais de anticorpos podiam ser expressos e apresentados no capsídeo de fagos filamentosos, dando início ao campo do *Phage Display* de anticorpos (McCAFFERTY, J. et al, 1990).

As bibliotecas de anticorpos produzidas por *Phage Display* podem ser varridas sobre superfície de células, tecidos ou órgãos em busca de novos marcadores moleculares. Além disso, a técnica ainda permite o aumento da afinidade de um anticorpo, mimetizando o processo fisiológico de hipermutação somática *in vitro* (CHOWDHURY e PASTAN, 1999). 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. 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 uma dupla-fita intermediária, 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 não há um limite para o tamanho dos fragmentos de DNA inseridos em regiões não essenciais do genoma do fago, resultando em partículas virais mais longas contendo uma cópia do inserto de DNA na forma fita simples (BARBAS et al, 2001).

O capsídeo do fago é composto por cinco proteínas: pVII, pIX, pVIII, pVI e pIII. A fusão das proteínas de interesse ocorre geralmente com duas dessas proteínas: pIII ou pVIII. pIII é a proteína responsável pela infectividade do vírus. É composta por três domínios (N1, N2 e CT) conectados por regiões ricas em glicina. O domínio N2 se liga ao pilus F durante a infecção liberando o domínio N1 que passa a interagir com a proteína TolA da superfície da bactéria (LOWMAN, H. e CLACKSON, T. 2004). Uma vantagem de utilizar a proteína pIII é a possibilidade de inserção de proteínas maiores (>100 aminoácidos) em comparação com a pVIII. Entretanto, por ser a responsável pela infecção do fago, fusões na pIII podem causar a perda da infectividade produzindo fagos não viáveis (SIDHU, et al. 2000).

A proteína pVIII é a principal proteína do capsídeo do fago. Peptídeos e proteínas são inseridos na porção N-terminal e tem a desvantagem de favorecer moléculas de menor afinidade pelo fato da proteína pVIII apresentar 2700 cópias por fago,

expressando no *Display* muitas cópias por fago, baixando a afinidade em processos de seleção (WEISS e SIDHU, 2000).

No caso de *display* de anticorpos a clonagem não é realizada no genoma do fago. A fusão recombinante é codificada em um plasmídeo separado de seu genoma em um sistema chamado *Phagemid*. Nesse sistema, o genoma do fago, chamado de *helper phage*, codifica todas as proteínas do capsídeo e o *Phagemid* codifica a fusão recombinante. Como resultado final temos a produção de fagos híbridos, que expressam tanto a proteína pIII/pVIII selvagem como a fusão recombinante. Esses fagos híbridos são, então, capazes de infectar bactérias e, o 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 partículas virais carregando preferencialmente o DNA plasmidial (*Phagemid*) contendo o pIII recombinante fusionada ao anticorpo (Figura 5) (BARBAS et al, 2001).

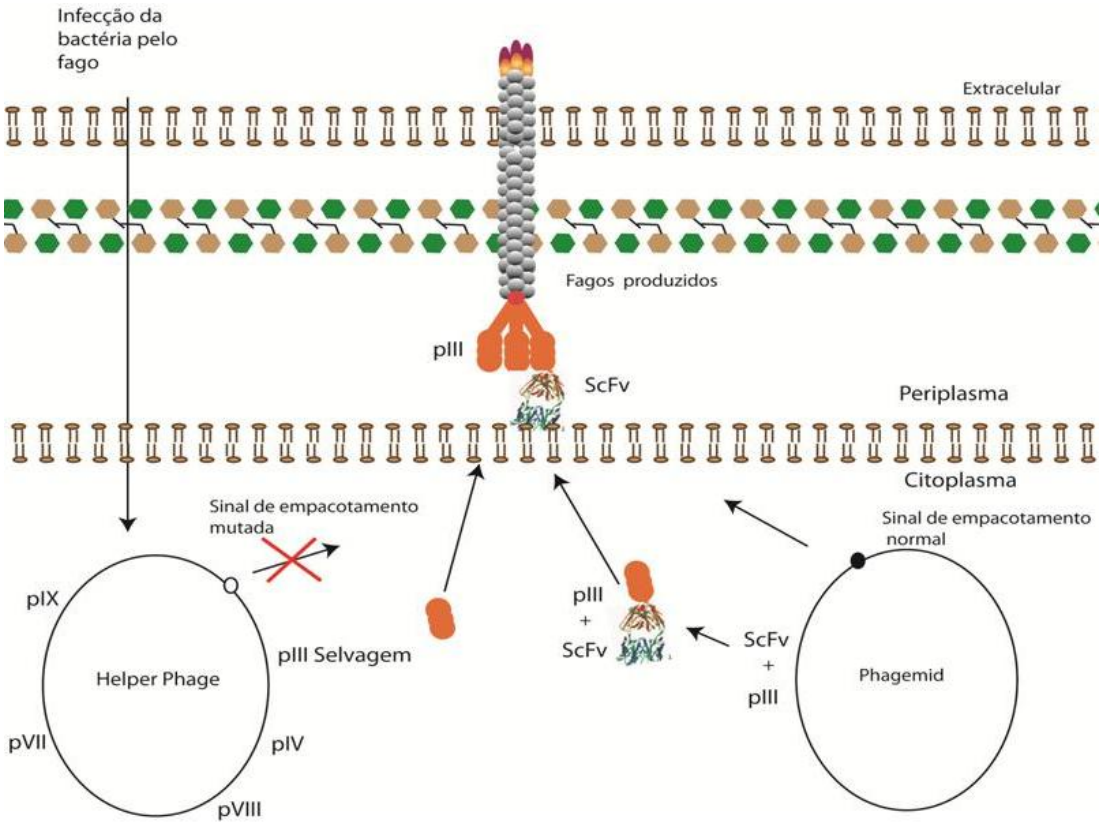


Figura 5. Phage Display com o sistema Phagemid. E.coli são tranformadas com o phagemid contendo a fusão ScFv-pIII. Para a produção de particular virais, as células são co-transfectadas com um fago auxiliar (helper phage) contendo todos genes necessários para a produção viral, mas deficiente na sua sequência de empacotamento. Desta forma, particular virais contendo pIII selvagem e pIII recombinantes, carregando o DNA simples fita do phagemid são produzidas.

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 (V_L ou V_H) e uma região constante (C_L ou C_{H1}). Já anticorpos *single-chain* são formados pelas junções das regiões variáveis das cadeias leve e pesada numa única cadeia, sem regiões constantes.

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 à construção da biblioteca. Outra vantagem é a habilidade do ScFv em multimerizar, o que pode aumentar a avidez 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 6).

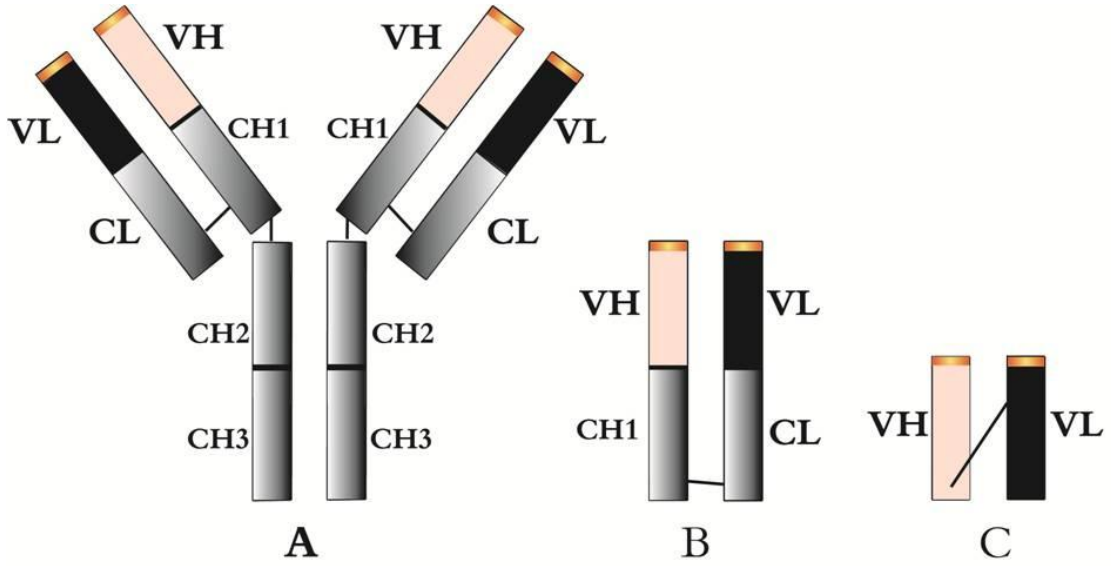


Figura 6. Estrutura de um anticorpo e suas variantes produzidas por Phage Display. (A) Representação de um anticorpo com suas duas cadeias leves e duas pesadas formando os domínios variáveis que ligam ao antígeno e domínios constantes responsáveis pela resposta efetora. (B) Fragmento Fab são dividos 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-chain ScFv contendo apenas as porções Fv unidas por um linker formado por serina e glicina (Adaptado de BARBAS et al, 2001).

O processo de formação de anticorpos *single-chain* consiste na amplificação das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas e, posteriormente, as cadeias são ligadas por um *linker* formado por 8 a 20 aminoácidos com repetições de glicina e

serina $(Gly_4Ser)_3$, formando uma única cadeia. 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 SOE-PCR.

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. 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 7).

Para a formação de fragmentos Fab além da amplificação das regiões variáveis é necessário também a amplificação das porções constantes tanto da cadeia leve como da pesada. O primer reverso das regiões variáveis e o primer senso das porções constantes também possuem sequências complementares para a reação de *Overlap*. As cadeias formadas V_L-C_L e V_H-C_H ainda serão unidas por mais uma reação de *Overlap* para poderem ser clonadas no vetor (Figura 8). Portanto, a construção de anticorpos Fab possui uma etapa a mais de amplificação comparados a anticorpos *single-chain*.

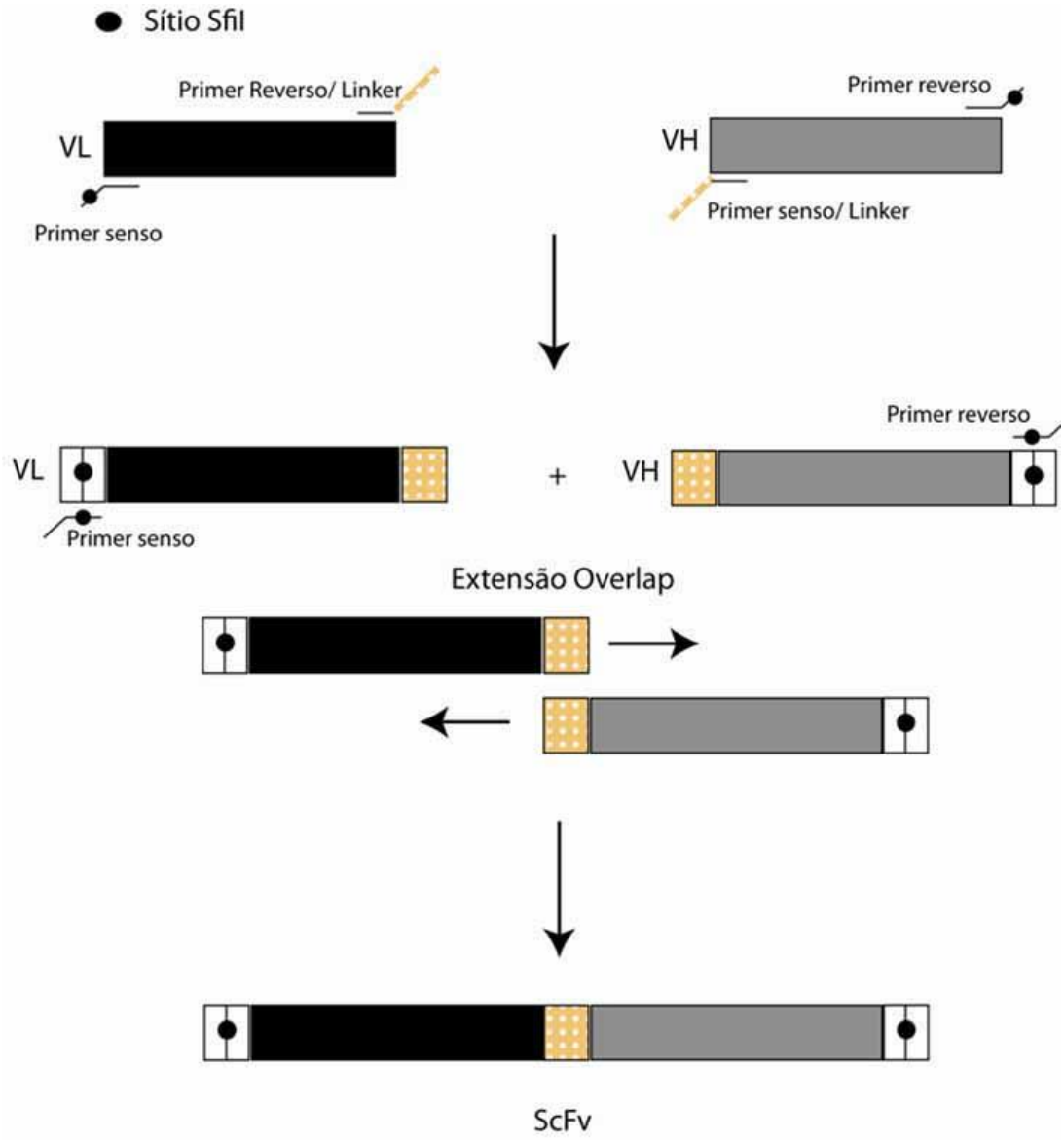


Figura 7. Processo de construção de anticorpos *single-chain*. As cadeias leve (V_L) e pesada (V_H) são amplificadas com primers senso específicos para a região variável e primers reverso específicos para o final da região variável e começo da porção constante. O primer reverso da cadeia leve e o primer senso da cadeia pesada possuem *linkers* com sequências complementares que possibilitam a junção das duas cadeias em uma reação de amplificação (PCR de *Overlap*).

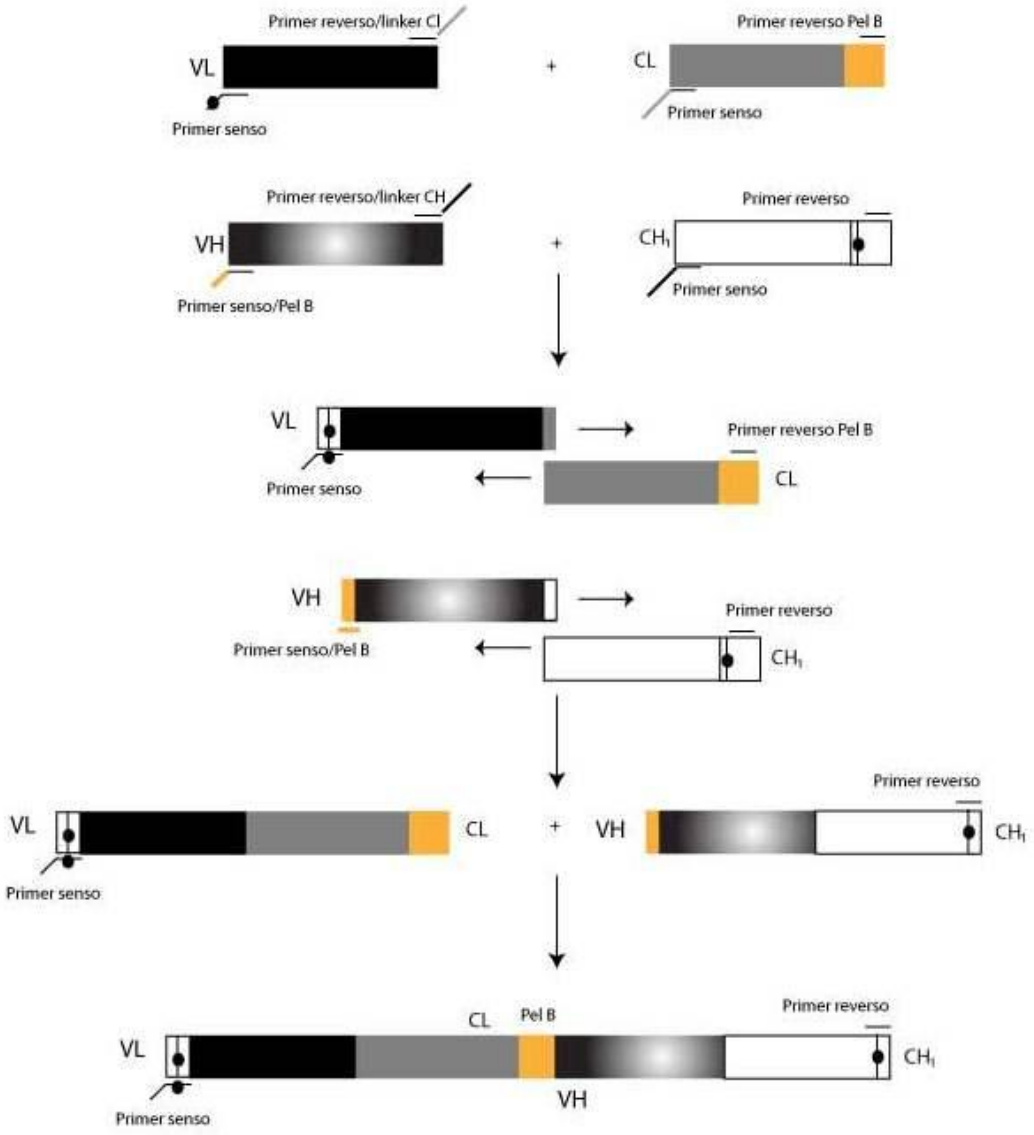


Figura 8. Amplificação de fragmentos Fab. Após a amplificação das regiões V_L e C_L, e V_H e C_H cada região variável é unida com sua respectiva porção constante por extensão *Overlap*. As cadeias formadas V_L-C_L e V_H-C_H ainda são unidas por uma nova reação de extensão *Overlap* para serem clonadas no vetor Phagemid.

Além da configuração do anticorpo, outra característica que definem as bibliotecas de anticorpos é segundo a origem das moléculas de IgG. Existem três classes principais de bibliotecas: bibliotecas imunes, não imunizadas (*naïve*) e bibliotecas sintéticas. As bibliotecas de anticorpos imunes são projetadas para isolar anticorpos específicos e de alta afinidade contra antígenos. A pré-exposição do hospedeiro a uma infecção resulta na produção de uma população dirigida de anticorpos contra o antígeno em particular (BERRY e POPKOV, 2005). Já bibliotecas *naïve*, por não serem dirigidas, tem a necessidade de apresentar um repertório maior de moléculas para seleção (DOBSON, C. et al, 2005). Bibliotecas sintéticas, por sua vez, são construídas utilizando sequências pré-determinadas de DNA para a inserção de estruturas moleculares humanas altamente otimizadas em posições que contribuirão para o reconhecimento de antígeno. Assim, essas bibliotecas de anticorpos sintéticos são capazes de gerar anticorpos específicos contra uma gama diversa de antígenos proteicos (NELSON e SIDHU, 2012).

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).

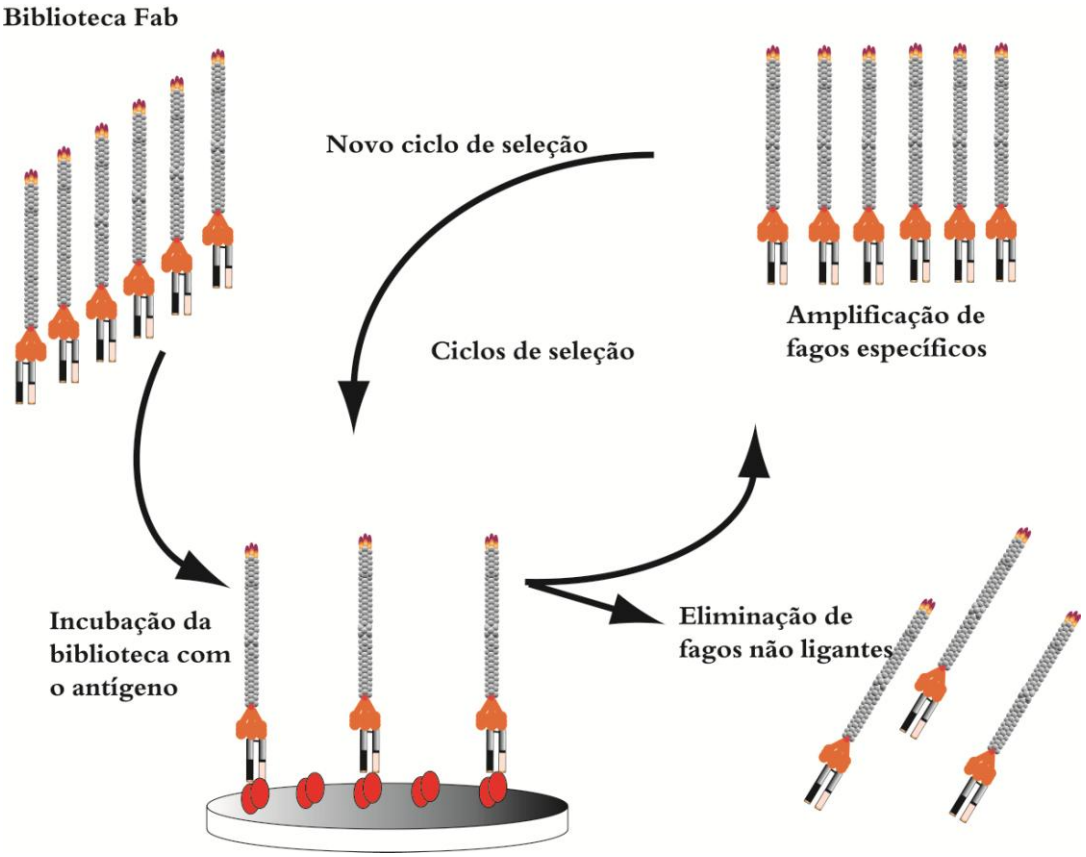


Figura 9. Estratégia de seleção com antígeno adsorvido em placa de microtitulação**.** Fagos expressando anticorpos em sua superfície são incubados com antígenos imobilizados. O enriquecimento de fagos ligantes se dá pela infecção com E.coli dos fagos que não foram removidos por lavagem em e posterior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

1.4. Anticorpos monoclonais na terapia

Atualmente, de 58 anticorpos aprovados 44 estão no mercado desde lançamento do OKT3 (ECKER, D. et al, 2015). Desses 44 a técnica de Phage Display aprovou apenas 6, entre eles, Adalimumab-Humira® (contra TNF-alfa), Adecatumumab (anti-CD326), Belimumab (estimulador de linfócito B), Ranibizumab – Lucentis® (anti-VEGF A). Porém, essa técnica conta com mais de 50 anticorpos em desenvolvimento (FRENZEL, A. et al, 2016). Isso se deve ao uso recente desta técnica para o desenvolvimento de biofármacos. Pelo fato de que a maioria dos

anticorpos desenvolvidos para o tratamento de câncer e doenças imunológicas são humanos, acredita-se que nos próximos anos um número maior de anticorpos será aprovado por *Phage Display*, já que a maioria dos anticorpos humanos, hoje, são desenvolvidos por esta técnica.

1.5. Limitações do sistema de Phage Display de anticorpos

O sucesso da técnica do *Phage Display* depende da padronização das etapas necessárias para a montagem da biblioteca como, amplificação das cadeias de imunoglobulina, clonagem dos genes no *Phagemid*, transformação bacteriana, infecção com *Helper Phage* e seleção de ligantes.

Um problema encontrado em construção de bibliotecas de anticorpos por *Phage Display* é a limitação do sistema *Phagemid*. Como ambos *helper phage* e *Phagemid* possuem uma cópia do gene III, apenas uma pequena fração dos fagos produzidos carregam os fragmentos de anticorpos (cerca de 1%) (RONDOT, et al, 2001). Alguns trabalhos foram desenvolvidos para contornar esse problema, como eliminar o *helper phage* do sistema (BRADBURY, et al, 2006) e o desenvolvimento do *Hyperphage* (DUBEL, et al, 2001).

Ainda que não seja facilmente realizada, amplificar sequências gênicas de imunoglobulinas para criar anticorpo ScFv ou Fab é um objetivo comum de todo protocolo de construção de bibliotecas de anticorpos. Geralmente os *primers* descritos são muito numerosos e longos, resultando em amplicons inespecíficos ou inexistentes. Outra etapa crítica é a do PCR de *overlap*, que pode resultar na amplificação de clones e redução da diversidade da biblioteca. Portanto, padronizar todas as etapas do sistema é fundamental para produzir bibliotecas com o máximo

de representatividade do sistema imune e selecionar anticorpos específicos para um ligante desejado. Por isso, criar novas estratégias para a formação de anticorpos monoclonais por *Phage Display* é importante para a evolução da técnica e para o sucesso das bibliotecas de anticorpos.

2. Objetivos

O sistema de *Phage Display* é uma ferramenta poderosa para selecionar anticorpos. Porém, a metodologia ainda apresenta obstáculos que reduzem a eficiência da técnica, como amplificação do repertório gênico e clonagem das sequências em vetores de expressão. O objetivo deste projeto é desenvolver uma nova metodologia para o *display* de anticorpos pelo sistema *Phagemid*. Para isso, vamos:

a) Construir um novo vetor para a construção de anticorpos ScFv, que poderá ser utilizado para construir bibliotecas de IgG murinas e humanas. Este vetor conterá todos os elementos necessários para clonagem das cadeias leves de pesadas, sem a necessidade do PCR de *overlap*.

b) Estabelecer novos *primers* para amplificação das sequências gênicas das imunoglobulinas. Para reproduzir com sucesso o repertório de IgG produzido pelo organismo temos que garantir que os *primers* cubram o máximo de sequências geradas pelos linfócitos B.

3. Materiais e Métodos

Amplificação dos segmentos de imunoglobulina

Os segmentos de imunoglobulina G foram amplificados utilizando *primers* senso (FGKV-1 ao 17) e reverso (RIGKC) da cadeia leve e senso (FGHV-1 ao 10) e reverso (RIGHC) da cadeia pesada (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.

A reação foi realizada com 1µl de cDNA; 10pmol de *primer* senso e 10pmol de *primer* reverso; PCR buffer (200mM Tris-HCl, 500mM KCl); 2mM $MgCl_2$; 2,5mM dNTP; 5 unidades de Taq platinum *high fidelity* (Thermo Fisher). Ao todo foram 35 ciclos de: 15 segundos a 94°C; 30 segundos a 56°C e 60 segundos a 72°C. O produto do PCR foi isolado do gel de agarose 1% e purificado com Gel *Extraction* Kit da QIAGEN®.

Clonagem do anticorpo Trastuzumab

As regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) do anticorpo Trastuzumab (Herceptin®) foram amplificadas utilizando os *primers*: senso (VL) ATACAACGCGTGATATTCAGATGACCCAG; reverso (VL) ATACATTAATTAACACGCTCGGCGCCGCCAC; senso (VH) ATATCGCTAGCGACTGGACCTGGAGGATCC; reverso (VH) ATATCGCGCGCGGGTGCCAGGGGGAAGAC. As sequências foram digeridas com

as enzimas de restrição MluI, PacI, NheI e HindIII por 2 horas a 37ºC e purificadas com Gel *Extraction* Kit da QIAGEN®. A ligação nos vetores pG8SAET e pCG3Sv foi realizada com 5 unidades de Ligase T4 (Thermo Fisher®) a 16ºC por 16 horas.

Construção dos *primers*

Para obter as sequências gênicas das imunoglobulinas foi utilizado o banco de dados VBASE2 (http: http://www.vbase2.org/vbase2.php; RETTER, I. et al. 2005). As sequências com *frame* de leitura correto e sem lacunas foram alinhadas e agrupadas por similaridade. Cada grupo deu origem a 2 ou 3 *primers* degenerados, resultando em 17 *primers* senso (FIGKV1-17) e 1 reverso (RIGKC) para a cadeia leve e 10 *primers* senso (FIGHV1-10) e 1 *primer* reverso (RIGHC) para a cadeia pesada, respeitando um limite de 4 bases para degeneração e 3 bases para *mismatch.*

Cadeia Leve Kappa Senso	Sequencia
FIGKV1	ATAACGCGTGATGTYCARATRACYCARWC
FIGKV2	ATAACGCGTGATATTGTGATRACSCAGGM
FIGKV3	ATAACGCGTGATATTGTGATRACSCAGGM
FIGKV4	ATAACGCGTGATAYCCAGATGAMMCAGWC
FIGKV5	ATAACGCGTGATGTTGTGRTGACYCARRC
FIGKV6	ATAACGCGTGATGTTCWAATGACCCAGTC
FIGKV7	ATAACGCGTGATGTTSTKYTGACCCAAAC
FIGKV8	ATAACGCGTGACATTVRGMTGWCHCARDC
FIGKV9	ATAACGCGTGACATCCAGATGAMMCARTC
FIGKV10	ATAACGCGTGACATCCAGDYKACHCAVTM
FIGKV11	ATAACGCGTGACATCCWRATGRCWYARYC
FIGKV12	ATAACGCGTGACATCHDGMTGACYCAGTC
FIGKV13	ATAACGCGTGAAAWTGHKCTSAYYSWGTC
FIGKV14	ATAACGCGTGACSTYGTGATGACCCAGWC
FIGKV15	ATAACGCGTGGWRWTGTGMTSAYCMAAWC
FIGKV16	ATAACGCGTCAAATTSTTCTCWCCCAGTC
FIGKV17	ATAACGCGTAACATTGTGMTGACMCARTC
Cadeia Pesada Senso	**Sequencia**
FIGHV1	ATAGCTAGCSAGGTCCAGCTGCAGCAGTCT
FIGHV2	ATAGCTAGCSAGGTCCAGCTGCAGCAATCT
FIGHV3	ATAGCTAGCSAGGTCCAGCTGCAGCAGCCT
FIGHV4	ATAGCTAGCSAGGTBCAGYTGCAGYAGTCT
FIGHV5	ATAGCTAGCSAGGTBAMKCTGVWRSAGTCT
FIGHV6	ATAGCTAGCSAAGTGMAGCTKGWGGAGTCT
FIGHV7	ATAGCTAGCSAGWTYMMKYTGVWRCAGTCT
FIGHV8	ATAGCTAGCCAGGTGCAGCTGVAGSAGWCH
FIGHV9	ATAGCTAGCSAKGTGCAGCTKMAGSAGTCA
FIGHV10	ATAGCTAGCCAGGTCCAACTGCAGCAGCCT
Cadeia Leve Reverso	**Sequencia**
RIGKC	ATATTAATTAAAGTTGGTGCAGCATCAGCC
Cadeia Pesada Reverso	**Sequencia**
RIGHC	ATAGCGCGCAACCAGGGGCCAGTG

Tabela 1. Os primers murinos FIGKV-1 ao 17 e RIGKC foram utilizados para amplificar os genes da cadeia leve. Os primers FIGHV1 ao 10 e RIGHC foram empregados na amplificação dos genes da cadeia pesada.

Cadeia Pesada Senso	Sequencia
FHIGHV 1	ATAACGCGTGAGGTNCAGCTGDHRSAGTC
FHIGHV 2	ATAACGCGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTC
FHIGHV 3	ATAACGCGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTC
FHIGHV 4	ATAACGCGTGAGATGCAGCTGGTGGAGTC
FHIGHV 5	ATAACGCGTGGTGSAGSTGGTGGAGTSYG
FHIGHV 6	ATAACGCGTGTGCCCATTCCCAGGTCCAA
FHIGHV 7	ATAACGCGTCAGATCACCTTGAAGGAGTC
FHIGHV 8	ATAACGCGTCAGCTGCAGCTGCAGGAGTC
FHIGHV 9	ATAACGCGTCCAGGTTCAGCTGTTGCAGC
FHIGHV 10	ATAACGCGTCTGTGTGAAGTTTACTGATG
FHIGHV 11	ATAACGCGTCAAATGCAGCTGGTGCAGTC
FHIGHV 12	ATAACGCGTCGAGTGCAGCTGGTGCAGTC
FHIGHV 13	ATAACGCGTAGGCGCAGCTGGTGGAGGCT
FHIGHV 14	ATAACGCGTTGAGGTACAGCTGGTGGAGT
Cadeia Kappa Leve Senso	**Sequencia**
FHIGKV 1	ATAGCTAGCGAAAYWGTRTTGACRCAGTCT
FHIGKV 2	ATAGCTAGCGACATCCAGATGACCCAGHCT
FHIGKV 3	ATAGCTAGCGATATTGTGATGACCCAGHCT
FHIGKV 4	ATAGCTAGCGATGYTGTGATGACYCARYCT
FHIGKV 5	ATAGCTAGCGCCATCCRGWTGACCCAGTCT
Cadeia Leve Reverso	**Sequencia**
RIGKC	ATATTAATTAAAGTTGGTGCAGCATCAGCC
Cadeia Pesada Reverso	**Sequencia**
RIGHC	ATAGCGCGCAACCAGGGGCCAGTG

Tabela 2. Os primers FHIGHV-1 ao 14 e RIGHC foram utilizados para amplificar os genes da cadeia pesada humana. Os primers FHIGKV1 ao 5 e RIGKC foram empregados na amplificação dos genes da cadeia leve

Construção do Vetor para expressão de anticorpos ScFv

A região promotora, sítios de clonagem e região terminadora foram sintetizadas pela empresa IDT® (Integrated DNA Technologies) e amplificadas com os *primers*: GAATTCAGTCTAAGCCTAGCGTAG e GGATCCGCATACGGCTTATGCGCA. O amplicon de 1500pb foi purificado e digerido com as enzimas EcoRI e BamHI por 2 horas a 37ºC e clonado no vetor pBLUESCRIPT e pG8SAET.

Produção de Fagos

10 ml da Cepa de E.coli XL1 transformadas com o vetor pCG3Sv foram cultivadas até DO 1.0 em meio LB com Ampicilina 100µg/µl. As bactérias foram infectadas com Helper Phage M13KO7 por 15 minutos. 190 ml de meio LB com Ampicilina 100µg/µl e Kanamicina 100µg/µl e cultivados por 16 horas. Para a precipitação de fagos foi realizada uma centrifugação a 5500g por 20 minutos e desprezado o pellet de bactérias. Ao sobrenadante foi adicionado a solução de PEG/NaCl no volume de 15%. Os fagos foram ressuspendidos em 1ml de tampão PBS.

Western Blot

Os fagos expressando o anticorpo Trastuzumab foi resolvido em gel de poliacrilamida 12% 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). Anticorpo Anti-E

tag na diluição de 1:1000 foi incubado por 16 horas a 4°C 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.

Ensaio de ligação do anticorpo Trastuzumab

HER2 (1ng/µl) foi adsorvido em placa *multiwell* por 16 horas a 4°C. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com BSA 1% em PBS (Tampão Fosfato-Salino) por 2 horas a 37°C. Após lavagem com PBST 0,05% foi adicionado 10^9 fagos com Trastuzumab ou fagos *Helper Phage* por 1 hora a 37°C. Seguido por nova lavagem com PBST foi adicionada 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.

Preparação de bactérias eletrocompetentes

Uma colônia isolada de *E. coli* XL1-Blue foi inoculada em 50 mL de meio SOB e a cultura foi incubada por 16 horas a 37°C. A cultura foi diluída (20 mL da cultura inicial em 2 L de meio) e incubada a 37°C até atingir OD_{600}=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 ressuspendidas em 1L 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 ressuspendida em 1 ml de água estéril e utilizada imediatamente na eletroporação.

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. Construção dos Vetores

A técnica do PCR de *Overlap extension* (SOE-PCR) é rotineiramente utilizada para unir as cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas para a produção de bibliotecas de anticorpos. Esse método, apesar de ser muito utilizado, apresenta uma baixa eficiência, reduzindo o rendimento e pode, ainda, resultar na amplificação de amplicons, reduzindo o repertório da biblioteca. Outro problema do PCR de *overlap* é a geração de um número significativo de produtos codificando proteínas truncadas, que por estarem em passos de leituras errados, não contém a fusão com a proteína pIII e não são incorporadas na partícula viral. Novamente, isto resulta numa redução da diversidade da biblioteca. Observamos isto durante o meu trabalho de mestrado (GOMES, 2013). Durante o projeto de mestrado e de doutorado, observamos que o SOE-PCR não é muito reprodutível. Tivemos bastante dificuldade e obter resultados consistentes com esta técnica. Assim, para contornar esse problema, optamos por desenvolver um novo vetor para construir bibliotecas de *phage display* de anticorpos no formato *single-chain*, sem a necessidade de extensão *Overlap*.

O vetor foi desenhado para que as cadeias de Ig VH e VL sejam clonadas diretamente no vetor em frame com a região que codifica para o um *linker* de Glicina e Serina que irá unir as regiões variáveis, produzindo o fragmento ScFv. Além disso, os vetores possuem dois promotores, um constitutivo Lac e um promotor T7. Este último é específico para a enzima T7 RNA polimerase, que possui uma processividade maior do que a RNA polimerase de *E. coli* e, portanto, poderá ser

utilizada em bactérias que possuem o sistema T7 para expressão (por exemplo, Rosetta BL21, que suplementa códons raramente utilizados pela bactéria). Devida a alta especificidade do promotor T7, expressões basais de genes sob controle deste promotor são extremamente baixas em cepas que não possuem esta RNA polimerase. Com este sistema, portanto, poderemos aumentar a expressão de imunoglobulinas em *E. coli*. Para isto, foi incluído um códon de parada (amber, TAG) entre as regiões que codificam a porção ScFv e a proteína pIII. Isto permite produzir a proteína ScFv sem a fusão com a proteína pIII em cepas de bactérias não supressoras (p.ex., BL21).

Para a construção do vetor, utilizamos como base o plasmídeo pBluescript (Figura 10). Ele foi modificado com técnicas básicas de biologia molecular de forma que a região contendo o *polylinker* e codificando o peptídeo α da beta-galactosidase foi substituído pela região contendo os elementos mencionados. Preservamos o promotor Lac encontrado no vetor. Como os fragmentos de anticorpos ScFv precisam ser enovelados com o auxílio de pontes de dissulfeto, os mesmos devem ser direcionados para o periplasma da bactéria utilizando sequências sinais já bem caracterizadas. No nosso vetor para produção de fragmentos ScFv, utilizamos a sequência sinal da proteína OmpA (CHEN, et al 1980).

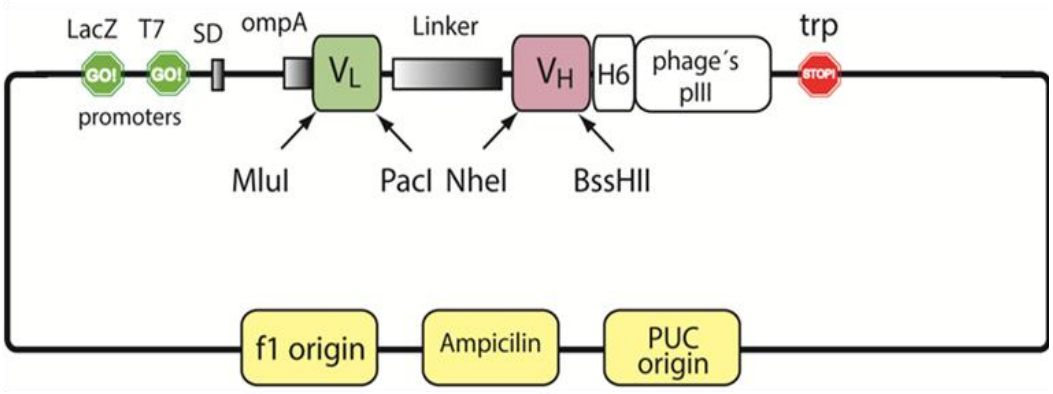


Figura 10. Construção dos novos vetores Phagemid. A região de clonagem para ScFv foi construída em um vetor pBluescript e possui um promotor constitutivo lacZ e um promotor T7, região de ligação do ribossomo (SD), peptídeo de direcionamento ao periplasma (ompA), duas regiões de clonagem para os fragmentos variáveis V_L e V_H cada uma com duas enzimas de restrição. A cadeia ScFv fará fusão com um tag de HA e com a proteína pIII codificada pelo gene III do fago.

4.1.1. As cadeias leve e pesada dos anticorpos *single-chain* são unidas por um *linker* com os aminoácidos glicina e serina

O tamanho dos peptídeos que unem as cadeias leve e pesada difere conforme o sistema utilizado, variando de 8 até 20 aminoácidos. Sabemos que *linkers* curtos favorecem a formação de dímeros, enquanto que *linkers* mais longos tendem a formar monômeros (BARBAS, C. et al, 2001). Para a construção deste vetor para expressão de moléculas ScFv escolhemos o mais longo *linker* de 20 aminoácidos que possui a sequência quatro repetições de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser $(G_4S)_4$ (Figura 11).

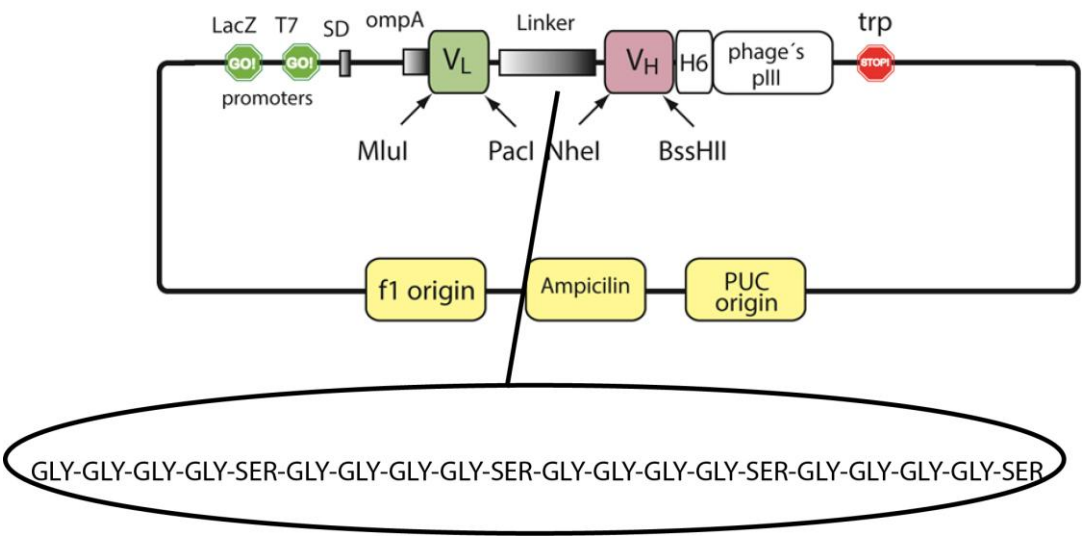


Figura 11. O linker do vetor para expressão de ScFv possui 20 aminoácidos. O vetor para expressão de fragmentos *single-chain* possui um *linker* constituído por 4 grupos de repetições Glicina e Serina $(G_4S_1)_4$ entre as cadeias V_L e V_H.

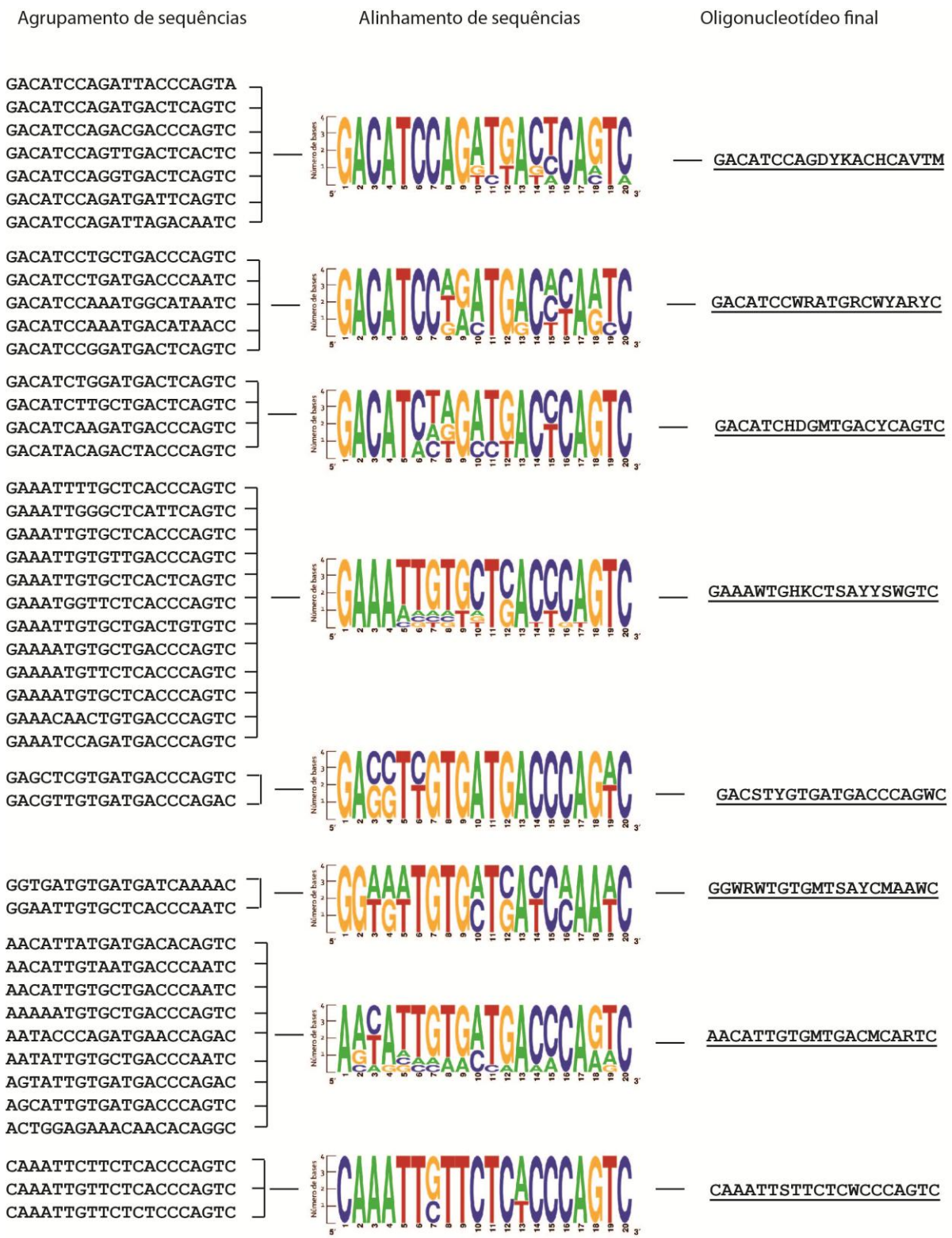
4.2. Construção dos primers

Para a construção de uma biblioteca de anticorpos é essencial termos oligonucleotídeos específicos e que amplifiquem o máximo do repertório imune. Como o repertório de imunoglobulinas é muito grande (estimado na ordem de 10^{12} anticorpos diferentes), os *primers* necessários para amplificar as sequências geradas são degenerados para que cada oligonucleotídeo amplifique um grupo maior de sequências. Porém, em humanos, este repertório é produzido a partir de 272 genes de cadeia pesada e 168 de cadeia leve humanas. Apesar da disponibilidade de *primers* descritos na literatura, observamos no trabalho desenvolvido durante o mestrado, que muitos produziram amplicons de ScFv com passo de leitura errados. Isto porque, na época, utilizamos um conjunto de primers que foi desenhado antes de todos os grandes avanços da genômica e,

principalmente, das novas metodologias de sequenciamento em larga escala. Houve, portanto, nas últimas décadas, um avanço significativo no número de genes de imunoglobulinas identificados. Assim, como muitos dos oligonucleotídeos descritos na literatura foram configurados há quase 20 anos, quando os bancos de dados ainda não eram tão completos como os de hoje, optamos por desenhar um novo conjunto de oligonucleotídeos para amplificar as regiões variáveis de imunoglobulinas humanas e de camundongos. Desta forma, nossos vetores poderão ser utilizados tanto para a produção de bibliotecas humanas *naïve* como hiperimunes murinas.

Para desenhar os oligonucletídeos, utilizamos a região *Framework* 1 para os *primers* senso, e os *primers* reverso foram colocados no início da região constante. As sequências correspondentes aos diferentes genes de Ig depositadas no banco de dados VBASE2 foram recuperadas. No total, utilizamos 650 genes de cadeia pesada e 206 de cadeia leve murinas, e 272 genes de cadeia pesada e 168 de cadeia leve humanas. As sequências destes genes foram alinhadas e agrupadas por similaridade utilizando a plataforma UGENE (http://ugene.unipro.ru/). O alinhamento gerou diversos grupos de genes, e cada grupo deu origem a 2 ou 3 *primers*. Para padronizar os *primers* gerados respeitamos um limite de 4 bases degeneradas e 3 *mismatches*. No total, obtivemos 17 primers senso (FIGKV1-17) para as cadeias leves e 10 primers senso (FIGHV1-10) para as diferentes cadeias pesadas (Figura 12 e 13).

Figura 12. Construção dos *primers* da cadeia leve. As sequências de cadeia leve (206 no total) foram alinhadas a agrupadas por similaridade. Cada grupo deu origem de 2 a 3 *primers.* Respeitamos um limite de 4 bases degeneradas e 3 *mismatches*. No total, obtivemos 17 primers senso para cadeia leve.



Continuação da Figura 12

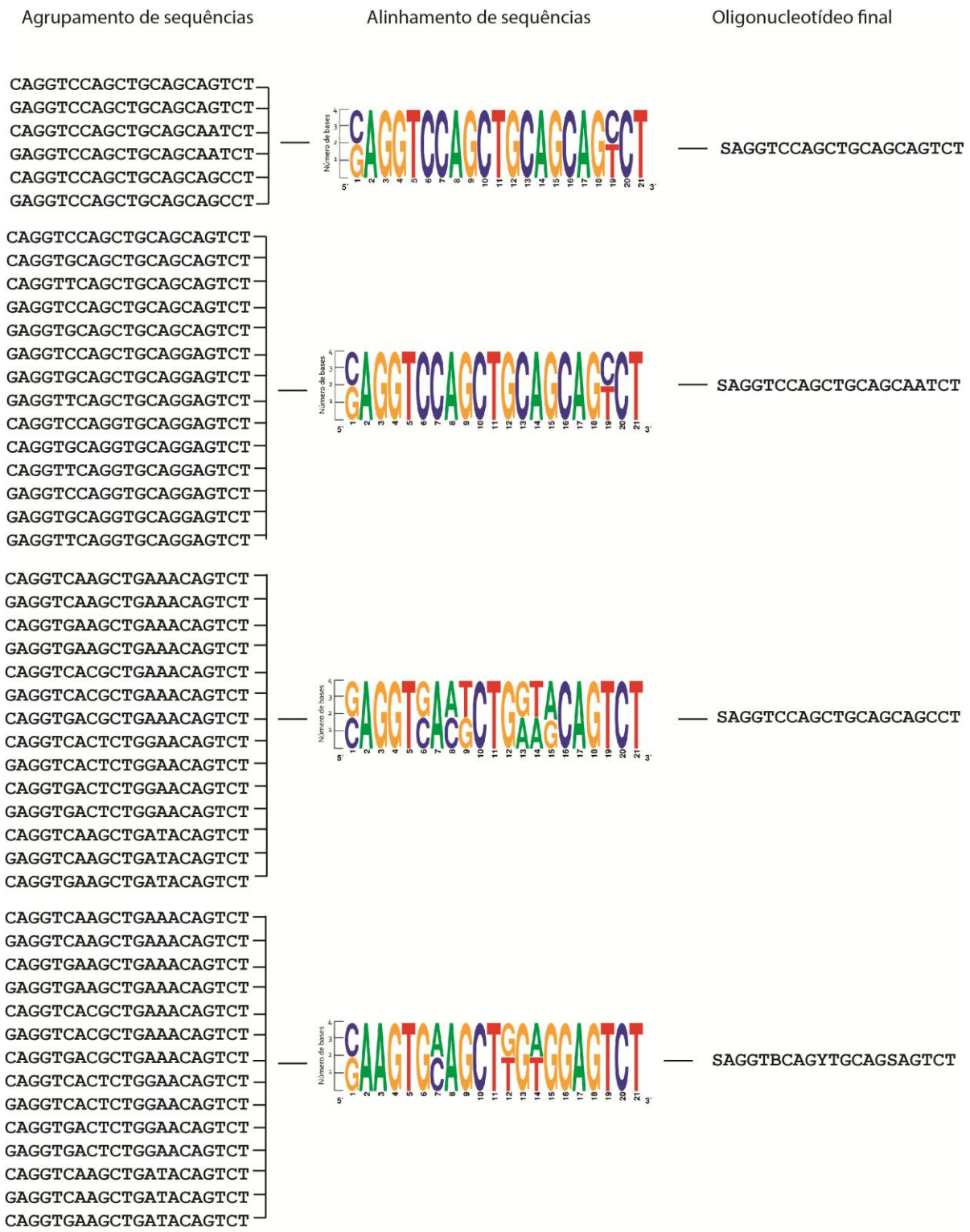


Figura 13. dos *primers* da cadeia pesada. As sequências de cadeia pesada (650 no total) foram alinhadas a agrupadas por similaridade. Cada grupo deu origem de 2 a 3 *primers.* Respeitamos um limite de 4 bases degeneradas e 3 *mismatches*. No total, obtivemos 10 primers senso para cadeia pesada.

Diferentemente de outros conjuntos de *primers* descritos na literatura (BARBAS, et al, 2001; MARKS, et al, 2004), que utilizam a região J das cadeias VL e VH para desenhar os *primers* reversos, optamos por deslocar nosso *primer* reverso para o início da região constante C_{H1} (Figura 14). Por utilizarem uma região menos conservada, estes pesquisadores propõem o uso de 3, 4 e até mesmo 6 *primers* reversos. Deslocar o *primer* reverso para a região constante permitiu que utilizássemos apenas 1 *primer* reverso para amplificar todo repertório imune. Isto diminui o número de reações de PCR e torna, na prática, nosso protocolo mais conciso.

Interessante ainda observar que mesmo a cadeia pesada sendo a que apresenta o maior número de genes, o seu *Framework* 1 possui uma variabilidade menor comparado com os genes de cadeia leve. Isso explica o menor número de *primers* senso gerado para a cadeia pesada.

```
CH1
murino      AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLES
humano      ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
            *.*. ***:****.* : :.. .:******.********:****:*:**********:*

CL
mouse       RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD
human       RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
          *  *** * ***** *** ** ***** ******    * ** *          * * **
```

Figura 14. **Regiões constantes CH1 e CL humanas e murinas.** Regiões do domínio constante (em destaque) que deram origem aos *primers* reversos RIGKC (leve) e RIGHC (pesada).

4.3. Enzimas de restrição são importantes para manter o repertório de sequências amplificadas

Outro aspecto essencial para a geração de uma biblioteca representativa são as enzimas de restrição utilizadas. Notamos que a grande maioria dos vetores disponíveis utilizam enzimas que são encontradas com frequência dentro dos genes de imunoglobulinas humanas e murinas (V_H e V_L). Isto significa que ao construir uma biblioteca, um número significativo de genes de Ig será perdido uma vez que durante a clonagem no vetor, os mesmos serão clivados pelas enzimas de restrição utilizadas. Para minimizar a fragmentação destes produtos, e assim, a diminuição da representatividade das bibliotecas produzidas, buscamos nos bancos de dados enzimas que não clivam (ou clivam o menor número possível) de genes de imunoglobulinas na sua região variável. Demos ênfase para os genes de Ig humanas que são os principais alvos para produção de bibliotecas com aplicação biotecnológica. Para a clonagem no vetor formato ScFv foi necessário escolher quatro enzimas que não apresentam sítios nas sequências das regiões variáveis tanto murinas quanto humanas. Para tal, com o auxílio do Dr. André Reis Teixeira, foi desenvolvido um programa em PERL de análise das sequências de imunoglobulinas. Através desse programa foi possível analisar quantas sequências de imunoglobulinas contém cada enzima de restrição (Figura 15). Com estas informações em mãos, determinamos as quatro melhores enzimas para incluir no nosso vetor. As enzimas escolhidas foram MluI e PacI (para V_L) e NheI e BssHII (para V_H). Essas foram selecionadas porque as sequências dos genes de Ig humanas não apresentam nenhum sítio de restrição. Apenas a enzima NheI cliva

seis genes de Ig murinas mas foi escolhida por não cortar nenhuma sequência humana (Figura 15).

Há ainda outro aspecto que nos fez centralizar a escolha das enzimas nas imunoglobulinas humanas. As bibliotecas humanas são geradas a partir do repertório de anticorpos encontrado em doadores não imunizados contra o antígeno de interesse; são, portanto, bibliotecas *naïve*, que necessitam do maior número possível de anticorpos para a seleção. Já, no caso de bibliotecas murinas podemos utilizar animais imunizados com o antígeno de interesse, o que aumenta a presença e diversidade de anticorpos na biblioteca. Assim, mesmo que alguns sejam fragmentados pelas enzimas, ainda teremos um repertório bastante vasto para explorar. Porém, é importante ressaltar que durante a maturação de afinidade dos anticorpos produzidos ao longo de uma resposta imune, há o processo de hipermutação somática. Desta forma, não podemos descartar que alguns genes modificados por este processo, poderão apresentar sítios de restrição para estas enzimas e serem perdidos durante a produção da biblioteca.

A

	Human - IGHV	
MluI	ACGCGT	0
BssHII	GCGCGC	0
NheI	GCTAGC	0
PacI	TTAATTAA	0
NotI	GCGGCCGC	0
SalI	GTCGAC	0
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	0
XhoI	CTCGAG	0
EcoRV	GATATC	2
KpnI	GGTACC	3
SpeI	ACTAGT	5
XbaI	TCTAGA	6
NdeI	CATATG	10
HindIII	AAGCTT	11
SmaI	CCCGGG	11
NcoI	CCATGG	12
EcoRI	GAATTC	15
SacI	GAGCTC	37
BamHI	GGATCC	46

	Human - IGKV	
MluI	ACGCGT	0
BssHII	GCGCGC	0
NheI	GCTAGC	0
PacI	TTAATTAA	0
NotI	GCGGCCGC	0
SalI	GTCGAC	0
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	0
XhoI	CTCGAG	4
EcoRV	GATATC	2
KpnI	GGTACC	53
SpeI	ACTAGT	0
XbaI	TCTAGA	1
NdeI	CATATG	0
HindIII	AAGCTT	3
SmaI	CCCGGG	1
NcoI	CCATGG	1
EcoRI	GAATTC	11
SacI	GAGCTC	3
BamHI	GGATCC	3

B

	Mouse - IGHV	
MluI	ACGCGT	2
BssHII	GCGCGC	0
NheI	GCTAGC	5
PacI	TTAATTAA	0
NotI	GCGGCCGC	0
SalI	GTCGAC	3
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	0
XhoI	CTCGAG	17
EcoRV	GATATC	118
KpnI	GGTACC	3
SpeI	ACTAGT	14
XbaI	TCTAGA	26
NdeI	CATATG	36
HindIII	AAGCTT	32
SmaI	CCCGGG	2
NcoI	CCATGG	81
EcoRI	GAATTC	23
SacI	GAGCTC	96
BamHI	GGATCC	54

	Mouse - IGKV	
MluI	ACGCGT	0
BssHII	GCGCGC	0
NheI	GCTAGC	1
PacI	TTAATTAA	0
NotI	GCGGCCGC	0
SalI	GTCGAC	0
SfiI	GGCCNNNNNGGCC	0
XhoI	CTCGAG	2
EcoRV	GATATC	21
KpnI	GGTACC	81
SpeI	ACTAGT	1
XbaI	TCTAGA	7
NdeI	CATATG	1
HindIII	AAGCTT	13
SmaI	CCCGGG	1
NcoI	CCATGG	10
EcoRI	GAATTC	5
SacI	GAGCTC	3
BamHI	GGATCC	28

Figura 15. Enzimas de restrição escolhidas para a clonagem. Das sequências murinas analisadas a enzima MluI corta apenas 2 e a enzima NheI corta 6 sequências (B), mas, para as sequências humanas, as enzimas não cortam nenhuma sequência (A).

4.4. Todos os *primers* desenvolvidos amplificam sequências de IgG

Uma vez desenhados, testamos os *primers* desenvolvidos neste estudo. Dada a dificuldade para obtenção de amostras de RNA de linfócitos humanos, limitamos nosso estudo aos *primers* murinos. A amplificação das sequências de Ig mostrou-se bastante eficiente. Todos os *primers* desenhados para amplificar genes de cadeia leve e pesada funcionaram. Este resultado indica uma ótima eficiência dos *primers* desenhados, o que deve garantir a amplificação da diversidade do repertório de Ig presentes no cDNA produzido a partir do RNA do baço murino. Alguns *primers* (7, 8, 10, 13 e 15) produziram amplicons em menor quantidade. Isto pode ser devido a abundância dessas sequências no repertório imune ou a uma menor eficiência destes *primers* (Figura 16).

Para comparação, incluímos o resultado obtido da amplificação do repertório de Ig murinas utilizando os *primers* desenhados por Carlos Barbas (Barbas, 2001), que utilizamos durante o projeto de mestrado (Figura 17). Observa-se que várias combinações de *primers* não resultam em amplicons.

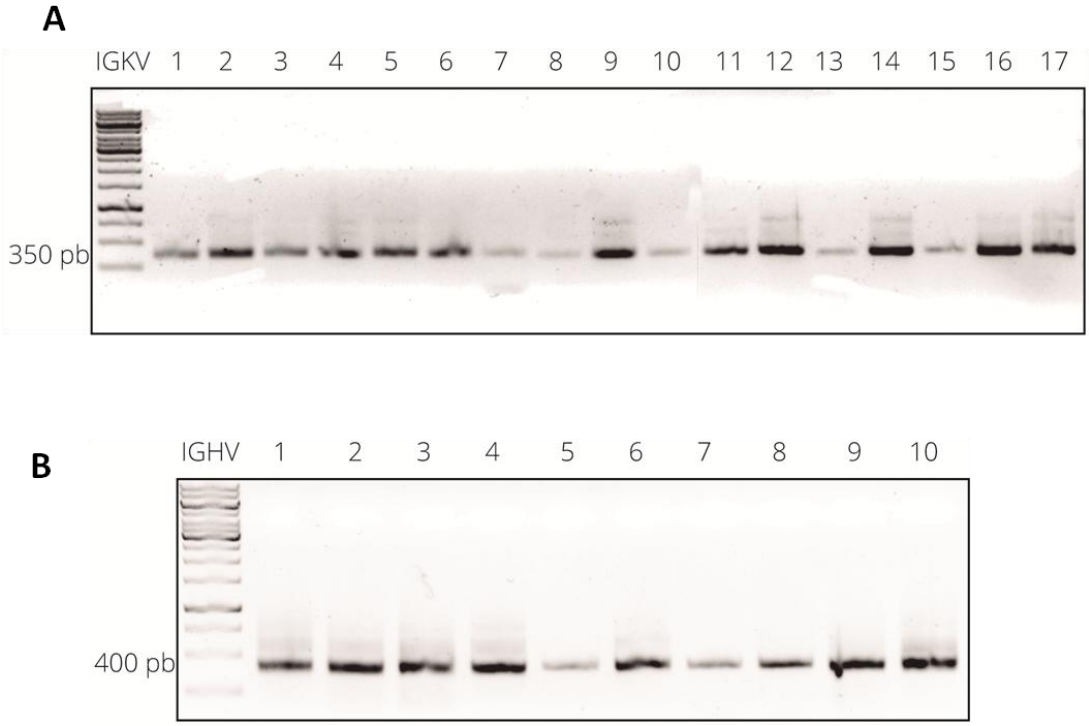


Figura 16. Amplificação das regiões variáveis V_L e V_H. (A) Amplificação das cadeias leves de imunoglobulina a partir do cDNA. Os primers FIGKV1 ao 17 geraram amplicoins de 350pb.. (B) Amplificação das regiões variáveis da cadeia pesada. Os primers FIGHV1 ao 10 amplificaram sequências de 400pb.

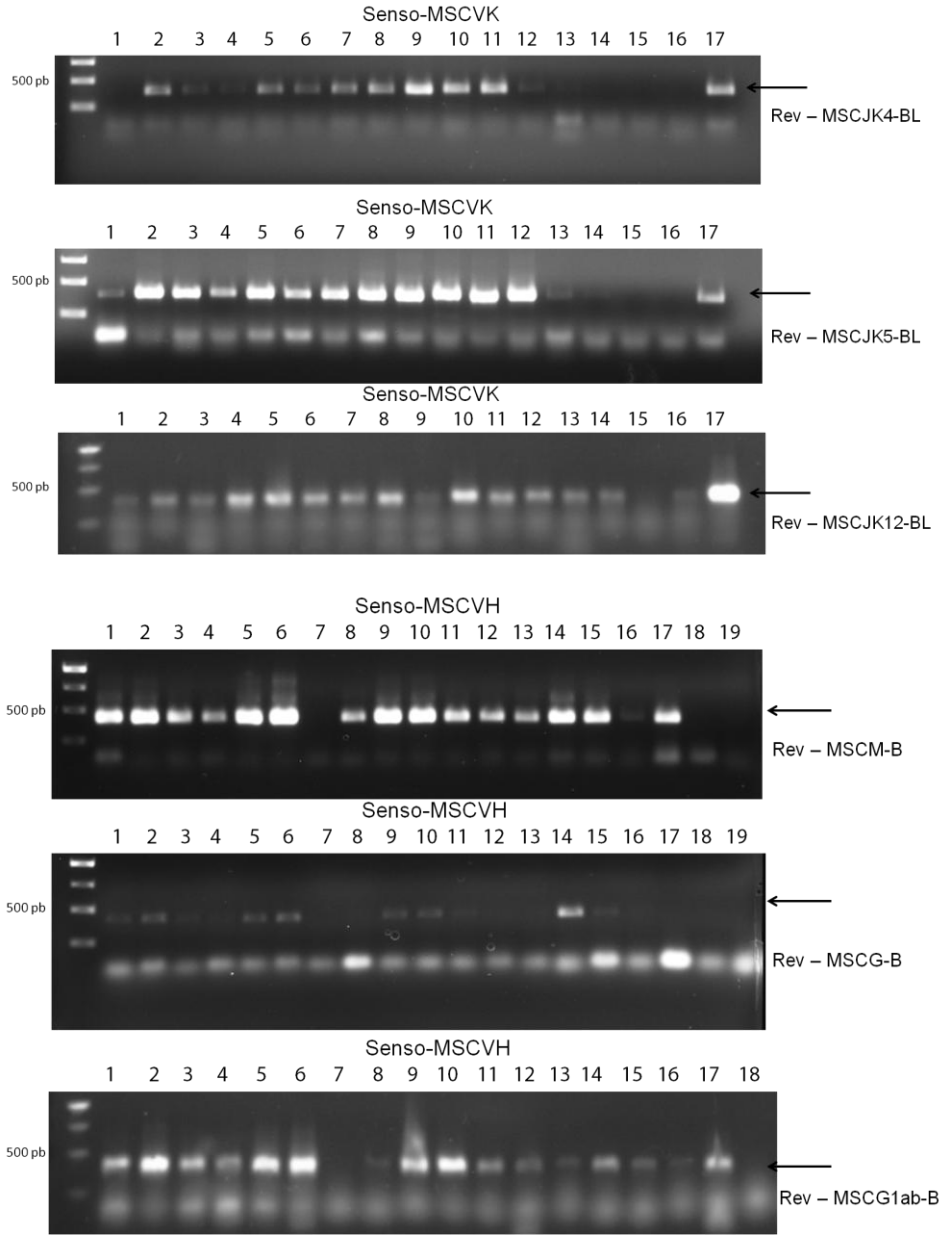


Figura 17. Amplificação das cadeias leve (VL) e pesada (VH) descrito por Barbas et al, 2001. Produtos das diferentes reações realizadas utilizando diferentes combinações de primers senso e reverso. Os primers senso estão indicados pelos números de 1 a 19, que correspondem as primers MSCVK1 a 17 (cadeia 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).

4.5. As sequências analisadas estão no frame correto de leitura

Uma das principais motivações para a produção de um novo conjunto de *primers* para amplificar o repertório de Ig foi a possibilidade de obtermos genes V_H e V_L no frame correto. Assim, com o objetivo de avaliarmos o *frame* de leitura correto das imunoglobulinas amplificadas e a diversidade das sequências, foi realizado o sequenciamento de 18 amplicons V_L (cadeia leve) e 14 amplicons V_H (cadeia pesada) totalizando 32 amplicons analisados. Todos os amplicons obtidos apresentaram-se no *frame* de leitura correto e não possuem códon de parada, indicando que as sequências amplificadas estão prontas para a clonagem no vetor e produção da biblioteca. Além disso, os clones analisados não possuem sequências repetidas, indicando uma boa diversidade do repertório de genes de imunoglobulina (Figura 18), embora nossa amostragem seja bastante pequena. Enfim, estes resultados sugerem que utilizando os novos *primers* que desenhamos e o vetor contendo o *linker* de GS_4, que dispensa o uso do PCR de *overlap*, nossas bibliotecas deverão conter um número maior de clones no passo de leitura correto.

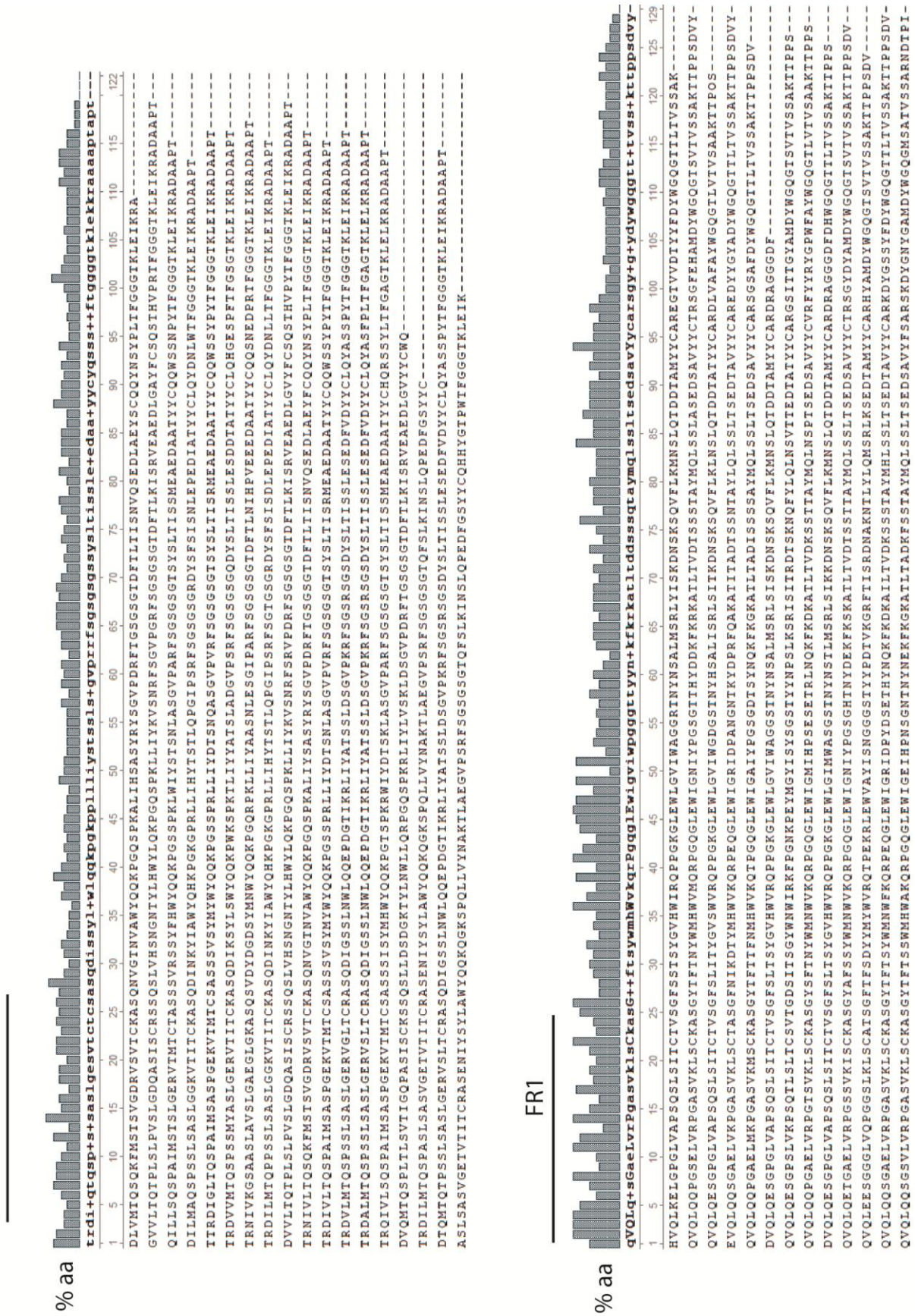


Figura 18. Sequenciamento dos clones das cadeias leve e pesada. Foram sequenciados 18 clones da cadeia leve e 14 clones da cadeia pesada. Todos os clones possuem sequências que correspondem a sequências de imunoglobulinas murinas e não são repetidas.

4.6. Construção do vetor pG8SAET

Duas proteínas são comumente utilizadas para a construção de bibliotecas de *phage display*: proteína pIII e a proteína pVIII. A proteína pIII é expressa com menor número de cópias na partícula viral (de 1 a 5 cópias), enquanto que a fusão da proteína exógena (no nosso caso, o fragmento de anticorpo) com a proteína pVIII resulta na apresentação de um número bem maior de cópias (centenas de cópias, utilizando o sistema do *phagemid*) (HENRY, et al, 2015). Por isso, resolvemos modificar o vetor produzido para permitir a construção dos dois tipos de bibliotecas. Além do vetor desenvolvido para expressão de ScFv em fusão com a proteína pIII, construímos um novo vetor para expressão de ScFv em fusão com a proteína pVIII. Neste caso, utilizamos o vetor pG8SAET (ZHANG, et al, 1999) como base. Este vetor utiliza o promotor do gene da proteína-A do *Staphylococcus aureus* e o terminador do gene *trp* de *E. coli*. O vetor pG8SAET não apresenta sítios de restrição para as enzimas utilizadas (BssHII, MluI, NheI e PacI), o que permitiu a simples transferência da região codificando o linker de Glicina e Serina e os sítios de restrição para clonagem dos genes V_H e V_L. Limitamos-nos a produzir o vetor para produção de fragmentos ScFv. Como o vetor pG8SAET contém a sequência sinal da proteína-A do *S. aureus* que direciona o ScFv para o periplasma, não foi preciso transferir a região codificando o peptídeo sinal da proteína OmpA. Com isto, produzimos o vetor pCG8Sv.

Para testar se o vetor produzido permite a expressão de anticorpos na proteína pVIII, clonamos as regiões variáveis V_H e V_L do anticorpo monoclonal Trastuzumab, que reconhece o antígeno HER2, no vetor pCG8Sv. O vetor foi sequenciado para confirmar o passo de leitura e a ausência de mutações. Observamos em Western-blot utilizando anticopor anti-E-Tag a presença de uma proteína de 35 kDa, peso

molecular esperado para o fragmento ScFv do Trastuzumab fusionado à proteína pVIII (Figura 19).

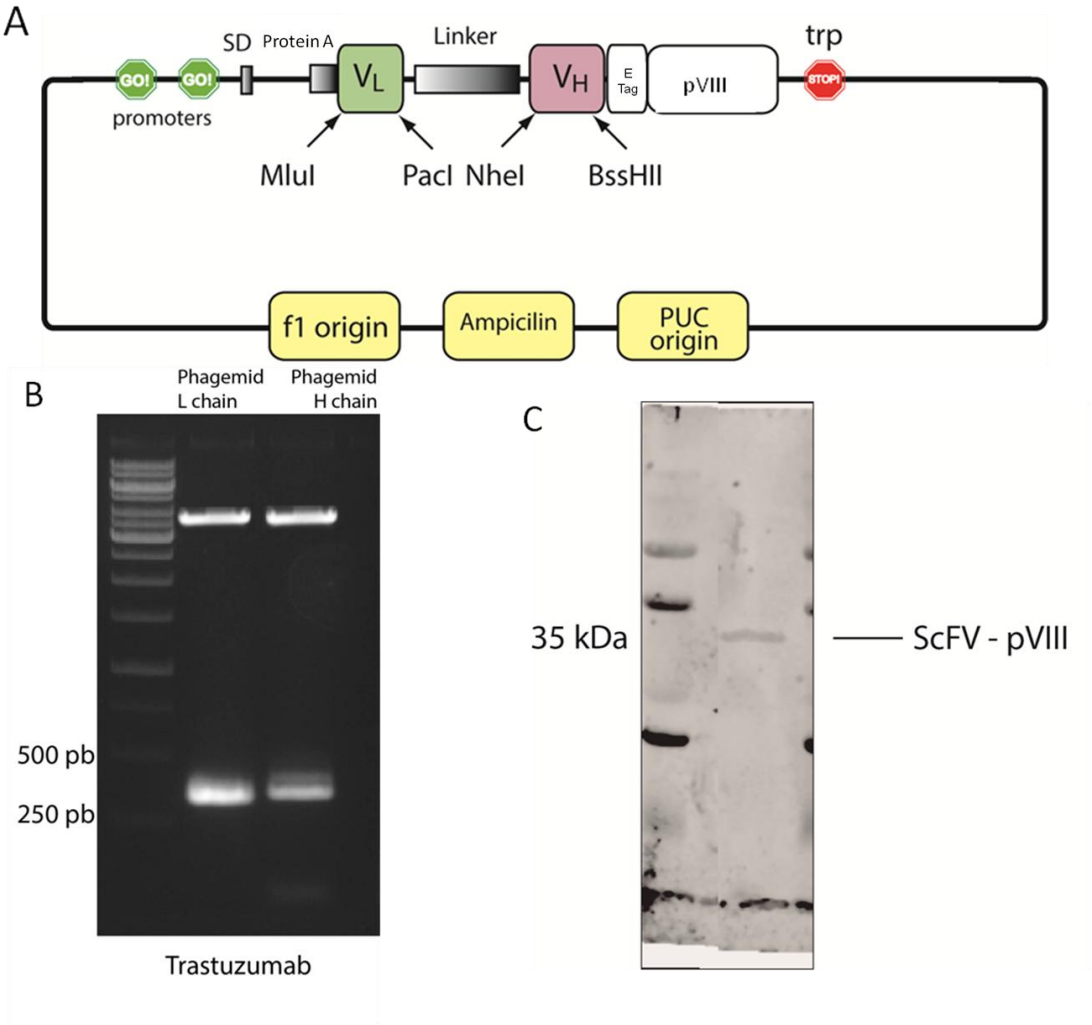


Figura 19. Construção de um novo vetor Phagemid para expressão de anticorpos *single-chain* em fusão com a proteína pVIII. (A) Região de clonagem de fragmentos ScFv no vetor pG8SAET. (B) Clonagem da cadeia leve e pesada do anticorpo Trastuzumab no vetor pG8SAET. (C) Expressão do anticorpo ScFv Trastuzumab no fago M13KA07. 10^{10} TU de fagos expressando Trastuzumab *single-chain* foram analisados por SDS-PAGE, seguido de *Western-blot* utilizando anticorpo anti-E tag.

4.7. O anticorpo testado Trastuzumab é uma molécula funcionalmente ativa

Além da expressão, é importante avaliarmos se os anticorpos produzidos por este sistema são funcionais, ou seja, se as moléculas são formadas na configuração correta para reconhecer o antígeno específico. Para isso, utilizamos o fago expressando o anticorpo Trastuzumab para realizar um ensaio de ligação ao seu antígeno, o receptor HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Foi demonstrado que o Trastuzumab pode ser convertido em ScFv e manter sua capacidade de ligação ao HER2 (KIKUCHI et al., 2017).

Células de *E. coli* foram transformadas com o vetor pCG8Sv-Trastuzumab para produção de fagos expressando o fragmento ScFv do Trastuzumab. Como controle, utilizamos os fagos produzidos pelo *helper phage*, que não apresentam fusão com a proteína pVIII. Os fagos foram incubados com HER2 ou BSA imobilizado em placa e o número de fagos ligados quantificados por FLISA. Observamos ligação aumentada dos fagos expressando o ScFv do Trastuzumab ao HER2, comparado com os controles (Figura 20).

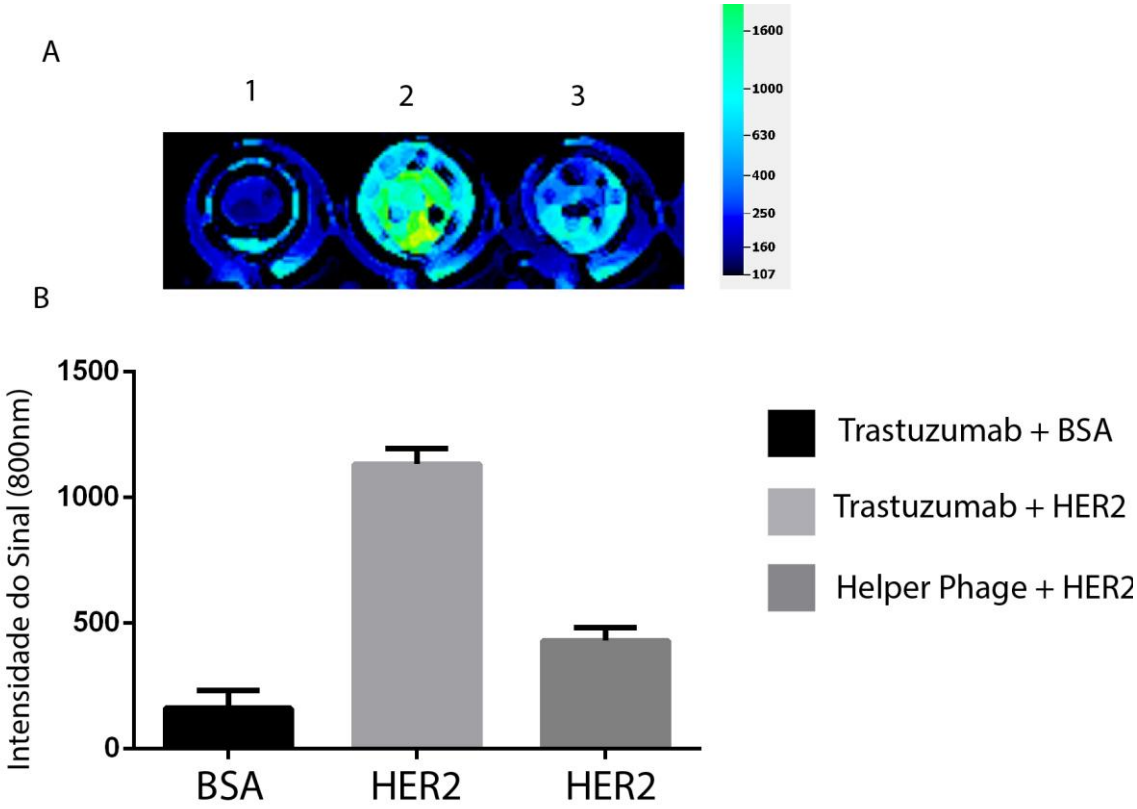


Figura 20. Ensaio de ligação do anticorpo Trastuzumab. (A) Intensidade da ligação Trastuzumab-BSA (1), Trastuzumab –HER2 (2) e *Helper Phage*-HER2 (3) por ensaio de ligação. (B) Quantificação do ensaio de ligação. Fagos (10^{10} TU) expressando Trastuzumab ou *Heper Phage* foram adicionados a placa contendo o receptor HER2 (50ng).

4.8. Construção da biblioteca da biblioteca de ScFv anti-VEGF

No trabalho desenvolvido durante o mestrado (GOMES, 2013) produzimos uma biblioteca hiperimune de fragmentos ScFv murinos anti-$VEGF_{188}$. Porém, como mencionamos, nossa biblioteca apresentou uma quantidade muito grande de fragmentos truncados e no passo de leitura errado. Para produzir uma nova biblioteca no vetor pCG3Sv, utilizamos o mesmo cDNA produzido anteriormente e aproveitamos para comparar a amplificação dos amplicons obtidos com o novo conjunto de *primers* que desenhamos, com os *primers* antigos desenhados por Carlos Barbas e colaboradores (BARBAS, et al, 2001). No nosso caso, temos

apenas um *primer* reverso para os genes V_H e V_L, diferentemente do conjunto desenhado por Barbas e colaboradores, que conta com 3 *primers* para cada.

Após a preparação do inserto e do vetor realizamos primeiro ensaios de ligação da cadeia leve (V_L). Diferentes relações equimolares vetor:inserto foram incubadas com T4 DNA ligase em tampão apropriado e transformadas em *E. coli* XL-1blue.

Utilizando as condições predeterminadas de 1:3 (vetor:inserto), construímos a biblioteca a partir de 5 µg de ScFv e 10 µg do vetor pCG3Sv, ambos digeridos com as enzimas de restrição MluI e PacI. O produto da ligação foi então transformado em *E.coli* cepa XL-1blue eletrocompetente, porém, ao final, obtivemos apenas 10^2 transformantes, um número muito baixo para uma biblioteca imune. Estes testes foram repetidos pelo menos mais duas vezes, com resultados semelhantes.

5. Discussão

A tecnologia do *Phage Display* é de grande importância para a indústria biotecnológica e farmacêutica, pois permite o desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos. Um exemplo é o biofármaco HUMIRA® (Adalimumab), o primeiro anticorpo humano aprovado pelo FDA e o mais vendido no mundo (PHILIPPIDIS, 2017). No entanto, a técnica apresenta diversos obstáculos que limitam sua realização em laboratórios. Uma das grandes dificuldades é a construção de bibliotecas de alta diversidade. Para isso, as reações de PCR das cadeias de imunoglobulina devem amplificar o maior número de moléculas possíveis. Para formar as estruturas ScFv ou Fab, o PCR de *Overlap* é importante e mais um fator limitante.

Nosso trabalho contribui para aprimorar a técnica e remover alguns destes fatores limitantes. Desenvolvemos um novo vetor para a produção de bibliotecas de phage display que eliminamos a necessidade do PCR de *overlap*, clonando diretamente os amplicons das regiões variáveis VL e VH no vetor. Outro fator importante é o número de *primers* utilizados. No nosso caso, obtivemos um número menor, comparando com conjuntos de *primers* de outros trabalhos descritos (BARBAS, et al, 2001; MARKS, et al, 2004), sendo que todos geraram amplicons. Isso é importante, visto que, nem todos os *primers* descritos por Carlos Barbas resultam em amplicons (GOMES, 2013).

Outra otimização importante proposta neste novo sistema é a escolha das enzimas de restrição baseada na frequência dos sítios nas cadeias de Ig. Observamos que muitos dos vetores descritos na literatura e comumente utilizados para a produção de bibliotecas usam enzimas que cortam genes de imunoglobulina humana. Por exemplo, a enzima PstI, utilizada em vários vetores da série pHAL

corta 177 genes humanos de cadeia leve e 12 de cadeia pesada (QI, et al, 2012). Outra enzima KpnI utilizada no vetor pDAN5 corta 53 genes humanos de cadeia leve e 3 de cadeia pesada (SBLATTERO, D. et al, 2000). Portanto, o nosso vetor, neste aspecto, é o melhor otimizado para clonagem de genes de Ig humanos.

Infelizmente tivemos muita dificuldade em detectar os anticorpos nos fagos, provavelmente, pela baixa expressão dos fragmentos com a proteína pIII. Esta é uma característica importante do sistema, uma vez que a expressão elevada de pIII é tóxica para a bactéria. Uma hipótese que levantamos é devido ao sistema *Phagemid*, que utiliza a proteína pIII, gerar poucas cópias do anticorpo por fago e grande parte dos fagos produzidos não apresentam pIII fusionada com o fragmento ScFv de anticorpo. Porém, não podemos descartar problemas com o desenho da nossa região promotora, que combinou os promoteres Lac e T7 em "tandem". Ao construirmos o vetor utilizamos como base o vetor pBluescript, no qual, redesenhamos toda a região promotora Lac e inserimos também o promotor T7, portanto, essa configuração poderia ter prejudicado a eficiência do promotor Lac e inibido a produção do fragmento ScFv. Por isso, construímos outro vetor, baseado no plasmídeo pG8SAET que utiliza a fusão à proteína pVIII. Os fagos produzidos com este vetor apresentam mais cópias de anticorpos do que pelo sistema que utiliza a proteína pIII. O vetor pG8SAET utiliza o promotor de proteína-A de *S.aureus* e, neste caso, conseguimos detectar a expressão do *single-chain* Trastuzumab e confirmamos sua funcionalidade pelo ensaio de ligação ao receptor HER2. Entretanto, estes resultados não provam que o nosso promotor Lac+T7 não funciona. Seria necessária a presença de um Tag-molecular para confirmar que o ScFv não está sendo produzido no vetor pCG3Sv.

Outro problema enfrentado foi a clonagem dos amplicons nos novos vetores para a produção da biblioteca. A ligação em larga escala não resultou em um alto número de transformantes. Levantamos a hipótese de que a enzima PacI não seja ideal para este método. Essa enzima produz uma extremidade protuberante de apenas 2 nucleotídeos (AT), o que poderia resultar em uma extremidade pouco coesiva, atrapalhando clonagens em larga escala (produção de $>10^8$-10^9 transformantes).

Por estes motivos, redesenhamos o vetor para corrigir estes problemas. Substituímos a enzima PacI pela enzima NotI. Adicionamos ainda um Tag-molecular, o T7-Tag na extremidade carboxi-terminal do ScFv, antes do His-tag, para detecção da proteína produzida com anticorpo monoclonal comercial. Enfim, este vetor foi encomendado e será testado em breve.

Em resumo, atingimos parcialmente nossos objetivos para o desenvolvimento de novos vetores para o sistema *Phagemid* de *Phage Display* e o desenvolvimento de novos *primers* que geram um repertório significativo e com frame de leitura correto para a produção de bibliotecas hiperimunes e *naïve,* humanas e murinas. Assim que o novo vetor for testado, poderemos iniciar a construção de bibliotecas de anticorpos murinas e humanas para isolar e caracterizar novos anticorpos monoclonais com aplicações em doenças humanas, como as dependentes da angiogênese, principal linha de pesquisa do nosso laboratório.

6. Conclusões

A tecnologia do *phage display* é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de biofármacos do tipo anticorpo monoclonal. Neste trabalho, aprimoramos os métodos e algumas destas ferramentas utilizadas nesta metodologia combinatorial para permitir a produção de bibliotecas de alta qualidade, enriquecidas em fragmentos de anticorpos no frame correto. A qualidade da biblioteca de *phage displa*y é essencial para o sucesso da seleção. Bibliotecas de baixa qualidade (p.ex., com muitos clones expressando fragmentos truncados) diminui substancialmente a chance de pesquisadores selecionarem bons anticorpos (alta afinidade). Em resumo, nosso trabalho e reagentes poderão contribuir para que pesquisadores utilizem de forma mais eficaz a metodologia do *phage display* de anticorpos.

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

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.

Berry,J. Popkov, M. Antibody Libraries from Immunized Repertoires. **Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery.** 2005.

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.

BRADBURY, A. et al. Eliminating helper phage from phage display. **NAR**. V.34, 2006.

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 alelle.**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.

CHEN, R. et al. Primary structure of major outer membrane protein II* (ompA protein) of Escherichia coli K-12. **PNAS**, v. 77, 1980.

CHOWDHURY, P; PASTAN, I. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. **Nature**. 1999.

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

DOBSON, C; MINTER, R. Naive antibodies libraries from natural repertoires. **Phage Display in Biotechnology and Drug Discovery.** 2005.

ECKER; JONES; LEVINE. The therapeutic monoclonal antibody market. **mABS**. 2015.

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-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 463-475, 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.

FRENZEL; SCHIRRMAN; HUST. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. **mABS.** 2016.

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**. 2° Edição, 2010.

GOMES, C. Construção de uma Biblioteca de Anticorpos ScFv Dirigidos Contra o Fator de Crescimento Vascular (VEGF). **Dissertação de Mestrado**. 2013.

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

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

HENRY, K. et al. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. **Frontiers in Microbiology**. 2015.

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.

HWANG, W. et al. Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. **Methods**, V. 36, 35–42. 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.

JONES, et al. The INNs and outs of antibody nonproprietary names. **mABS. 2016.**

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.

KIKUCHI, T. et al. In situ delivery and production system of trastuzumab scFv with Bifidobacterium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2017.

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.

KUSHNER, B, et al. High-Dose Cyclophosphamide Inhibition of Humoral Immune Response to Murine Monoclonal Antibody 3F8 in Neuroblastoma Patients: Broad Implications for Immunotherapy. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 48:430–434

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.

LOWMAN HB, Clackson T. Phage display: a practical approach. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. pp. 10–11. 2004.

MARKS, J. Cloning of human immnunoglobulin genes. **Antibody Engineering**. 2004.

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.

NAGY, Z. A History of Modern Immunology: The Path Toward Understanding. **Monoclonal antibodies: the final proof for clonal selection**. Cap 4 pag 37. 2013.

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

NELSON, B; SIDHU, SS. Synthetic antibody libraries. **Methods Mol Biol**. 2012.

PÀEZ-RIBES, M. et al. Antigiogenic 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.

PELAT, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M. P., & Thullier, P. (2008). Germline humanization of a non-human primate antibody that neutralizes the anthrax toxin, by in vitro and in silico engineering. Journal of Molecular Biology, 384, 1400–1407.

PHILIPPIDIS, A. The Top 15 Best-Selling Drugs of 2016. **GEN**. 2017.

POLLACK, A. F.D.A. Approves Cancer Drug From Genentech Archived. **New York Times,** 2016.

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.

QI, H. et al. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. **Journal of Molecular Biology**. 2012.

RETTER I, Althaus HH, Münch R, Müller W: VBASE2, an integrative V gene database. Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1;33(Database issue):D671-4.

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

ROBERT, R., Streltsov, V. A., Newman, J., Pearce, L. A., Wark, K. L., & Dolezal, O. (2010). Germline humanization of a murine Abeta antibody and crystal structure of the humanized recombinant Fab fragment. Protein Science, 19, 299–308.

RONDOT, S. et al. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. **Nature.** V. 19, 2001.

SBLATTERO, D; BRADBURY, A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. **Nature.** 2001.

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.

SIDHU SS, et al. High copy display of large proteins on phage for functional selections. **J. Mol. Biol**. 296 (2): 487–95. 2000.

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.

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

STIEHM, E. Effects of immune globulin therapy. **IG Living**. 2015.

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

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

TAN, S; GRIMES, S. Paul Ehrlich (1854-1915): man with the magic bullet. **Singapore Medical Journal**. 2010.

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.

VIDARSSON, G. et al. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Front Immunol**. 2014.

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

WEISS GA, Sidhu SS. "Design and evolution of artificial M13 coat proteins". **J. Mol. Biol**. V. 300 (1): 213–9. 2000.

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.

ZHANG, L. et al. *Staphylococcus aureus* expresses a cel I surface protein that binds both IgG and P,-glycoprotein I. **Microbiology**. 1999.