UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α-distroglicana, por *Phage Display*

Thais Canassa De Leo

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α-distroglicana, por *Phage Display*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Thais Canassa De Leo
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 23/01/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Canassa De Leo, Thais

Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α-distroglicana, por *Phage Display*. Ribeirão Preto, 2017.

89p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Dias Baruffi, Marcelo.

1. *Phage Display*. 2. Mucinas. 3. Fragmentos de anticorpos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Thais Canassa De Leo

Título do trabalho: Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α-distroglicana, por *Phage Display*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família:

meus pais, Rosane e Gilberto,

meus avós, tios, padrinhos e primos,

meu namorado, Otávio,

e aos meus irmãos nascidos em outros lares.

Vocês são luz e fonte de amor na vida.

E uma vida não seria suficiente para retribuir os esforços e amor incondicional.

Gratidão.

Agradecimentos

Ao professor Dr. Marcelo Dias Baruffi,

Pela oportunidade de desenvolver e confiar a mim o desenvolvimento deste trabalho. Pela orientação acadêmica, mas também pela orientação de desenvolvimento pessoal. Por ser o maior exemplo de amor à ciência que me inspira seguir carreira acadêmica. Obrigada por tudo.

Aos professores Drs. Andrea Maranhão e Marcelo Brígido,

Por me receberem de braços abertos em seu laboratório, estabelecerem uma colaboração tão amistosa que só gera bons frutos, pelos diversos ensinamentos e orientações durante minha estadia em Brasília. É ótimo trabalhar com vocês!

À Dra. Vanessa Leiria Campo,

Pela colaboração estabelecida neste trabalho, ensinamentos compartilhados e amizade.

Aos amigos do laboratório de glicoimunologia da FCFRP-USP,

Lílian Cataldi, Rubens Eduardo, Anna Karoline Aguiar, Thaís Plépis, Talícia Santos, Fábio Kubata e Martin Amstalden que fizeram da rotina de trabalho momentos tão agradáveis e de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. É um prazer trabalhar com vocês! Não posso deixar de agradecer àqueles que hoje percorrem outros caminhos, mas fizeram parte da construção do nosso grupo: Thalita Riul, Flávia Porto, João Francisco, Daniel Cerri e Elder Latorraca.

Aos amigos laboratório de imunologia molecular da Universidade de Brasília,

Manuela Maragno, Fernanda Borges, Ronny Petterson, Laura Miazato, Ana Paula Costa, Isabel Souza, Ruan Riasco, Thompson Tomatieli, Jhennipher Lana, Natalia Gladistone e Bianca Alencar pela receptividade e companhias tão agradáveis durante minha estadia em Brasília. Agradeço especialmente ao Rafael Burtet e ao Nestor Leyton pelos ensinamentos e disponibilidade em me auxiliar durante exprimentos. Muito obrigada a todos.

Ao laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP,
Professora Dra. Maria Cristina Nonato, Joane Rustiguel, Felipe Calil, Mariana Ajalla, Iara Cardoso, Marília Cirqueira e Victor Rangel pelo auxílio na realização dos experimentos. Obrigada pela amizade e convívio!

Ao laboratório de Bioinformática da Univeridade de Brasília,
Dr. Waldeyr Mendes Silva pelo auxílio na utilização da plataforma ATTILA. Obrigada pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao serviço de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
e aos funcionários do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia, por todos os serviços prestados e disponibilidade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto,
Por me acolher desde 2012 no início de minha iniciação científica, pelos excelentes profissionais e pelo suporte por todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
Pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Epígrafe

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

CANASSA DE-LEO, T. **Seleção, caracterização parcial e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-glicopeptídeos miméticos de mucinas tumorais e α-distroglicana, por Phage Display** 2017. 87f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adenocarcinomas e distroglicanopatias são doenças graves que estão associadas a quadros de hipoglicosilação de mucinas tumorais, como a MUC1 (*transmembrane glycoprotein Mucin 1*) e de mucinas de α-distroglicana (α-DG). Um dos mais importantes desafios associados à terapia anti-câncer refere-se ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que permitam o direcionamento da ação de drogas anti-tumorais para a célula cancerosa com o objetivo de evitar o acometimento de células saudáveis. Nessa linha, é crucial a construção de sistemas de liberação de medicamentos sítio específicos por meio de marcadores tumorais. Quanto ao diagnóstico das distroglicanopatias, atualmente este se baseia principalmente na observação de manifestações clínicas, biópsias musculares e medidas enzimáticas, sendo que os anticorpos monoclonais disponíveis no mercado não são específicos para a condição do músculo distrófico. Dessa forma, mucinas tumorais e mucinas de α-DG modificadas tem sido consideradas potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e/ou terapêuticas aplicáveis a estas doenças. Para este trabalho, foram sintetizados, em fase sólida, glicopeptídeos miméticos de MUC1 e α-DG hipoglicosilados, os quais foram utilizados como ferramenta de busca por novos anticorpos recombinantes. Estes antígenos foram imobilizados em uma placa e sobre eles foi aplicada uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Fabs) humanos recombinantes para o desenvolvimento do processo de seleção pela tecnologia de *Phage Display*. Após quatro *rounds* consecutivos de seleção, os genes codificadores dos Fabs da biblioteca não selecionada e selecionada foram sequenciados e analisados *in silico* na plataforma ATTILA. Esta análise permitiu rastrear o enriquecimento dos domínios VH e VL durante a seleção, além de possibilitar a escolha de inúmeros clones para produção. Para este trabalho, quatro fragmentos de anticorpos scFvs recombinantes inéditos para a mucina tumoral MUC1 e α-DG hipoglicosilados foram desenhados e clonados em vetor de expressão pET29(a) contendo um marcador de identificação (peptídeo FLAG) e outro de purificação (cauda de histidina). A expressão de um scFv recombinante anti-MUC1 foi realizada em *E. coli* BL21-DE3 pela adição de 0,5mM de IPTG com indução a 20ºC por 16 horas. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel, seguida de gel filtração, sendo estas etapas monitoradas por SDS-PAGE. A identificação imunoquímica da proteína recombinante foi confirmada por *Western Blot*, utilizando o anticorpo *anti*-FLAG. Entende-se que este trabalho, por meio da produção de novas ferramentas biotecnológicas, poderá cooperar para o desenvolvimento de novas formas abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas para tumores e distroglicanopatias.

Palavras-chave: *Phage Display*, anticorpos recombinantes scFv, MUC1, mucinas de α-DG

ABSTRACT

CANASSA DE-LEO, T. **Selection, partial characterization, and production of human recombinant antibodies anti-mimetic glycopeptides of tumoral mucins and α-dystroglycan by Phage Display**. 2017. 87f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adenocarcinomas and dystroglycanopathies are serious diseases associated with hypoglycosylation of tumoral mucins, such as MUC1 (transmembrane glycoprotein Mucin 1) and α-dystroglican mucins (α-DG). One of the most important challenges associated with anti-cancer therapy is the development of therapeutic strategies that allow the targeting of anti-tumor drugs to the cancer cell in order to avoid the involvement of healthy cells. In this regard, the construction of site-specific drug delivery systems by tumor markers is crucial. The diagnosis of dystroglicanopathies are currently based on the observation of clinical manifestations, muscle biopsies and enzymatic measures, and the available monoclonal antibodies are not specific for the dystrophic muscle condition. Thus, tumoral mucins and modified α-DG mucins have been considered potential targets for the development of new diagnostic and/or therapeutic strategies applicable to these diseases. For this work, glycoproteins MUC1 and α-DG hypoglycosylated mimetics were synthesized by solid phase reaction, and were used as a search tool for new recombinant antibodies. These antigens were immobilized in a plate and a library of recombinant human antibody (Fabs) fragments was applied thereon for the development of the screening process by Phage Display technology. After four consecutive rounds of selection, the Fabs coding genes from the unselected and selected library were sequenced and analyzed *in silico* on ATTILA platform. This analysis allowed us to track the enrichment of the VH and VL domains during selection process, and also presented several option of clones to choose for production. For this work, four novel fragments of recombinant scFvs antibodies specific for tumoral mucin MUC1 and α-DG hypoglycosylated were designed and cloned into pET29 (a) expression vector containing an identification marker (FLAG peptide) and a purification tag (histidine tail). Expression of a recombinant anti-MUC1 scFv was performed on E. coli BL21-DE3 by the addition of 0.5 mM of IPTG with induction at 20°C for 16 hours. Purification was performed by affinity chromatography on nickel resin, followed by gel filtration, these steps being monitored by SDS-PAGE. Immunochemical identification of the recombinant protein was confirmed by Western Blot, using the anti-FLAG antibody. It is understood that this work, through the production of new biotechnological tools, could cooperate for the development of new forms of diagnostic and/or therapeutic approaches for tumors and dystroglicanopathies.

Keywords: Phage Display, scFV recombinant antibodies, MUC1, α-DG mucins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema sintético das vias de O-glicosilação na MUC1. 4
Figura 2 - Representação esquemática da MUC1 na superfície celular. 4
Figura 3 - Representação esquemática da α-distroglicana. 8
Figura 4 - Representação esquemática do processo de recombinação e expressão dos genes das cadeias pesadas e leves das Igs. 12
Figura 5 - Representação esquemática de um domínio de Ig com destaque para as regiões CDR e sua variabilidade. 13
Figura 6 - Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina. 14
Figura 7 - Representação esquemática de diferentes possíveis formas de produção de anticorpos. 16
Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago M13. ..19
Figura 9 - Representação esquemática de um bacteriófago M13 recombinante. 20
Figura 10 - Representação esquemática da estrutura química do glicopeptídeo sintético relacionado à mucina tumoral MUC1. 26
Figura 11 - Esquema ilustrativo do sítio de clonagem do vetor pComb3X. 27
Figura 12 - Representação esquemática da seleção de fagos frente a antígenos imobilizados.....34
Figura 13 - Representação esquemática do processo de enriquecimento que ocorre durante o *panning*. 39
Figura 14 - Representação esquemática da estratégia de clonagem dos scFvs em vetor pET29(a). 41
Figura 15 - Representação esquemática do sistema de imunodetecção do scFv recombinante.....45
Figura 16 - Análise eletroforética das extrações plasmidiais das células utilizadas no *panning* contra o antígeno 29. 50
Figura 17 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VH selecionados para o antígeno 29 ao longo do processo de *panning*.....50
Figura 18 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VL selecionados para o antígeno 29 ao longo do processo de *panning*. 51
Figura 19 - Análise eletroforética dos produtos de PCR referentes aos domínios VH e VL selecionados para o antígeno 29 purificados. 51

Figura 20 - SDS-PAGE do extrato bacteriano bruto e do material ligado à resina de Ni. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos para as regiões canônicas flanqueadoras dos domínios VL e VH dos genes de Fab de imunoglobulinas humanas.....36
Tabela 2 - Componentes da reação de PCR para amplificação dos domínios VL e VH do Fab de imunoglobulinas humanas.....36
Tabela 3 - Parâmetros de termociclagem para amplificação dos domínios VL e VH do Fab de imunoglobulinas humanas.....37
Tabela 4 - Titulação do fago auxiliar VCSM13 47
Tabela 5 – Análise da eficiência de transformação do vetor pUC18 controle 48
Tabela 6 - Titulação *input* referente ao *round* 1 de seleção contra o antígeno 29.....48
Tabela 7 - Titulação *ouput* referente ao *round* 1 de seleção contra o antígeno 29 ...49
Tabela 8 - Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 29 49
Tabela 9 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 29: comparação de enriquecimento do *round* 0 x *round* 4 52
Tabela 10 - Clones candidatos para domínio VL específico para o antígeno 29: comparação de enriquecimento do *round* 0 x *round* 4 52
Tabela 11 - Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 66 55
Tabela 12 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 3 58
Tabela 13 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 4 58
Tabela 14 - Clones candidatos para domínio VL específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 4 59
Tabela 15 - Dados resumidos da produção de scFvs por diferentes autores ao longo dos anos.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µF: microfarad

µg: micrograma

µL: microlitro

ATTILA: Ferramenta Automatizada para Análise de Imunoglobulina (*AutomaTed Tool For Immunoglobulin Analysis*)

BCR: Receptor de célula B (*B cell receptor*)

BSA: Albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*)

cDNA: DNA complementar (*complementary DNA*)

CDR: Região determinante de complementariedade (*complementarity determining region*)

CH: Domínio constante de cadeia pesada de imunoglobulina (*constant heavy*)

CL: Domínio constante de cadeia leve de imunoglobulina (*constant light*)

CMD: Distrofias musculares congênitas (*congetinal muscular dystrophy*)

c-myc: fosfoproteína nuclear que desempenha papel na progressão do ciclo celular.

DG: Distroglicana (*dystroglycana*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados do inglês (*deoxynucleotide triphosphate*)

***E. coli*:** *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético do inglês (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico do inglês (*epidermal growth factor receptor*)

ER: Receptor de estrógeno (*estrogen receptor*)

Fab: Fragmento de ligação ao antígeno (*fragment antigen binding*)

Fc: Fragmento cristalizável (*fragment crystallizable*)

FCMD: Distrofia muscular congênita de Fukuyama (*Fukuyama congenital muscular dystrophy*)

***FKRP*:** Proteína relacionada a fukutina (*fukutin-related protein*)

GalNAc: N-acetil galactosamina

GlcNAc: N-acetil glicosamina

HAMA: Anticorpo humano contra anticorpo murino (*human anti-mouse antibody*)

HCl: ácido clorídrico

HER2: Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HIF-1α: Fator indutor de hipóxia 1α (*hypoxia-inducible factor 1α*)

Ig: Imunoglobulina

IMAC: Cromatografia de afinidade com metal imobilizado (*immobilized metal affinity chromatography*)

IPTG: Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo

kb: kilobase

KCl: cloreto de potássio

kDa: kilodalton

kV: quilovolts

L: litro

LB: Luria Bertani (meio de cultivo)

M: molar

mA: miliampere

Man: manose

mAU: Unidade de absorbância (*mili-absorbance unit*)

MCF-7: Fundação do câncer de Michigan (*Michigan Cancer Foundation-7*)

MDC1D: Distrofia muscular congênita tipo 1D (*Congenital muscular dystrophy type 1D*)

$MgCl_2$: cloreto de magnésio

$MgSO_4$: sulfato de magnésio

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: RNA mensageiro (*messenger RNA*)

mTOR: Alvo mamífero de rapamicina (*mammalian target of rapamycin*)

MUC1: mucina tumoral 1

MW: Peso molecular (*molecular weight*)

NaCl: cloreto de sódio

NeuAc: ácido neuramínico

NGS: Sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*)

nm: nanômetro

O.D.$_{600nm}$: Densidade ótica em comprimento de onda 600nm (*optical density)*

ºC: graus Celsius

p53: gene suppressor tumoral mutado em aproximadamente metade dos cânceres humanos.

pb: pares de base

PCR: Reação de polímerase em cadeia (*polymerase chain reaction)*

PEG: Polietileno glicol (*polyethylene glycol*)

pfu: Unidades formadoras de colônia (*plaque forming units*)

PKM2: Piruvato quinase 2 (*pyruvate kinase 2*)

***POMGnT1*:** O-manosil-N-acetilglicosaminiltransferase (*Protein O-Linked Mannose N-Acetylglucosaminyltransferase 1*)

***POMT1*:** O-manosil transferase 1 (*Protein O-Mannosyltransferase 1*)

***POMT2*:** O-manosil transferase 2 (*Protein O-Mannosyltransferase 2*)

PS: Sinal de empacotamento (*packaging signal*)

RNA: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RPM: rotações por minuto

SB: Super Broth (meio de cultivo)

scFv: Cadeia simples de fragmento variável (*single chain fragment variable*)

SDS: Dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SOC: Super Optimal Broth (meio de cultivo)

ssDNA: DNA cadeia simples (*single-strand DNA*)

TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBE: Tampão Tris-Borato-EDTA

TBS: Tampão Tris-salino

TBS-T: TBS-Tween

TNF: Fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*)

V: volt

VH: Domínio de cadeia pesada variável de imunoglobulina (*variable heavy*)

VhH: fragmento de anticorpo de cadeia simples obtido de camelídeos

VL: do inglês, *variable light* (domínio de cadeia leve variável de imunoglobulina)

V-NAR: Novo receptor de antígeno variável (Imunoglobulina de tubarão)

Ω: ohm

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Código	Códon (DNA)
Isoleucina	I	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	TTT, TTC
Metionina	M	ATG
Cisteína	C	TGT, TGC
Alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Y	TAT, TAC
Triptofano	W	TGG
Glutamina	Q	CAA, CAG
Asparagina	N	AAT, AAC
Histidina	H	CAT, CAC
Ácido glutâmico	E	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	GAT, GAC
Lisina	K	AAA, AAG
Arginina	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG

SUMÁRIO

RESUMO.....i
ABSTRACT ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES iii
LISTA DE TABELAS v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi
LISTA DE AMINOÁCIDOS.....ix

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Adenocarcinomas e mucinas tumorais 2
1.1.1. Terapias 5
1.2. Distroglicanopatias e mucinas 6
1.2.1. Diagnóstico e terapêutica associados às distroglicanopatias.....9
1.3. Imunoglobulinas.....10
1.4. A produção de fragmentos de anticorpos na pesquisa e prática clínica 14
1.5. *Phage Display* e bibliotecas de moléculas apresentadas em bacteriófagos.....18

2. OBJETIVOS 22

3. MATERIAL E MÉTODOS.....24
Resumo gráfico: 25
3.1. Glicopeptídeos sintéticos 26
3.2. Biblioteca de fragmentos de anticorpos 27
3.3. Preparo do fago auxiliar VCSM13 28
3.4. Preparo de células eletrocompetentes 29
3.5. Transformação bacteriana com biblioteca pComb3XSS-Fab 30
3.6. *Panning* - Seleção da biblioteca de Fabs frente aos antígenos de interesse.....31
3.7. Titulação *input* e *output*.....34
3.8. Preparo do DNA para sequenciamento 35
3.9. Sequenciamento de nova geração (NGS – *Next generation sequencing*).....37
3.10. Análise do sequenciamento e seleção das cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas 39

3.11. Estratégia de clonagem do scFv em vetor de expressão 40
3.12. Expressão do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL em vetor pET29(a) 41
3.13. Purificação do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL ..43
3.14. Análise eletroforética e detecção por *Western Blot* do scFv-anti29-VH1VL recombinante.....44

4. RESULTADOS 46
4.1. Análise do título do fago auxiliar VCSM13.....47
4.2. Análise da eficiência de transformação 47
4.3. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes contra o antígeno 29 relacionado a mucina tumoral MUC1 48
4.3.1. *Panning*: Enriquecimento e titulação dos fagos recombinantes e específicos para o antígeno 29 48
4.3.2. Preparo do DNA para sequenciamento (Antígeno 29).....50
4.3.3. Análise do resultado do sequenciamento (Antígeno 29).....51
4.3.4. Expressão e purificação do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL.....53
4.4. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos contra o antígeno 66 relacionado a α-DG 55
4.4.1. *Panning*: Enriquecimento e titulação dos fagos recombinantes e específicos para o antígeno 66 55
4.4.2. Preparo do DNA para sequenciamento (Antígeno 66).....55
4.4.3. Análise do resultado do sequenciamento (Antígeno 66).....57

5. DISCUSSÃO 60
5.1. Preparo do fago *helper*, células eletrocompetentes e transformação.....61
5.2. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes contra os antígeno 66 e 29 relacionados a α-DG e MUC1, respectivamente.....62
5.3. Preparo do DNA, sequenciamento e análise dos dados 64
5.4. Obtenção do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL.....66

6. CONCLUSÃO.....70

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

8. APÊNDICE 82
8.1. Linhagens celulares e partículas virais 83
8.2. Meios de Cultura 83
8.3. Antibióticos 84
8.4. Soluções de uso geral 84
8.5. Materiais de eletroforese 86
8.6. Outros 87
8.6.1. Enzimas 87
8.6.2. Produtos comerciais gerais 88
8.6.3. Colunas de purificação 89

1. INTRODUÇÃO

1.1. Adenocarcinomas e mucinas tumorais

O termo câncer faz referência a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que, diferentemente daquelas infecciosas e degenerativas, decorrem da formação de um tecido constituído por células autônomas com características distintas daquelas que a antecederam. Atualmente é a segunda maior causa de morte no mundo, perdendo apenas para doenças cardiovasculares. Além de fatores genéticos, causas externas como radiações ionizantes, alimentos, drogas, medicamentos, toxinas, poluentes e hábitos danosos como tabagismo e etilismo, são os maiores contribuintes para o desenvolvimento de câncer na população mundial. A exposição aos fatores de risco aumenta a cada dia tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, sendo que os tipos mais recorrentes na população brasileira e mundial são: próstata, mama feminina, cólon de útero, intestino e pulmão (CANCER RESEARCH UK, 2012; INCA, 2016; JUNIOR; BATOCCHIO; LESSA, 2014).

As mucinas são um grupo heterogêneo de glicoproteínas de elevado peso molecular expressas na superfície de células epiteliais ou secretadas. Elas estão associadas a proteção do lúmen de muitos tecidos glandulares contra infecção por patógenos microbianos. Estas moléculas podem ser encontradas em células dos olhos, glândulas mamárias, pulmão, trato gastrointestinal e tratos genitourinário, desempenhando, também, funções de propriedades adesivas, transdução de sinais intracelulares, retenção de muco e funcionamento celular (LINDEN et al., 2008; NELSON; COX, 2011; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). Assim como o ciclo celular da célula tumoral apresenta-se desregulado, os mecanismos biossintéticos das mucinas tumorais também o são, de forma que o processo de glicosilação nestas células seja comprometido. Desta forma, células tumorais são caracterizadas por glicolipídeos e glicoproteínas considerados antígenos próprios alterados (ALBERTS et al., 2010; ANDRIANIFAHANANA; MONIAUX; BATRA, 2006; HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; HOSSAIN; WALL, 2016). Dentre as classes de mucinas tumorais, a mucina epitelial 1 (MUC1) é a mais estudada, estando documentada em diferentes tipos de tumores epiteliais tais como mama, pulmão, pâncreas, rim, ovário, cólon e próstata, também chamados de adenocarcinomas (HOSSAIN; WALL, 2016; KUFE, 2009; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). A MUC1 encontra-se expressa em quase todas as células epiteliais glandulares. Ela foi

detectada pela primeira vez em 1982, no leite humano, como uma proteína de elevado peso molecular rica em resíduos de serina, treonina, prolina e muitas cadeias de carboidratos *O*-ligados. Esta molécula encontra-se super expressa em células malignamente transformadas e com padrão de glicosilação alterado. Assim, novos padrões moleculares, não existentes na célula sadia, passam a ser expressos no tumor de forma a gerar novos epítopos com potencial antigênico na célula tumoral. Estudos envolvendo a MUC1 se desenvolvem no sentido de unir pesquisadores de áreas diversas como a glicobiologia, imunologia e oncologia (SHIMIZU; YAMAUCHI, 1982; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999).

A MUC1 é uma glicoproteína transmembrana cujo domínio extracelular é composto por aproximadamente 20 aminoácidos em *tandem repeat*, em números que variam devido ao caráter polimórfico do gene codificador. Esta região é rica em resíduos de serina, treonina e prolina, apresentando diversos potenciais sítios para *O*-glicosilação (KUFE et al., 1984; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Já as porções transmembrana e citoplasmática apresentam um alto grau de conservação de suas sequências codificadoras em comparação com genes homólogos de outras espécies, sugerindo o desempenho de um papel importante na transdução de sinal e outras interações (RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015; SPICER et al., 1991).

As glicanas alteradas que compõe a MUC1 são denominadas Antígenos Carboidratos Associados a Tumor (TACAs), sendo elas αGalNAc (Tn), Neu5Acα2-6αGalNAc (STn) e βGal1-3αGalNAc (TF) (BEATTY; FINN, 2013; HOSSAIN; WALL, 2016). A reação de glicosilação da MUC1 ocorre ao longo do complexo de Golgi por enzimas da família *N*-acetilgalactosaminiltransferases, conforme exemplificado no esquema da figura 01 (LLOYD et al., 1996). Após completamente sintetizada, esta glicoproteína fica exposta na região apical da célula, voltada para o lúmen. Entretanto, na célula tumoral cujo ciclo celular apresenta-se desregulado, a síntese das cadeias de *O*-glicanas ocorre de forma truncada e terminadas por sialiação (Figura 01 e figura 02). Além disso, ocorre a perda da polarização celular, de forma que a MUC1 fique disposta, e superexpressa, por toda superfície celular (ALBERTS et al., 2010; KUFE et al., 1984; LLOYD et al., 1996; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999).

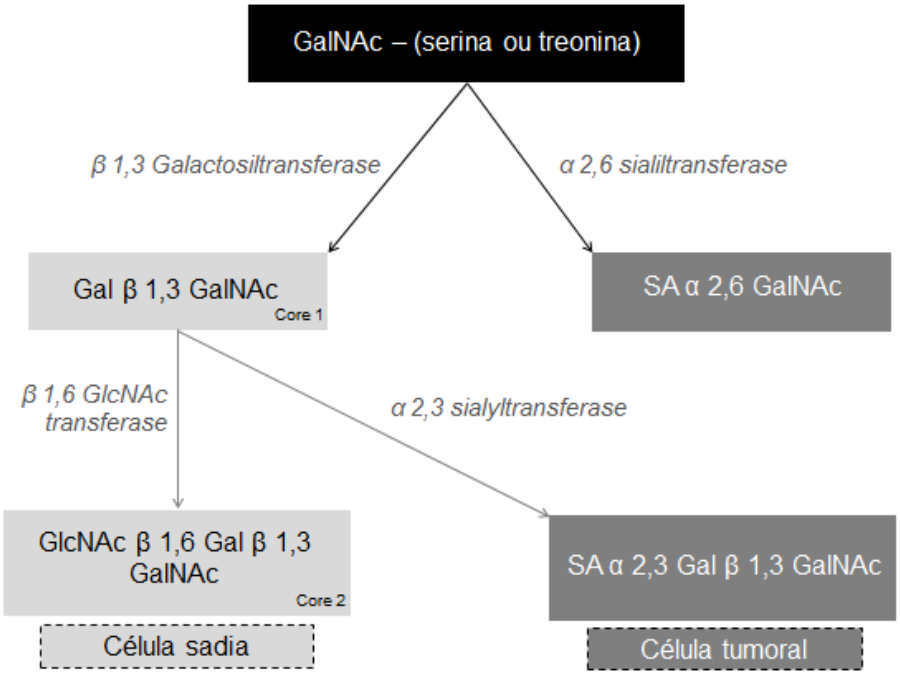


Figura 1 - Esquema sintético das vias de O-glicosilação na MUC1.
Em células não-tumorais, ocorre a adição de *N*-acetilgalactosamina e *N*-acetil-glicosamina pela ação de acetiltransferases. Já em células tumorais, ocorre a adição de ácido siálico (SA) a partir da estrutura *core* 1 ou diretamente na *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ligada à proteína. Retirado e adaptado de Taylor-Papadimitriou et al., 1999 e Lloyde et al., 1996.

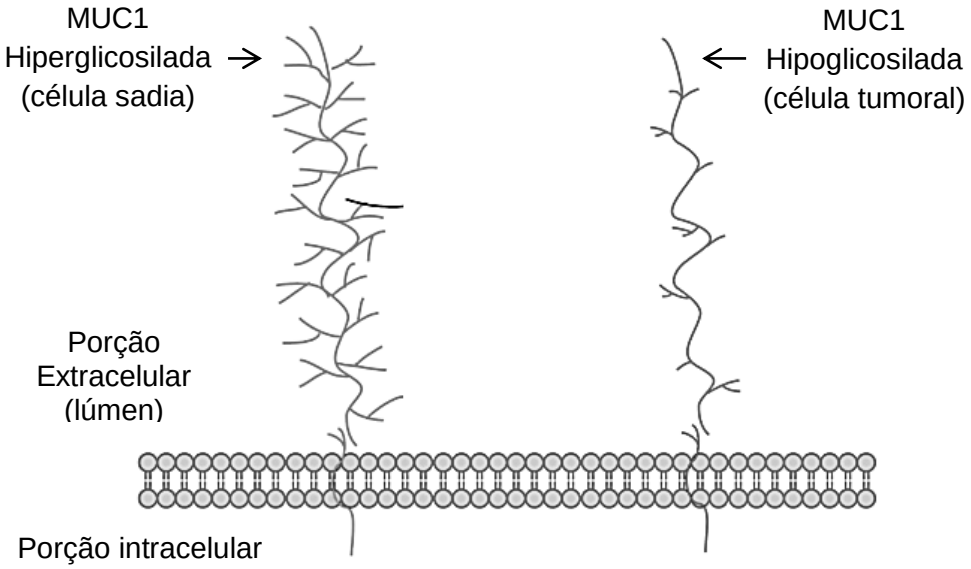


Figura 2 - Representação esquemática da MUC1 na superfície celular.
A figura ilustra as diferenças entre a MUC1 hiperglicosilada expressa na superfície de células sadias e a MUC1 hipoglicosilada expressa em células tumorais. Retirado e adaptado de Hossain; Wall (2016).

Muitos dados da literatura relatam que a MUC1, principalmente suas porções transmembrana e citoplasmática, estão envolvidas em funções e interações importantes relacionadas à sinalização celular. Conforme já mencionado, a célula malignamente transformada perde sua polarização e esta mucina, antes localizada somente na porção apical, passa a ser distribuída por toda membrana, podendo interagir com tirosina-quinases de outras porções celulares (MEHLA; SINGH, 2014; SINGH; HOLLINGSWORTH, 2006). De forma direta e indireta, a MUC1 interfere no ciclo de vida da célula tumoral, favorecendo sua progressão. Ela está envolvida em processos de regulação de metabolismo da glicose no tumor ao atuar como moduladora dos fatores p53, c-myc e mTOR; regulação e estabilidade da atividade transcricional do fator de transcrição HIF-1α, relacionado a sobrevivência do tumor em ambientes hostis e desenvolvimento de quimioresistência; participação na regulação da atividade enzimática da PKM2, uma enzima crítica da via glicolítica; e atua, também, na regulação do fluxo de carbono na via da glicólise aeróbica e sobrevivência da célula tumoral em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, favorecendo assim, a inibição do processo apoptótico (MEHLA; SINGH, 2014).

Os diversos envolvimentos e funções metabólicas da MUC1 no contexto da progressão tumoral implica na utilização desta mucina como um importante alvo terapêutico no tratamento e/ou diagnóstico do câncer.

1.1.1. Terapias

Devido ao elevado grau de expressão e glicosilação alterada, a MUC1 é considerada um importante alvo para a imunoterapia de adenocarcinomas. Nesse sentido, muitas estratégias já foram, e tem sido, trabalhadas: vacinação com sequência de peptídeos, tratamentos com anticorpos monoclonais e monoclonais conjugados (RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). A MUC1, considerada um importante marcador tumoral de relevância clínica, foi a primeira molécula antigênica marcadora de superfície a ser utilizada em tratamentos com viés imune (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Na década de 80 foi desenvolvido o anticorpo monoclonal HMFG1 contra MUC1 obtida em solução no leite humano.

Alguns anos depois este anticorpo foi conjugado a compostos radioativos, como yttrium-90 e outras formas derivadas, e utilizado no tratamento de pacientes com câncer de ovário (BURCHELL et al., 1987; HIRD et al., 1993; MARAVEYAS et al., 1994; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015). Rapidamente os anticorpos monoclonais se tornaram ferramentas importantes na prática clínica. Porém, quando administrados em humanos, eram observadas reações imunopatológicas indesejadas, como HAMA (*human anti-mouse antibody*), devido a epítopos característicos de imunoglobulinas murinas. A engenharia genética possibilitou a manipulação gênica para o desenvolvimento dos anticorpos humanizados, ou seja, anticorpos cujas porções murinas antigênicas eram substituídas por sequências humanas. Entretanto, em alguns casos foi observada a perda de reatividade da molécula pelo seu antígeno (OLIMPIERI; MARCATILI; TRAMONTANO, 2015). O monoclonal HMFG1 foi utilizado no desenvolvimento da forma humanizada AS1402, a qual passou por fase I de teste clínico em pacientes com câncer de mama avançado, mas não apresentou resultados objetivos satisfatórios, apesar da atividade *in vitro* e tolerância dos pacientes (PEGRAM et al., 2009). Gulec e colaboradores (2011) utilizaram o anticorpo monoclonal humanizado hPAM4 (Clivatuzumab Tetraxetan) no tratamento de pacientes com câncer pancreático e observaram resultados positivos. Os autores ainda afirmam que a especificidade da molécula pode ser ainda explorada no sentido de ser utilizada como veículo de entrega de drogas (GOLD et al., 2007; GULEC et al., 2014; RIVALLAND; LOVELAND; MITCHELL, 2015).

1.2. Distroglicanopatias e mucinas

Distroglicanopatias correspondem a um grupo de distrofias musculares congênitas (CMD) caracterizadas por anormalidades no processo de glicosilação de proteínas envolvidas no ancoramento muscular, nas quais o portador apresenta sintomas desde seu nascimento (MOORE; HEWITT, 2009). Estas doenças apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, dentre elas, desabilidades intelectuais, problemas oculares e neurais, com quadros de piora ou melhora durante os primeiros anos de vida, mas que ao se associarem a deformidades na coluna e contraturas, reduzem consideravelmente a qualidade e expectativa de vida (SPARKS

et al., 1993). Devido à falta de um registo mundial, o número de indivíduos acometidos pelas distroglicanopatias é impreciso, mas sabe-se que a distribuição global é heterogênea, com prevalência na população caucasiana (BOUCHET-SÉRAPHIN; VUILLAUMIER-BARROT; SETA, 2015).

A distroglicana (DG) é uma glicoproteína composta por duas subunidades, α e β, que fazem parte do complexo distrofina glicoproteína e atuam em conjunto no ancoramento de proteínas musculares intracelulares (distrofina) à laminina da matrix extracelular, sendo essencial para a manutenção da estabilidade estrutural e funcional da fibra muscular. Apesar de sua função já ser claramente desvendada, estudos sobre a bioquímica e variações químicas desta molécula, revelam a importância das modificações pós traducionais para o correto desempenho de sua função estrutural no músculo (BARRESI; CAMPBELL, 2006; BROWN et al., 1999; MOORE; HEWITT, 2009; SCIANDRA et al., 2015).

O gene DAG1 codifica a distroglicana precursora, a qual é clivada por modificações pós traducionais em subunidades α e β. A porção β é transmembrana e possui aproximadamente 43 kDa, sendo sua extremidade C-terminal, citoplasmática, rica em resíduos de prolina. Já a α-DG é ancorada e exposta ao meio extracelular, apresentando uma massa molecular aparente que varia de 120 a 160 kDa dependendo do tecido em que é expressa (cérebro e músculo esquelético) (BRANCACCIO et al., 1995, 1997; MUNTONI; BROCKINGTON; BROWN, 2004). Esta subnidade apresenta um peptídeo conector, rico em resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr), altamente *O*-glicosilado entre as extremidades globulares C e N-terminal (Figura 03).

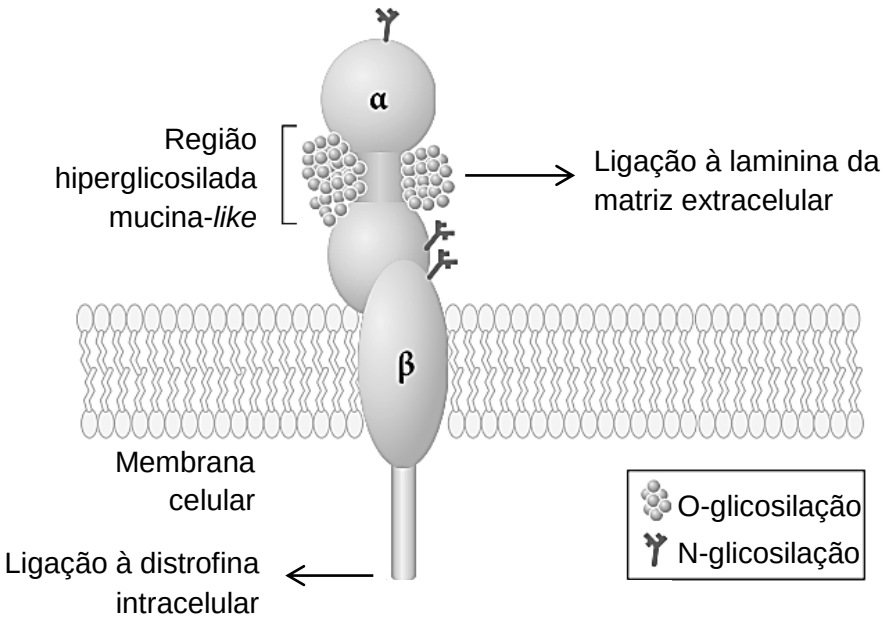


Figura 3 - Representação esquemática da α-distroglicana.
A figura ilustra a disposição da α-DG na membrana celular. A subunidade β fica inserida na membrana, apresentando uma porção citoplasmática reponsável por se ligar à distrofina. A subunidade α apresenta duas cabeças globulares conectadas por um segmento peptídico amplamente *O*-glicosilado, representando uma região semelhante à mucinas. Esta porção glicosilada liga-se à laminina, ancorando proteínas musculares à matriz extracelular. Retirado e adaptado de Merry; Astrautsova, (2008)

Os padrões de *O*-glicosilação no domínio mucina-*like* da α-DG é conservado entre todos os mamíferos (TOLEDO et al., 2012), sendo este processo realizado por diferentes enzimas do tipo glicosil-transferases. Chiba e colaboradores (1997) identificaram pela primeira vez a estrutura de *O*-manose, Neu5Acα2–3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα-O-Ser/Thr, que compõe o domínio de hiperglicosilação da α-DG. Mutações genéticas nos genes codificadores das enzimas que editam este domínio polissacarídico associam-se a alterações nos padrões de glicosilação da α-DG, sendo estes genes *POMT1* (OMIM 607423), *POMT2* (OMIM 607439), *POMGnT1* (OMIM 606822), *fukutin* (OMIM 607440), *FKRP* (OMIM 606596) e *LARGE* (OMIM 603590) (BOUCHET-SÉRAPHIN; VUILLAUMIER-BARROT; SETA, 2015; ENDO, 2015; MOORE; HEWITT, 2009; MUNTONI et al., 2007). Dessa forma, as mutações, não no gene codificador da α-DG, mas sim nas enzimas responsáveis pela glicosilação, levam a um quadro de hipoglicosilação da porção mucina-*like* da α-DG. Esta é a principal razão da ocorrência de anormalidades musculares nas distroglicanopatias.

O impacto da correta *O*-glicosilação pôde ser evidenciado por meio de modificações químicas da α-DG hiperglicosilada por ácido periódico e ácido trifluorometanosulfônico, resultando na perda de adesão à laminina (ENDO, 2015; MARTIN, 2003; SMALHEISER, 1993).

Camundongos *Large* são um modelo de distroglicanopatias caracterizados por deficiência na produção da glicosil-transferase LARGE. Barresi e colaboradores (2004) trabalharam superexpressando a LARGE humana nestes animais e observaram que a ligação da α-DG à laminina foi reconstituída, inclusive em pacientes com deficiência em outras glicosil-transferases. Entre outras distroglicanopatias podem ser citadas a distrofia de Fukuyama (FCMD), sendo a segunda mais prevalente no Japão, a síndrome de Walker-Warburg, a doença *muscle-eye-brain* e a distrofia muscular tipo 1D (MDC1D), acometida pela LARGE humana – todas caracterizadas por anormalidades nas enzimas de *O*-glicosilação da α-DG (MUNTONI et al., 2004; SPARKS et al., 1993).

1.2.1. Diagnóstico e terapêutica associados às distroglicanopatias

As distroglicanopatias apresentam dezenas de quadros clínicos diferentes e com diferentes graus de comprometimento das atividades motoras do indivíduo, sendo quase impossível associar um gene a um único fenótipo. Devido a essa miscelânea de manifestações, torna-se um desafio diagnosticar quais mutações estão envolvidas em cada quadro. Com o advento do sequenciamento de nova geração, foi possível sequenciar genomas inteiros de indivíduos e famílias e, então, descobrir novos genes associados às distroglicanopatias. O diagnóstico desta desordem baseia-se principalmente na observação de manifestações clínicas, medidas da atividade enzimática de enzimas como a POMGnT1 a partir de biópsias musculares e métodos de imuno-histoquímica, e também testes genéticos (BÖNNEMANN et al., 2014; MUNTONI et al., 2007; SPARKS et al., 1993). As formas de terapia são determinadas de acordo a condição física apresentada pelo indivíduo ou mesmo o tipo de mutação que ele carrega. Nos primeiros anos de vida, indica-se a fisioterapia e tratamentos ortopédicos (BÖNNEMANN et al., 2014; SPARKS et al., 1993).

Os anticorpos monoclonais IIH6 e VIA4-1 presentes no mercado são capazes de reconhecer a forma hiperglicosilada padrão da α-DG, porém, não se sabe exatamente quais epítopos eles reconhecem. Assim, em ensaios de imuno-histoquímica e *Western Blot* o quadro de hipoglicosilação característico das distroglicanopatias pode ser detectado pela perda de imunoreatividade observada em relação à condição saudável da α-DG (MOORE; HEWITT, 2009; MUNTONI et al., 2007; VOGLMEIR et al., 2011). Anticorpos recombinantes capazes de reconhecer a condição hipoglicosilada da α-DG representam maior acurácia e especificidade no diagnóstico de distroglicanopatias.

1.3. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são glicoproteínas expressas na superfície de células B ou secretadas, que atuam na neutralização e eliminação de antígenos não próprios. A ativação dos linfócitos B para secreção de anticorpos pode ocorrer a partir de diferentes vias, sendo elas dependente do auxílio de linfócitos T auxiliares (*helper*) ou não. Antígenos microbianos multivalentes, como polissacarídeos e lipídeos, ligam-se aos receptores BCR dos linfócitos B, induzindo diretamente a produção de anticorpos. Já a secreção de anticorpos dependente de T requer a captura de antígenos proteicos microbianos pelo linfócito B, e apresentação deste às células T auxiliares, que por sua vez levam a ativação de B. A eliminação e neutralização de patógenos depende de diversos mecanismos efetores e anticorpos de diferentes isotipos. Entretanto anticorpos produzidos de maneira T dependente se ligam com maior avidez aos seus antígenos proteicos, sendo os mediadores mais eficazes da resposta humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A capacidade dos linfócitos B de produzirem diferentes classes – ou isótipos – de imunoglobulinas proporciona uma plasticidade imensa na resposta imune humoral, pois cada classe associa-se a diferentes funções efetoras contra diversos agentes infecciosos: antígenos polissacarídicos estimulam principalmente anticorpos IgM; a resposta contra vírus, bactérias e antígenos proteicos envolve a produção de IgG; a eliminação de parasitas helmintos está associada a produção de IgE, enquanto que a defesa de mucosas ocorre pela produção de IgA. A mudança de isótipo é

desencadeada em resposta a sinais bioquímicos gerados a partir da ligação da molécula CD40 ao seu ligante presente na superfície das células B e a liberação de diferentes citocinas. Mas a variabilidade e especificidade das imunoglobulinas produzidas pelo sistema imunológico vai muito além da diversidade de isótipos, de forma que existam bilhões de anticorpos circulantes no nosso organismo. A capacidade de cada indivíduo gerar esse repertório diverso vem de um processo muito engenhoso, selecionado pela evolução biológica, capaz criar milhares de anticorpos diferentes a partir de um número limitado de genes. Isso só é possível devido à combinação aleatória de três diferentes *loci* gênicos que codificam para a região variável das imunoglobulinas. Os *loci* gênicos de variabilidade (V), diversidade (D) e junção (J), rearranjam-se num processo denominado recombinação V(D)J, codificam para as cadeias pesadas e as cadeias leve κ e λ (vale ressaltar que as cadeias κ e λ não possuem o segmento D em sua composição) das Ig. Existem aproximadamente 100 genes funcionais de variabilidade no lócus da cadeia pesada humana, 35 genes no lócus na cadeia κ e 30 genes para cadeia λ, sendo que estes números variam entre as espécies. Os segmentos gênicos de cada lócus estão separados por espaçadores de até 2000 quilobases. À jusante dos genes V, encontram-se os segmentos de diversidade e junção, cujo número, semelhantemente a V, varia em diferentes *loci* das Igs. Os genes J tem em média 40 pares de base, estão separados por sequências não codificadoras e encontram-se estreitamente ligados às sequências codificadoras da região constante. Dessa forma, o rearranjo de V, D e J formam um único éxon que codifica para a região variável da Ig (Figura 04). Além deste mecanismo, a variabilidade do repertório de imunoglobulinas é dada pela adição e deleção aleatória de bases nitrogenadas, por ação de endonucleases, nas junções entre os segmentos VDJ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; MARANHÃO et al., 2015; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

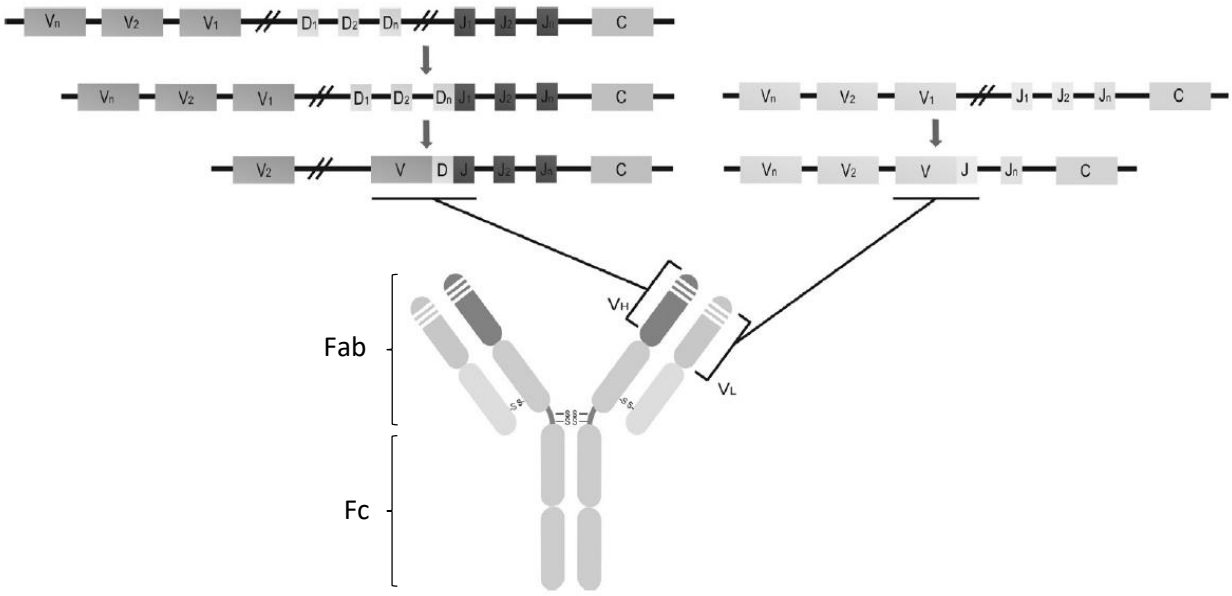


Figura 4 - Representação esquemática do processo de recombinação e expressão dos genes das cadeias pesadas e leves das Igs.
A figura ilustra a sequência resumida dos processos de recombinação dos segmentos V, D e J para expressão de Igs. C representa a região codificadora da porção constante de Igs. Retirado e modificado de Maranhão et al., 2015.

Os anticorpos de todas as classes apresentam características estruturais semelhantes tanto nas regiões variáveis de ligação ao antígeno quanto nas regiões constantes que desempenham funções efetoras. Estas moléculas, basicamente, apresentam uma estrutura central simétrica composta por duas cadeias idênticas de maior peso molecular (cadeias pesadas) e duas cadeias idênticas de menor peso molecular (cadeias leves). As cadeias leve e pesada são constituídas por unidades homólogas de domínios globulares repetidos, denominados domínio Ig, formados por duas camadas de folha β, cada uma com três a cinco fitas de cadeias polipeptídicas antiparalelas. Pontes dissulfeto unem as camadas de folha β, enquanto curtas alças unem as sequências antiparalelas (Figura 5a). No sítio de ligação ao antígeno, três destas alças são extremamente importantes no que tange o nível de variabilidade para reconhecimento antigênico, formando a região determinante de complementariedade CDR (Figura 5b). Com o avanço das técnicas de sequenciamento, foi possível sequenciar as regiões codificadoras das cadeias leve e pesada e, portanto, as CDRs e as regiões que as intercalam, denominadas *frameworks*. A determinação das CDRs pode ser dada pela definição de Kabat ou Chotia, que levam em consideração a

variabilidade de resíduos em cada posição dos domínios variáveis ou a estrutura secundária, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; CRUSE; LEWIS, 2010; MARANHÃO et al., 2015; NELSON; COX, 2011).

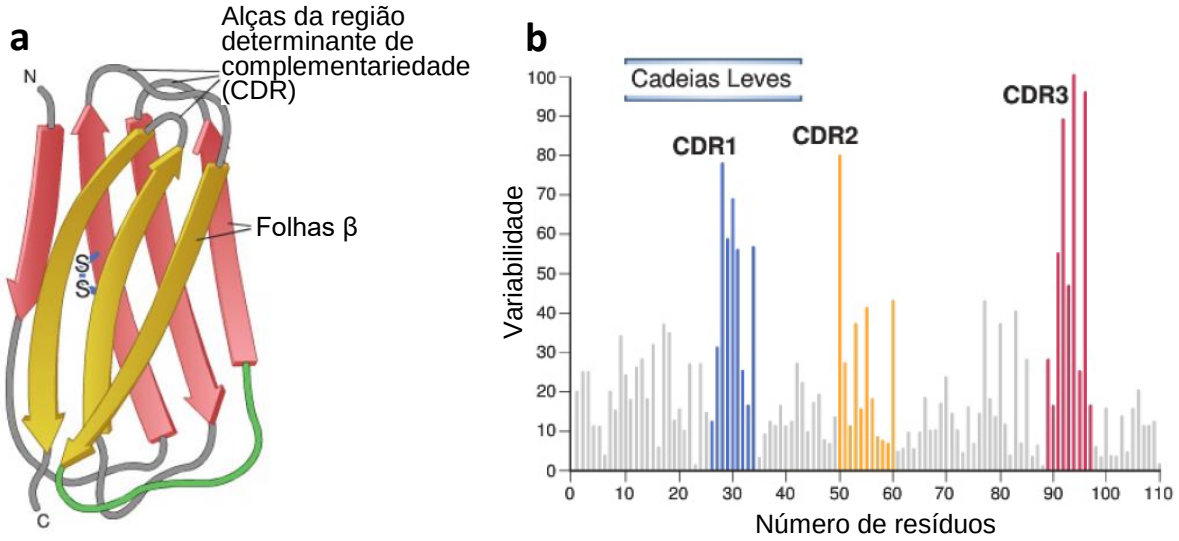


Figura 5 - Representação esquemática de um domínio de Ig com destaque para as regiões CDR e sua variabilidade.
a) Estrutura de um domínio Ig, ilustrando as duas camadas de folha β ligadas por pontes dissulfeto, com as fitas antiparalelas associadas por alças curtas; b) Gráfico Wu-Kabat ilustrando as regiões de hipervariabilidade de imunoglobulinas, com destaque para as CDRs 1, 2 e 3. Retirado e adaptado de Abbas; Lichtman; Pillai, 2012.

Tanto cadeia leve quanto cadeia pesada, na extremidade aminoterminal, fazem parte da região variável de reconhecimento ao antígeno, enquanto que a porção carboxi-terminal de ambas possuem domínios constantes. A porção responsável por reconhecer o antígeno, composta por cadeia leve e pesada, é denominada região Fab. A parte das cadeias pesadas que ultrapassam os limites da cadeia leve, formam a região Fc, o qual pode ser removido do restante da molécula de anticorpo por digestão enzimática com papaína (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; ALBERTS et al., 2014; NELSON; COX, 2011). A figura 06 a seguir ilustra uma estrutura de imunoglobulina IgG.

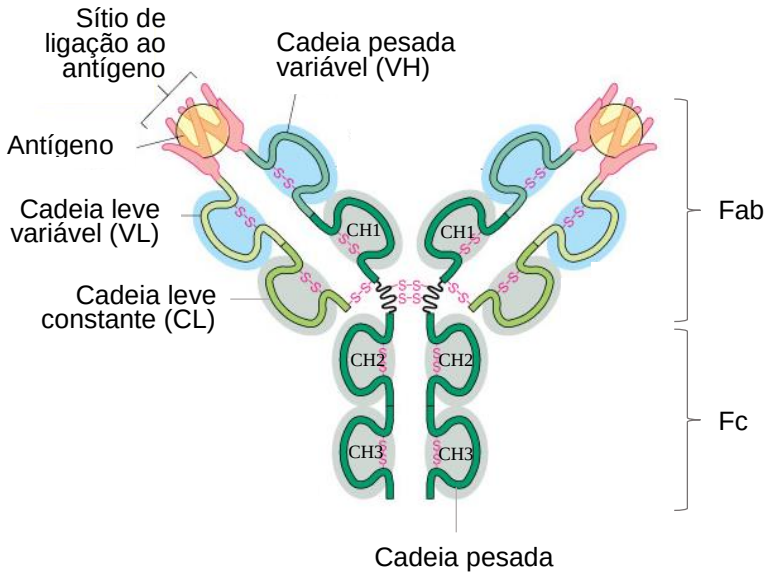


Figura 6 - Representação esquemática de uma molécula de imunoglobulina. O sítio de ligação ao antígeno é formado pela justaposiçao das porções VL e VH. O Fab é formado por VH, VL, CL e CH1 (constante 1 da cadeia pesada). Já o Fc é formado pelos domínios globulares CH2 e CH3 da cadeia pesada. Retirado e adaptado de Alberts et al., 2014.

1.4. A produção de fragmentos de anticorpos na pesquisa e prática clínica

Anticorpos e produtos relacionados foram a classe de agentes terapêuticos de maior crescimento nos anos 2000. Muitos já foram aprovados e são comercializados para o tratamento de doenças como câncer e doenças inflamatórias. Anticorpos como rituximab (Rituxan/ Mabthera; Genentech/Roche/Biogen Idec), infliximab (Remicade; Centocor/Merck), trastuzumab (Herceptin; Genentech/ Roche) e cetuximab (Erbitux; ImClone Systems), desenvolvidos a partir dos antígenos CD20, fator de necrose tumoral (TNF), receptor para fator de crescimento epitelial humano 2 (HER2) e fator de crescimento epitelial (EGFR), respectivamente, são grandes sucessos “clássicos” já estabelecidos no mercado. Com o avanço da engenharia genética e da capacidade de modificação dos anticorpos, estas moléculas puderam ser desmontadas em fragmentos menores capazes de reter as características de ligação a um antígeno específico (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005). Os *designers* de anticorpos acreditam que a natureza modular das imunoglobulinas pode ser explorada no sentido de customizá-las para as mais diferentes aplicações. Características como

tempo de meia vida, distribuição, valência, afinidade, avidez, penetração tecidual e outras bioatividades podem ser modificadas por técnicas de engenharia genética, controlando tanto eficácia quanto segurança do uso da molécula (NELSON, 2010).

A terapia baseada no uso de anticorpos depende da habilidade desta molécula alcançar seu alvo em quantidades adequadas. Devido aos coeficientes de permeabilidade vascular, transporte e pressão intersticial do tumor (comparado aos outros tecidos), anticorpos inteiros, com peso molecular de aproximadamente 150kDa, penetram tumores sólidos muito lentamente, de maneira heterogênea, apresentando altos níveis no soro e certos níveis de toxicidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; HOLLIGER; HUDSON, 2005; JAIN, 1990; JAIN; BAXTER, 1988). A fragmentação dos anticorpos em moléculas menores permite eles acessem tecidos que anticorpos inteiros não conseguiriam e ainda preservam a capacidade de ligação ao antígeno (BECK et al., 2010; JAIN, 1990). Vale notar que, a porção Fc é extremamente importante no que tange o elevado tempo de meia-vida do anticorpo no soro. Entretanto, em diversas aplicações, esta porção não é necessária e até mesmo indesejada, devido a possibilidade de liberação de citocinas e geração de efeitos tóxicos indesejados (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

A facilidade de manipulação pela engenharia genética extrapolou a produção dos anticorpos sob as mais diversas formas. Os chamados fragmentos de anticorpos são compostos pelos domínios VH e/ou VL que retém a capacidade de ligação ao antígeno que a IgG parental possuía. Como vantagem, apresentam uma melhor farmacocinética na penetração nos tecidos e podem ser utilizados desde simples ferramentas de pesquisa, até o diagnóstico e tratamento de doenças (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; NELSON, 2010). Com a diminuição dos anticorpos em unidades menores, foi possível construir vastas bibliotecas de fragmentos de anticorpos para seleções *in vitro* frente a um antígeno de interesse, o que atrai o interesse de muitos grupos de pesquisa e da indústria biotecnológica, em comparação com a tecnologia do hibridoma (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Na utilização da tecnologia de *Phage Display* para a seleção de anticorpos específicos para um antígeno, propriedades como expressão, solubilidade e estabilidade são selecionadas concomitantemente à afinidade pelo antígeno alvo. Domínios leve κ (Vκ) e domínios VH selecionadas por *Phage Display* apresentam boa estabilidade termodinâmica e solubilidade (JESPERS et al., 2004). Os fragmentos de anticorpos

podem ser trabalhados sob diversas formas, sendo Fabs e scFvs os mais conhecidos. Os Fabs são basicamente a representação da região variável de uma imunoglobulina, compostos por um domínio VL, um domínio VH, um CL e um CH1. Já os scFvs são fragmentos de anticorpos caracterizados por possuírem apenas um domínio pesado e um domínio leve unidos por um peptídeo flexível, a fim de mimetizar a região variável, de um anticorpo inteiro, de reconhecimento ao antígeno. Além disso, muitos grupos de pesquisa atualmente trabalham com moléculas chamadas VhH e V-NAR, produzidas, respetivamente, por camelídeos e tubarões e caracterizadas por serem compostas por cadeias semelhantes a IgGs humanas de domínios V-*like* associados a uma porção constante (Figura 07) (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; MARANHÃO et al., 2015).

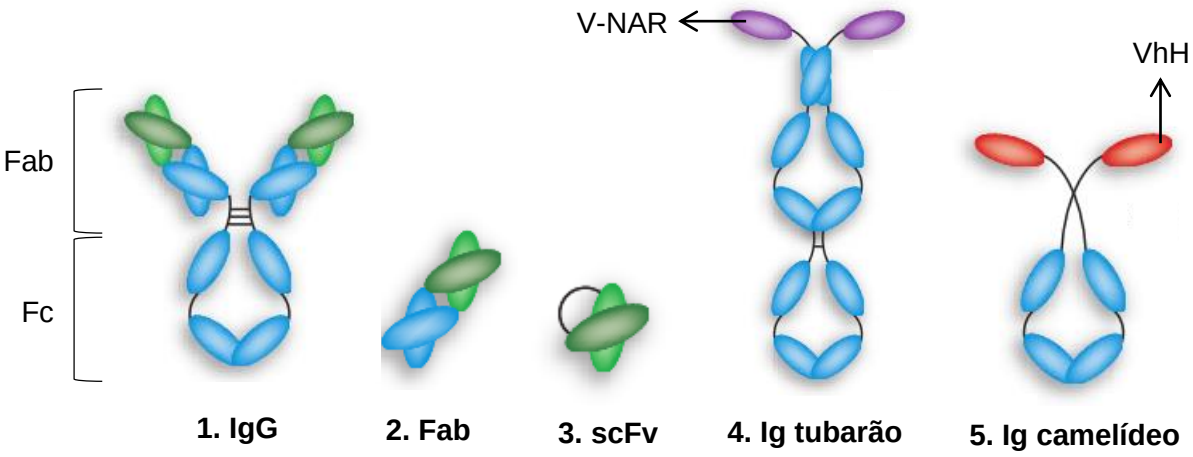


Figura 7 - Representação esquemática de diferentes possíveis formas de produção de anticorpos.
A primeira ilustração esquematiza uma imunoglobulina do tipo IgG humana, com porção constante Fc e porção variável Fab. A segunda ilustração representa uma unidade Fab composta pelos domínios variáveis VH e VL e constantes CH1 e CL. A terceira figura ilustra uma unidade de cadeia simples scFv composta apenas pelos domínios variáveis VH e VL. As figuras 4 e 5 ilustram imunoglobulinas não clássicas produzidas por tubarões e camelídeos; as regiões variáveis dessas Igs são produzidas na forma de pequenos fragmentos de anticorpos chamados V-NAR e VhH. Retirado e adaptado de Holliger; Hudson, 2005.

O custo e rendimento de produção de anticorpos inteiros e de fragmentos de anticorpos apresentam diferenças significativas. Pequenos anticorpos são passíveis de serem produzidos em plataformas mais baratas, mas rápidas e de maior

rendimento de produção, como *E. coli*, uma vez que não carecem de modificações pós traducionais. Entretanto, fragmentos de anticorpos, no geral, podem ter baixo tempo de meia vida no organismo devido à ausência do Fc e rápido *clearance*. A ligação covalente destas moléculas a polietilenoglicol (PEG), uma estratégia conhecida como PEGlação, e a conjugação a proteínas como albumina, são estratégias aprovadas pelo FDA capazes de melhorar a farmacodinâmica, farmacocinética e perfil imunológico da molécula, aumentando seu efeito terapêutico (BECK et al., 2010; HOLLIGER; HUDSON, 2005; HOLT et al., 2008; MISHRA; NAYAK; DEY, 2016).

Assim como os monoclonais foram conjugados a diversos tipos de moléculas, os fragmentos de anticorpos tem o mesmo potencial para conjugação a enzimas, drogas, toxinas e outros, para utilização como ferramenta de pesquisa, diagnóstico e tratamento (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Mehrling (2015) esclarece a importância da utilização destas novas moléculas no tratamento do câncer, por exemplo, como uma revolução na quimioterapia. Ao longo do histórico da busca pela cura do câncer, o elevado uso de quimioterápicos citotóxicos foi responsável pelo surgimento de reações adversas na maior parte dos pacientes. Diante deste cenário, o autor defende que quimioterapia clássica está ao poucos sendo substituída por métodos inovadores que direcionam a droga diretamente ao seu alvo, eliminando as células cancerosas, mas mantendo as saudáveis intactas – sendo um destes métodos a utilização de anticorpos antígeno-tumor-específicos. Um exemplo é a conjugação do quimioterápico auristatina, de elevada citotoxicidade, ao anticorpo brentuximab vedotin (BV), que tem como alvo proteínas CD30. Este trabalho apresentou resultados promissores no tratamento de pacientes com linfoma de Hodgkin's, com 85% de redução do tumor em 97% dos pacientes (GARNOCK-JONES, 2013). Tais fragmentos de anticorpos tem um elevado potencial neste tipo de tratamento direcionado, podendo endereçar a droga a célula tumoral e ainda evitar a possibilidade de liberação de citocinas e efeitos tóxicos devido a presença da porção constante Fc.

Os estudos e análises sobre a eficácia clínica dos novos formatos de fragmentos de anticorpos, com diferentes propriedades farmacológicas, e sua possibilidade de produção em diferentes plataformas (de maior rendimento e mais baratas), alavancam o surgimento de novas bioterapias e diagnóstico direcionados, e com possível maior acessibilidade devido à redução do custo de produção.

1.5. *Phage Display* e bibliotecas de moléculas apresentadas em bacteriófagos

O reconhecimento molecular e a identificação de pares ligantes são a base biológica para o estudo e obtenção de novos fármacos utilizada por muitos grupos de pesquisa. A técnica de *Phage Display*, estabelecida na década de 80 por George Smith, tem feito grandes contribuições nesse campo, pois foi desenvolvida sustentando-se em aspectos que contribuem para caracterizações importantes no reconhecimento molecular. A etimologia das palavras resume o princípio desta técnica: *Phage*, do inglês, é um vírus bacteriófago que apresenta (do inglês, *Display*), algo em sua superfície. Desta maneira, existe uma relação direta entre fenótipo e genótipo, na qual a molécula expressa na superfície do capsídeo encontra-se diretamente associada a sua sequência codificadora carregada pelo vírus. Outro aspecto importante é a possibilidade de clonagem de vastas bibliotecas de DNA em vírus bacteriófagos, de forma que cada partícula recombinante represente um clone da biblioteca e possa ser recuperada da ligação ao seu alvo e amplificada biologicamente. Bibliotecas de peptídeos, anticorpos e diversas moléculas de interesse podem ser trabalhadas na técnica de *Phage Display* (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

Bacteriófagos filamentosos constituem um grande grupo caracterizado pela presença de um DNA circular cadeia simples (ssDNA) e capacidade de infectar bactérias gram-negativas. A classe Ff (f1, fd e M13) infecta bactérias *E. coli* pelo *pillus* sexual e se replica de forma não lítica. Seu ssDNA encontra-se abrigado em um capsídeo em forma de cilindro constituído pelas proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (Figura 08) (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004; MAGALHÃES et al., 2015).

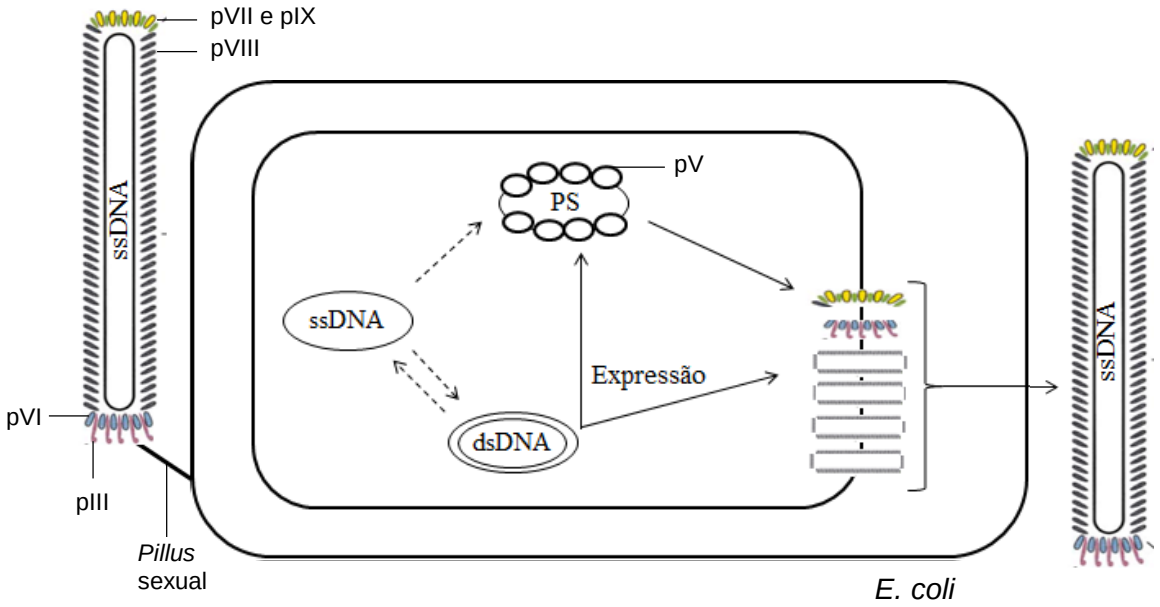


Figura 8 - Representação esquemática do ciclo de vida de um bacteriófago M13. A figura ilustra uma representação geral do processo de infecção pela interação da pIII com o *pillus* sexual de uma *E. coli*. O DNA simples fita é convertido em dupla fita (dsDNA), pelo mecanismo de cículo rolante, para então codificar as proteínas estruturais do fago e a proteína pV, a qual impede a formação de dsDNA em algumas cópias de ssDNA. A formação do complexo PS (sinal de empacotamento) é um sinal para *assembling* da partícula viral no espaço periplasmático intermembranas e, então, sua extrusão (BARBAS et al., 2001; SIDHU, 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

A estrutura e forma de replicação dos bacteriófagos Ff, somados aos avanços das técnicas de clonagem na biologia molecular, permitiram com que estes microorganismos se tornassem uma ferramenta ideal de pesquisa. A construção de bibliotecas combinatórias de peptídeos, fragmentos de anticorpos ou quaisquer outras moléculas de interesse, se baseia na utilização de vetores do tipo fagomídeo. Estes vetores possuem todas as características básicas de um vetor de expressão padrão, tais como gene marcador de seleção, origem de replicação bacteriana, promotor e um sítio de clonagem. Entretanto, sua peculiaridade se dá pela presença de uma segunda origem de replicação, sendo esta viral, e um gene codificador da proteína pIII do capsídeo, em linha com o sítio de clonagem. No sítio de clonagem pode ser inserida a sequência do peptídeo ou do fragmento de anticorpo de interesse, num processo de construção de bibliotecas, o qual será, então, expresso em fusão com o gene pIII. A presença da origem de replicação viral garante que este DNA seja replicado e passado

às partículas virais filhas recombinantes, as quais expressarão em fusão à pIII de sua superfície o peptídeo de interesse – além de carregar o fagomídeo com o gene codificador deste peptídeo (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002; CLARCKSON; LOWMAN, 2004; GOULART et al., 2015; MAGALHÃES et al., 2015).

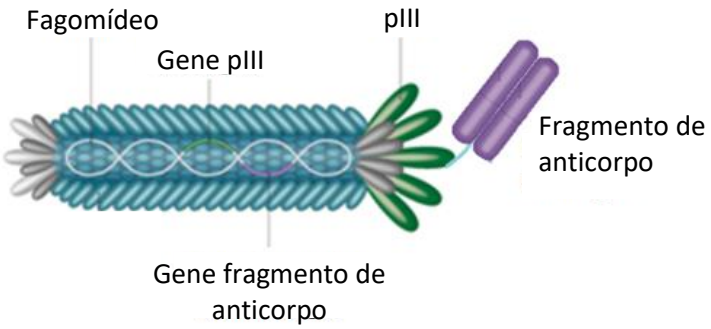


Figura 9 - Representação esquemática de um bacteriófago M13 recombinante.
A figura ilustra uma representação geral de um bacteriófago utilizado na técnica de *Phage Display*, carregando um fagomídeo com genes codificadores da pIII e do fragmento de anticorpo, além da expressão destas moléculas fusionadas em sua superfície externa. Retirado e adaptado de <https://www.bio-rad-antibodies.com/hucal-antibody-technology.html.>

Porém, uma vez que o fagomídeo não possui todos os genes necessários para a montagem de uma nova partícula viral, quando esta metodologia é utilizada, torna-se necessária a adição de fagos auxiliares (fago *helper*) que contenham, então, estes genes requeridos. É importante destacar que fagos *helper* possuem mutações na origem de replicação que dificultam o empacotamento do seu próprio material, favorecendo, então, a formação de novas partículas virais com o DNA do fagomídeo (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

As proteínas expressas no capsídeo em fusão à pIII correspondem a um único clone de um peptídeo – ou quaisquer outros tipos de proteínas – proveniente de uma biblioteca de interesse. Portanto, uma vez que cada bacteriófago carrega um fagomídeo, contendo a sequência codificadora de um clone de uma vasta biblioteca e expressa esta sequência em seu capsídeo em fusão à pIII, uma biblioteca de *Phage Display* é um conjunto de bilhões de fagos, no qual cada partícula corresponde um clone. Com a biblioteca de fagos recombinantes em mãos, é possível desafia-la múltiplas vezes frente a um antígeno imobilizado, num processo denominado *panning,*

e selecionar ligantes específicos com base em sua afinidade. Os clones que se ligam com maior afinidade ao antígeno alvo podem ser recuperados e amplificados biologicamente por infecção e seguir para consecutivas etapas de seleção (BARBAS et al., 2001; CLARCKSON; LOWMAN, 2004).

Quando se trata da utilização de bibliotecas combinatórias de anticorpos para obtenção de anticorpos específicos para alvos terapêuticos, a tecnologia de *Phage Display* ultrapassa barreiras e limitações dos processos de imunização e utilização de animais que são realizados no processo de produção de anticorpos monoclonais pela técnica do hibridoma. Os fragmentos de anticorpos são totalmente humanos, dispensando etapas de humanização e construção de anticorpos quiméricos. A obtenção da sequência gênica, que codifica para as regiões variáveis das imunoglobulinas, após as etapas de seleção, expande as possibilidades de produção em larga escala em plataformas variadas. Os anticorpos podem ser produzidos sob diferentes formas, como scFv, Fab, *minibodies* ou mesmo anticorpos inteiros (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002; FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013; GOULART et al., 2015).

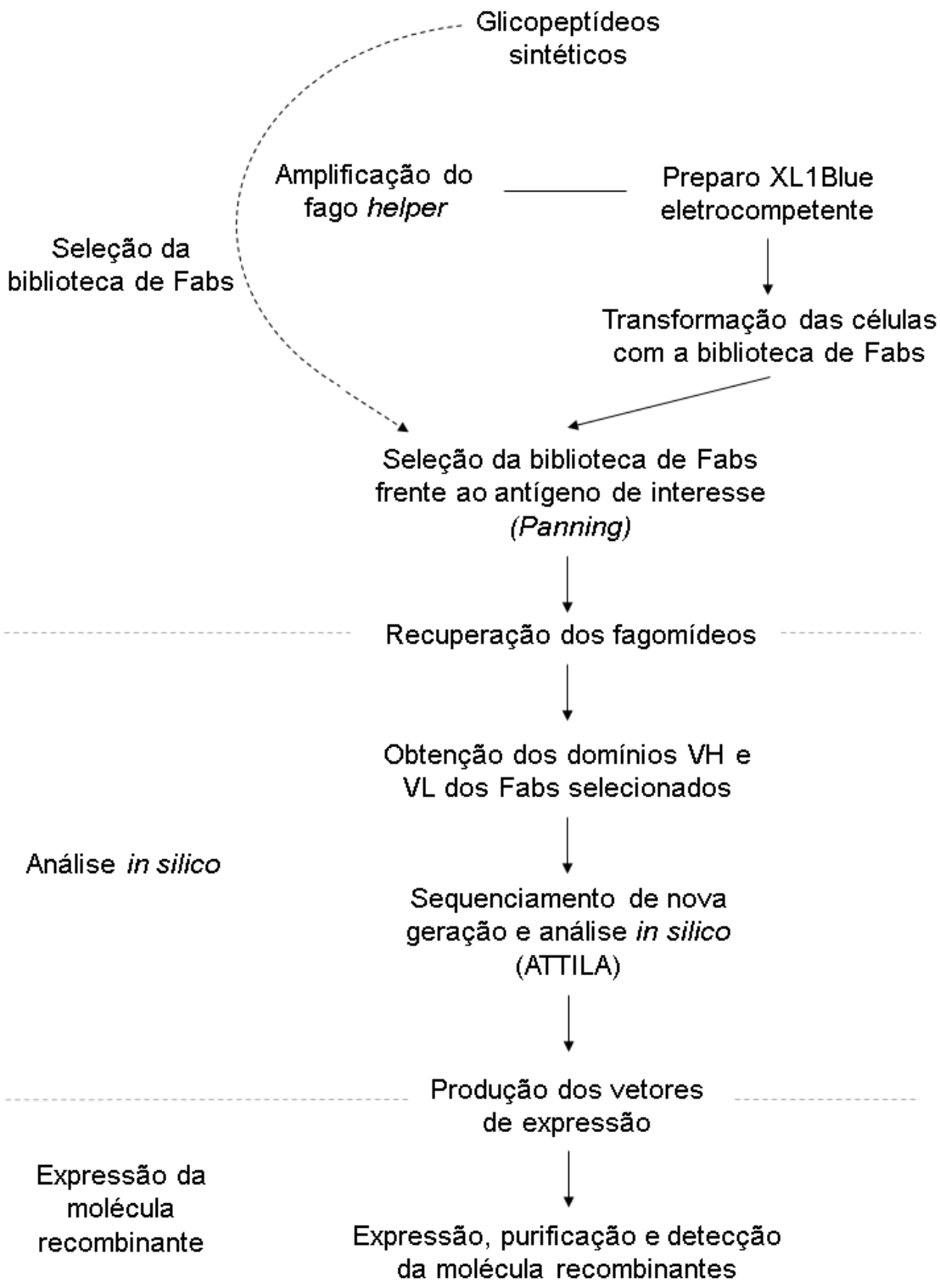
A prática de *Phage Display* se tornou uma tecnologia promissora e inovadora no campo da identificação de novas moléculas, com o diferencial de se poder modificar e manipular o gene codificador da molécula de interesse. Um trabalho de obtenção de pares ligantes, seleção de anticorpos, entre outros, realizado pela natureza ao longo de milhões de anos, pode ser, pelo *Phage Display*, conduzido *in vitro* em poucos dias (BARBAS et al., 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002). Além disso, o advento do sequenciamento de nova geração (NGS) trouxe grandes contribuições para a técnica de *Phage Display*, pois se tornou possível sequenciar estas bibliotecas e obter um número ilimitado de clones selecionados e combinações, os quais não eram possíveis de se analisar pelos antigos métodos de sequenciamento.

2. OBJETIVOS

Obtenção e caracterização de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos anti-MUC1 e anti-α-DG hipoglicosilados, os quais podem apresentar potencial na elaboração de novas estratégias diagnósticas e terapêuticas para distrofias musculares e câncer.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Resumo gráfico:



3.1. Glicopeptídeos sintéticos

Os glicopeptídeos sintéticos miméticos relacionados a mucinas tumorais e de α-DG (aqui chamados de antígenos 29 e 66, respectivamente) foram gentilmente cedidos pela Dra. Vanessa Leira Campo do Laboratório de Síntese de Fármacos da FCFRP-USP. Ambos foram obtidos por síntese em fase sólida com base nas estruturas das glicanas hipoglicosiladas de α-DG e MUC1.

O glicopeptídeo relacionado a MUC1 mimetiza o antígeno TACA Tn (αGalNAc-Ser/Thr), mas em conformação β. Com base em ensaios biológicos, Campo e colaboradores (2017) mostraram que os anticorpos gerados pela imunização com o glicopeptídeo mimético βGalNAc-Ser/Thr apresentaram maior capacidade de reconhecer células tumorais MCF-7. Em comparação com o antígeno αGalNAc-Ser/Thr, o isômero βGalNAc-Ser/Thr apresenta-se como um antígeno promissor e de elevada imunogenicidade capaz de ser usado como ferramenta na obtenção de novas abordagens terapêuticas no câncer.

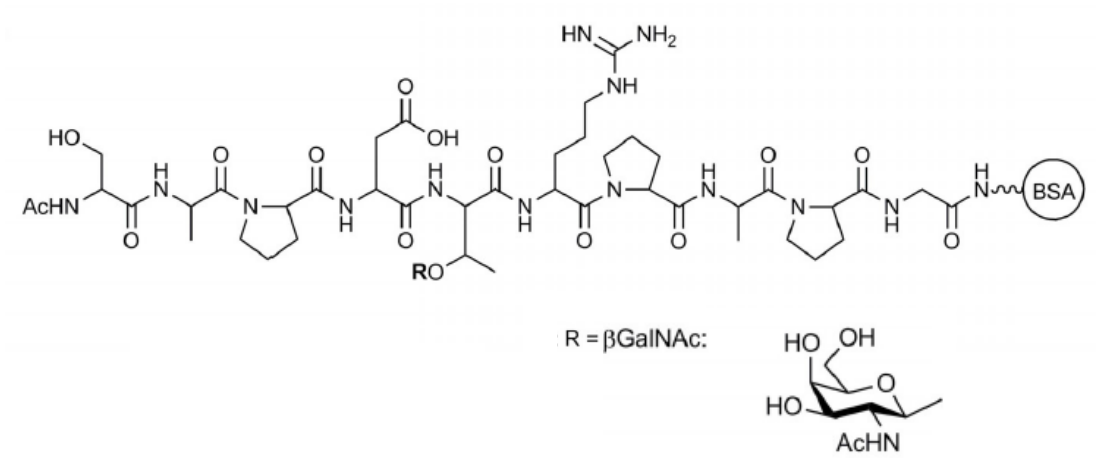


Figura 10 - Representação esquemática da estrutura química do glicopeptídeo sintético relacionado à mucina tumoral MUC1.

A figura ilustra a estrutura química do glicopeptídeo sintético mimético de MUC1 tumoral com a cadeia R lateral em conformação β destacada. A molécula está conjugada a proteína BSA. Adaptado de Campo et al., 2017.

3.2. Biblioteca de fragmentos de anticorpos

A biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos IgG/IgM foi fornecida pela pesquisadora profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão e pelo pesquisador prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido do Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB). Esta biblioteca foi construída por Dantas-Barbosa; Brígido; Maranhão, (2005) a partir da extração do RNA mensageiro de células B de pacientes acometidos por osteosarcoma. O mRNA foi utilizado como molde para construção de uma biblioteca de cDNA, seguido de amplificação dos genes de domínio leve variável (VL), leve constante (CL), pesado variável (VH) e pesado constante 1 (CH1), os quais foram rearranjados por PCR *overlapping* para remontagem das sequências Fabs. As sequências gênicas que codificam para a sequência dos Fabs foram clonadas em plasmídeo (fagomídeo) pComb3X (figura 11).

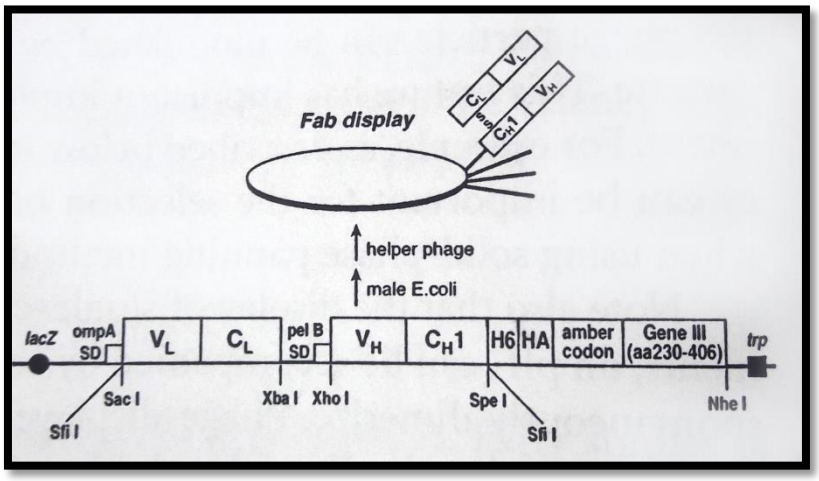


Figura 11 - Esquema ilustrativo do sítio de clonagem do vetor pComb3X.
A figura ilustra a região de clonagem da sequência codificadora do Fab no fagomídeo pComb3x e a expressão na superfície do bacteriófago por auxílio do fago *helper*. Retirado de Barbas et al., 2001.

3.3. Preparo do fago auxiliar VCSM13

(Adaptado de BARBAS et al., 2001)

Uma vez que fagomídeos carecem dos genes necessários para a montagem e replicação da partícula viral, bibliotecas de *Phage Display* clonadas nestes tipos de vetores requerem a adição de um fago auxiliar (*helper*). Além de um gene marcador de seleção de resistência à canamicina, o fago *helper* contém todos os genes codificam para a formação de um bacteriófago filamentoso. Assim, a co-infecção de bacteriófagos recombinantes, portadores de fagomídeos, e de fagos *helper* garante a reprodução de novas partículas virais recombinantes que encapsulam preferencialmente o fagomídeo. Isso ocorre porque a cadeia simples de DNA originada pelo *helper* possui mutações que dificultam o seu encapsulamento (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

i. Para o procedimento de preparo do fago *helper*, foi inoculada uma colônia isolada de *E. coli* da cepa XL1-Blue em 5mL de meio SB contendo tetraciclina numa concentração final de 10 µg/mL e incubada sob agitação a 250 rpm, 37ºC durante a noite. Após, 20µL do pré inóculo foram diluídos em 5mL de meio SB contendo tetraciclina 10 µg/mL e esta cultura foi mantida sob agitação. Quando a densidade óptica ($O.D._{600nm}$) atingiu o valor de 0.8, foram infectados 100µL desta com 2µL de fago *helper* estoque diluído nas ordens 10^{-6}, 10^{-7} e 10^{-8} , seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após, 50µL de cada preparação foram adicionados em meio LB top-ágar liquefeito. A mistura foi realizada por inversão, o conteúdo despejado sobre placas de LB-ágar e estas foram incubadas a 37ºC durante a noite. No dia seguinte, foi possível observar as placas de lise, colônias de bactérias com retardo no crescimento devido à infecção pelo fago auxiliar.

ii. Em um tubo falcon de 50mL contendo 10mL de meio SB e tetraciclina 10 µg/mL, foram inoculados 40µL de um pré inóculo de XL1-Blue o qual foi mantido sob agitação a 37ºC até atingir OD 0.8 – 1.0. Com o auxílio de uma ponteira estéril, foi transferida uma placa de lise para esta cultura a qual foi mantida sob as mesmas condições de cultivo por mais duas horas. Posteriormente, a cultura infectada foi transferida para um elerlenmeyer de 2L, sendo acrescida de mais 500mL de meio SB

pré aquecido e 70 µg/mL de antibiótico canamicina e cultivada a 37ºC, 250rpm durante a noite.

iii. No dia seguinte, a cultura foi transferida para tubos de 50mL de centrifugada a 2500xg por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e incubados a 70ºC por 20 minutos a fim de eliminar bactérias residuais ainda presentes. Em seguida o material foi novamente centrifugado a 2500xg por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a 4ºC.

Determinação do título: 2µL de diluições da ordem 10^{-7}, 10^{-8} e 10^{-9} do fago produzido foram utilizados para infectar 100µL de uma cultura de *E. coli* XL1Blue $O.D._{600nm}$ 0.8. Esta suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, 50µL de cada preparação foram adicionados em meio LB top-ágar liquefeito. A mistura foi realizada por inversão, o conteúdo despejado sobre placas de LB-ágar e estas foram incubadas a 37ºC durante a noite. O título foi calculado a partir da contagem do número médio de placas de lise multiplicado pela diluição do fago.

3.4. Preparo de células eletrocompetentes

(Adaptado de Barbas et al., 2001 e Maranhão, 2003)

i. Para o preparo do pré-inóculo, uma colônia isolada de bactéria *E. coli* XL1-Blue foi inoculada em meio SB com 10 µg/mL de tetraciclina e cultivada durante a noite a 37ºC sob agitação de 250 rpm. No dia seguinte, 4mL do pré inóculo foram diluídos em 1L de SB acrescido de 5mL da solução estoque de glicose 2mol/L e 5mL da solução estoque de Mg 2mol/L, sendo este volume dividido em 4 erlenmeyers de 1L e cultivado a 250rpm, 37ºC até atingir OD_{600nm} 0.7 – 0.9.

ii. A cultura bacteriana foi centrifugada a 3000xg durante 20 minutos a 4ºC em tubos falcon de 50 mL. A partir desta etapa os frascos contendo o sedimento de células foram mantidos em gelo.

iii. O sedimento bacteriano foi ressuspendido em 30-40mL de glicerol 10% (v/v) gelado, centrifugado a 3000xg durante 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante descartado, sendo este procedimento repetido três vezes. Por fim, as células foram ressuspendidas em 1-2mL de glicerol 10% (v/v) gelado. Este volume foi divido em microtubos previamente resfriados em alíquotas de 200µL, as quais foram estocadas

no freezer -80ºC e utilizadas na eletroporação e nos preparos de pré-inóculo nos experimentos de seleção.

3.5. Transformação bacteriana com biblioteca pComb3XSS-Fab

(Adaptado de Barbas et al., 2001)

i. Para o procedimento de transformação por eletroporação, foram separados 6 microtubos com células eletrocompetentes recém preparadas. Em cinco destes foi adicionado 1µg de DNA (Biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes – pComb3XSS-Fab), enquanto que no sexto e último tubo foi adicionado 10ng de vetor pUC18 como controle positivo. O vetor pComb3XSS apresenta resistência a carbenicilina. Cada mistura foi adicionada em cubetas BioRad 0.2mm previamente resfriadas e submetidas a eletroporação nas seguintes condições: 2,5 kV de voltagem, 25µF de capacitância e 200Ω de resistência.

ii. Imediatamente após cada choque, a cubeta foi lavada com 3mL de meio SOC. Os 15mL totais de transformação com a biblioteca, bem como os 3mL de transformação com o vetor pUC18 foram incubados sob agitação por 1 hora a 37ºC.

iii. Para calcular a eficiência do processo de transformação foram plaqueados 100µL, 10µL e 1µL da suspensão bacteriana transformada em placas de LB ágar-carbenicilina.

iv. Foram adicionados à cultura 10mL de meio SB pré aquecido e suplementado com 20 µg/mL de carbenicilina e 20 µg/mL de tetraciclina. A cultura ficou sob agitação de 250rpm a 37ºC por 1 hora e em seguida foi adicionada mais carbenicilina para uma concentração final de 50 µg/mL, sendo a cultura mantida por mais uma hora nas mesmas condições de incubação.

v. Os 15mL de cultura foram transferidos para um erlenmeyer de 1L contendo meio SB pré aquecido para um volume final de 200mL, 50 mg/mL de carbenicilina, 10 µg/mL de tetraciclina e 1% de glicose. Foram adicionados também 2mL de fago auxiliar VCSM13 ($1x10^{13}$ *pfu*/mL) e a cultura foi incubada sob agitação a 300rpm, 37ºC por 2 horas. Logo após, foi adicionado antibiótico canamicina numa concentração final de 70 µg/mL, seguido de agitação durante a noite sob as mesmas condições.

vi. A cultura cultivada durante a noite foi centrifugada a 6000xg por 15 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Nesta etapa o sedimento bacteriano foi guardado para futuras extrações plasmidiais. Os fagos presente no sobrenadante foram precipitados pela adição de 4% (p/v) de PEG 8000 e 3% (p/v) de NaCl, sendo esta mistura, após dissolvida, incubada em gelo por 30 minutos.

vii. Em seguida, a suspensão de fagos e sais precipitantes foi centrifugada a 6200xg a 4ºC durante 40 minutos, o sobrenadante foi descartado, e os tubos foram deixados invertidos por 10 minutos sobre papel toalha a fim de garantir a secagem do sedimento com as partículas virais.

viii. Por fim, as partículas foram coletados por ressuspensão do sedimento com 2mL de TBS-BSA 1% (p/v). O volume foi transferido para microtubos e centrifugado em velocidade máxima de microcentrífuga a 4ºC por 5 minutos para remoção de quaisquer resíduos bacterianos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e armazenado a 4ºC em azida sódica 0,02%.

3.6. *Panning* - Seleção da biblioteca de Fabs frente aos antígenos de interesse

(Adaptado de Barbas et al., 2001)

Uma vez que a biblioteca está expressa na superfície dos fagos, pode-se dar início ao processo de seleção dos Fabs contra o antígeno de interesse. Recomenda-se que a seleção seja realizada no mesmo dia de preparo das partículas virais. Neste trabalho, foram realizados 5 *rounds* de seleção de acordo com o protocolo abaixo.

i. Para imobilização do antígeno (sensibilização), foram adicionados 5µg de massa do antígeno de interesse diluídos em 25µL de TBS-1X em dois poços de uma placa MaxiSorp® Nunc de 96 poços. A placa foi selada e mantida na estufa a 37ºC por 1 hora.

ii. A solução de sensibilização foi removida e a poços foram bloqueados com 100µL de TBS-BSA 3% (p/v). A placa foi selada e mantida na estufa a 37ºC por 1 hora.

iii. Neste intervalo, foi preparado um inóculo contendo 5mL de meio SB, 10 µg/mL de tetraciclina, glicose 1% (v/v) e 5µL de células *E. coli* XL1-Blue

eletrocompetentes, para ser utilizado no passo **vii** deste protocolo. Esta cultura foi incubada a 37ºC sob agitação a 250 rpm até atingir OD_{600nm} 0.8 – 1.0.

iv. Após o bloqueio, esta solução foi removida e foram adicionados 100µL da solução de fagos recombinantes (partículas virais expressando a biblioteca de fragmentos de anticorpos preparada na etapa anterior). A placa foi selada e mantida na estufa a 37ºC por 2 horas.

v. Para o processo de seleção, a solução de fagos foi removida e os poços foram lavados com TBS-Tween 0,5% de acordo com os seguintes parâmetros:

- adição de 150µL de solução TBS-Tween;
- pipetagem vigorosa dez vezes *up/down*;
- intervalo de 5 minutos com esta solução no poço;
- descarte da solução e repetição do processo mais 4 vezes.

vi. Após as lavagens, as partículas virais recombinantes de maior afinidade ao antígeno foram recuperadas/eluídas pela adição de 50µL de tampão ácido (Glicina HCl 100mM, pH 2.2) por 10 minutos. Posteriormente o volume foi recuperado com o auxílio de uma pipeta e adicionado em um microtubo previamente preparado contendo solução neutralizante (Tris-base 2M). O volume de 3µL de solução neutralizante a ser utilizado foi estabelecido com base no pH neutro revelado por uma fita indicadora de pH (Merck).

vii. Cinquenta microlitros dos fagos obtidos no passo anterior foram utilizados para infectar, durante 15 minutos a temperatura ambiente, 2mL de células XL1-Blue (OD_{600nm} 0.8 – 1.0) preparadas no passo **iii**.

OBS: Nesta etapa, foram reservados 100µL da infecção para serem utilizadas na titulação *output*.

viii. Após o período de infecção, os 2mL de cultura foram acrescidos de 6mL de SB pré aquecido, 10 µg/mL de tetraciclina e 20 µg/mL de carbenicilina, seguido de 1 hora de incubação a 37ºC e 250 rpm. Posteriormente, foi adicionada mais carbenicilina para uma concentração final de 30 µg/mL e as mesmas condições de cultivo.

ix. Em seguida, foi adicionado 1mL de fago auxiliar VCSM13 (10^{-12} a 10^{-13} *pfu*/mL) à cultura e este volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 1L. Foram adicionados 91mL de meio SB pré aquecido, 50 µg/mL de carbenicilina, 10 µg/mL de tetraciclina e glicose 1% (v/v). Esta cultura foi incubada por 2 horas a 37ºC

sob agitação de 300 rpm e posteriormente acrescida de 70 µg/mL de canamicina. Seguiu-se para agitação durante a noite sob as mesmas condições.

x. Na manhã seguinte, a cultura foi centrifugada a 5000xg por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para novos tubos e o sedimento bacteriano residual foi armazenado a -20ºC para futuras extrações plasmidiais.

xi. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e neles foram adicionados 4% (p/v) de PEG 8000 e 3% (p/v) de NaCl. Após a diluição destes agentes, o material foi incubado em banho de gelo por 30 minutos para precipitação dos fagos.

xii. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 6200xg por 40 minutos a 4ºC e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram deixados invertidos sobre papel toalha a fim de secar o sedimento contendo os fagos. Por fim, as partículas foram coletadas utilizando-se 2mL de TBS-BSA 1% (p/v) para lavar as paredes do tubos e ressuspender o sedimento. Este volume foi transferido para microtubos e centrifugado em velocidade máxima de microcentrífuga a 4ºC por 5 minutos para remoção de quaisquer resíduos bacterianos. As partículas virais foram transferidas para novo microtubo e armazenadas a 4ºC em azida sódica 0,02%.

Os fagos recombinantes recuperados representam a população de fagos selecionados durante o primeiro *round*. Este material será usado para uma consecutiva seleção, o *round* 2, de forma a enriquecer cada vez mais aquelas partículas virais de maior afinidade ao antígeno de interesse.

A figura 12 a seguir ilustra um esquema simplificado da metodologia de seleção (*panning*) de fagos frente a determinados antígenos:

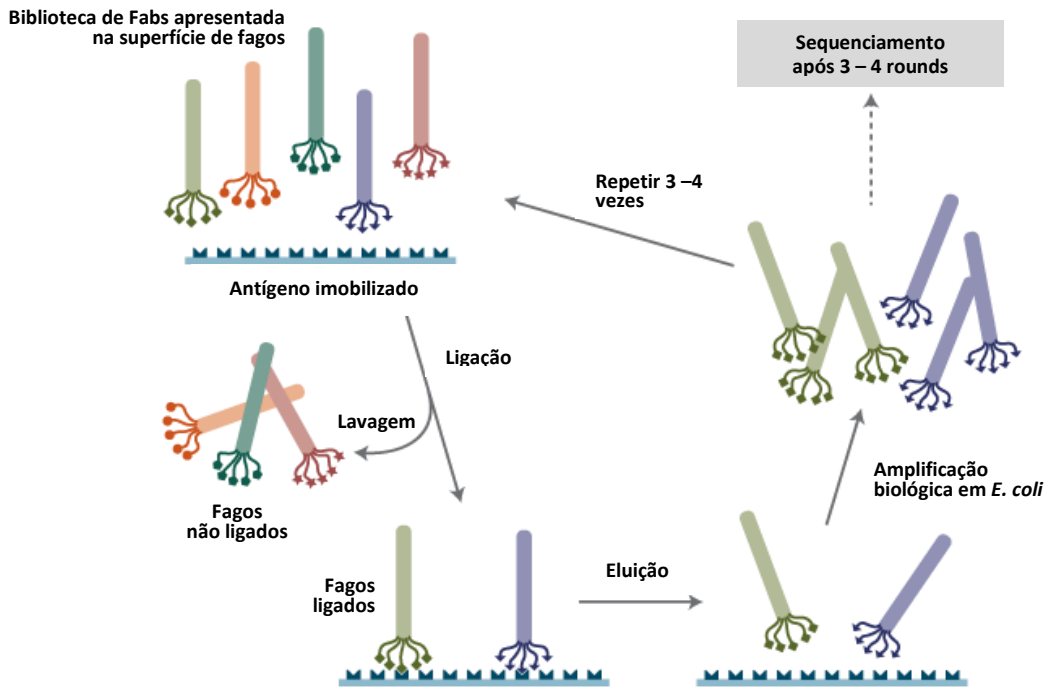


Figura 12 - Representação esquemática da seleção de fagos frente a antígenos imobilizados.

A figura ilustra o sistema de seleção por *panning* passo a passo, iniciando pela imobilização do antígeno. Posteriormente é adicionada a biblioteca de fragmentos de anticorpos; lavagens para remoção dos ligantes de menor afinidade e recuperação dos ligantes de alta afinidade. Por fim, estes são amplificados biologicamente por infecção em *E. coli* e utilizados em consecutivos *rounds* de seleção. Ao final, é realizado sequenciamento para análise dos clones enriquecidos. Adaptado de www.neb.com.

3.7. Titulação *input* e *output*

(Adaptado de Barbas et al., 2001)

- *Input*

  É realizada com a suspensão de partículas virais que será adicionada na placa de seleção, portanto trata-se do “título de entrada”.

  - Foram preparadas diluições da ordem 10^{-8}, 10^{-9} e 10^{-10} da mesma suspensão de fagos recombinantes (não selecionados) que foi adicionada na placa de 96 poços do passo **iv** do item anterior (*Panning* - Seleção da biblioteca de Fabs frente aos antígenos de interesse);

- Infectou-se 200µL de células XL1-Blue (O.D.$_{600nm}$ 0.8 – 1.0) com 2µL de cada uma das diluições, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos;
- Por fim, foram plaqueados 100µL cada uma destas diluições em placas de LB ágar suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina e 1% de glicose (v/v). Incubação em estufa a 37ºC durante a noite.

- *Output*

  É realizado com os 100µL de infecção reservados no passo **vii** do item anterior (*Panning* - Seleção da biblioteca de Fabs frente aos antígenos de interesse), sendo portanto as partículas virais recuperadas após a seleção na placa. Trata-se do "título de saída".

  - Foram preparadas diluições da ordem 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} da suspensão de células infectadas reservadas;
  - Então, foram plaqueados 100µL de cada uma destas diluições em placas de LB ágar suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina e 1% de glicose (v/v). Incubação em estufa a 37ºC durante a noite.

O valor dos títulos é calculado multiplicando-se o número médio de colônias obtidas pela diluição e pelo volume da infecção.

3.8. Preparo do DNA para sequenciamento

Conforme mencionado no protocolo de *panning*, o sedimento bacteriano referente a cada *round* de seleção e amplificação das partículas virais foi armazenado a -20ºC. A partir deste material, foi realizada a extração de DNA (fagomídeo), o qual foi utilizado como molde nas reações de PCR para obtenção dos amplicons referentes aos domínios VL e VH dos fragmentos de anticorpos humanos recombinantes.

Os sedimentos bacterianos foram ressuspendidos em meio LB e seguiu-se para a extração de DNA utilizando-se um kit de Miniprep conforme as orientações do fabricante.

Para as reações de polimerase em cadeia (PCR) foram utilizados oligonucleotídeos (*primers*) específicos desenhados para as regiões flanqueadoras e canônicas das cadeias VL e VH do Fab de imunoglobulinas humana (tabela 01).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos para as regiões canônicas flanqueadoras dos domínios VL e VH dos genes de Fab de imunoglobulinas humanas

Oligonucleotídeo	Abrangência	Sequência
5' Fd_overlap (LeadVH)	Amplificação a partir da região 5' do VH	5' GCTGCCCAACCAGCCATGGCC 3'
3' VH_rev (HFab_VHJ_parc)	Amplificação a partir da região 3' do VH	5' CGATGGGCCCTTGGTGGAGGC 3'
5' V Kappa (HSCK)	Amplificação a partir da região 5' do VL	5' GGGCCCAGGCGGCCGAGCTC 3'
3' V Kappa rev (HCK5-B)	Amplificação a partir da região 3' do VL	5' AAGACAGATGGTGCAGCCACAGT 3'

As reações de PCR para obtenção dos fragmentos VH e VL foram realizadas separadamente utilizando como molde o produto de miniprep referente a cada *round* de seleção. Para esta reação foi utilizada a enzima taq DNA polimerase, seguindo as indicações do fabricante. A reação está apresentada na tabela 02:

Tabela 2 - Componentes da reação de PCR para amplificação dos domínios VL e VH do Fab de imunoglobulinas humanas

Reagente	Concentração final	Volume (µL)
DNA	20-50 ng	(Variável)
Buffer 5X	1X	10
$MgCl_2$ (25mM)	1mM	2
dNTP (10mM)	0,2mM	1
Oligonucleotídeo Forward 5' (10 µM)	0,2mM	1
Oligonucleotídeo Reverse 3' (10 µM)	0,2mM	1
Taq DNA polimerase	1,25U	0,25
H_20 q.s.p.		50

Os parâmetros de termociclagem foram definidos de acordo com as temperaturas de anelamento dos *primers*, sendo apresentadas na tabela 03 a seguir:

Tabela 3 - Parâmetros de termociclagem para amplificação dos domínios VL e VH do Fab de imunoglobulinas humanas

Passo	Temperatura (ºC)	Tempo (min)	
1	95	2	
2	95	1	Repetir os passos 2, 3 e 4 trinta vezes
3	65	1	
4	72	1	
5	72	5	
6	4	Hold	

Ao final de cada reação de PCR, todo o volume desta era aplicado em gel de agarose 0,8%, utilizando tampão de amostra para visualização da corrida do DNA no gel. A eletroforese foi conduzida em tampão de corrida TAE 1X, a 40V, em temperatura ambiente. Para visualização do DNA, foi utilizado um sistema de fotodocumentação PhotoDoc-It^{TM} (UVP). A banda e interesse referente ao amplicons foi recortada com o auxílio de um bisturi e purificada utilizando um kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme as orientações do fabricante.

3.9. Sequenciamento de nova geração (NGS – *Next generation sequencing*)

Os métodos de sequenciamento de nova geração revolucionaram a pesquisa em genômica devido à sua capacidade de sequenciar milhões de pequenos fragmentos de DNA em paralelo. Cada um dos três bilhões de bases do genoma humano pode ser sequenciado múltiplas vezes proporcionando alta profundidade na obtenção de dados, o que permite sua utilização na pesquisa e em várias práticas clínicas para detecção de mutações, por exemplo. Esta tecnologia trouxe grandes contribuições para o *Phage Display* ao possibilitar que milhares de sequências

provenientes do processo de seleção fossem identificadas e rastreadas (BRINTON et al., 2016). Um NGS envolve basicamente 4 passos: (I) preparação da biblioteca de DNA com adaptadores e index, (II) formação dos *clusters* de DNA na *flow cell*, (III) sequenciamento e (IV) análise de dados conforme o objetivo do trabalho. A princípio, o conceito por trás da tecnologia NGS é semelhante ao do sequenciamento de Sanger: uma DNA polimerase catalisa a incorporação de dNTPs, marcados por uma sonda fluorescente, numa cadeia molde durante ciclos consecutivos de síntese de DNA. Assim, durante cada ciclo, no ponto de incorporação, os nucleotídeos são identificados pela excitação de fluoróforo (BEHJATI; TARPEY, 2013; ILLUMINA, 2015).

Os amplicons referentes às sequencias codificadoras dos Fabs, obtidos nas etapas de preparo do DNA, foram submetidos à sequenciamento NGS na plataforma Illumina Miseq, utilizando o kit de sequenciamento MiSeq® Reagent Kit v3 (2x300 ciclos). O preparo da biblioteca de sequências foi realizado utilizando-se oligonucleotídeos com sequências complementares as das regiões canônincas de imunoglobulinas (presentes nas extremidades dos amplicons obtidos por PCR) acrescido de pares de base complementares ao dos adaptadores da *flow cell* do sistema Illumina. Em destaque estão as sequências complementares a dos adaptadores so sistema:

- *Forward* VH:
  5’<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u>GCTGCCCAACCAGCCATGGCC
- *Reverse* VH:
  5’<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u>CGATGGGCCCTTGGTGGAGGC

- *Forward* VL:
  5’<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u>GGGCCCAGGCGGCCGAGCTC

- *Reverse* VL:
  5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT

O trabalho de sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto.

3.10. Análise do sequenciamento e seleção das cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas

Os dados gerados pelo NGS foram analisados na plataforma ATTILA (AutomaTed Tool For Immunoglobulin Analysis) desenvolvida no Laboratório de Bioinformática da Universidade de Brasília (http://attila.computationalbio.org/). Esta plataforma é capaz de identificar, discriminar e analisar sequências que codificam para as cadeias leve e pesada de imunoglobulinas humanas baseando-se na distância entre resíduos de aminoácidos canônicos destas moléculas. Comparando os dados correspondentes aos *rounds* inicial e final do processo de seleção, o programa reporta os maiores enriquecimentos de sequências (denominadas candidatas), sugerindo aquelas que possivelmente tem a maior afinidade pelo antígeno. Para fins didáticos, o processo de enriquecimento está exemplificado na figura 13 a seguir:

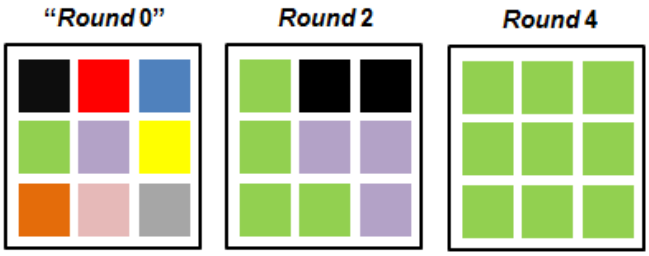


Figura 13 - Representação esquemática do processo de enriquecimento que ocorre durante o *panning*.
A população de clones de maior afinidade, representado pela cor verde, é numericamente enriquecido durante o processo de seleção.

A plataforma ATTILA é capaz de fornecer a análise dos clones VH e VL que sofreram maior enriquecimento, a codificação destes em aminoácidos, as regiões

determinantes de complementariedade (CDRs) 1, 2 e 3 bem como as *frameworks* 1, 2 e 3. A partir da observações dos clones que apresentaram maior enriquecimento, foram selecionados dois VHs e um VL contra cada antígeno, totalizando dois clones reativos para α-DG e dois clones reativos para MUC-1.

Utilizando a ferramenta *Backtranseq* (http://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/) os aminoácidos foram retrocodificados em nucleotídeos com base no *codon usage* <Eeco_h.cut> para otimização de códon e expressão em células *E. coli*. A seguir, com o auxílio da plataforma BioEdit©, foram identificados e removidos os possíveis sítios de restrição existentes dentro das sequências VH's e VL's. A fim de se garantir a qualidade e integridade da sequência, foram identificadas todas as CDR's 1, 2 e 3 de VH e VL conforme a definição de Kabat e as sequências foram submetidas a alinhamento na ferramenta IGBLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi).

3.11. Estratégia de clonagem do scFv em vetor de expressão

Unidades scFv são estruturas simples que não necessitam de modificações pós traducionais, sendo ideais para expressão em sistema procarioto (*E. coli*). A construção destes fragmentos deve ser elaborada de forma que o domínio VH, na extremidade amino-terminal esteja conectado ao domínio VL carboxi-terminal. O peptídeo conector destas unidades é uma cadeia polipeptídica flexível composta por quatro glicinas e uma serina repetidas três vezes $(GGGGS)_3$ (GOULART et al., 2015).

As sequências escolhidas codificadoras so scFv foram sintetizadas em vetor de expressão pET-29a(+) entre os sítios de restrição *Nde* I e *Xho* I pela empresa Biomatik. Este vetor possui uma HisTag $(His)_6$ que fusiona-se na porção carboxi-terminal da proteína recombinante, sendo esta uma estratégia de purificação com base em cromatografia IMAC (do inglês *Immobilized metal affinity chromatography*) por níquel. Além disso, foi adicionado na extremidade carboxi-terminal um *tag* sintético FLAG (DYKDDDDK) de purificação e detecção. A ilustração abaixo representa o sistema de expressão descrito:

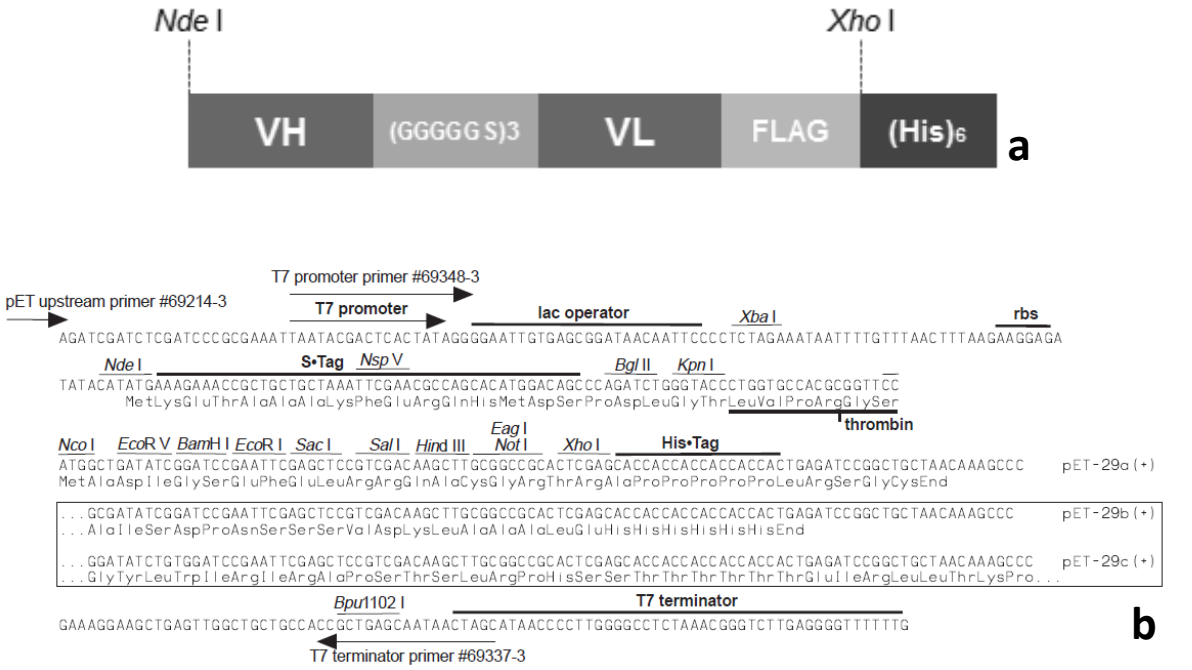


Figura 14 - Representação esquemática da estratégia de clonagem dos scFvs em vetor pET29(a).
a) Os genes codificadores dos domínios leve e pesado serão unidos por um peptídeo conector flexível $(GGGGGS)_3$, seguidos de um tag FLAG, clonados entre os sítios de restrição *Nde* I e *Xho* I. A causa de histidina $(His)_6$ é proveniente do próprio vetor; (b) detalhe da região de múltipla clonagem do vetor pET29(a).

Os clones obtidos pela seleção frente ao antígeno 29 (MUC1) foram denominados scFv-anti29-VH1VL e scFv-anti29-VH2VL, enquanto que os clones obtidos pela seleção frente ao antígeno 66 (α-DG) foram denominados scFv-anti66-VH1VL e scFv-anti66-VH2VL.

As sequências gênicas codificadoras dos fragmentos de anticorpos humanos recombinantes obtidas neste trabalho são parte de um processo de patente, em curso, e por isso não serão aqui reportadas.

3.12. Expressão do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL em vetor pET29(a)

Os vetores pET foram originalmente desenvolvidos por Studier e colaboradores na década de 80. Os genes clonados nestes plasmídeos estão sob controle do forte

promotor T7, que garante uma produção proteica equivalente a até 50% do volume celular bacteriano. Para este sistema de expressão, são necessárias cepas bacterianas modificadas com a construção DE3, na qual a célula hospedeira carrega em seu genoma uma cópia do gene codificador da T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lacUV5*. A adição de IPTG promove a expressão desta polimerase extremamente seletiva para seu promotor T7, levando, então, a altos níveis de expressão do gene recombinante clonado no sistema pET (NOVAGEN, 1999; STUDIER; MOFFATT, 1986).

A expressão do fragmento de anticorpo scFv-anti29-VH1VL foi testada em diferentes condições, variando-se cepa bacteriana de *E. coli* (Arctic-DE3 e BL21-DE3), temperatura e tempo de indução, bem como a concentração de IPTG (dados não apresentados). Considerando o rendimento da produção, estabeleceu-se a cepa *E. coli* BL21-DE3 como células hospedeira produtora, sob condições de indução a 20ºC e 0,5mM de IPTG durante 16 a 18 horas.

Foram utilizados 100ng do plasmídeo recombinante pET29(a)-scFv-anti29-VH1VL para transformar células termocompetentes *E. coli* BL21-DE3 por choque térmico a 42ºC por 2 minutos. As células foram previamente preparadas pelo método do cloreto de cálcio descrito por Sambrook e colaboradores (2001). Após o choque, a suspensão bacteriana foi cultivada em 1mL de meio LB a 37ºC durante 1 hora a 180 rpm. O volume foi concentrado para 600µL por centrifugação e dividido em placas de petri contendo LB ágar suplementado com 34 µg/mL de cloranfenicol e 25 µg/mL de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37ºC por 16 horas. Para o preparo do pré inóculo, uma colônia foi inoculada em 5mL de meio LB (34 µg/mL de cloranfenicol e 25 µg/mL de canamicina) e cultivada sob agitação 180rpm a 37ºC por 16 horas. Posteriormente, 4mL da suspensão cultivada foram adicionados em 1L de meio LB autoclavado em erlenmeyer de 2L e suplementado com 34 µg/mL de cloranfenicol e 25 µg/mL de canamicina. Este material ficou sob agitação de 180rpm a 37ºC até que sua densidade óptica (O.D. λ = 600nm) atingisse valor 0.6 – 0.7 para adição de 0,5mM de IPTG. A indução da expressão proteica foi realizada a 20ºC durante 16 - 18h a 180rpm. Por fim, a cultura foi centrifugada a 5000xg durante 10 minutos a 4ºC para obtenção do sedimento bacteriano.

3.13. Purificação do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL

O planejamento do processo de purificação do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL foi baseado em cromatografia de afinidade por níquel IMAC. Esta metodologia baseia-se na capacidade de 4 ou mais resíduos de histidina se ligarem ao níquel imobilizado, sendo altamente difundida e utilizada por pesquisadores do mundo devido à possibilidade de purificação sob condições desnaturantes, reutilização e preço acessível (SIGMA-ALDRICH, 2012).

Para obtenção da proteína recombinante, o sedimento bacteriano de células BL21-DE3 transformadas e induzidas, conforme descrito no tópico anterior, foi ressuspendido em tampão de lise (10 µg/mL de DNAse, 10 µg/mL de RNAse, 0,1 mg/mL de lisozima, 1mM de inibidor de protease PMSF, tampão de lavagem HisTrap GE q.s.p. 10mL) suplementado com 0,5% de Triton X100 e 0,1% de glicerol. Em seguida, as células foram submetidas à lise mecânica por sonicador (Sonics Vibracell-VCX130- Sonics & Material Inc. New Down, CT – USA) com 7 pulsos de 20 segundos a 40 Watts com intervalos de 40 segundos em banho de gelo. O lisado foi centrifugado a 10.000xg por 40 minutos a 4ºC para separação do sobrenadante solúvel e do precipitado insolúvel.

A coluna de purificação (HisTrap 1mL GE Healthcare) foi equilibrada com 10 volumes de tampão de lavagem suplementado com 0,5% de Triton X100 e 0,1% de glicerol; em seguida foi aplicado o sobrenadante solúvel contendo os fragmentos de anticorpos recombinantes e coletado o *flow through*; novamente a coluna foi lavada com 20 volumes de tampão de lavagem 0,5% de Triton X100 e 0,1% de glicerol. Os fragmentos scFv-anti29-VH1VL foram eluídos com tampão de eluição (imidazol 500mM) e 0,5% de Triton X100 e 0,1% de glicerol. Vale ressaltar que previamente foi realizada eluição com gradiente de imidazol, entretanto a proteína de interesse não foi obtida em apenas uma fração, difundindo-se ao longo do gradiente.

A segunda fase do processo de purificação foi realizada em cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 75 (GE Healthcare). O volume proteico obtido na etapa de cromatografia de afinidade foi divido para análise de dois parâmetros cromatográficos diferentes. Na primeira análise foi utilizado um fluxo de 0,4mL/min, enquanto na segunda foi utilizado fluxo de 0,6mL/min. Em todas as etapas, foram coletadas frações de 1ml.

3.14. Análise eletroforética e detecção por *Western Blot* do scFv-anti29-VH1VL recombinante

A análise eletroforética foi realizada com o intuito de avaliar as etapas de purificação pelas quais a proteína recombinante foi submetida, bem como avaliar sua massa molecular aparente.

As amostras foram preparadas sob condições redutoras e desnaurantes com tampão de amostra 6X e aquecimento a 100ºC por 10 minutos. Em seguida foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e submetidas a corrente de 300 Volts (V) e 20 miliamperes (mA) por gel. O resultado pôde ser analisado pela coloração por *Coomassie* durante 2 horas.

Para realização do *Western Blot,* após detectar a purificação homogênea da proteína recombinante, foi preparado no novo gel de acrilamida SDS-PAGE 12% para nova corrida da proteína recombinante purificada e do lisado bacteriano solúvel. Assim, após a separação eletroforética das amostras, foi realizada a transferência destas para membrana de nitrocelulose 0.22 micrômetros utilizando um sistema Bio-Rad Trans-Blot®. O sistema de transferência foi montado utilizando-se duas pequenas esponjas, quatro papéis filtro, uma membrana de nitrocelulose 0.22 micrômetros e o gel pós corrida eletroforética, de forma que as proteínas, negativamente carregadas, migrassem para o eletrodo positivo em direção a membrana. Os parâmetros utilizados foram: 35 V, 300 mA durante 55 minutos com o sistema inserido em banho de gelo. Posteriormente a membrana foi corada com *Ponceau S* para confirmação da eficiência do sistema de transferência. O bloqueio da membrana foi realizado na presença de leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-Tween 0.05% (TBS-T) durante 1 horas e 30 minutos sob agitação. A membrana foi lavada em TBS-T e incubada com anticorpo primário *rabbit* anti-FLAG a 1 µg/mL durante 16 horas sob agitação. Após, a membrana foi lavada 5 vezes com intervalos de 5 minutos com TBS-T e seguiu-se para incubação com anticorpo secundário *goat* anti-*rabbit*-HRP (1:15.000) durante 50 minutos sob agitação. Novamente a membrana foi lavada com TBS-T nas mesmas condições e revelada em filme fotográfico, com exposição de 30 segundos, com auxílio do kit Amersham ECL Prime *Western Blot*ting Detection Reagent (GE Healthcare). A figura 15 abaixo ilustra o sistema de detecção do scFv recombinante.

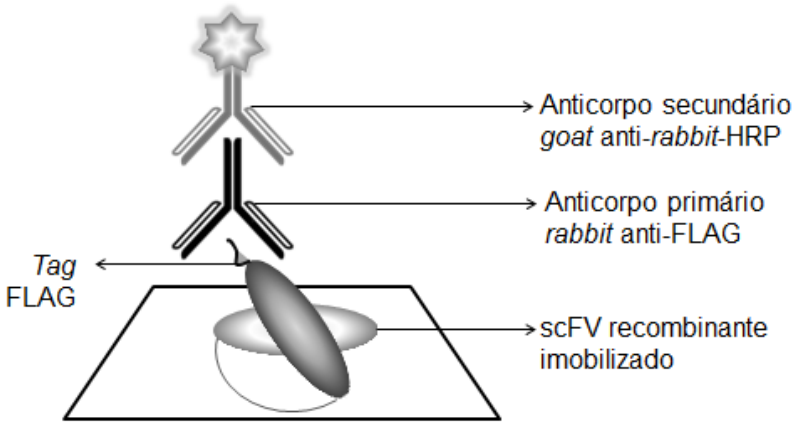


Figura 15 - Representação esquemática do sistema de imunodetecção do scFv recombinante.

O fragmento de anticorpo recombinante foi imobilizado em membrana de nitrocelulose, detectado pelo *tag* FLAG, sendo a revelação realizada por anticorpo conjugado a enzima peroxidade HRP.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do título do fago auxiliar VCSM13

O título do fago *helper* foi obtido a partir da contagem do número médio de placas de lise multiplicado pela diluição do fago. Espera-se que o título calculado esteja entre 10^{12} e 10^{13} *pfu*/mL. Esta preparação é estável por alguns meses a 4ºC, mas seu valor tende a decair com o passar do tempo. A tabela 04 abaixo ilustra os cálculos de contagem do número médio de placas de lise:

Tabela 4 - Titulação do fago auxiliar VCSM13

Diluição	Número de placas de lise	Padronização
(10^{-7})	822	822×10^{7}
(10^{-8})	110	1100×10^{7}
(10^{-9})	11	1100×10^{7}
	Média:	$1{,}0 \times 10^{10}$

O valor $1{,}0 \times 10^{10}$ corresponde ao número de *pfu* por µL plaqueado, portanto o título desta preparação é $1{,}0 \times 10^{13}$ *pfu*/mL.

4.2. Análise da eficiência de transformação

A transformação de células *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes com o fagomídeo pComb3XSS-Fab apresentou um número excessivo de colônias transformantes, sendo inviável sua contabilização para o cálculo de eficiência de transformação. Já a transformação controle utilizando o vetor pUC18 gerou a contabilização demonstrada na tabela 05 a seguir:

Tabela 5 – Análise da eficiência de transformação do vetor pUC18 controle

Placa	Volume plaqueado	Número colônias	Padronização
01	100µL	(*Incontável*)	-
02	10µL	5816	5816
03	1µL	635	6350
		Média:	6083

A tabela indica que 10ng de vetor pUC18 deram origem a 6,1 x 10^3 transformantes a partir de 10µL plaqueados. Portanto, a eficiência de transformação foi de 6,1x10^7 clones/µg DNA/mL.

4.3. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes contra o antígeno 29 relacionado a mucina tumoral MUC1

4.3.1. *Panning*: enriquecimento e titulação dos fagos recombinantes e específicos para o antígeno 29

A eficácia do método de seleção (*panning*) é dada pelo enriquecimento de determinados clones de fagos carreadores de Fabs, o qual pode ser monitorado pela titulação *input* e *output* destes fagos recombinantes. Será apresentada a titulação representativa da titulação do *round* 1 do *panning* com o antígeno 29. A titulação é feita multiplicando-se o número médio de colônias obtidas pela diluição e pelo volume da infecção, com exemplificado nas tabela 06 e 07 e nos respectivos cálculos abaixo.

Tabela 6 - Titulação *input* referente ao *round* 1 de seleção contra o antígeno 29

Diluição	Volume plaqueado	N colônias	Padronização
10^{-8}	100µL	687	687x10^8
10^{-9}	100µL	53	530x10^8
10^{-10}	100µL	7	700x10^8
		Média:	639x10^8

Assim: $639x10^8$ ----- 100µL plaqueados
X ------ 200µL (volume infecção)
$X = 1,278x10^{11}$

Tabela 7 - Titulação *ouput* referente ao *round* 1 de seleção contra o antígeno 29

Diluição	Volume plaqueado	N colônias	Padronização
10^{-1}	100µL	*Incontável*	-
10^{-2}	100µL	2056	$2056x10^2$
10^{-3}	100µL	306	$3060x10^2$
		Média:	$2608x10^2$

Média: $2608x10^2$ ----- 100µL
X ------ 2000µL (volume infecção)
$X = 5,216x10^6$

Após os eventos de titulação, os dados são resumidos em uma única tabela na qual é calculada, também, a razão do título *input* dividido pelo *output*. Esta razão indica aproximadamente o número de fagos removidos (de menor afinidade) para cada fago não removido (ligante de maior afinidade) em cada *round*.

A tabela 08 abaixo resume os resultados de titulação do *panning* realizado para o antígeno 29.

Tabela 8 - Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 29

Round	Número de lavagens	*Input*	*Output*	Razão in/out
1	5	$1,28x10^{11}$	$5,22x10^6$	$2,45x10^4$
2	10	$7,90x10^{10}$	$1,49x10^5$	$5,30x10^5$
3	15	$11,41x10^{10}$	$1,53x10^5$	$9,21x10^4$
4	15	$1,10x10^{10}$	$9,20x10^4$	$1,20x10^3$
5	15	$5,95x10^{10}$	$4,39x10^4$	$1,35x10^6$

4.3.2. Preparo do DNA para sequenciamento (Antígeno 29)

O DNA plasmidial das células infectadas nos *rounds* 0, 1, 2, 3, 4 e 5 foi extraído (figura 16) e utilizado para confirmar a existência das sequências referentes aos domínios VH (figura 17) e VL (figura 18) por reação de polimerase em cadeia (PCR). Após, a banda de interesse foi recortada com o auxílio de um bisturi, purificada com kit Illustra GFX (figura 19) e enviada para as etapas de sequenciamento.

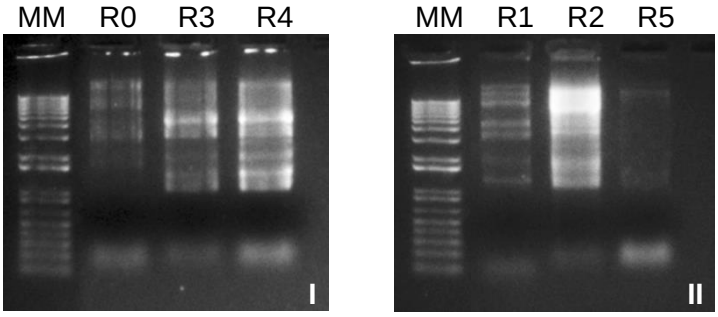


Figura 16 - Análise eletroforética das extrações plasmidiais das células utilizadas no *panning* contra o antígeno 29.
Extrações plasmidiais em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus; Rn extração plasmidial referente ao *round* n.

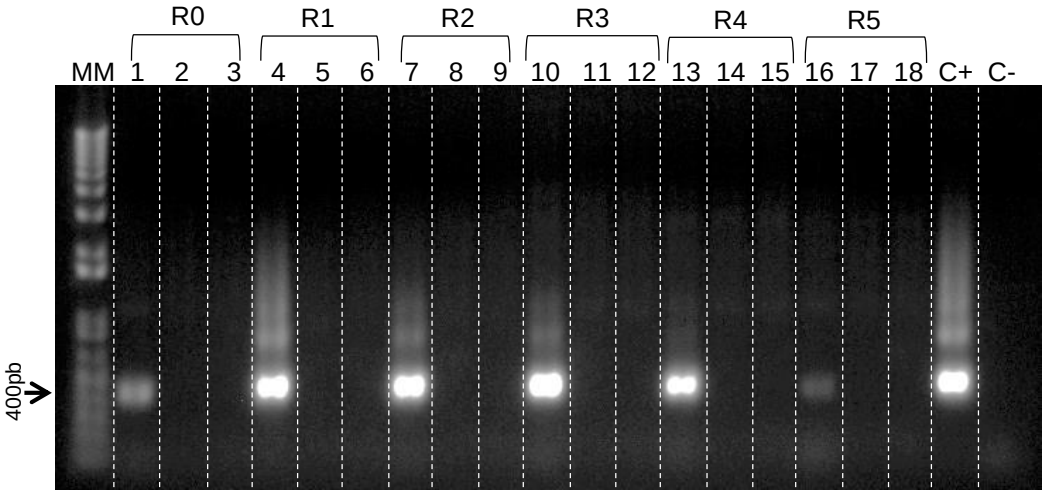


Figura 17 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VH selecionados para o antígeno 29 ao longo do processo de *panning*.
Reação de PCR para confirmação dos domínios VH aplicada em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus. Rn corresponde ao *round* n de seleção. C+: controle positivo das reações, utilizando como molde o DNA original da biblioteca pComb3X-Fab. C-: controle negativo geral da reação de PCR padrão sem DNA molde. As *lanes* 1, 4, 7, 10, 13 e 16 correspondem a reações de PCR padrão para amplificação do domínio VH; as *lanes* 2, 5, 8, 11, 14 e 17 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer reverse*; as lanes 3, 6, 9, 12, 15 e 18 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer forward*.

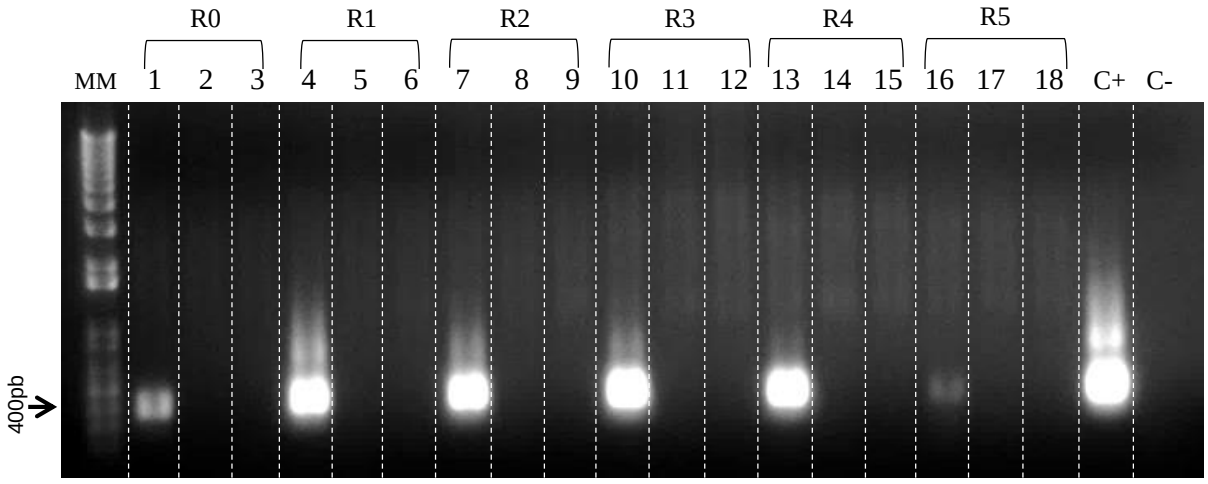


Figura 18 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VL selecionados para o antígeno 29 ao longo do processo de *panning*.

Reação de PCR para confirmação dos domínios VL aplicada em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus. Rn corresponde ao *round* n de seleção. C+: controle positivo das reações utilizando como molde o DNA original da biblioteca pComb3X-Fab. C-: controle negativo geral da reação de PCR padrão sem DNA molde. As *lanes* 1, 4, 7, 10, 13 e 16 correspondem a reações de PCR padrão para amplificação do domínio VH; as *lanes* 2, 5, 8, 11, 14 e 17 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer reverse*; as *lanes* 3, 6, 9, 12, 15 e 18 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer forward*.

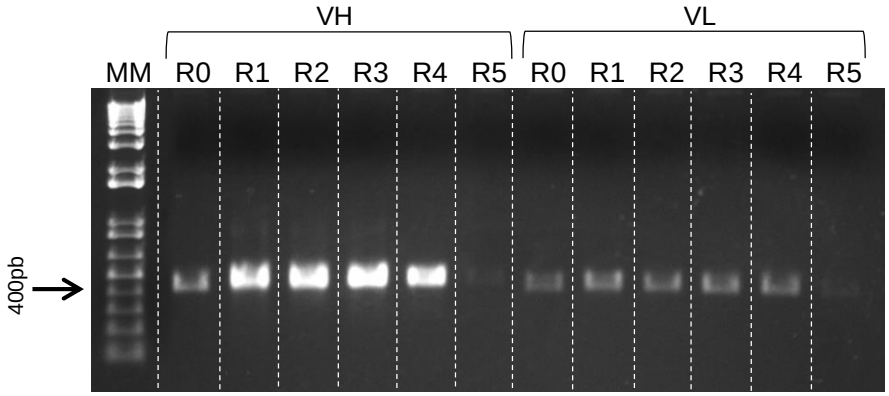


Figura 19 - Análise eletroforética dos produtos de PCR referentes aos domínios VH e VL selecionados para o antígeno 29 purificados.

Produtos de PCR purificados referentes aos domínios VH e VL aplicados em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus; Rn: *round* n de seleção.

4.3.3. Análise do resultado do sequenciamento (Antígeno 29)

A análise do sequenciamento das regiões VH e VL dos fragmentos de anticorpos selecionados por *Phage Display* foi realizada na plataforma ATTILA. Os

gráficos e tabelas gerados fornecem informações à cerca do enriquecimento que determinadas sequências sofreram do *round* 0 até o *round* 4 final, fatores estatísticos de confiabilidade (*p-value*, InfIC e SupIC) (dados não amostrados) e a identidade das sequências selecionadas com sequências de *germlines* de imunoglobulinas humanas de bancos de dados.

As tabelas 09 e 10 abaixo ilustram os dados de enriquecimentos das sequências candidatas para o antígeno 29 relacionado a MUC1. Destacado em pontilhado, estão os clones escolhidos para a continuidade do trabalho.

Tabela 9 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 29: comparação de enriquecimento do *round* 0 x *round* 4

Sequência	Enriquecimento	*Germline* Igs	Identidade (%)
1º	9182,74	VH1-46	87,755
2º	7427,29	VH4-34	90,816
3º	7383,20	VH3-53	85,263
4º	5593,53	VH4-34	78,571
5º	3266,08	VH1-69	71,429
6º	2062,91	VH1-46	100
7º	1194,47	VH3-15	87,879
8º	733,27	VH3-11	84,694
9º	490,78	VH4-34	93,878

Tabela 10 - Clones candidatos para domínio VL específico para o antígeno 29: comparação de enriquecimento do *round* 0 x *round* 4

Sequência	Enriquecimento	*Germline* Igs	Identidade (%)
1º	683,73	V1-3	56,383
2º	337,69	V2-17	53,261
3º	266,98	V1-13	55,319
4º	242,79	V1-19	55,172
5º	237,03	V1-7	51,613
6º	209,67	V2-17	53,846
7º	191,62	V1-13	55,319
8º	177,13	V2-6	50
9º	161,00	V1-13	55,789

Desta forma, foram planejados dois clones de scFv específicos para o antígeno 29: (I) o primeiro clone, constituído pela sequência candidata 1 VH mais a sequência candidata VL, formando o scFv-anti29-VH1VL e (II) scFv-anti29-VH2VL constituído pela sequência candidata 2 de VH mais VL.

A plataforma ATTILA forneceu as sequências selecionadas de domínios VH e VL na forma de aminoácidos. Estas sequências formam retrotraduzidas em pares de base, sendo sua identidade confirmada pela detecção de CDR'S e alinhamento (IGBLAST TOOL). Por fim, sintetizadas e clonadas em vetor pET-29(a) para a expressão proteica na forma de scFvs.

4.3.4. Expressão e purificação do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL

A expressão e purificação por cromatografia de afinidade baseada em IMAC (HisTrap – Níquel) da proteína recombinante foi analisada em SDS-PAGE 12%, conforme ilustrado na figura 20 a seguir:

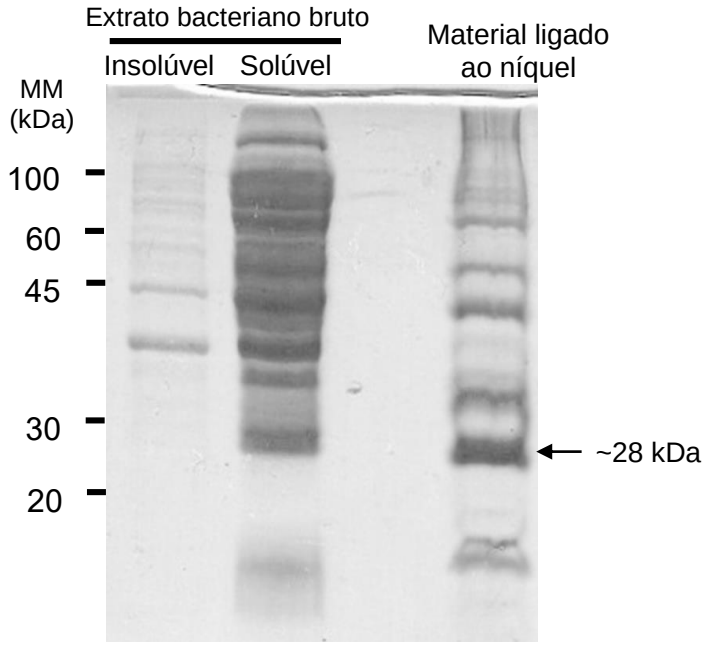


Figura 20 - SDS-PAGE do extrato bacteriano bruto e do material ligado à resina de Ni.

O extrato bruto (materiais insolúvel e solúvel - 7,5µL cada) e o material eluído do Ni (7,5 µL) foram aplicados em gel 12% com tampão de amostra contendo 2-ME. O perfil eletroforético mostra que o scFv recombinante é produzido na forma solúvel. A seta indica o peso molecular preditivo do scFv purificado. MM corresponde ao marcador de peso molecular Sigma ColorBurst ™.

Para se obter uma preparação homogênea de scFv, o material ligado ao Ni foi aplicado em coluna de exclusão molecular (Superdex 75). O pico proteico principal foi concentrada em Amicon 3000MW, filtrado em filtro 0.22µm para esterilização e submetido à análise SDS-PAGE, revelando uma única banda com peso molecular aparente em torno de 28 kDa (Figura 22a). Uma vez que o scFv contém uma marca de detecção (FLAG), a preparação homogênea desta proteína recombinante e do material solúvel (extrato bacteriano bruto) foram analisadas por *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-FLAG. Conforme indicado na Figura 22b, uma banda proteica aproximadamente 28 kDa foi detectada em ambas as amostras, confirmando os dados da figura 22a e o peso molecular predito scFv de acordo com a plataforma ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/).

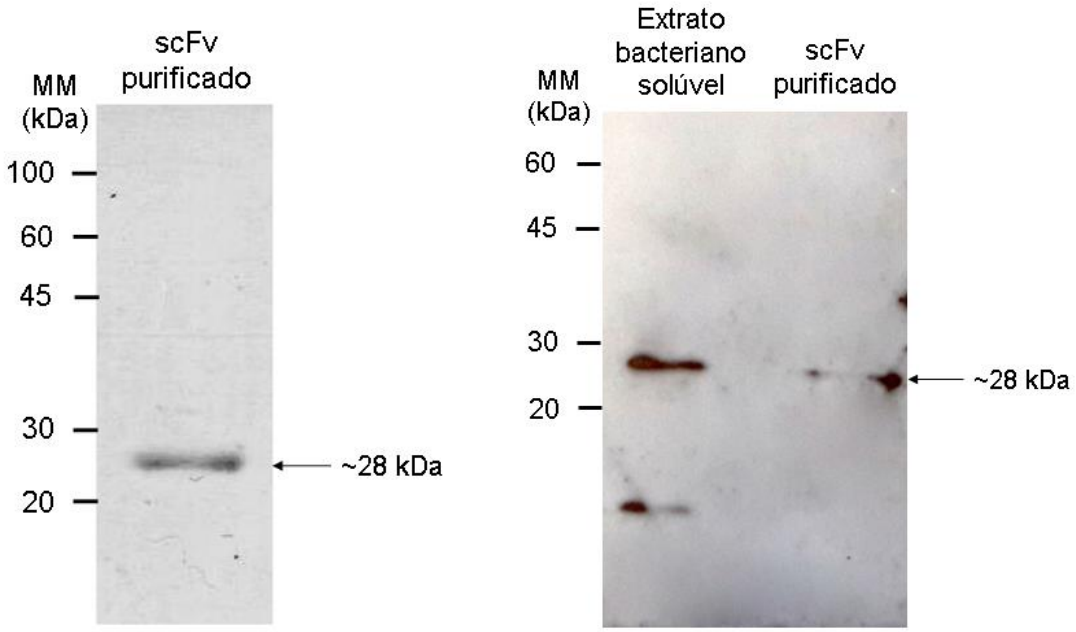


Figura 21 - Análise do perfil de purificação e imunodetecção da molécula scFv-anti29-VH1VL por SDS-PAGE e *Western Blot.*

a) Perfil eletroforético do scFv recombinante purificado por cromatografia de afinidade e gel filtração em gel em gel SDS-PAGE 12%. b) Análise de *Western Blot* da fração solúvel e do scFv purificado usando o anticorpo anti-FLAG. A seta indica o peso molecular aparente do scFv recombinante. MM corresponde ao marcador de peso molecular Sigma ColorBurst ™.

4.4. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos recombinantes humanos contra o antígeno 66 relacionado a α-DG

4.4.1. *Panning*: Enriquecimento e titulação dos fagos recombinantes e específicos para o antígeno 66

A eficácia do método de seleção (*panning*) é dada pelo enriquecimento de determinados clones de fagos carreadores de Fabs, o qual pode ser monitorado e evidenciado pela titulação *input* e *output* destes fagos recombinantes e pela razão entre estes valores. A tabela 11 abaixo resume os resultados de titulação do *panning* realizado para o antígeno 29.

Tabela 11 - Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 66

Round	**Número de lavagens**	***Input***	***Output***	**Razão in/out**
1	5	$6,69x10^{10}$	$4,5x10^{6}$	$1,48x10^{4}$
2	10	$6,3x10^{9}$	$6,02x10^{5}$	$1,04x10^{4}$
3	15	$1,05x10^{10}$	$3,8x10^{3}$	$2,7x10^{6}$
4	15	$8x10^{8}$	$3,7x10^{3}$	$2,1x10^{5}$
5	15	$5x10^{9}$	$2x10^{2}$	$2,5x10^{7}$

4.4.2. Preparo do DNA para sequenciamento (Antígeno 66)

O DNA plasmidial das células infectadas nos *round*s 0, 1, 2, 3, 4 e 5 foi extraído (figura 22) e utilizado para confirmar a existência das sequências referentes aos domínios VH (figura 23) e VL (figura 24) por PCR. Posteriormente, a banda de interesse foi recortada, purificada (figura 25) e enviada para sequenciamento.

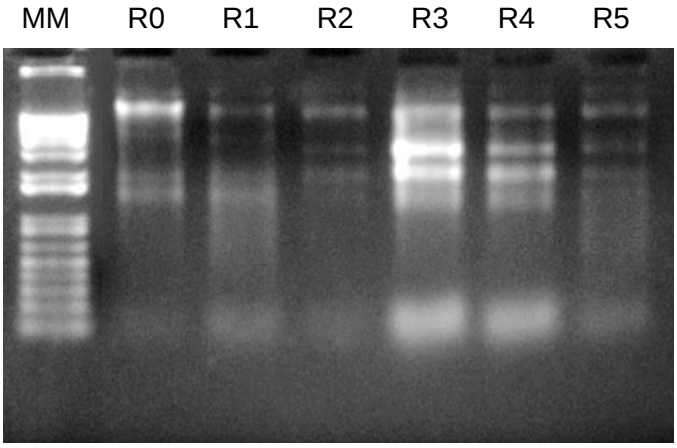


Figura 22 - Análise eletroforética das extrações plasmidiais das células utilizadas no *panning* contra o antígeno 66.

Extrações plasmidiais em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus; Rn extração plasmidial do *round* n.

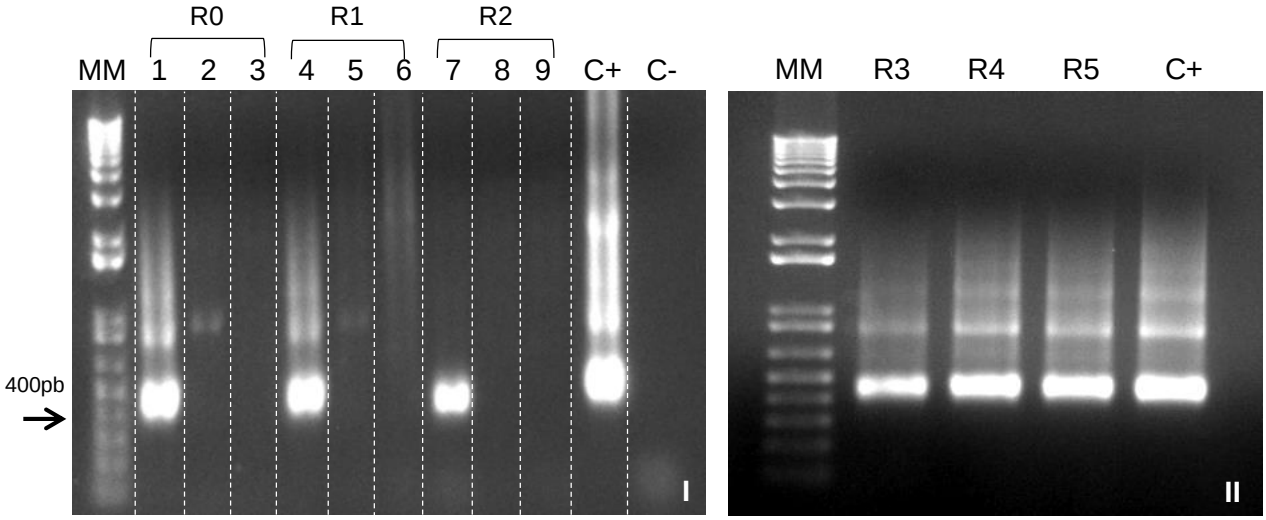


Figura 23 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VH selecionados para o antígeno 66 ao longo do processo de *panning*.

Reação de PCR para confirmação dos domínios VH aplicada em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus. Rn corresponde ao *round* n de seleção. C+: controle positivo das reações utilizando como molde o DNA original da biblioteca pComb3X-Fab. C-: controle negativo geral da reação de PCR padrão sem DNA molde. As *lanes* 1, 4 e 7 correspondem a reações de PCR padrão para amplificação do domínio VH; as *lanes* 2, 5 e 8 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer reverse*; as *lanes* 3, 6 e 9 correspondem à reação de controle de *primers* utilizando apenas o *primer forward*.

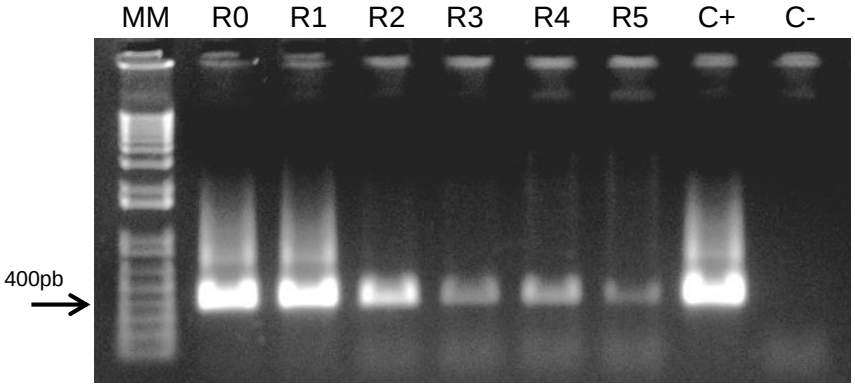


Figura 24 - Análise eletroforética das reações de PCR para confirmação dos domínios VL selecionados para o antígeno 66 ao longo do processo de *panning*.
Reação de PCR para confirmação dos domínios VL aplicada em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus. Rn corresponde ao *round* n de seleção. C+: controle positivo das reações utilizando como molde o DNA original da biblioteca pComb3X-Fab. C-: controle negativo geral da reação de PCR padrão sem DNA molde.

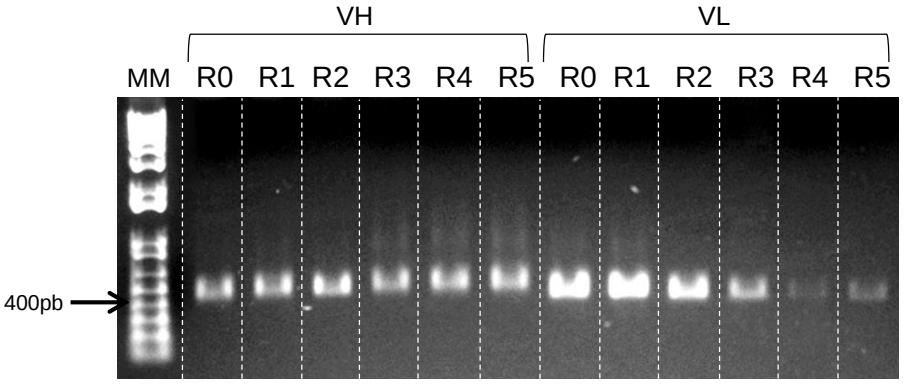


Figura 25 - Análise eletroforética dos produtos de PCR referentes aos domínios VH e VL selecionados para o antígeno 66 purificados.
Produtos de PCR purificados referentes aos domínios VH e VL aplicados em gel de agarose 0,8%. MM: marcador molecular Invitrogen 1kb Plus; Rn: *round* n de seleção.

4.4.3. Análise do resultado do sequenciamento (Antígeno 66)

A análise do sequenciamento dos domínios VH e VL dos fragmentos de anticorpos selecionados por *Phage Display* foi utilizada a plataforma ATTILA.

As tabelas 12, 13 e 14 abaixo ilustram os dados de enriquecimentos e estatísticos das sequências candidatas para o antígeno 66 relacionado a α-DG. Destacado em pontilhado, estão os clones escolhidos para a continuidade do trabalho.

Tabela 12 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 3

Sequência	Enriquecimento	*Germline* Igs	Identidade (%)
1º	1903,07	VH1-18	98,913
2º	1006,49	VH4-34	100
3º	890,11	VH1-69	91,837
4º	847,00	VH3-9	83,838
5º	730,62	VH3-13	96,907
6º	573,29	VH3-48	78,571
7º	553,89	VH3-53	86,598
8º	484,93	VH3-7	83,673
9º	415,96	VH3-11	83,673
10º	377,17	VH3-23	89,691

Tabela 13 - Clones candidatos para domínio VH específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 4

Sequência	Enriquecimento	*Germline* Igs	Identidade (%)
1º	706,59	VH1-46	95,918
2º	345,19	VH3-74	87,5
3º	300,76	VH4-34	97,938
4º	285,16	VH3-74	89,888
5º	229,93	VH1-2	81,633
6º	217,32	VH3-20	97,959
7º	209,51	VH1-2	96,939
8º	198,11	VH1-18	98,901
9º	187,90	VH3-74	90,11

Tabela 14 - Clones candidatos para domínio VL específico para o antígeno 66: comparação de enriquecimento do round 0 x round 4

Sequência	Enriquecimento	*Germline* Igs	Identidade (%)
1º	3112,93	V2-17	51,19
2º	2541,55	V1-3	51,613
3º	1589,23	V2-17	51,087
4º	1510,38	V1-13	56,044
5º	1190,53	V1-13	55,319
6º	1032,83	V1-16	54,023
7º	1023,39	V1-13	55,319

Desta forma, foram planejados dois clones de scFv específicos para o antígeno 66: (I) o primeiro clone, constituído pela sequência candidata 1 VH, do enriquecimento *round* 0 x *round* 3, mais a sequência candidata VL, formando o scFv-anti66-VH1VL e (II) scFv-anti29-VH2VL constituído pela sequência candidata 2 de VH, do enriquecimento *round* 0 x *round* 4, mais VL.

A plataforma ATTILA forneceu as sequências selecionadas de domínios VH e VL na forma de aminoácidos. Estas sequências formam retrotraduzidas em pares de base, sendo sua identidade confirmada pela detecção de CDRs e alinhamento (IGBLAST TOOL). Por fim, sintetizadas e clonadas em vetor pET-29(a) para a expressão proteica na forma de scFvs.

5. DISCUSSÃO

5.1. Preparo do fago *helper*, células eletrocompetentes e transformação

Para este trabalho optou-se por utilizar uma biblioteca de fragmentos de anticorpos (Fabs) clonada em fagomídeo pComb3X. Russel e colaboradores (2004) afirmam que fagomídeos, por serem menores que outros vetores de bacteriófagos, são mais fáceis de trabalhar, pois não são observadas rupturas entre os genes montados, promotores e terminadores, dando origem, então, a uma biblioteca maior e mais diversa. A biblioteca de Fabs utilizada neste trabalho apresenta uma diversidade de $1{,}45 \times 10^8$ clones, um tamanho considerado adequado para se trabalhar na técnica de *Phage Display*. Bibliotecas de tamanho insuficiente, pobres ou com diversidade inapropriada não geram bons resultados após a seleção (BARBAS et al., 2001b; DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005; MAGALHÃES et al., 2015).

Uma vez que o fagomídeo não possui todos os genes necessários para gerar uma nova partícula viral, torna-se necessária a adição do fago auxiliar (*helper*), o qual contém todos os genes requeridos para a replicação do bacteriófago recombinante. A qualidade e adequação das preparações do fago *helper* é baseada no seu título, estimado entre 10^{12} e 10^{13} *pfu*/mL, de acordo com Barbas e colaboradores (2001), a fim de garantir a eficácia da produção de novas partículas virais no processo de infecção. O título do fago *helper* obtido nas preparações deste trabalho apresentou um valor de $1{,}0 \times 10^{13}$ *pfu*/mL, sendo satisfatório e garantindo o sucesso nas obtenções de fagos recombinantes.

Para se obter elevada eficiência de transformação (clones/µg de DNA/mL), Sambrook e colaboradores (2001) sugerem que a transformação seja realizada a 4ºC, que o DNA adicionado esteja a uma concentração entre 1 a 10 µg/mL e que o choque elétrico seja de alta voltagem. Nos procedimentos de transformação deste trabalho, procurou-se manter as células sempre a 4ºC e seguir as recomendações de Sambrook & Russel (2001) e de Barbas e colaboradores (2001), além de ser realizada uma transformação controle. Conforme exibido na sessão de resultados, a eficiência de transformação com o vetor controle pUC18 foi de $6{,}1 \times 10^7$ clones/µg de DNA/mL, entretanto a transformação utilizando o fagomídeo pComb3XSS-Fab gerou inúmeras e incontáveis colônias. Apesar de não ter sido possível calcular a eficiência de transformação com o fagomídeo, é possível inferir que esta também foi elevada:

considerando que foram realizados 5 procedimentos de transformação consecutivos e que o tamanho da biblioteca de Fabs utilizada é de $1,45x10^8$, pode-se concluir que a etapa de transformação foi realizada com sucesso, sendo sua eficiência satisfatória, de forma que a maior parte dos clones tenham transformados as células XL1-Blue.

5.2. Seleção da biblioteca de fragmentos de anticorpos humanos recombinantes contra os antígeno 66 e 29 relacionados a α-DG e MUC1, respectivamente

Barbas e colaboradores (2001) afirmam que a titulação dos fagos *input* pode atingir valores de até 10^{12}, enquanto que os valores do *output* variam de 10^5 a 10^8, dependendo do número de lavagens. A tabela 8 da sessão de resultados ("Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 29") apresenta os dados de titulação do antígeno 29 relacionado a MUC1, na qual é possível observar que os dados estão em conformidade com aquele descrito na literatura. O decaimento da titulação de cada *round* de seleção decorre do processo de seleção e da redução da variabilidade da biblioteca conforme os clones são selecionados. O mesmo pode ser observado na tabela 12 ("Titulação dos fagos selecionados para o antígeno 66") da mesma sessão, que apresenta os dados de *panning* do antígeno 66 relacionado a α-DG. Em ambos os casos foi ainda calculada a razão *input*/*output* que indica o número de fagos removidos (de menor afinidade) para cada fago não removido (ligante de maior afinidade ao alvo). A tendência desta razão é atingir valores cada vez menores, indicando redução na variabilidade da biblioteca trabalhada e a redução no número de fagos ligantes removidos (uma vez que o número de fagos de maior afinidade aumenta ao longo do *panning*). Entretanto esta é uma regra teórica, pois pode-se observar que ao aumentar o número de lavagens por *round*, é aumentada a estringência/força de seleção, de forma que a razão *input*/*output* se mantenha ou até mesmo aumente. Coincidentemente, tanto para a seleção do antígeno 29 quanto do antígeno 66, observa-se uma variação brusca na titulação do quinto *round* ainda que se mantendo o número de lavagens. Quando este fenômeno é observado, sugere-se que o sistema não esteja mais funcionando adequadamente, ou seja, o processo de seleção não está progredindo e a perda de clones ligantes ao antígeno alvo passa a

ser maior do que sua seleção. Por esta razão, foi dada continuidade para as etapas de sequenciamento somente com os fagos selecionados até o quarto *round*.

A quantidade de *rounds* realizados pode variar entre diferentes trabalhos, tipos de biblioteca e antígenos alvos. Por exemplo, Wang e colaboradores (2016) e Wu e colaboradores (2016) trabalharam com uma biblioteca de fragmentos de anticorpos scFv para selecionar clones contra neurotoxina tetânica e transportador de zinco 8. Entretanto, Wang trabalhou com apenas 2 *rounds* de seleção ao passo que Wu utilizou 4 *rounds* de seleção, sendo que ao final um número limitado de clones foram designados para sequenciamento. Williams e colaboradores (2016) utilizaram células T reguladoras como antígeno alvo em 2 *rounds* de seleção por *Phage Display*, enquanto Christiansen e colaboradores (2015) utilizaram dois rounds para mapeamento de epítopos com uma biblioteca de peptídeos (Ph.D.-7 M13, New England Biolabs®). Para o trabalho descrito nesta dissertação, optou-se por seguir a metodologia proposta por Barbas (2001), na qual o acompanhamento do processo de seleção é feito pelos dados da titulação. Porém, analisando a literatura, observa-se que o número de etapas de seleção é bastante variável devido ao fato cada grupo seguir uma metodologia diferente e trabalhar com diversas bibliotecas que respondem aos mais variados antígenos. Tentando minimizar a laboriosidade do método e o tempo dispendido nas etapas de *panning*, ’T Hoen e colaboradores (2012) utilizaram uma biblioteca de peptídeos comercial (Ph.D.-7 M13, New England Biolabs®) contra células KS483 osteoblásticas e realizaram uma série de *rounds*. Ao final, todos os *rounds* foram sequenciados em uma plataforma Illumina Whole Genome Analyzer WG2, sendo possível fazer uma varredura do enriquecimento dos peptídeos, assim como foi proposto e realizado para este trabalho. Os autores concluíram que com apenas dois *rounds* de seleção, o peptídeo de maior afinidade e “ganhador” já havia sido selecionado e que o sequenciamento de nova geração traz imensas contribuições para a tecnologia de *Phage Display*. Este assunto será mais bem abordado no item seguinte “Preparo do DNA, sequenciamento e análise dos dados”.

5.3. Preparo do DNA, sequenciamento e análise dos dados

Analisando os resultados da PCR, nas reações padrão contendo o molde e todos os elementos necessários à reação, foram observados arrastes (*smear*) em algumas amostras, bem como bandas inespecíficas em aproximadamente 1000pb para o antígeno 29 relacionado a MUC1 e 1650pb para o antígeno 66 relacionado à α-DG. Entretanto, os controles negativos apresentaram resultado satisfatório, indicando a ausência de contaminação bem como a qualidade de cada *primer* isolado, incapaz de gerar bandas inespecíficas. Considerando que os parâmetros de temperatura, tempos de anelamento de *primers* e extensão da cadeia foram controlados, bem como a quantidade de reagentes adicionados à reação, sugere-se que os artefatos observados sejam oriundos da velocidade de rampa de temperatura do termociclador, ou seja, o tempo que o equipamento leva para ajustar-se a cada temperatura. Se esta velocidade for lenta, as temperaturas baixas permitem o anelamento inespecífico dos *primers*. É possível considerar ainda que a temperatura de anelamento foi calculada um pouco abaixo do ideal (BIO-RAD LABORATORIES, [s.d.]). Porém, após as bandas corretas serem recortadas do gel, purificadas e novamente analisadas, observa-se que quase 100% dos arrastes e bandas contaminantes são removidos, garantindo a pureza e qualidade do DNA para o sequenciamento.

O sequenciamento de nova geração trouxe grandes contribuições para a tecnologia de *Phage Display* ao possibilitar que milhares de sequencias provenientes do processo de seleção fossem identificadas e rastreadas ao longo do seu processo de enriquecimento (BRINTON et al., 2016). Diversos grupos de pesquisa utilizaram NGS, conseguindo detectar em qual etapa o antígeno candidato já havia se estabelecido como ligante de maior afinidade (’T HOEN et al., 2012; BRINTON et al., 2016; CHRISTIANSEN et al., 2015; RAVN et al., 2010; TURNER et al., 2016). O trabalho descrito nesta dissertação utilizou a plataforma Illumina Miseq de sequenciamento. O MiSeq foi lançado pela Illumina como um sistema de “sequenciamento pessoal” capaz de gerar menor quantidade de dados em menor tempo, se comparado aos sistemas HiSeq e NextSeq do mesmo fabricante. Além disso, esta plataforma é capaz de gerar *reads* do tamanho adequado à necessidade deste trabalho (2X300). Devido às suas vantagens, adequação e maior acessibilidade,

o sistema Miseq (Illumina) foi escolhido como método de sequenciamento deste trabalho.

Analisando as tabelas de clones candidatos geradas pela plataforma ATTILA de bioinformática, nota-se que o enriquecimento da cadeia pesada VH no *round* 4 foi muito maior para o antígeno 29 relacionado a mucina tumoral MUC1 (*fold change* 9182,74), do que para o antígeno 66 relacionado a α-DG (*fold change* 706,59). Tal diferença pode ter ocorrido por duas razões: (I) na seleção de Fabs contra o antígeno 66, após ser realizado o processo de *panning* do *round* 3, a cultura de amplificação de fagos não cresceu por motivos não esclarecidos, devendo esta biblioteca selecionada ser novamente reamplificada. Foi hipotetizado que talvez a estringência de seleção, dada pelo número de lavagens (15 vezes), tenha sido muito elevada e a cultura precisasse de mais tempo para gerar turbidez; (II) a segunda razão pode ser relacionada a origem da biblioteca de fragmentos de anticorpos utilizada, proveniente de pacientes com osteosarcoma. Por este motivo, vários clones presentes na biblioteca já poderiam ser relacionados a alguns tipos de antígenos tumorais e foram ainda mais selecionados no processo de *panning* deste trabalho. Desta forma, em função do *fold change* relativamente baixo para o antígeno 66, optou-se por escolher o melhor clone candidato do *round* 3 e outro do *round* 4. Já para o antígeno 29, optou-se pelos dois clones mais enriquecidos apenas do quarto *round*. Quanto ao domínio leve VL, nota-se que para o antígeno tumoral, seu enriquecimento foi menor se comparado ao VH, - o que já era esperado conforme análises anteriores de bibliotecas de Fabs realizadas pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (dados não publicados) - sugerindo sua menor participação no reconhecimento antígeno-específico. Em relação ao antígeno 66 de α-DG, o enriquecimento de VL foi linear e com *fold change* maior do que aquele observado para as cadeias VH. Dessa forma, tanto para o antígeno 66 quanto para o antígeno 29, foi selecionada apenas a melhor sequência candidata do quarto *round* de seleção.

A combinação do sequenciamento de nova geração e da plataforma ATTILA, utilizados neste trabalho, acrescentam um alto valor agregado na busca pelos fragmentos de anticorpos de interesse. A profundidade da geração de *reads* do NGS permitiu com que um vasto número de fragmentos de anticorpos selecionados fossem identificados e ranqueados, pelo ATTILA, conforme seu aumento de frequência ao longo do processo de seleção (*panning*). Desta forma, diferentemente de diversos

trabalhos anteriormente publicados, nos quais um determinado número de clones de anticorpos eram submetidos a sequenciamento (Sanger), neste trabalho foi possível acessar todas as sequências de anticorpos que foram selecionadas por *panning* na técnica de Phage Display. Além disso, utilizando desta abordagem, é possível combinar domínios VH e VL diferentes.

5.4. Obtenção do fragmento de anticorpo recombinante scFv-anti29-VH1VL

As cepas bacterianas mais utilizadas para expressão de anticorpos recombinantes são BL21-DE3, HB2151e XL1-blue (FIELDS et al., 2013). A escolha de cepa bacteriana foi uma etapa importante devido ao fato de que os domínios VH e VL de imunoglobulinas humanas possuem resíduos de cisteína em sua constituição. A formação de pontes dissulfeto entre estes resíduos, a utilização de um forte promotor (promotor T7 dos vetores pET) e o caráter redutor do meio intracelular são fatores que podem levar a formação de corpos de inclusão (TERPE, 2006). Todos os trabalhos sobre expressão de scFvs, para mucinas tumorais ou não, utilizaram sistemas de expressão controlados pela adição de IPTG. As principais diferenças residiam na concentração deste reagente, no tempo e temperatura de indução. A cepa bacteriana mais citada foi BL21-DE3. A tabela 15 abaixo ilustra as principais diferenças das produções analisadas.

Tabela 15 - Dados resumidos da produção de scFvs por diferentes autores ao longo dos anos

Autor	Produto	Célula hospedeira	IPTG	Temperatura	Tempo
CHENG et al., 2016	scFv anti proteína G vírus da raiva	*E. coli* Bl21-DE3	0,5mM	-	-
(WU et al., 2016a)	scFv anti ZnT8	*E. Coli* Top10	1mM	37ºC	24h
(WANG et al., 2016)	scFv contra TeNT	*E. coli* KS1000-DE3	0,005mM	30ºC	*Over night*
(LIU et al., 2015)	scFv anti FGFR3 tumoral	*E. coli* Bl21-DE3	0,5mM	20ºC	16h

(LIU et al., 2014)	scFv anti aflatoxina B1	*E. coli* Bl21-DE3	0,4mM	37ºC	2,5h
(YUASA; KOYAMA; FUJITA-YAMAGUCHI, 2014)	scFv anti-TF	*E. coli* Bl21-DE3	1mM	37ºC	4h
(SHARMA; SURESH; WUEST, 2014)	scFv anti CA125 tumoral imac	*E. coli* Rosetta-DE3 (derivada de BL21)	0,8mM	26ºC	16h
(MAHGOUB, 2012)	scFv anti EGFRvIII tumoral	*E. coli* Origami-DE3	0,1mM	25ºC	5h
(LIU et al., 2011)	scFv anti Integrina αvβ3	*E. coli* Bl21-DE3	0,4mM	25ºC	6h
(THIE et al., 2011)	scFv anti-MUC1	*E. coli*	50µM	25ºC	3h
(KIM et al., 2002)	scFv anti mucinas gastrointestinais	*E. coli* Bl21-DE3	1mM	37ºC	3h
(RAY et al., 2001)	scFv anti GPRV (raiva)	*E. coli* HB2151	1mM	30ºC	*Over night*
(WONG et al., 2001)	scFv anti-MUC1	*E. coli* HB2151	1mM	30ºC	*Over night*
(HENDERIKX et al., 1998)	scFv anti-MUC1	*E. coli* TG1	1mM	30ºC	*Over night*

Já na década de 90, Kipriyanov e colaboradores relataram a dificuldade de se obter scFvs solúveis e as limitações associadas às técnicas de reenovelamento proteico (*refolding*). Apesar do elevado rendimento de produção de proteínas em corpos de inclusão, são necessários tratamentos intensos de isolamento das células, solubilização, reenovelamento e purificação para se obter a proteína na forma ativa (SINGH et al., 2015). Dentre os autores citados na tabela, Wu et al., (2016), Kim et al., (2002), Cheng et al., (2016), Liu et al., (2014) e Yuasa; Koyama; Fujita-Yamaguchi, (2014) obtiveram os fragmentos de anticorpos na forma insolúvel. Ainda, o trabalho de Sharma; Suresh; Wuest, (2014) apresentou as formas solúvel e insolúvel, mas os autores optaram pela purificação da fração solúvel apenas, devido à baixa viabilidade dos processos de *refolding* (FRENZEL; HUST; SCHIRRMANN, 2013).

A fim de se obter anticorpos scFv na forma intracelular solúvel, além da análise da literatura, foram realizados testes expressão do fragmento scFv recombinante em cepas *E. coli* Arctic-DE3 e BL21-DE3 variando-se IPTG, tempo de indução e

temperatura (dados não mostrados). O sistema de expressão da cepa Arctic-DE3 foi construído a fim de melhorar o rendimento de proteínas insolúveis, na forma solúvel, por meio da atividade de chaperoninas Cpn10 e Cpn60, obtidas da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica* (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010). Porém, seu cultivo deve ser realizado em baixas temperaturas (10ºC – 12ºC), por 24 horas e 1mM de IPTG, de acordo com o fabricante. Nos testes de expressão realizados foi observado um baixo rendimento, devido às baixas temperaturas de cultivo celular. Por esta razão, optou-se por realizar a produção do scFv-anti29-VH1VL em BL21-DE3. Comparando-se os resultados analisados em teste de expressão e os dados da literatura, foram estabelecidos como parâmetros de produção: indução pela adição de 0,5mM de IPTG a 20ºC durante 16 – 18h.

Para o processo de purificação, optou-se pela adição da cauda de histidina (His-Tag) contendo seis resíduos deste aminoácido. Diversas vantagens como purificação em condições desnaturantes, reutilização da coluna e baixo custo estão associadas a esta metodologia (SIGMA-ALDRICH, 2012). Por estas razões, pode-se inferir a preferência de escolha da maioria dos autores pela purificação por His-Tag (KIM et al., 2002; LIU et al., 2014, 2011, 2015; MAHGOUB, 2012; WANG et al., 2016; WU et al., 2016b; YUASA; KOYAMA; FUJITA-YAMAGUCHI, 2014). A figura 20 da sessão de resultados revela um processo de purificação não homogêneo, ou seja, existem outras proteínas indesejadas junto ao scFv recombinante. Esta ocorrência também é observada em alguns trabalhos dos autores citados anteriormente. A pureza e homogeneidade da amostra foi resolvida por cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75), conforme ilustrado na figura 21a. A identidade da molécula scFv-anti29-VH1VL foi confirmada por *Western Blot* (figura 21b) pela detecção com anticorpo anti-FLAG. O FLAG é um epítopo que permite uma detecção precisa e sem reações cruzadas. Neste trabalho optou-se por não utilizar o His-Tag como epítopo de detecção devido à possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com resíduos de histidina de outras proteínas; da mesma forma optou-se por não utilizar o epítopo FLAG como forma de purificação devido ao elevado custo e limitações associadas, como a dependência estrutural para o para purificação (HERNAN; HEUERMANN; BRIZZARD, 2000).

Por muito tempo se buscou tratar o câncer com agentes que atuassem no sentido de bloquear a progressão do ciclo celular, visto seu descontrole (ROBINSON,

1993). Porém, o elevado uso de quimioterápicos citotóxicos foi responsável pelo surgimento de reações adversas na maior parte dos pacientes. Apesar do sucesso de muitos quimioterápicos, a quimioresistência a alguns medicamentos ainda é um dos maiores desafios na busca pelo tratamento do câncer, pois mucinas secretadas e não secretadas podem formar uma barreira física que bloqueia o acesso de drogas terapêuticas de maior peso molecular e células efetoras do sistema imunológico (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; JONCKHEERE; SKRYPEK; VAN SEUNINGEN, 2014). Neste cenário, a quimioterapia clássica pode estar em vias de ser substituída por novos métodos inovadores que direcionem a droga diretamente ao seu alvo, eliminando as células cancerígenas, mas mantendo as saudáveis intactas (MEHRLING, 2015). Mais recentemente, novas perspectivas sobre o tratamento anti-câncer vem sendo desenvolvidas no sentido de agir diretamente sobre a célula tumoral. Thomas Mehrling, diretor da Mundipharma EDO GmbH (Suíça), afirma inclusive que “a quimioterapia está se tonando mais inteligente” (2015). Diante deste cenário, e considerando a relevância da MUC1 como um marcador tumoral clínico amplamente estudado, a obtenção de anticorpos recombinantes específicos para antígenos sintéticos e miméticos de mucina tumoral MUC1 hipoglicosilada, representa um potencial avanço em dois segmentos terapêuticos do câncer: (I) a elaboração de novas ferramentas diagnósticas para o desvendamento da doença e (II) a construção de um sistema de delivery de drogas quimioterápicas ou outros tipos de medicamentos diretamente na célula tumoral, visto a especificidade do anticorpo para um antígeno marcador prevista neste trabalho. Finalmente, entende-se os resultados de produção e determinação da sequência codificadora do scFv anti-MUC1 hipoglicosilado está de acordo com a proposta descrita por Bradbury e Plückthun (2015) sobre a necessidade o caráter analítico e de produção em escala de anticorpos com a descrição de sua sequencias codificadoras e de aminoácidos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou por meio de um processo eficiente de seleção de fagos recombinantes que foi possível (I) selecionar, (II) caracterizar por sequenciamento de nova geração, (III) escolher, expressar de forma solúvel e purificar um novo fragmento de anticorpo humano recombinante anti MUC1. Além disso, o uso da sequenciamento de nova geração e de novas plataformas de análise para processos de seleção, como a ATTILA, contribuíram grandemente para melhorar a análise de clones selecionados e expandir as opções de anticorpos recombinantes para produzir. Por fim, as novas ferramentas biotecnológicas obtidas com o desenvolvimento deste trabalho, poderão cooperar para a elaboração de novas abordagens diagnósticas e/ou terapêuticas para tumores e distroglicanopatias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

’T HOEN, P. A. C. et al. Phage display screening without repetitious selection rounds. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 622–631, 2012.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

AGILENT TECHNOLOGIES. **ArcticExpress™ Competent Cells and ArcticExpress™ (DE3) Competent Cells**, 2010. Disponível em: <www.genomics.agilent.com>

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALBERTS, B. et al. **Essential cell biology**. 4. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC., 2014.

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1765, n. 2, p. 189–222, 2006.

BARBAS, C. F. et al. **Phage Display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

BARRESI, R. et al. LARGE can functionally bypass α-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. 696–703, 2004.

BARRESI, R.; CAMPBELL, K. P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 2, p. 199–207, 2006.

BEATTY, P. L.; FINN, O. J. Preventing cancer by targeting abnormally expressed self-antigens: MUC1 vaccines for prevention of epithelial adenocarcinomas. **ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 1284, n. The Renaissance of Cancer Immunotherapy, p. 52–56, 2013.

BECK, A. et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 345–352, 2010.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S. What is next generation sequencing? **Archives of Disease in Childhood - Education and Practice**, v. 98, n. 6, p. 236–238, 2013.

BIO-RAD LABORATORIES. **PCR Troubleshooting**. Disponível em: <http://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/pcr-troubleshooting#gel2>.

BOUCHET-SÉRAPHIN, C.; VUILLAUMIER-BARROT, S.; SETA, N.

Dystroglycanopathies: About Numerous Genes Involved in Glycosylation of One Single Glycoprotein. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 2, n. 1, p. 27–38, 2015.

BRADBURY, A.; PLÜCKTHUN, A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. **Nature**, v. 518, n. 7537, p. 27–29, 2015.

BRANCACCIO, A. et al. Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle α-dystroglycan. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 139–142, 1995.

BRANCACCIO, A. et al. The N-terminal region of alpha-dystroglycan is an autonomous globular domain. **European Journal of Biochemistry**, v. 246, p. 166–172, 1997.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 26, 2002.

BRINTON, L. T. et al. PHASTpep: Analysis Software for Discovery of Cell-Selective Peptides via Phage Display and Next-Generation Sequencing. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–22, 2016.

BROWN, S. C. et al. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle α -dystroglycan-laminin interaction. **Journal of cell science**, v. 112, p. 209–216, 1999.

BURCHELL, J. et al. Development and Characterization of Breast Cancer Reactive Monoclonal Antibodies. **Cancer Research**, n. 17, p. 5476–5482, 1987.

CAMPO, V. L. et al. Synthetic MUC1 glycopeptide bearing βGalNAc-Thr as Tn antigen isomer induces antibodies production against tumor cells. **ChemBioChem**, p. 527–538, 2017.

CANCER RESEARCH UK. **Worldwide cancer statistics**. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Four>. Acesso em: 6 abr. 2017.

CHENG, Y. et al. A V L -Linker-V H Orientation Dependent Single Chain Variable Antibody Fragment Against Rabies Virus G Protein with Enhanced Neutralizing Potency In Vivo. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, n. 1, p. 24–32, 2016.

CHIBA, A. et al. Structures of Sialylated O-Linked Oligosaccharides of Bovine Peripheral Nerve α-Dystroglycan. **The journal of biological chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2156–2162, 1997.

CHRISTIANSEN, A. et al. High-throughput sequencing enhanced phage display enables the identification of patient- specific epitope motifs in serum. **Scientific Reports**, n. August, p. 1–13, 2015.

CLACKSON, T.; LOWMAN, H. B. **Phage Display**. New York: Oxford University Press, 2004.

CRUSE, J. M.; LEWIS, R. T. **Atlas of Immunology**. 3rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

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

ENDO, T. Glycobiology of α-dystroglycan and muscular dystrophy. **Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 1, p. 1–12, 2015.

FIELDS, C. et al. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125–1148, 2013.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Front Immunol**, v. 4, p. 217, 2013.

GARNOCK-JONES, K. P. Brentuximab vedotin: A review of its use in patients with hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma following previous treatment failure. **Drugs**, v. 73, n. 4, p. 371–381, 2013.

GOLD, D. V. et al. PAM4-reactive MUC1 is a biomarker for early pancreatic adenocarcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7380–7387, 2007.

GOULART, L. R. et al. Phage Display: fundamentos e aplicações. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

GULEC, S. A. et al. Treatment of Advanced Pancreatic Carcinoma with 90 Y-Clivatuzumab Tetraxetan: A Phase I Single-Dose Escalation Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 244, p. 1–16, 2014.

HENDERIKX, P. et al. Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4324–4332, 1998.

HERNAN, R.; HEUERMANN, K.; BRIZZARD, B. Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection. **BioTechniques**, v. 28, n. 4, p. 789–793, 2000.

HIRD, V. et al. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal

antibody. **Br J Cancer**, v. 68, n. 2, p. 403–406, 1993.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 45–60, 2004.

HOLT, L. J. et al. Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 21, n. 5, p. 283–288, 2008.

HOSSAIN, M. K.; WALL, K. A. Immunological Evaluation of Recent MUC1 Glycopeptide Cancer Vaccines. **Vaccines**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2016.

ILLUMINA. **An Introduction to Next-Generation Sequencing TechnologyIllumina.com**. [s.l: s.n.].

INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp>. Acesso em: 6 abr. 2017.

JAIN, R. K. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. **Cancer Research**, v. 50, n. 3 SUPPL., 1990.

JAIN, R. K.; BAXTER, L. T. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: Significance of elevated interstitial pressure. **Cancer Research**, v. 48, n. 18, p. 7022–7032, 1988.

JESPERS, L. et al. Crystal structure of HEL4, a soluble, refoldable human VH single domain with a germ-line scaffold. **Journal of Molecular Biology**, v. 337, n. 4, p. 893–903, 2004.

JUNIOR, H. J. F.; BATOCCHIO, G.; LESSA, M. DO S. N. Dissecando e desmistificando o câncer. In: BIFULCO, V. A.; JUNIOR, H. J. F. (Eds.). . **Câncer - Uma visão multiprofissional**. 2. ed. Barueri: Editora Manole LTDA, 2014.

KIM, D. J. et al. Production and characterisation of a recombinant scFv reactive with human gastrointestinal carcinomas. **British journal of cancer**, v. 87, n. 4, p. 405–13, 2002.

KIPRIYANOV, S. M.; MOLDENHAUER, G.; LITTLE, M. High Level production of

soluble single chain antibodies in small-chain Escherichia coli cultures. **Journal of Immunological Methods**, v. 200, p. 69–77, 1997.

KUFE, D. et al. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. **Hybridoma**, v. 3, n. 3, p. 223–32, 1984.

KUFE, D. W. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 12, p. 874–85, 2009.

LINDEN, S. K. et al. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 3, p. 183–197, 2008.

LIU, A. et al. Expression of VH-linkerVL orientation-dependent single-chain Fv antibody fragment derived from hybridoma 2E6 against aflatoxin B1 in Escherichia coli. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 255–262, 2014.

LIU, D. et al. Production and characterization of a humanized single-chain antibody against human integrin αvβ3 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24500–24507, 2011.

LIU, Z. et al. Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in Escherichia coli. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 302–306, 2015.

LLOYD, K. O. et al. Comparison of O-Linked Carbohydrate Chains in MUC-1 Mucin from Normal Breast Epithelial Cell Lines and Breast Carcinoma Cell Lines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33325–33334, 1996.

MAGALHÃES, L. DA S. et al. Phage Dipslay: Aspectos básicos e perspectivas atuais. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

MAHGOUB, I. O. Expression and characterization of a functional single-chain variable fragment (scFv) protein recognizing MCF7 breast cancer cells in E. coli cytoplasm. **Biochemical Genetics**, v. 50, n. 7–8, p. 625–641, 2012.

MARANHÃO, A. Q. Transformação bacteriana. In: AZEVEDO, M. DE O. et al. (Eds.). . **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Editora UnB, 2003.

MARANHÃO, A. Q. et al. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES DE ANTICORPOS: MÉTODOS E APLICAÇÕES. In: RESENDE, R. R. (Ed.). . **Biotecnologia Aplicada à Saúde**. São Paulo: Blucher, 2015.

MARAVEYAS, A. et al. Pharmacokinetics and Toxicity of an Yttrium-90-CITC-DTPA-HMFG 1 Radioimmunoconjugate for Intraperitoneal Radioimmunotherapy of Ovarian Cancer. **Cancer (Supplement)**, v. 73, n. 3, p. 1067–1075, 1994.

MARTIN, P. T. Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. **Glycobiology**, v. 13, n. 8, p. 55R–66R, 2003.

MEHLA, K.; SINGH, P. K. MUC1: A Novel Metabolic Master Regulator. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 42, n. 1, p. 115–125, 2014.

MEHRLING, T. Chemotherapy is getting " smarter ". **Future Oncology**, v. 11, p. 549–552, 2015.

MERRY, C. L. R.; ASTRAUTSOVA, S. A. Glycans in evolution and development. Workshop on Glycoscience and Development. **EMBO reports**, v. 9, n. 7, p. 617–622, 2008.

MISHRA, P.; NAYAK, B.; DEY, R. K. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 337–348, 2016.

MOORE, C. J.; HEWITT, J. E. Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. **Glycoconj J**, v. 26, n. 3, p. 349–357, 2009.

MUNTONI, F. et al. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. **Current Opinion in neurology**, 2004.

MUNTONI, F. et al. Muscular dystrophies due to defective glycosylation of dystroglycan. **Acta Myologica**, p. 129–135, 2007.

MUNTONI, F.; BROCKINGTON, M.; BROWN, S. C. Glycosylation eases muscular dystrophy. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. 676–677, 2004.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 Ed. ed. São Paulo: Artmed Editora, 2010.

NELSON, A. L. Antibody fragments: hope and hype. **Landes Bioscience**, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011.

NOVAGEN. **pET System ManualNovagen**, 1999.

OLIMPIERI, P. P.; MARCATILI, P.; TRAMONTANO, A. Tabhu: Tools for antibody humanization. **Bioinformatics**, v. 31, n. 3, p. 434–435, 2015.

PEGRAM, M. D. et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. R73, 2009.

PEREIRA, F. V et al. FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development in vivo, and modulates the immune system. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 7, p. 1018–27, 2013.

RAVN, U. et al. By-passing in vitro screening - Next generation sequencing technologies applied to antibody display and in silico candidate selection. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 21, 2010.

RAY, K. et al. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 125, n. 1, p. 94–101, 2001.

RIVALLAND, G.; LOVELAND, B.; MITCHELL, P. Update on Mucin-1 immunotherapy in cancer: a clinical perspective. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 15, n. 12, p. 1773–1787, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Labratory Press, 2001.

SCIANDRA, F. et al. Genetic Engineering of Dystroglycan in Animal Models of Muscular Dystrophy. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 635792, 2015.

SHARMA, S. K.; SURESH, M. R.; WUEST, F. R. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in E. coli for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. **Protein Expression and Purification**, v. 102, p. 27–37, 2014.

SHIMIZU, M.; YAMAUCHI, K. Isolation and Characterization of Mucin-Like Glycoprotein in Human Milk Fat Globule Membrane. **The Journal of Biochemistry**, v. 91, n. 2, p. 515–524, 1982.

SIGMA-ALDRICH. **Epitope Tags in Protein Research**, 2012. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-

Aldrich/Brochure/1/epitope-tags-in-protein-research.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/3B0BCFB6-7E9C-4E97-BC93-8037121740EE>

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, p. 1–10, 2015.

SINGH, P. K.; HOLLINGSWORTH, M. A. Cell surface-associated mucins in signal transduction. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 467–476, 2006.

SMALHEISER, N. R. Cranin Interacts Specifically With the Sulfatide-Binding Domain of Laminin. **Journal of Neuroscience Research**, 1993.

SPARKS, S. E. et al. **Congenital Muscular Dystrophy Overview**. [s.l: s.n.].

SPICER, A. P. et al. Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential o-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 23, p. 15099–15109, 1991.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J Mol Biol**, v. 189, n. 1, p. 113–130, 1986.

TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. et al. MUC1 and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1, n. 1, p. 98–103., 1999.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, p. 211–222, 2006.

THIE, H. et al. Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

TOLEDO, A. G. et al. O -Mannose and O – N -acetyl galactosamine glycosylation of mammalian α -dystroglycan is conserved in a region-specific manner. **Glycobiology**, v. 22, n. 11, p. 1413–1423, 2012.

TURNER, K. B. et al. Next-generation sequencing of a single domain antibody repertoire reveals quality of phage display selected candidates. **PLoS ONE**, v. 11, n.

2, p. 1–15, 2016.

WANG, H. et al. Tetanus neurotoxin neutralizing antibodies screened from a human immune scFv antibody phage display library. **Toxins**, v. 8, n. 9, 2016.

WILLIAMS, G. et al. Phenotypic screening reveals TNFR2 as a promising target for cancer immunotherapy. **Oncotarget**, 2016.

WONG, C. et al. Human scFv antibody fragments specific for the epithelial tumour marker MUC-1, selected by phage display on living cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 50, n. 2, p. 93–101, 2001.

WU, Q. et al. Screening and identification of human ZnT8-specific single-chain variable fragment (scFv) from type 1 diabetes phage display library. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 7, p. 686–693, 2016a.

WU, Q. et al. Screening and identification of human ZnT8-specific single-chain variable fragment (scFv) from type 1 diabetes phage display library. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 7, p. 686–693, 2016b.

YUASA, N.; KOYAMA, T.; FUJITA-YAMAGUCHI, Y. Purification and refolding of anti-T-antigen single chain antibodies (scFvs) expressed in Escherichia coli as inclusion bodies. **BioScience Trends**, v. 8, n. 1, p. 24–31, 2014.

8. APÊNDICE

8.1. Linhagens celulares e partículas virais

- *E. coli* XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F′ *proAB lacI*^{q} Z*ΔM15* Tn*10* (Tet^{r})]. Linhagem bacteriana utilizada para transformação por eletroporação e propagação das partículas virais. Resistência: tetraciclina.

- VCSM13 Bacteriófago auxiliar (*helper*): partícula viral utilizada para infectar células transformadas com o fagomídeo pComb3XSS-Fab. Resistência: canamicina.

- *E. coli* BL21-DE3: F^{-} *dcm ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *gal* λ (DE3). Linhagem bacteriana utilizada na expressão dos fragmentos de anticorpos recombinantes. Resistência: cloranfenicol.

8.2. Meios de Cultura

- Meio LB (1L)
  Triptona 10g
  Extrato de levedura 5g
  NaCl 10g
  pH 7

- Meio LB ágar (1L)
  Meio LB acrescido de 15g de ágar bacteriológico.

- Meio LB top ágar (1L)
  Meio LB acrescido de 7g de ágar bacteriológico.

- Meio SB (1L)
  Triptona 30g
  Extrato de levedura 20g
  MOPS 10g
  pH 7

- Meio SOC (100 mL):
  Triptona 2g
  Extrato de levedura 0,5g
  NaCl 0,05g
  KCl 0,00186g
  Glicose 20mM
  $MgCl_2$ 10mM
  $MgSO_4$ 10mM
  pH 7

8.3. Antibióticos

- Cultura bacteriana: As soluções dos antibióticos tetraciclina, carbenicilina, canamicina e cloranfenicol foram preparadas utilizando água ultrapura e armazenadas a -20ºC protegidas de luz. As concentrações finais utilizadas estão descritas na sessão de métodos.

8.4. Soluções de uso geral

- Glicose 20%
  Solução preparada com glicose 20% (p/v) com água ultrapura, sendo posteriormente esterilizada por filtração (0.22µm).

- Glicose 2 mol/L (10mL)
  Solução preparada com 3,603g de glicose acrescida de água ultrapura com volume suficiente para 10mL. Esterilizada por filtração (0.22µm).

- Solução Mg 2 mol/L
  Solução preparada pela adição de 0,952g de $MgCl_2$ e 1,203g de $MgSO_4$ à água ultrapura num volume suficiente para 10mL. Esterilizada por filtração (0.22µm) ou autoclavagem.

- Tampão tris-salino: TBS (500mL)
  Tris-Base 0,605g
  NaCl 2,922g
  pH 8
  Esterilizado por autoclavagem.

- TBS-BSA 1%
  Esta solução foi preparada utilizando-se 1% (p/v) de albumina bovina sérica (SIGMA) em solução de TBS, sendo posteriormente esterilizada por filtração (0.22µm).

- TBS-BSA 3%
  Esta solução foi preparada utilizando-se 3% (p/v) de albumina bovina sérica (BSA) em solução de TBS, sendo posteriormente esterilizada por filtração (0.22µm).

- TBS-Tween 0,5%
  Esta solução foi preparada utilizando-se 0,5% (v/v) de detergente Tween em solução de TBS1X, sendo posteriormente esterilizada por filtração (0.22µm).

- Tampão de lavagem
  Fosfato de sódio 20mM
  Cloreto de sódio 0,5M
  Imidazol 40mM
  pH 6,8

- Tampão de eluição
  Fosfato de sódio 20mM
  Cloreto de sódio 0,5M
  Imidazol 500mM
  pH 6,8

8.5. Materiais de eletroforese

- Gel de agarose 0,8%
  Utilizado na análise eletroforética de fragmentos gênicos. A agarose foi diluída por aquecimento em tampão TBE ou TAE.

- Tampão de amostra 10X para DNA em gel de agarose (4mL)
  Azul de bromofenol 25mg
  Tris-base 0,18g
  Glicerol 6mL
  Gel-Red

- Tampão Tris-Borato-EDTA: TBE (1L)
  Tris-base 10,8g
  Ácido bórico 5,5g
  EDTA 0,5M (pH 8) 5mL

- Tampão Tris-acetato-EDTA: TAE (500mL)
  Tris-base 2,42g
  Ácido acético glacial 0,571mL
  EDTA 0,5M (pH 8) 1mL

- Gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12%:

  - Gel de separação:

Produto	Volume
H_20	1,6mL
Acrilamida mix 30%	2,0mL
Tris 1,5M (pH 8,8)	1,3mL
SDS 10%	0,05mL
Persulfato de amônia 10%	0,05mL
TEMED	0,002mL

- Gel de empilhamento

Produto	Volume
H_20	0,68mL
Acrilamida mix 30%	0,17mL
Tris 1M (pH 6,8)	0,13mL
SDS 10%	0,01mL
Persulfato de amônia 10%	0,01mL
TEMED	0,001mL

- Tampão de amostra 6x para SDS-PAGE:
  Tris-HCl 600mM
  SDS 12% (p/v)
  B-Mercaptoetanol 12% (v/v)
  Glicerol 60% (v/v)
  Azul de bomofenol 0,3% (p/v)
  pH 6,8

- Corante de *Coomassie* para coloração de proteínas em gel SDS-PAGE:
  Azul brilhante de Coomassie 0,25% (p/v)
  Metanol 30% (v/v)
  Ácido acético glacial 7% (v/v)

- *Ponceau S* para coloração de proteínas em membrana de nitrocelulose:
  Ponceau 0,5% (p/v)
  Ácido acético glacial 1% (v/v)

8.6. Outros

8.6.1. Enzimas

- GoTaq® G2 Hot Start Polymerase: (Promega). Enzima DNA polimerase utilizada nas reações de PCR.

- Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). Enzima DNA polimerase utilizada nas reações de PCR.

8.6.2. Produtos comerciais gerais

- Cubetas 0,2mm: usadas para eletroporação no equipamento Gene Pulser. (Bio-Rad).
- Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification: Kit para purificação de DNA a partir de gel de agarose. (GE Healthcare).
- Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit. Kit para extração de DNA plasmidial de células bacterianas. (GE Healthcare).
- Marcador de massa molecular DNA 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).
- Placa de microtitulação 96 poços fundo chato (Nunc Maxisorp™).
- Pure Yield™ Plasmid Miniprep System Protocol: Kit para extração de DNA plasmidial de células bacterianas. (Promega).
- Solução mix de deoxinucleotídeos dNTP: preparada com dATP, dTTP, dGTP e dCTP (Thermo Scientific).
- IPTG (Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo) para expressão de proteínas recombinantes pelo sistema DE3. (Sigma).
- Membrana de nitrocelulose 0.22 micrômetros Hybondn-Amersham Biosciences: utilizada para ensaios de *Western Blot*.
- Anticorpo policlonal *Rabbit* Anti-DYKDDDDK-*tag*: anticorpo para detecção de proteína marcadas pelo *tag* sintético FLAG. (GenScript).
- Anticorpo policlonal *Goat* anti-*Rabbit* HRP: anticorpo secundário para detecção e revelação por enzima peroxidase. (Jackson ImmunoResearch).
- Gel Filtration LMW Calibration Kit: utilizado na calibração de coluna de purificação por exclusão molecular. (GE Healthcare).
- Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units 3000MW: concentrador utilizado para diálise e concentração de proteínas recombinantes. (Merck).
- Millex-GP Syringe Filter Unit, 0.22 µm: Filtro utilizado na esterilização de soluções e proteínas. (Merck).

8.6.3. Colunas de purificação

- HisTrap™ (GE Healthcare) 1mL: coluna para purificação dos fragmentos de anticorpos recombinantes por cromatografia de afinidade.
- Superdex 75 (GE Healthcare): coluna para cromatografia por exclusão molecular utilizada na segunda etapa de purificação dos fragmentos de anticorpos recombinantes.