# VIVIANE MIDORI MURATA

# Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2012

# VIVIANE MIDORI MURATA

# Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Moro Co-orientadora: Dra. Lilian Rumi Tsuruta

Versão original

São Paulo 2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Murata, Viviane Midori.

Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display* / Viviane Midori Murata. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Ana Maria Moro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Anticorpos monoclonais

Versão do título para o inglês: Production and characterization of the Fab portion of anti-digoxin antibody by phage display technology.

Descritores: 1. Anticorpos monoclonais 2. Clonagem 3. *Phage display* 4. Digoxina 5.Fragmentos Fab I. Moro, Ana Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB07/2012

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO **Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia** Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):	Viviane Midori Murata.
Título da Dissertação:	Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de <i>phage display</i> .
Orientador(a):	Ana Maria Moro.

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu noivo e aos amigos do Laboratório de Biofármacos em Células Animais do Instituto Butantan

#### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Ana Maria Moro pela oportunidade, confiança, incentivo e ensinamentos.

À minha co-orientadora, Dra. Lilian Rumi Tsuruta por dividir seus conhecimentos e experiências, pela sinceridade e pelas cobranças que ajudaram na minha formação, contribuindo para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os funcionários que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Biofármacos em Células Animais: Teresa, Rose, Angélica, André, Mari Schmidt, Mari Santos, Elisa, Fernanda, Bruno, Denis, Marcelino, Silmara, Neide, Zezé, Sônia, Priscila, João, André, Daniela, Carla, Caio, Rosa, Diego, Queren, Carol, Alecio, Ligia, Claudia, Márcio, Theri, Flávia, Fátima, pelo tempo que passamos juntos, pelas conversas, risadas, almoços, cafés, festinhas dentro e fora do laboratório.

Ao Dirceu, que contribuiu imensamente para meu crescimento pessoal, me fazendo repensar sobre a vida e sobre a relação que temos com cada pessoa que passa por nós, tenho certeza de que todos que o conheceram se lembrarão para sempre.

Ao Dr. Jorge Kalil, por doar as células do hibridoma anti-digoxina.

Ao Dr. Carlos Barbas do Instituto Scripps, por fornecer o vetor pComb3XTT.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e ao meu noivo pela compreensão, paciência, apoio e suporte financeiro, que tornaram possível a conclusão dessa jornada.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

"Não basta dar os passos que nos devem levar um dia ao objetivo, cada passo deve ser ele próprio um objetivo em si mesmo, ao mesmo tempo que nos leva para diante."

Johann Goethe

#### RESUMO

MURATA, V. M. Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo antidigoxina utilizando a tecnologia de *phage display.* 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2012.

A digoxina é um medicamento utilizado para o tratamento de distúrbios cardíacos. Possui uma janela terapêutica estreita, com nível terapêutico muito próximo ao nível tóxico. Para combater seu efeito tóxico, fragmentos Fab de anticorpo policional antidigoxina estão disponíveis comercialmente. Este trabalho, iniciado a partir de um hibridoma produtor de anticorpo monoclonal anti-digoxina, teve o objetivo de buscar, através da tecnologia de phage display, sequências variantes com maior afinidade ao alvo, que poderão possibilitar a obtenção de um produto para uso em dosagem mais precisa na desintoxicação de pacientes sob tratamento com digoxina. A tecnologia de phage display permite a seleção de anticorpos de alta afinidade e especificidade para um determinado antígeno e sua produção em quantidades ilimitadas. Esta tecnologia utiliza fagos filamentosos que são capazes de incorporar fragmentos de DNA exógenos e expor a proteína sintetizada em sua superfície, como os fragmentos de anticorpos, que podem ser selecionados pelo antígeno apropriado. A partir de um hibridoma anti-digoxina, o RNA total foi extraído para a síntese do cDNA. Os genes da cadeia leve e porção Fd foram amplificados com oligonucleotídeos específicos e clonados sequencialmente no vetor fagomídeo pComb3X para a construção da biblioteca combinatória de fragmentos Fab. Após infecção pelo fago auxiliar, fagos expondo fragmentos Fab em suas superfícies foram selecionados pela ligação à digoxina conjugada a BSA. Após três rodadas de seleção, 10 clones foram selecionados aleatoriamente para verificar a presença dos genes das cadeias leve e pesada. Seis clones apresentaram os dois insertos e foram sequenciados. Todos apresentaram a mesma sequência de cadeia pesada. Em relação à cadeia leve, 2 clones eram idênticos, um era pseudogene e um clone tinha um aminoácido distinto no CDR2. Quatro clones apresentando variações na sequência do framework1 da cadeia leve foram expressos como fragmentos Fab solúveis. Os clones apresentaram ligação à digoxina-BSA por ELISA e Western blotting. A ligação específica também foi confirmada através de ressonância plasmônica de superfície (BIAcore), que mostrou diferenças na capacidade de ligação entre os clones. Nós concluímos que diferenças nas sequências do framework1 e CDR2 da cadeia leve podem ter influenciado na ligação ao antígeno.

**Palavras-chave:** Anticorpos monoclonais. Clonagem. *Phage display*. Digoxina. Fragmentos Fab. Região variável.

## ABSTRACT

MURATA, V. M. Production and characterization of the Fab portion of antidigoxin antibody by phage display technology. 2012. 75 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Digoxin is a pharmaceutical used in the control of cardiac dysfunction. Its therapeutic window is narrow, with therapeutic dosage very close to the toxic dosage. To counteract the toxic effect, polyclonal anti-digoxin Fab fragments are commercially available. Our work is based on monoclonal anti-digoxin antibody, which would account for a product with a specific potency and more precise dosage for the detoxification of patients under digoxin treatment. Phage display technology allows the selection of high affinity and specificity antibodies to a determined antigen and its production in unlimited amounts. This technology makes use of filamentous phages able to incorporate fragments of exogenous DNA and expose the synthesized protein on its surface, like antibody fragments, that can be selected by the appropriate antigen. From an anti-digoxin hybridoma, total RNA was extracted for the cDNA synthesis. Light chain and Fd genes were amplified with specific primers, and the genes were cloned sequentially in the pComb3X phagemid vector for the combinatorial Fab library construction. After helper phage infection, phages displaying Fab fragments on their surfaces were selected by their binding to the digoxin coupled to BSA. Three rounds of this selection were done, then random selected clones were evaluated for the presence of light and heavy chain genes and the positive ones were sequenced. Out of 10 clones randomly chosen, 6 presented both inserts and were sequenced. All clones have identical sequences for the heavy chain. The sequencing of light chain showed 2 identical clones, one was a pseudogene and one presented a distinct amino acid in CDR2. Four clones presenting variations in the framework 1 were induced to express soluble Fabs, all positive for anti-digoxin binding in ELISA assays and Western blotting. The specific binding was further confirmed by plasmon surface resonance (BIAcore), which showed differences in the binding capacity of the four clones. We conclude that the differences in framework1 and CDR2 sequences of light chain might have influenced the binding response to the antigen.

**Key-words:** Monoclonal antibodies. Cloning. Phage display. Digoxin. Fab fragments. Variable region.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – absorbância

AcMo - Anticorpo Monoclonal

BSA - albumina do soro bovino (bovine serum albumin)

BLAST – Basic Local Aligment Search Tool

cDNA - DNA complementar (complementary DNA)

CDR - região determinante de complementaridade (*complementarity determining region*)

Dig-BSA - Digoxina conjugada a BSA

DO - Densidade Óptica

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

ExPASy - Expert Protein Analysis System

Fab - Fragment antigen binding

Fc - Fragment crystallizable

FDA - Food and Drug Administration

FR - framework region

HC - cadeia pesada (heavy chain)

HRP - horseradish peroxidase

IgG - imunoglobulina G

IPTG - Isopropyl-β-D-Thiogalactoside

kDa - quilodalton

LB - Luria-Bertani

LC - cadeia leve (light chain)

MOPS - Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico

nm - nanômetro

pb - pares de bases

PBS - solução salina de fosfato (phosphate buffered saline)

PCR - reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)

pIII - proteína do gene III

RT-PCR - reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)

RU - unidades de ressonância (resonance units)

SB - Super Broth

scFv - single chain variable fragment

- SPR ressonância plasmônica de superfície (surface plasmon resonance)
- TAE tampão Tris-Acetato-EDTA
- TBS tampão salina de Tris (Tris buffered saline)
- UFC Unidade Formadora de Colônia
- UFP Unidade Formadora de Placa
- V<sub>L</sub> região variável da cadeia leve (light chain variable region)
- V<sub>H</sub> região variável da cadeia pesada (heavy chain variable region)
- $\beta$ -ME beta-mercaptoetanol
- γ gamma
- к kappa
- λ lambda

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação do gene o porção Fd e da cadeia leve	la 30
Tabela 2 - Títulos dos fagomídeos antes e depois de cada rodada de <i>panning</i> e determinação da eficiência do <i>panning</i> (% ligação) e do enriquecimento da biblic	oteca 55
Tabela 3 - Análise de homologia da LC dos fragmentos Fab dos quatro clones a digoxina utilizando BLASTp	nti- 59
Tabela 4 - Análise de homologia da HC dos fragmentos Fab dos quatro clones a digoxina utilizando BLASTp	nti- 59

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da digoxina (C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub> ), um glicosídeo cardíaco de 780,92 Da18
Figura 2 - Estrutura da molécula de IgG e de seus fragmentos que mantêm sítios de ligação ao antígeno22
Figura 3 - Representação esquemática de bacteriófago filamentoso da classe Ff e suas proteínas do capsídeo23
Figura 4 – Esquema do vetor fagomídeo pComb3XTT usado no sistema de <i>phage display</i>
Figura 5 – Representação esquemática das principais etapas do <i>phage display</i> e <i>panning</i>
Figura 6 – Perfil da ligação do antígeno Dig-BSA à IgG anti-digoxina presente no sobrenadante do cultivo de hibridoma pelo teste de ELISA
Figura 7 – Perfil eletroforético da IgG anti-digoxina purificada por cromatografia de afinidade pela proteína A
Figura 8 – Perfil da ligação da IgG anti-digoxina purificada à Dig-BSA imobilizada em diferentes concentrações para padronização dos testes de ELISA
Figura 9 – Produtos das amplificações dos cDNAs do hibridoma anti-digoxina usando oligonucleotídeos de imunoglobulina murina51
Figura 10 – Análise de restrição da biblioteca LC construída a partir da clonagem do repertório dos genes LC no vetor pComb3X para verificar presença do inserto LC52
Figura 11 – Análise de restrição da biblioteca combinatória de fragmentos Fab construída no vetor pComb3X para verificar presença dos insertos LC e HC53
Figura 12 - Análise de restrição da diversidade da biblioteca combinatória construída no vetor pComb3X pela digestão com a enzima de restrição BstNI54
Figura 13 – Analise de restrição da biblioteca de fragmentos Fab anti-digoxina após 3 rodadas de <i>phage display</i> seguido de <i>panning</i> para verificar presença dos genes LC e HC
Figura 14 – Análise de restrição da diversidade da biblioteca de fragmentos Fab anti- digoxina após 3 rodadas de <i>phage display</i> seguido de <i>panning</i> pela digestão com a enzima de restrição BstNI
Figura 15 – Representação simbólica das sequências de aminoácidos deduzidos da LC dos clones 1, 2, 9 e 10, selecionados após <i>phage display</i> 58
Figura 16 – Perfil eletroforético dos clones 1, 2, 9 e 10 digeridos com as enzimas de restrição Spel e Nhel para a remoção do gene III que codifica a proteína pIII60

Figura 17 – Western blotting de extratos brutos contendo fragmentos Fab anti- digoxina dos clones 1, 2, 9 e 10 expressos em <i>E. coli</i> XL1-Blue
Figura 18 – Imunodetecção do antígeno Dig-BSA e BSA pelos fragmentos Fab anti- digoxina expressos em <i>E. coli</i> pelos 4 clones selecionados após <i>phage display</i> 62
Figura 19 – Perfil da ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos em <i>E. coli</i> pelos 4 clones à Dig-BSA e BSA pelo teste de ELISA63

Figura 20 - Sensorgrama do BIAcore do ensaio de ligação dos fragmentos Fab expressos em *E.coli* pelos 4 clones ao antígeno Dig-BSA.......64

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção e caracterização de albumina bovina conjugada com digoxina (Dig-BSA)	27
3.1.1 Obtenção dos conjugados Dig-BSA	27
3.1.2 Caracterização dos conjugados Dig-BSA	27
3.2 Obtenção do anticorpo monoclonal anti-digoxina	28
3.2.1 Purificação do anticorpo monoclonal anti-digoxina	28
3.3 Construção da biblioteca de Fab no fagomídeo pComb3X a partir de hibridomas anti-digoxina	29
3.3.1 Obtenção de cDNA dos hibridomas anti-digoxina	29
3.3.2 Amplificação dos genes da LC e da porção Fd da HC	30
3.3.3 Obtenção de células competentes e vetor	31
3.3.3.1 Preparo de células de Escherichia coli XL1-Blue para transformação por choque térmico	31
3.3.3.2 O vetor pComb3X	32
3.3.3.3 Transformação por choque térmico	34
3.3.3.4 Extração plasmidial	34
3.3.3.5 Precipitação com etanol	34
3.3.3.6 Análise do DNA através da disgetão com enzimas de restrição	34
3.3.3.7 Preparo de células de Escherichia coli XL1-Blue eletrocompetentes	35
3.3.4 Clonagem do repertório de genes LC no vetor pComb3X	35
3.3.4.1 Transformação por eletroporação	36
3.3.5 Clonagem do repertório de genes HC na biblioteca LC	37
3.3.5.1 Sequenciamento e análise de DNA	37
3.4 Phage display e enriquecimento da biblioteca Fab	38

3.4.1 Preparação de fago auxiliar (helper phage)	39
3.4.1.1 Determinação de título do fago auxiliar	40
3.4.2 Geração da biblioteca de fagos Fab anti-digoxina (phage display)	40
3.4.2.1 Enriquecimento da biblioteca de fagos Fab anti-digoxina (panning)	41
3.5 Expressão de fragmentos Fab solúveis	42
3.5.1 Quantificação dos fragmentos Fab solúveis por Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sanduíche	43
3.6 Caracterização dos extratos brutos contendo fragmentos Fab dos clone obtidos por <i>phage display</i>	e <b>s</b> 44
3.6.1 Ensaio de ligação do fragmento Fab solúvel ao antígeno pelo teste de ELISA	44
3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (S PAGE)	<b>DS-</b> 44
3.6.3. Western Blotting	45
3.6.4. Análise de afinidade no BIAcore® T100	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Obtenção e caracterização do conjugado Dig-BSA	47
4.2 Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti-digoxina	48
4.3 Construção da biblioteca combinatória de fragmentos Fab anti-digoxina	<b>1</b> 50
4.4 Phage display e enriquecimento da biblioteca Fab anti-digoxina	54
4.5 Expressão e caracterização da ligação dos fragmentos Fab anti-digoxin	<b>a</b> .60
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS	71

#### 1 INTRODUÇÃO

A digoxina é o glicosídeo cardíaco mais usado no tratamento de falência cardíaca congestiva e fibrilação atrial (Figura 1). Os digitálicos, grupo ao qual a digoxina pertence, são os compostos mais antigos na medicina cardiovascular que práticas clínicas contemporâneas (EICHHORN, continuam em uso em GHEORGHIADE, 2002). Pesquisas e experiências com a digoxina iniciaram há mais de 200 anos (WITHERING, 1785) e suas aplicações em pacientes com falência cardíaca foram descritas apenas no século 20, definindo sua capacidade de aumentar a contratilidade do coração. A digoxina se liga ao sítio de ligação para glicosídeos cardíacos, presente na subunidade  $\alpha$  da enzima Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase, também conhecida como bomba de sódio-potássio, inibindo sua atividade. Esta proteína de membrana é responsável pelo transporte de sódio para o meio extracelular e ao ser inibida, gera um aumento do sódio intracelular. Este aumento estimula o intercâmbio pela bomba de sódio-cálcio, aumentando a concentração do cálcio intracelular, utilizado pelas proteínas contráteis. Como consequência ocorre aumento da contração no miocárdio (EICHHORN, GHEORGHIADE, 2002). Sua aplicação em falência cardíaca foi aprovada em 1998 pela Food and Drug Administration (FDA), mas seu uso tem diminuído com o aparecimento de novas terapias, como  $\beta$ -bloqueadores, bloqueadores de receptor da angiotensina (ARBs, angiotensin receptor blockers), bloqueadores de aldosterona e terapia de resincronização cardíaca (CRT, cardiac resynchronization therapy). Contudo, ainda é usada em cerca de 30% dos pacientes com falência cardíaca. É uma droga de baixo custo, sendo importante em países em desenvolvimento onde os pacientes não têm acesso a terapias sofisticadas (GHEORGHIADE et al., 2006).



**Figura 1** – Estrutura química da digoxina (C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>14</sub>), um glicosídeo cardíaco de 780,92 Da.

FONTE: http://www.drugbank.ca/drugs/APRD00098.

Os digitálicos possuem janela terapêutica muito estreita e sua toxicidade está entre as reações adversas mais prevalentes, encontradas pelos clínicos (ANDRÉS, 2000). A concentração da digoxina no soro não depende apenas da dose administrada, mas também está relacionada com interações com outras medicações e às condições do paciente (ANTMAN, SMITH, 1985). A incidência de intoxicação com digoxina aumenta em situações onde a excreção da digoxina pelos rins é impedida (SMITH; BUTLER; HABER, 1970). Doses tóxicas de digoxina podem acarretar arritmias graves e fatais (EICHHORN, GHEORGHIADE, 2002).

O uso de digitálicos tem sido facilitado pela geração de anticorpos, usados para monitorar as concentrações da droga no soro de pacientes, com a finalidade de manter níveis seguros. A digoxina não é antigênica por ser uma molécula pequena (780,92 Daltons) e precisa ser ligada covalentemente a proteínas imunogênicas apropriadas (carreadores), como a albumina bovina (BSA), para produzir anticorpos específicos anti-digoxina. A digoxina foi conjugada a BSA em 1967, para obtenção de anticorpos específicos em coelhos (BUTLER, CHEN, 1967). Em 1970, Smith et al. documentaram a alta afinidade e especificidade de populações de anticorpos selecionados para haptenos de glicosídeos cardíacos. Fragmentos Fab (*Fragment antigen binding*) de anticorpos específicos para digoxina obtidos em ovelhas demonstraram habilidade de reverter intoxicações pela digoxina (SMITH et al., 1976). Um estudo realizado em cães mostrou que a administração intravenosa da

porção purificada do fragmento Fab de anticorpos policionais anti-digoxina de ovelha pode rapidamente reverter a cardiotoxicidade, ligando-se à digoxina livre no plasma e fazendo a redistribuição da droga dos tecidos, de volta para a circulação sanguínea. Os fragmentos Fab são excretados relativamente rápidos pela urina, por isso os fragmentos Fab de alta afinidade, que retêm ligação com a droga podem fornecer uma rota de eliminação da droga, assim como meio de neutralizá-la (BUTLER et al., 1977). Terapias com potássio e agentes bloqueadores beta adrenérgico têm sido usados como alternativa para combater a intoxicação digitálica, mas a administração de fragmentos Fab de al., 1990). Um estudo retrospectivo, com 141 pacientes intoxicados pela digoxina, avaliou os resultados de 66 pacientes tratados com fragmentos Fab e sugeriu seu uso como terapia de primeira linha única, pela baixa taxa de mortalidade dos pacientes tratados pelos fragmentos (LAPOSTOLLE et al., 2008).

O fragmento Fab do anticorpo policional anti-digoxina gerado em ovelha (Digibind<sup>®</sup>) é produzido comercialmente nos Estados Unidos pela GlaxoSmithKline na forma de frasco-ampola com aprovação do FDA. Além desse, uma preparação de Fab de anti-digoxina policional ovina é comercializada na Europa com o nome de Digidot, produzida pela Boehringer Mannheim e em 2001, uma outra preparação DigiFab<sup>®</sup> (Protherics) recebeu a aprovação do FDA.

No Brasil o anticorpo anti-digoxina Fab (Digibind<sup>®</sup>) pode ser importado conforme a Resolução RDC nº 28, de 09 de maio de 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que autoriza a importação dos medicamentos constantes na lista de medicamentos liberados em caráter excepcional destinados unicamente, a uso hospitalar ou sob prescrição médica, cuja importação esteja vinculada a uma determinada entidade hospitalar e/ou entidade civil representativa, para seu uso exclusivo, não se destinando à revenda ou ao comércio.

O uso de fragmentos Fab em casos de intoxicação por digoxina é seguro e efetivo, porém a neutralização com fragmentos Fab é uma terapia cara, sendo utilizada apenas quando outras opções de tratamento parecem falhar. Seu alto custo também limita sua disponibilidade a todos os hospitais ou países. (ANDRÉS, 2000; FLANAGAN, JONES, 2004).

Os anticorpos são glicoproteínas com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, formados por duas cadeias leves (LC, light chain) idênticas de aproximadamente 24 kDa cada, e duas cadeias pesadas (HC, heavy chain) idênticas de 55 a 70 kDa cada. Uma cadeia leve está ligada covalentemente a uma cadeia pesada por uma ponte dissulfeto, enquanto as duas cadeias pesadas estão ligadas entre si por pontes dissulfeto. As regiões carboxiterminais das cadeias pesadas exercem funções efetoras. As cadeias leves e pesadas possuem uma região aminoterminal variável ( $V_L$ , variable light e  $V_H$ , variable heavy) que participa no reconhecimento dos antígenos. Cada região variável das cadeias leves e pesadas contém três regiões hipervariáveis, também chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDRs, complementarity determining regions), nomeadas a partir da porção aminoterminal, de CDR1, CDR2 e CDR3, sendo CDR3 a mais variável (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Entre essas regiões estão presentes sequências mais conservadas chamadas de arcabouço ou framework regions: FR1, FR2, FR3 e FR4 (TONEGAWA, 1983). Os camundongos possuem duas famílias de genes da cadeia leve, a *lambda* ( $\lambda$ ) e *kappa* ( $\kappa$ ) que se diferenciam por suas regiões constantes. A cadeia  $\lambda$  constitui apenas 5% do total de genes da cadeia leve, além de ser muito menos heterogênea do que a cadeia κ ou cadeia pesada. (TONEGAWA, 1983). A região constante da cadeia pesada se divide em 5 classes, IgG; IgA; IgM; IgD e IgE. A IgG é a mais abundante no soro de mamíferos e em camundongos é subdividida em IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, enquanto nos humanos é subdividida em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A IgG1 é a mais encontrada no soro humano (ABBAS, LICHTMAN, 2005) e possui estrutura bem definida, com duas pontes dissulfeto unindo as cadeias pesadas na região da dobradiça (entre CH1 e CH2).

Em 1975, Kohler e Milstein desenvolveram a tecnologia de produção de anticorpos monoclonais (AcMos), que lhes rendeu o Nobel de Fisiologia e Medicina em 1984. A técnica consiste na geração de hibridomas, que são células originárias da fusão de células mielômicas, com capacidade de reprodução indefinida, aos linfócitos B retirados do baço de um animal previamente imunizado, que secretam anticorpos (KÖHLER, MILSTEIN, 1975). Em 1986, foi aprovado pelo FDA o primeiro AcMo para uso terapêutico em humanos (OKT3). Anticorpos terapêuticos e seus fragmentos, obtidos por todas as tecnologias disponíveis representam o mercado mais promissor entre os biofármacos movimentando em 2009 nos EUA, \$16,9

bilhões (AGGARWAL, 2010). Muitos anticorpos monoclonais murinos têm sido produzidos para tratamento ou diagnóstico de doenças humanas. Contudo seu uso tem sido limitado por apresentar meia-vida curta no soro e devido a sua alta imunogenicidade, podendo gerar uma reação conhecida como *human anti-mouse antibody* (HAMA). Para superar esses problemas, iniciou-se a busca para gerar anticorpos menos imunogênicos como os quiméricos, humanizados, totalmente humanos e os fragmentos de anticorpos (MORO, RODRIGUES, 2001).

Os fragmentos de anticorpos mantêm os sítios de ligação ao antígeno, são menos imunogênicos do que o IgG inteiro, se difundem melhor no espaço intersticial, são facilmente eliminados via filtração glomerular e são mais estáveis em estoques do que o IgG (FLANAGAN, JONES, 2004). Podem ser obtidos pela digestão da imunoglobulina com a enzima pepsina que produz dois fragmentos Fab ligados por ponte dissulteto, F(ab')<sub>2</sub> divalente, com peso aproximado de 110 kDa e porção Fc fragmentada, ou pela a enzima papaína que produz dois fragmentos Fab, monovalentes, com peso molecular de 50 kDa e porção Fc inteira (Figura 2). Os fragmentos Fab anti-digoxina disponíveis comercialmente, foram obtidos pela digestão de IgG utilizando a enzima papaína. Os fragmentos de anticorpos também podem ser obtidos através da expressão em Escherichia coli, oferecendo a vantagem de obtenção em grandes quantidades, a baixo custo. A tecnologia de DNA recombinante oferece ainda a oportunidade para a introdução de mutações nas sequências gênicas, que podem ser vantajosas. No caso dos fragmentos Fab pode aumentar a quantidade expressa, a estabilidade, a solubilidade e facilitar a humanização e maturação de afinidade (KWONG, RADER, 2009).

Figura 2 - Estrutura da molécula de IgG e de seus fragmentos que mantêm sítios de ligação ao antígeno.

Fragmentos de imunoglobulinas apresentados: Fab,  $F(ab')_2 e scFv$ , onde  $V_H e V_L$  são conectados na mesma cadeia polipeptídica por um peptídeo flexível.



Uma metodologia muito utilizada na geração de fragmentos de anticorpos é a tecnologia de *phage display*, que surgiu em 1985, quando George Smith demonstrou que a correlação entre fenótipo e genótipo podia ser estabelecida em bacteriófagos (fagos) filamentosos (Figura 3). Smith mostrou que fragmentos de DNA exógeno podiam ser inseridos no gene III, que codifica a proteína do capsídeo (pIII) destes fagos, criando uma proteína de fusão. Os peptídeos exógenos expostos na superfície dos fagos podiam ser selecionados através da afinidade pelo anticorpo específico, permitindo que fossem enriquecidos em relação ao peptídeo original, por um processo usualmente denominado *panning*.

Figura 3 - Representação esquemática de bacteriófago filamentoso da classe Ff e suas proteínas do capsídeo.

As proteínas do capsídeo apresentadas podem ser usadas para a expressão de proteínas recombinantes, na forma de proteína de fusão, através da tecnologia de *phage display*.



Em 1989, Huse e colaboradores reportaram a geração de uma biblioteca de fragmentos Fab em fago lambda, a partir da combinação ao acaso das cadeias leve e pesada do anticorpo murino, como método que poderia substituir a tecnologia de hibridomas. Os genes variáveis de imunoglobulinas podem ser amplificados a partir de hibridomas ou células de linfócitos B, usando oligonucleotídeos iniciadores universais e reação em cadeia da polimerase (PCR, polymerase chain reaction), possibilitando clonagem em vetores de expressão (ORLANDI et al., 1989). McCafferty e colaboradores (1990) demonstraram que os domínios variáveis completos de um anticorpo podiam ser expostos na forma de fragmento variável de cadeia única (scFv, single chain variable fragment) fundidos à pIII na superfície do fago fd, permitindo a seleção do fago pela afinidade ao antígeno, dando início ao uso da tecnologia de phage display para a produção de anticorpos. A construção do vetor pComb3, permitiu que fragmentos Fab fundidos à pIII fossem expostos na superfície do fago M13 (BARBAS et al., 1991). A tecnologia permite a seleção de um clone de fago expondo fragmentos de anticorpo de alta afinidade e especificidade para um determinado antígeno dentro de uma biblioteca de fagos construída a partir de rearranjo dos domínios variáveis (CLACKSON et al., 1991). A construção do anticorpo pela tecnologia de phage display se inicia com a construção de uma biblioteca de imunoglobulinas, que pode ser gerada a partir de animais imunizados, não imunizados ou uma biblioteca sintética (STRACHAN et al., 2002).

Os fagos filamentosos da classe Ff (f1, fd e M13) possuem 11 genes (I - XI) e destes, 5 codificam proteínas do capsídeo que podem ser fundidas às proteínas recombinantes de interesse com maior ou menor grau de êxito, sendo a pIII a mais usada para *phage display*. Proteínas também podem ser expostas em pequenas partículas de fagos chamadas de fagomídeos, que são plasmídeos que carregam o gene da proteína recombinante do capsídeo e contém origem de replicação do fago M13 (BARBAS et al., 2001). O DNA do fagomídeo pode ser empacotado em partículas virais com a ajuda de um fago auxiliar (*helper phage*) que fornece todas as proteínas e enzimas do fago selvagem, necessárias para a replicação do fago. A proteína de fusão do capsídeo é exposta em partículas que contêm os genomas do fagomídeo e do fago auxiliar. Estas partículas contendo os dois genomas podem ser selecionadas através de marcadores de seleção (BARBAS et al., 1991). O *helper phage* possui origem de replicação deficiente e seu genoma é ineficientemente empacotado quando comparado ao fagomídeo (BARBAS et al., 2001).

Após a seleção e a caracterização do anticorpo monoclonal, a tecnologia de *phage display* permite a manipulação dos genes do anticorpo através da geração de mutantes. Isto possibilita a seleção de novos variantes de anticorpos, alguns com afinidade e especificidade aumentadas em relação ao clone original (KRYKBAEV et al., 2002).

Phage display é uma tecnologia acessível e relativamente barata, que não requer muitos reagentes e as instalações para a sua realização são as comumente encontradas em laboratórios de Biologia Molecular. Não se trata, porém, de tecnologia banal e muitos detalhes precisam ser trabalhados para se chegar a um bom resultado. Contribuiu grandemente para a realização do projeto o fato da tecnologia ser bem conhecida pela co-orientadora desse projeto, que a utilizou em sua tese de doutorado no Japão (TSURUTA et al., 2003). A implantação da tecnologia de *phage display* tem grande valor para nosso laboratório, para a produção de outros anticorpos e por permitir a manipulação de genes para melhorar a especificidade e afinidade.

Devido às vantagens da tecnologia do *phage display* e à importância dos anticorpos anti-digoxina em casos de intoxicação e de sua produção comercial ser estrangeira e de alto custo, acreditamos na necessidade do desenvolvimento e a produção desse medicamento no Brasil. O anticorpo anti-digoxina produzido pela tecnologia de *phage display* é uma alternativa para o tratamento de intoxicação por digitálicos no Brasil, já que pode diminuir consideravelmente os custos do medicamento, considerados elevados por se tratar de medicamento importado.

Alcançamos o sucesso do projeto, cujo objetivo foi a produção da porção Fab do anticorpo anti-digoxina com potencial terapêutico, pela tecnologia de *phage display*. Uma série de variantes foi obtida e quatro foram caracterizadas pela ligação à digoxina conjugada a BSA (Dig-BSA). Diferente dos produtos comerciais importados, este anticorpo é monoclonal e não é produzido em animais.

### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivo Geral

Esse projeto teve como objetivo geral obter clones do fragmento Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display* e a caracterização da sua ligação ao antígeno.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Extrair RNA total dos hibridomas anti-digoxina e amplificar os genes da LC e da HC, porção Fd (V<sub>H</sub> e C<sub>H</sub>1) das imunoglobulinas por PCR.
- Construir a biblioteca combinatória de fragmentos Fab no vetor de phage display.
- Selecionar os clones de anti-digoxina através da ligação com o antígeno.
- Expressar fragmentos Fab solúveis de anti-digoxina.
- Caracterizar a ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina dos clones ao antígeno.

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

# 3.1 Obtenção e caracterização de albumina bovina conjugada com digoxina (Dig-BSA)

#### 3.1.1 Obtenção dos conjugados Dig-BSA

O protocolo baseou-se na técnica descrita por Erlanger e Beiser (1964). Quarenta e quatro miligramas de digoxina foram ressuspendidos em 2 mL de etanol 95%, foram adicionados 2 mL de NaIO<sub>4</sub> 0,1 M e a solução foi mantida em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos. Após 30 minutos de interação, 60 µL de glicerol 1 M foi adicionado para inativar o excesso de periodato, e a solução foi mantida sob agitação por mais 5 minutos. Cinquenta e seis miligramas de BSA (Sigma) foram dissolvidos em 2 mL de PBS e o pH foi acertado em 9,5 com a solução Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. A solução de digoxina oxidada pelo periodato foi adicionada à solução de BSA, lentamente e gota a gota, mantendo o pH entre 9,3 e 9,5 pela adição de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%. A solução continuou sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente, mantendo o pH estável por 30 minutos na faixa de 9,3 a 9,5. Adicionou-se 6 mg de NaBH<sub>4</sub> dissolvido em 2 mL de água deionizada preparada de imediato. A solução foi coberta com parafilme (a liberação de H<sub>2</sub> poderia causar explosão) e mantida em repouso por 24 horas a 4 °C. A solução foi dialisada em 2 L de PBS com 20-30% de etanol a 4 °C por dois dias. Foram feitas duas trocas do tampão, sendo que na última utilizou-se somente PBS. A amostra foi centrifugada, quantificada através do método de Bradford e estocada a -20 °C.

#### 3.1.2 Caracterização dos conjugados Dig-BSA

Para estimar o número de moléculas de digoxina conjugada a BSA, usou-se como referência a absorbância no comprimento de onda de 388 nm de uma solução de digoxina de concentração conhecida, em duplicata. A referência e a amostra de Dig-BSA foram completados com água até 2 mL, em seguida 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foram adicionados e os tubos foram mantidos em repouso a temperatura ambiente por 4 horas. Foi feita a leitura da absorbância e calculado o número de mols de digoxina presente no conjugado Dig-BSA. A estimativa do número de moléculas de digoxina

presente no conjugado foi obtida através da relação entre o número de mols de digoxina do Dig-BSA e o número de mols da BSA adicionado para a obtenção do conjugado.

#### 3.2 Obtenção do anticorpo monoclonal anti-digoxina

Um anticorpo monoclonal anti-digoxina foi gerado pela tecnologia de hibridoma, a partir da imunização de camundongos Balb/c com conjugado ovalbumina-digoxina, no Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PAULA, 1993) e nos foi gentilmente doado pelo Dr. Jorge Kalil.

Células do hibridoma anti-digoxina foram cultivadas em dois frascos *Spinner Flask, 500 mL* (Bellco Glass, Inc., EUA), um contendo 400 mL de meio e outro com 300 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium and Ham's F-12 Nutrient Mixture* (DME/F12) (Sigma-Aldrich, Inc., EUA) suplementado com soro fetal bovino 3% (Cultilab, Brasil) e L-glutamina 4 mM (Merck KGaA, Alemanha), em estufa (Forma Scientific Inc., EUA) a 37 °C e  $CO_2$  5%. A contagem das células viáveis foi feita com o auxílio do corante de exclusão azul de Trypan e câmara de Neubauer. As células foram precipitadas em *Centrifuge 5804 R* (Eppendorf AG, Alemanha) a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C.

#### 3.2.1 Purificação do anticorpo monoclonal anti-digoxina

Os sobrenadantes dos cultivos foram purificados por cromatografia de afinidade em 245 mL de resina *proteína A-Sepharose 4FF* (GE Healthcare) empacotada em coluna *XK 50/30* de 5 cm de diâmetro x 30 cm de altura (GE Healthcare). A coluna foi conectada a uma bomba peristáltica *P50* (GE Healthcare) que promove o bombeamento da amostra pela coluna, a saída da coluna foi conectada a um monitor de UV a 280 nm *UV1* (GE Healthcare), que por sua vez foi ligado a um registrador *REC 101* (GE Healthcare). O equilíbrio da coluna foi realizado através do tampão glicina 1,5 M/cloreto de sódio 3 M pH 8,3, posteriormente a coluna foi carregada com o sobrenadante do cultivo diluído 1:1 no tampão de equilíbrio. Após o carregamento, passou-se pela coluna tampão de equilíbrio para remover possíveis ligações inespecíficas e reequilibrar a coluna. Para

a eluição utilizou-se o tampão citrato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM pH 4,3. O eluato foi dialisado duas vezes contra PBS durante uma noite. Após a eluição a coluna foi regenerada com tampão glicina 50 mM/cloreto de sódio 150 mM pH 2,3 seguida do tampão Tris 50 mM/cloreto de sódio 1 M pH 8,6. O enxágue da coluna foi efetuado com a passagem do tampão Tris 50 mM/cloreto de sódio 150 mM pH 8,6. Durante a etapa de carregamento foi utilizado o fluxo de 1 mL/min, as demais etapas foram realizadas com fluxo de 10 mL/min.

# 3.3 Construção da biblioteca de Fab no fagomídeo pComb3X a partir de hibridomas anti-digoxina

#### 3.3.1 Obtenção de cDNA dos hibridomas anti-digoxina

Células do hibridoma anti-digoxina foram cultivados em um frasco *Spinner Flask, 250 mL* (Bellco Glass, Inc), nas mesmas condições descritas no item 3.2. O cultivo foi precipitado a 5.000 x g por 10 minutos a 4 °C.

O RNA total das células dos hibridomas foi extraído utilizando o *Trizol*<sup>®</sup> *Reagent* (Invitrogen Corporation, EUA), baseado no método de isolamento de RNA por fenol, isotiocianato de guanidina e clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987), conforme manual do fabricante. A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria, através da absorbância a 260 nm (A<sub>260</sub>) no aparelho *Ultrospec 1000* (Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd., Inglaterra) e a equação utilizada para o cálculo foi: [RNA (µg/mL)] = 40 x A<sub>260</sub> x diluição. A pureza do material também foi verificada pela relação entre a absorbância a 260 nm e 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>). A razão ótima entre A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> para o RNA varia de 1,9 a 2,0.

A síntese de cDNA foi feita por transcrição reversa do RNA total, utilizando o kit *SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogem Corporation), usando o Oligo  $(dT)_{20}$  e seguindo o manual do fabricante. As reações foram feitas no aparelho termociclador *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA).

#### 3.3.2 Amplificação dos genes da LC e da porção Fd da HC

O cDNA dos hibridomas anti-digoxina foi usado como molde para amplificar os genes da LC e da porção Fd (V<sub>H</sub> e C<sub>H</sub>1) da HC, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o tipo *kappa* ( $\kappa$ ) da LC e subclasse IgG1 ( $\gamma$ 1) da HC de imunoglobulinas murinas, com base no banco de dados de Kabat (KABAT et al., 1991). Os oligonucleotídeos, contendo sítios de restrição específicos para clonagem no vetor pComb3 (BARBAS et al., 1991), foram sintetizados pela Invitrogen Brasil Ltda. Foram usados seis oligonucleotídeos 5' para a LC  $\kappa$  ( $\kappa$ 1;  $\kappa$ 2;  $\kappa$ 3;  $\kappa$ 4;  $\kappa$ 5 e  $\kappa$ 6), contendo sítio de restrição para a enzima SacI e sete para a porção Fd (1A+1B; 2A; 2B; 2C; 3B+3C e 3D), com sítio para XhoI (ITOH et al., 1999) e os oligonucleotídeos 3' Mok3' e MolgG1, contendo sítios de restrição para XbaI e SpeI, respectivamente (BARBAS et al., 2001). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos usados para amplificação do gene da porção Fd e da cadeia leve Em vermelho, azul, amarelo e verde estão representados, respectivamente, os sítios das enzimas de restrição Xhol, Sacl, Spel e Xbal.

Primer	Sequência
1A+1B	SAGGTGCAGCTK <mark>CTCGAG</mark> TCAGGACCTRGC
2A	SAGGTYCAGCTG <mark>CTCGAG</mark> TCTGGASCTGAG
2B	CAGGTCCARCTG <mark>CTCGAG</mark> YCTGGGGCTGAG
2C	GAGGTTCAGCTG <mark>CTCGAG</mark> TCTGKGGCWGAG
3A	GARGTGAAGGTG <mark>CTCGAG</mark> TCTGGRGGAGGC
3B+3C	GARGTGAAGCTT <mark>CTCGAG</mark> TCTGGAGGWGGC
3D	GARGTGCAGCTG <mark>CTCGAG</mark> GGKGGGGGGGGAGGA
k1	GCGCGCGAGCTCGACRTTGTGATGWCACAGTCTCCATCCTYC
k2	GCGCGCGAGCTCGATRTTKTGATGACCCARACTCCACTCTCC
k3	GCGCGCGAGCTCGACATTGTGCTGACMCARTCTCCWGCTTC
k4	GCGCGCGAGCTCSAAAWTGTKCTCACCCAGTCTCCAGCAATC
k5	GCGCGCGAGCTCGAYATYCAGATGACMCAGWCTMCATCCTCC
k6	GCGCGCGAGCTCCAAATTGTKCTCWCCCAGTCTCCAGCAATC
MoIgG1	AGGCTTACTAGTACAATCCCTGGGCACAAT
MoK3'	GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCCTGTTGAA

Os genes da LC e porção Fd foram amplificados através de reação de PCR usando a *Taq DNA Polymerase, recombinant – BR* (Invitrogen Brasil Ltda.), no aparelho *GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA) iniciando a 94

°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 57 °C por 1 minuto e alongamento a 72 °C por 1 minuto. Um alongamento final de 5 minutos a 72 °C foi realizado após os ciclos (TSURUTA et al., 2003).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose, utilizando Sistema Horizontal de Eletroforese LCH 7x8 (Loccus Biotecnologia, Brasil). O gel de agarose 1,5% foi preparado com tampão TAE (Tris-EDTA 40 mM; acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e corado com *SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain* (Invitrogen Corporation). As amostras foram preparadas com *Blue/Orange Loading Dye, 6x* (Promega Corporation, EUA) e um marcador de massa molecular *100bp DNA Ladder* (Promega Corporation) foi usado. A corrida foi realizada por 40 minutos a 90 V. O resultado foi visualizado no aparelho transiluminador de luz azul, *Safe Imager<sup>™</sup> Blue Light Transilluminator* (Invitrogen Corporation) e as imagens foram capturadas pelo sistema *KODAK Gel Logic 100 Imaging System* e o *KODAK Molecular Image Software* (Carestream Health, Inc., EUA). Após a análise, os produtos da amplificação dos genes LC e HC foram separadamente misturados, obtendo-se os repertórios para a construção da biblioteca combinatória.

A concentração de DNA foi determinada pela absorbância a 260 nm no espectrofotômetro *Ultrospec 6300 Pro* (Biochrom Ltd. Inglaterra). As medições foram feitas em amostras diluídas em água Milli-Q, usando cubetas de quartzo de 10 mm. O cálculo utilizado foi: [dsDNA ( $\mu$ g/mL)] = 50 x A<sub>260</sub> x diluição. A pureza do material também foi verificada pela relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. A razão ótima para o DNA varia de 1,8 a 1,9.

#### 3.3.3 Obtenção de células competentes e vetor

3.3.3.1 Preparo de células de Escherichia coli XL1-Blue para transformação por choque térmico

A linhagem bacteriana de *Escherichia coli* utilizada para clonagem e expressão do anticorpo recombinante foi a XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacl*qZΔM15 Tn10 (Tetr)].

Uma alíquota da bactéria E. coli XL1-Blue Competent Cells (Stratagene Corporation, EUA) foi plaqueada em uma placa de meio Luria-Bertani (LB) – ágar (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; ágar 1,5%; glicose 0,1 M), contendo tetraciclina a 10 µg/mL e incubada durante uma noite a 37 °C. No dia seguinte, uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio Super Broth (SB) (triptona 3%; extrato de levedura 2%; MOPS 1%, pH 7,0), contendo tetraciclina a 40 µg/mL e incubada durante uma noite a 37 °C sob agitação. Desta cultura foi retirado 0,4 mL e inoculado em 200 mL de SB contendo glicose 0,04 M e MgCl<sub>2</sub> 0,01 M e incubada a 37 °C sob agitação até a absorbância no aparelho Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd.) a 600 nm atingir 08-09. A cultura foi incubada no gelo por 20 minutos e centrifugada a 900 x g por 10 minutos a 4 °C (Centrifuge 5804 R -Eppendorf AG). O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 50 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril e gelado e incubadas no gelo por 20 minutos. A suspensão foi centrifugada a 900 x g por 10 minutos a 4 °C, as células foram ressuspendidas em 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril e gelado e incubadas no gelo por 20 minutos. Uma nova centrifugação a 900 x g por 10 minutos a 4 °C foi feita, o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 2,4 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M seguido pela adição de 0,6 mL de glicerol. A suspensão foi dividida em alíquotas de 110  $\mu$ L em tubos gelados em banho de etanol com gelo seco e estocadas a -80 °C. O título das células competentes foi determinado através da transformação por choque térmico com um DNA controle.

#### 3.3.3.2 O vetor pComb3X

O vetor fagomídeo pComb3XTT (BARBAS et al., 2001) (Figura 4) foi fornecido pelo Dr. Carlos Barbas do Instituto Scripps (*The Scripps Research Institute*, EUA), junto com a licença para sua utilização. Pertence à família de vetores pComb3X (*Genbank* AF268281) e pode ser usado na clonagem de fragmentos Fab, scFv, peptídeos e proteínas para o sistema de *phage display*. Este vetor possui os genes de LC e HC do fragmento Fab humano para a toxina tetânica "TT", um único promotor *lacZ*, origem de replicação *F1 Ori* e resistência à ampicilina *ampR*. Contém duas sequências de peptídeo sinal, *outer membrane protein (ompA)* para LC e *pectate lyase B (pelB)* para HC, que direcionam as cadeias polipeptídicas para o

periplasma. A cauda de 6 histidinas (His6) e de 10 hemaglutininas (HA) possibilitam a purificação e a detecção da proteína recombinante. Possui um códon de terminação âmbar (TAG), que permite a expressão de proteína solúvel sem a pIII em linhagens não supressoras. Para a expressão da proteína solúvel, pode-se também remover o gene da proteína pIII pela digestão com as enzimas de restrição Spel e Nhel.

**Figura 4** – Esquema do vetor fagomídeo pComb3XTT usado no sistema de *phage display*.

O vetor possui os genes de LC e HC do fragmento Fab humano para a toxina tetânica "TT". A cadeia leve foi clonada nos sítios de restrição Sacl e Xbal e a cadeia pesada do fragmento Fab foi clonada nos sítios de restrição Xhol e Spel.



FONTE:http://www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb\_images/pcomb\_images\_files/pComb\_Maps /pComb3X\_Maps.pdf, adaptado.

#### 3.3.3.3 Transformação por choque térmico

A amplificação do vetor foi feita através da transformação por choque térmico da bactéria *E. coli* XL1-Blue *Competent Cells* (Stratagene Corporation) com o vetor pComb3XTT. Cinquenta microlitros da bactéria XL1-Blue foram incubados com 0,5  $\mu$ L do vetor pComb3XTT por 10 minutos no gelo, 45 segundos a 42 °C no aparelho *Thermomixer compact* (Eppendorf AG) e 5 minutos no gelo. Foram adicionados 450  $\mu$ L de meio *SOC* (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,05%; KCl 20 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; glicose 20 mM) e incubado por 1 hora sob agitação a 37 °C. Dessa cultura foram plaqueados 200  $\mu$ L em uma placa de meio LB-ágar, contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubados durante uma noite a 37 °C.

#### 3.3.3.4 Extração plasmidial

Os plasmídeos foram purificados com os kits *Maxiprep HiSpeed*<sup>®</sup> *Plasmid Maxi kit* (Qiagen Sciences, Inc., EUA) e *Miniprep Wizard*<sup>®</sup> *Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corporation), conforme protocolo do fabricante.

#### 3.3.3.5 Precipitação com etanol

A precipitação com etanol foi feita adicionando etanol absoluto (2,2x o volume da amostra) e acetato de amônio (10% do volume da amostra) e incubação por 1 hora a -80 °C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 20.800 x g por 15 minutos a 4 °C e os sedimentos foram lavados duas vezes com etanol 70% gelado e centrifugados a 20.800 x g por 5 minutos a 4 °C após cada lavagem. As amostras foram ressuspendidas em água Milli-Q autoclavada.

#### 3.3.3.6 Análise do DNA através da disgetão com enzimas de restrição

Os DNAs purificados foram digeridos por 2 horas a 37 °C com as enzimas de restrição Sacl e Xbal (New England Biolabs Inc., EUA) para verificar a presença da cadeia leve e com as enzimas Xhol e Spel (New England Biolabs Inc.) para verificar o inserto da cadeia pesada. Em seguida os DNAs foram analisados através de

eletroforese em gel de agarose. Os marcadores de massa molecular utilizados foram *1 kb DNA Ladder* (Promega Corporation) ou *1kb DNA Ladder* (Invitrogen).

#### 3.3.3.7 Preparo de células de Escherichia coli XL1-Blue eletrocompetentes

Uma alíquota da bactéria E. coli XL1-Blue Competent Cells (Stratagene Corporation) foi plaqueada em uma placa de meio LB-ágar, contendo tetraciclina (10  $\mu$ g/mL) e incubada durante uma noite a 37 °C. No dia seguinte, uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio SB, contendo tetraciclina (40 µg/mL) e incubada durante uma noite a 37 °C sob agitação. Desta cultura foi retirado 0,4 mL e inoculado em 200 mL de SB contendo glicose 0,04 M e MgCl<sub>2</sub> 0,01 M e incubada a 37 °C sob agitação até a DO a 600 nm atingir 08-09. A cultura foi incubada no gelo por 20 minutos e centrifugada a 900 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 100 mL de glicerol 10% estéril e gelado. A suspensão foi centrifugada a 1.500 x g por 20 minutos a 4 °C, ressuspendida em 50 mL de glicerol 10% e centrifugada a 2.500 x g por 30 minutos a 4 °C. O sedimento foi novamente ressuspendido em 50 mL de glicerol 10% e centrifugado a 3.000 x g por 30 minutos a 4 °C. As células foram então ressuspendidas em 2 mL de glicerol 10% e divididas em alíquotas de 150 µL em tubos gelados em banho de gelo seco/etanol e estocadas a -80 °C. O título foi determinado através de eletroporação com um DNA controle.

#### 3.3.4 Clonagem do repertório de genes LC no vetor pComb3X

O repertório de genes LC foi clonado no vetor pComb3X para a construção da biblioteca LC. Quinze microgramas dos genes LC e do vetor pComb3XTT foram digeridos com as enzimas de restrição Sacl (10U/ $\mu$ g) e Xbal (13U/ $\mu$ g) a 37 °C durante uma noite. No dia seguinte, as amostras foram precipitadas com etanol e ressuspendidas em 20  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada. Os DNAs foram aplicados no gel de agarose *UltraPure*<sup>TM</sup> *L.M.P. Agarose - Low Melting Point* (Invitrogen Corporation) e submetidos à eletroforese a 50 V por cerca de 3 horas. Como padrão foi usado o marcador *1kb DNA Ladder* (Promega Corporation). As bandas com o peso aproximado de 4.000 pb (vetor) e de 700 pb (inserto) foram extraídas do gel,

com auxílio de um bisturi e purificadas com o kit *Wizard*<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation), seguindo instruções do fabricante. As amostras purificadas foram precipitadas com etanol e ressuspendido em 10 μL de água Milli-Q autoclavada. A determinação da concentração do DNA foi feita utilizando o aparelho *Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer* (Invitrogen Corporation) e o kit *Quant-iT<sup>TM</sup> dsDNA BR Assay kits* (Invitrogen Corporation). Quinhentos nanogramas dos genes LC foram ligados a 100 ng de vetor pComb3X durante uma noite a 23 °C, utilizando 2 U de *Taq DNA ligase* (Invitrogen Corporation).

#### 3.3.4.1 Transformação por eletroporação

Setenta microlitros de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes foram incubados com 2  $\mu$ L da reação de ligação acima em cubetas de Eletroporação 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA) durante 10 minutos no gelo. Após a incubação, as amostras receberam um pulso de 2.500 V por 5,0 ms no aparelho *Multiporator*<sup>®</sup> (Eppendorf AG). Imediatamente foram adicionados 3 mL de meio SOC e incubados sob agitação por 1 hora a 37 °C. Foram plaqueados 200  $\mu$ L da cultura em placa LB-ágar contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e as placas foram incubadas durante uma noite a 37 °C.

O tamanho da biblioteca foi estimado pelo cálculo do número de colônias em Unidade Formadora de Colônia (UFC). Também foram escolhidas colônias aleatoriamente, inoculadas em 5 mL de meio SB contendo ampicilina (100 μg/mL) e incubadas durante uma noite a 37 °C sob agitação. No dia seguinte os inóculos foram centrifugados e os plasmídeos foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation). Foram feitas digestões com as enzimas de restrição Sacl e Xbal para verificar a presença da cadeia leve.

A biblioteca dos genes LC foi amplificada através de transformação por eletroporação, incubando-se 2 μL da biblioteca LC com 70 μL de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente. Após eletroporação e incubação por 1 hora a 37 °C, adicionou-se 20 mL de meio SB contendo ampicilina (100 μg/mL) e incubou-se a 37 °C durante uma noite. Os plasmídeos foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation) e quantificados pela absorbância a 260 nm no espectrofotômetro *Ultrospec 6300 Pro* (Biochrom Ltd.).
#### 3.3.5 Clonagem do repertório de genes HC na biblioteca LC

Para a clonagem dos genes da porção Fd no vetor pComb3X contendo os genes LC, foram utilizados os mesmos materiais e métodos da clonagem do repertório de genes LC (item 3.2.4), com exceção das enzimas de restrição. Dez microgramas do repertório de genes HC e da biblioteca dos genes LC contida no vetor pComb3X foram digeridas com as enzimas de restrição Spel (3U/µg) e Xhol (6U/µg) durante 3 horas a 37 °C. Na reação de ligação utilizou-se 300 ng dos genes da porção Fd, 100 ng de vetor e 2 U de *Taq DNA ligase* (Invitrogen Corporation). A reação ocorreu durante uma noite a 23 °C. Foram eletroporados a mistura de 70 µL de *E. coli* XL1-Blue com 2 µL da reação de ligação em um aparelho *Multiporator*<sup>®</sup> (Eppendorf AG), 2.500 V, 5,0 ms, cubetas 0,4 cm (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Após a eletroporação, foi adicionado 3 mL de meio SOC e incubado sob agitação por 1 hora a 37 °C. Foram plaqueados 200 µL da cultura em placa LB-ágar, contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados durante uma noite a 37 °C.

A análise da biblioteca combinatória foi feita de forma parecida como a feita para a biblioteca LC, acrescentando as digestões com as enzimas de restrição Xhol e Spel para detectar a presença da porção Fd e a análise da diversidade da biblioteca combinatória, feita pela digestão com a enzima de restrição BstNI, que reconhece o sítio CC/WGG (New England Biolabs Inc.). Os clones que apresentaram os insertos da LC e da HC foram quantificados por espectrofotometria e sequenciados.

#### 3.3.5.1 Sequenciamento e análise de DNA

O sequenciamento de DNA dos clones que apresentaram os dois insertos foi feito usando o oligonucleotídeo iniciador ompseg (5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3') para a cadeia leve e o oligonucleotídeo pelseg (5'- ACC TAT TGC CTA CGG CAG CCG-3') para a cadeia pesada (BARBAS et al., 2001). As amostras foram preparadas com BigDye<sup>®</sup>Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Foi utilizado o Serviço de Sequenciamento de DNA (SSDNA) do Departamento de Bioquímica – IQUSP, que realiza os següenciamentos pelo método de através do sequenciador capilar ABI PRISM® Sanger, 3100GeneticAnalyzer / HITACHI. As sequências nucleotídicas foram analisadas

através do programa *Chromas lite* (Technelysium Pty Ltd.) e os aminoácidos foram deduzidos utilizando o programa de tradução *Expert Protein Analysis System* (ExPASy), do *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB). As sequências dos clones foram comparadas com sequências do GenBank usando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), Bethesda, MD, EUA (ALTSCHUL et al., 1990) e foram alinhadas usando o programa de alinhamento para DNA e proteínas ClustalW2, do *European Bioinformatics Institute* (EBI), pertencente ao *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) (LARKIN et al., 2007). A identificação dos CDRs foi baseada no esquema de numeração de Kabat (1991).

#### 3.4 Phage display e enriquecimento da biblioteca Fab

A biblioteca combinatória de fragmentos Fab anti-digoxina foi enriquecida através de *phage display* e *panning* com o antígeno imobilizado. Um esquema mostrando as principais etapas do enriquecimento da biblioteca está representado na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática das principais etapas do phage display e panning.

A biblioteca de fragmentos Fab foi transformada em células *E. coli* XL1-Blue, infectada pelo fago auxiliar e os fagos expondo fragmentos Fab anti-digoxina foram selecionados por rodadas de *panning* através de ligação à Dig-BSA imobilizada em placa. Os fagos que não ligaram foram descartados por lavagem e os fagos que ligaram foram eluídos e usados para re-infectar *E. coli* XL1-Blue.



# 3.4.1 Preparação de fago auxiliar (helper phage)

Uma alíquota da bactéria *E. coli* XL1-Blue *Competent Cells* (Stratagene) foi plaqueada em placa LB-ágar contendo tetraciclina (10  $\mu$ g/mL) e incubada durante uma noite a 37 °C. Uma colônia de XL1-Blue foi inoculada em 10 mL de SB contendo 10  $\mu$ g/mL de tetraciclina e incubada sob agitação a 37 °C até a DO a 600 nm atingir 1,0. Foi então adicionada 1 placa de VCSM13 *Interference-Resistant Helper Phage* (Stratagene Corporation) e incubada por 2 horas a 37 °C. Foram transferidos 2 mL da cultura infectada para um Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de SB com 10  $\mu$ g/mL de tetracilcina e 70  $\mu$ g/mL de canamicina e incubada sob agitação a 37 °C durante uma noite (20 horas). A cultura foi centrifugada a 1.600 x g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante incubado em banho-maria por 25 minutos a

70 °C seguido por mais uma centrifugação a 1.600 x g por 25 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram estocados a 4 °C (estáveis por meses).

#### 3.4.1.1 Determinação de título do fago auxiliar

Foi feito um inóculo de 10  $\mu$ L de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetente em 10 mL de SB com 10  $\mu$ g/mL de tetracilcina e incubado por 5-6 horas a 37 °C. Diluições de 10<sup>-6</sup>,10<sup>-7</sup> e 10<sup>-8</sup> do VCSM13 foram preparadas. Foram adicionados 5  $\mu$ L de cada diluição a 100  $\mu$ L de XL1-Blue e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado 3 mL de soft ágar (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,5%; Ágar 0,65%) pré-aquecido (42 °C) e derramado sobre a placa de LB-ágar pré-aquecido (37 °C). As placas foram incubadas durante uma noite a 37 °C. Cada placa de lise formada representa uma partícula viral da suspensão. O título do fago foi calculado em Unidades Formadoras de Placa (UFP)/mL: nº placas de lise/v ( $\mu$ L) fago x fator diluição x 10<sup>3</sup>  $\mu$ L.

# 3.4.2 Geração da biblioteca de fagos Fab anti-digoxina (phage display)

Dois microlitros da biblioteca combinatória obtida acima foram transformados por eletroporação em 70 µL de *E. coli* XL1-Blue eletrocompetentes. Após incubação por 1 hora a 37 °C, foram plaqueados 50 µL da cultura em placa LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados durante uma noite a 37 °C para confirmar o tamanho da biblioteca combinatória. Adicionou-se à cultura 7 mL de SB contendo ampicilina 100 µg/mL, tetraciclina 10 µg/mL e glicose 40 nM. Após incubação por 2 horas a 37 °C, foram adicionados aproximadamente 1 x 10<sup>11</sup> UFP de fago auxiliar, seguindo por mais uma incubação por 2 horas a 37 °C. O cultivo foi centrifugado a 2.200 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspendido em 10 mL SB contendo ampicilina 100 µg/mL e canamicina 70 µg/mL e incubado durante uma noite (20 horas) a 30 °C. O cultivo foi centrifugado a 4.500 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Ao sobrenadante foram adicionados 2 mL de polietilenoglicol (PEG) 6.000 20%/NaCl 2,5 M. A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo e foi centrifugada a 4.500 x g

por 30 minutos a 4 °C, o sedimento foi ressuspendido em 400  $\mu$ L de BSA 2%/TBS e centrifugado a 20.800 x g por 5 minutos a 4 °C. Foram separados 5  $\mu$ L do sobrenadante para determinar o título (diluição 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>) e o restante foi aliquotado e armazenado a 4 °C (biblioteca de fagos).

# 3.4.2.1 Enriquecimento da biblioteca de fagos Fab anti-digoxina (panning)

Uma placa de 96 poços (Nunc, EUA) foi sensibilizada com 50 µL do conjugado dig-BSA previamente preparado (ver item 3.4.1) a 4 µg/mL. A placa foi incubada a 4 °C durante uma noite, seguida por 3 lavagens com PBS. Foi feito o bloqueio com 150 µL de BSA 1%/PBS e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Em cada poço foram adicionados 50 µL da suspensão de fagos, que foram incubados por 2 horas a 37 °C e após incubação os poços foram lavados 5x com BSA 2%/TBS. A eluição foi feita através da incubação por 10 minutos a temperatura ambiente com 50 µL de tampão de eluição (HCI 0,1 M – glicina, pH 2,2). Foi feita a neutralização com 3 µL de Tris-base 2 M, e os conteúdos dos poços foram transferidos para tubos de 1,5 mL. Uma alíquota de 5 µL foi separada para determinar título (diluição 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>). Um novo ciclo de *panning* teve início, infectando 0,5 mL de cultura de *E. coli* XL1-Blue com 100 µL de fagos eluídos. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente, 100 µL foram plaqueados em LB-ágar contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubados durante uma noite a 37 °C, enquanto ao restante, adicionou-se 10 mL de SB, 100 µg/mL de ampicilina, 10 µg/mL de tetraciclina e glicose 40 nM, dando continuidade ao procedimento de panning.

A partir do segundo ciclo de *panning*, a eficiência de cada ciclo foi calculada, em porcentagem de ligação, como mostrado abaixo:

Ligação (%) = <u>título de fagos depois do *panning* x 100</u> título de fagos antes do *panning* 

O fator de enriquecimento da biblioteca foi obtido pela razão entre a porcentagem de ligação do último ciclo de *panning* em relação ao ciclo anterior.

Após o terceiro ciclo de *panning* da biblioteca combinatória, 10 clones foram aleatoriamente selecionados da placa de diluição 10<sup>-4</sup> para serem analisados conforme descrito na análise da biblioteca combinatória (item 3.3.5) e os clones que

apresentaram os dois insertos foram sequenciados como já descrito anteriormente. Após análise dos dados de seqüenciamento, 4 clones foram selecionados para expressar fragmentos Fab solúveis.

# 3.5 Expressão de fragmentos Fab solúveis

A expressão de fragmentos Fab solúveis em bactérias E. coli da linhagem XL1-Blue é possível após a retirada do gene III do vetor pComb3X através de dupla digestão com as enzimas de restrição Spel e Nhel (New England Biolabs Inc.). Após a digestão com as enzimas por 2 horas a 37 °C, foi realizada uma precipitação com etanol. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose *UltraPure™L.M.P. Agarose - Low Melting Point* (Invitrogen Corporation) 1%. Bandas de aproximadamente 4100 bp foram isoladas, purificadas com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation) e precipitadas com etanol. O vetor sem o gene III foi religado utilizando 2 U de Taq DNA ligase (Invitrogen Corporation) durante uma noite a 16 °C (~ 20 horas). Para analisar os vetores preparados e confirmar a retirada do gene III, foram feitas transformações por eletroporação em XL1-Blue. Os plasmídeos foram purificados por Miniprep Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation), precipitados com etanol e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% após digestão com a enzima de restrição Xhol e também por dupla digestão com as enzimas de restrição Sacl e Xbal.

Após as análises, 1 µL de cada vetor foi transformado por choque térmico em 50 µL de XL1-Blue para a expressão dos fragmentos Fab solúveis. Foram plaqueados 20 µL e 100 µL em placas de Petri contendo LB-ágar com ampicilina (100 µg/mL) e as placas foram incubadas durante uma noite a 37 °C. No dia seguinte, as colônias foram removidas, inoculadas em 10 mL de meio SB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas por 2 horas a 37 °C. Foram inoculados 2 mL dessa cultura num frasco contendo 100 mL de meio SB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas por 2 horas a 37 °C. Foram inoculados 2 mL dessa cultura num frasco contendo 100 mL de meio SB com ampicilina (100 µg/mL) e MgCl<sub>2</sub> 20 mM. Seguiu-se uma incubação a 37 °C até a DO a 600 nm atingir aproximadamente 1,0, momento em que se adicionou *IsopropyI-β-D-Thiogalactoside* (IPTG) a 0,5 mM. O cultivo foi Induzido durante uma noite (~ 16horas) a 30 °C. Após o término da indução, o cultivo foi centrifugado a 2.200 x g a 4 °C por 15 minutos. O

precipitado foi ressuspendido em 5 mL de PBS e lisado por sonicação (Microson<sup>™</sup>, Ultrasonic Cell Disruptor - Misonix, Inc., EUA): 10 pulsos de 10 segundos, intercalados com incubações de 2 minutos no gelo. A suspensão foi centrifugada a 20.800 x g a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C e utilizado para confirmar a ligação ao antígeno. Uma segunda indução foi realizada em maior escala (1 L) a fim de obter fragmentos Fab para a realização de ensaios de ligação ao antígeno, inoculando-se 10 mL do pré inoculo em 500 mL de meio SB com ampicilina (100 μg/mL) e MgCl<sub>2</sub> 20 mM (2 frascos).

# 3.5.1 Quantificação dos fragmentos Fab solúveis por Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sanduíche

As quantificações foram feitas em microplacas MaxiSorp de 96 poços (Nunc-Immuno<sup>™</sup> Plates,). Em cada poço foram adicionados 100 µL de solução sensibilizadora (tampão de revestimento pH 9,6: 0,16 g de carbonato de sódio 15 mM (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); 0,30 g de bicarbonato de sódio 35 mM (NaHCO<sub>3</sub>); água qsp 100 mL), com o anticorpo AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Rabbit-Anti-Mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> Specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., EUA), diluído 1/400 (1,5 µg/mL), que foram incubados em câmara úmida durante uma noite a 4 °C. No dia seguinte a placa foi lavada três vezes com PBS, cada poço foi bloqueado com 300 µL de BSA 1%/PBS e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Após o bloqueio, a placa foi lavada três vezes com PBS. A curva-padrão foi preparada com o ChromPure Mouse IgG, Fab fragment (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) na concentração inicial de 0,01 µg/mL e diluição seriada 1/2 com BSA 1%/PBS. O extrato bruto contendo fragmentos Fab também foi diluído na concentração apropriada em BSA 1%/PBS. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C e depois lavada três vezes com PBS. Foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo conjugado Peroxidaseconjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), diluído 1/7000 em BSA 1%/PBS e incubados por 1 hora a 37 °C. A placa foi lavada três vezes com PBS. Foram adicionados em cada poco 100 µL da solução reveladora [10 mL de tampão de acetato/ácido cítrico 0,1 M pH 6,0 (1,36 g de acetato de sódio em água qsp 100 mL, pH acertado para 6,0 com ácido cítrico 100 mM); 100 µL de 3,3',5,5'-

tetrametilbenzidina (TMB) a 1% em dimetilsulfóxido (DMSO); 1,5  $\mu$ L de água oxigenada] e a placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,7 N e então foi feita a leitura da absorbância a 450 nm usando o leitor de placas (Labsystems iEMS Analyzer) e software Genesis Lite (Labsystems and Life Sciences International UK LTD.).

# 3.6 Caracterização dos extratos brutos contendo fragmentos Fab dos clones obtidos por *phage display*

# 3.6.1 Ensaio de ligação do fragmento Fab solúvel ao antígeno pelo teste de ELISA

Os extratos brutos dos quatro clones foram usados para analisar a ligação dos fragmentos Fab pela digoxina através do teste de ELISA, como descrito anteriormente (item 3.5.1), com algumas alterações. A sensibilização foi feita com Dig-BSA e BSA (controle negativo) na concentração de 4  $\mu$ g/mL. Em uma placa auxiliar, foram colocados 260  $\mu$ L do Fab solúvel no 1º poço de cada coluna e os demais foram preenchidos com 130  $\mu$ L de BSA 1%/PBS. Foi feita uma diluição seriada 1/2 ao longo da coluna. Foram transferidos 100  $\mu$ L de cada poço para a placa sensibilizada. O anticorpo conjugado utilizado foi *Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab')*<sup>2</sup> *Fragment Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')*<sup>2</sup> *Fragment Specific* (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), diluído 1/8.000. Um ensaio semelhante foi feito com o anticorpo monoclonal anti-digoxina produzido pelo hibridoma.

# 3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram feitas com géis de poliacrilamida em concentrações que variavam de 7,5% a 12%, com 0,75 mm ou 1,0 mm de espessura dependendo das amostras. As amostras foram diluídas em PBS quando necessário e preparadas com tampão de amostra com ou sem agente redutor (β-Mercaptoetanol). Os marcadores de massa molecular utilizados foram o *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (Amersham Biosciences UK Limited) e *HMW-SDS* 

*Marker kit* (GE Healthcare). As amostras foram reduzidas pela incubação por 5 minutos a 100 °C. O sistema utilizado foi o *Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell* (Bio-Rad). Os géis foram corados por nitrato de prata ou Corante Azul de Coomassie R250.

#### 3.6.3. Western Blotting

Os ensaios de Western blotting eram sempre realizados após SDS-PAGE de dois géis idênticos. Um gel era corado com nitrato de prata ou Coomassie, funcionando como referência do outro, que era transferido para uma membrana.

Um ensaio foi feito para detectar fragmentos Fab expressos pelos quatro clones. Os extratos brutos dos clones foram aplicados em dois géis de poliacrilamida 12%, que foram submetidos à eletroforese. Em um gel foi realizada a coloração por Coomassie (referência), enquanto o outro foi transferido para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, EUA) utilizando o sistema *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). O marcador de massa molecular usado no gel transferido foi o *Kaleidoscope* (Bio-Rad). A membrana foi bloqueada com leite desnatado 10%/PBS, lavada 3x com Tween 0,1%/PBS e incubada com o anticorpo conjugado *Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') Fragment Goat Anti-Mouse IgG, F(ab') Fragment Specific* (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), diluído 1/20.000, por 1 hora a 37 °C. A revelação foi feita com o kit *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare).

Para analisar a ligação dos fragmentos Fab pela digoxina, foi feito um ensaio para cada um dos quatro clones, aplicando Dig-BSA e BSA em dois géis de poliacrilamida 7,5%, que foram submetidos à eletroforese. Em um gel foi realizada a coloração por nitrato de prata (referência), enquanto o outro foi transferido para uma membrana de PVDF, como descrito anteriormente. Após o bloqueio, cada membrana foi incubada com o extrato bruto de um dos clones por 1 hora a 37 °C. A imunodetecção e a revelação foram feitas utilizando os mesmos reagentes e condições já mencionados.

# 3.6.4. Análise de afinidade no BIAcore® T100

O ensaio de ligação dos fragmentos Fab presentes nos extratos celulares pelo antígeno foi realizada usando do BIAcore<sup>®</sup> T100 (GE Healthcare) por

ressonância plasmônica de superfície (SPR, surface plasmon resonance). O conjugado Dig-BSA, usado como ligante, foi diluído em tampão acetato pH 4,0 numa concentração de 50 µg/mL. A imobilização foi feita em um chip sensor revestido por carboximetil dextrana, tipo CM5 (GE Healthcare) pelo método de amine coupling (ligação covalente com a dextrana contida no chip), com alvo de 10.000 RU, usando os reagentes do kit de imobilização covalente [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethanolamine-HCl pH 8,5] (GE Healthcare) e tampão HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0,05% pH 7,4) como tampão de corrida. O fragmento Fab dos extratos brutos foram quantificados por ELISA (item 3.5.1), diluídos em tampão HBS-EP a 2 µg/mL e usados como analito no ensaio de ligação com o conjugado Dig-BSA imobilizado no chip. O ensaio foi feito com fluxo de 15 µL/min, com tempo de 40 s de contato do analito na superfície, e 40 s de dissociação. A regeneração foi feita com NaOH 50 mM por 60 s num fluxo de 30 µL/min.

# **4 RESULTADOS**

# 4.1 Obtenção e caracterização do conjugado Dig-BSA

A digoxina foi conjugada à albumina sérica bovina (BSA) para ser utilizada no enriquecimento da biblioteca combinatória de fragmentos Fab anti-digoxina por *panning* e nos ensaios de ligação ao anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma anti-digoxina e aos fragmentos Fab produzidos pelos clones.

O número de resíduos de digoxina para cada molécula de BSA foi estimado em 5,8 e foi calculado conforme descrito no item 3.1.2. A concentração de proteína obtida pelo método de Bradford foi de 10 mg/mL.

Foi feito um teste de ELISA para verificar a ligação do conjugado Dig-BSA ao anticorpo monoclonal anti-digoxina. O conjugado foi imobilizado nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 µg/mL em uma microplaca e o sobrenadante do cultivo do hibridoma anti-digoxina foi diluído seriadamente com fator de diluição 2 e aplicado como anticorpo primário. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A Figura 6 mostra as absorbâncias obtidas a 450 nm em função da dluição do sobrenadante do hibridoma para cada concentração do antígeno. O anticorpo monoclonal apresentou o mesmo perfil de ligação ao conjugado Dig-BSA nas quatro concentrações do antígeno.

Figura 6 – Perfil da ligação do antígeno Dig-BSA à IgG anti-digoxina presente no sobrenadante do cultivo de hibridoma pelo teste de ELISA.

O conjugado Dig-BSA foi imobilizado em quatro concentrações: 1, 2, 4 e 8 µg/mL. O sobrenadante do cultivo do hibridoma anti-digoxina foi usado como anticorpo primário. Como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase.



# 4.2 Obtenção e purificação do anticorpo monoclonal anti-digoxina

O anticorpo monoclonal anti-digoxina, presente no sobrenadante do cultivo do hibridoma, foi purificado para ser utilizado como referência em parte dos ensaios de ligação ao conjugado. As células do hibridoma anti-digoxina foram cultivadas em dois frascos contendo 400 mL e 300 mL de meio, nas concentrações de  $0,74x10^6$  cél/mL com 98% viabilidade e de  $0,94x10^6$  cél/mL com 97% viabilidade, respectivamente. Após a purificação por cromatografia de afinidade pela proteína A, o eluato foi concentrado e analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na forma reduzida por  $\beta$ -ME e não reduzida (Figura 7). Podemos observar uma única banda na amostra não reduzida (canaleta 1), representando o anticorpo inteiro. Na amostra reduzida é possível visualizar as duas bandas características representando as cadeias leve e pesada de IgG. Pode-se visualizar ainda uma banda fraca correspondente à IgG não reduzida.

**Figura 7** – Perfil eletroforético da IgG anti-digoxina purificada por cromatografia de afinidade pela proteína A.

Gel de SDS-PAGE 12% corado por Coomassie. **M**: Marcador de massa molecular LMW (Amersham), **1**: IgG purificado não reduzido, **2**: IgG purificado reduzido com  $\beta$ -ME.



O anticorpo monoclonal anti-digoxina purificado foi usado também para padronizar a concentração da Dig-BSA imobilizada nos testes de ELISA. Foram imobilizadas concentrações do antígeno de 0,5 a 10 µg/mL e a IgG purificada foi usada como anticorpo primário, com concentração inicial de 500 ng/mL. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1/10.000. Na Figura 8 é apresentado o perfil de ligação da anti-digoxina para 6 concentrações de Dig-BSA. A concentração de 4 µg/mL foi escolhida para a imobilização da Dig-BSA e da BSA em todos os testes de ELISA.

Figura 8 – Perfil da ligação da IgG anti-digoxina purificada à Dig-BSA imobilizada em diferentes concentrações para padronização dos testes de ELISA. O conjugado Dig-BSA foi imobilizado em seis concentrações: 0,5; 1; 2; 4; 8 e 10 μg/mL. A IgG anti-digoxina purificada do hibridoma foi usada como anticorpo primário na concentração inicial de 500 ng/mL. Como anticorpo secundário foi usado anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase



# 4.3 Construção da biblioteca combinatória de fragmentos Fab anti-digoxina

A construção da biblioteca combinatória foi iniciada com a obtenção dos repertórios dos genes da LC e da HC a partir do hibridoma anti-digoxina, seguida por clonagem sequencial desses genes no vetor pComb3X.

Células do hibridoma anti-digoxina na concentração de  $0,95 \times 10^6$  células/mL, com 96% viabilidade, foram utilizadas para a extração do RNA total das células. Após a extração do RNA total a concentração obtida foi de 2,6 µg/mL e a razão A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> foi de 1,93. O cDNA sintetizado através de transcrição reversa do mRNA foi utilizado para amplificar genes da LC e HC, usando oligonucleotídeos iniciadores específicos de genes para imunoglobulinas murinas da LC ( $\kappa$ ) e porção Fd (V<sub>H</sub> e C<sub>H</sub>1) da HC ( $\gamma$ 1). Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 9). A amplificação dos genes da HC está representada na Figura 9A, onde podemos observar que o cDNA não foi amplificado usando o oligonucleotídeo 1A+1B (canaleta 1); os oligonucleotídeos 2A, 2B, 2C apresentaram uma banda de aproximadamente 650 pb (canaletas 2, 3 e 4), os oligonucleotídeos 3A, 3B+3C apresentaram uma banda de aproximadamente 750 pb (canaletas 5 e 6) e o oligonucleotídeo 3D não amplificou (canaleta 7). Na amplificação dos genes da LC (Figura 9B), podemos observar que houve amplificação usando os oligonucleotídeos k1 e k3, que apresentaram bandas de aproximadamente 700 pb (canaletas 1 e 3) e κ6, que apresentou banda de aproximadamente 600 pb (canaleta 6). Após a análise por eletroforese, os fragmentos de DNA da LC e HC foram separadamente misturados, formando os repertórios de genes da LC e HC. Estes repertórios foram clonados sequencialmente no vetor para a construção da biblioteca combinatória.

Figura 9 – Produtos das amplificações dos cDNAs do hibridoma anti-digoxina usando oligonucleotídeos de imunoglobulina murina. As amplificações foram feitas por PCR e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%. (A) Produtos das amplificações dos genes HC usando o oligonucleotídeo 3' MolgG1 e os sete oligonucleotídeos 5'. M: Marcador de massa molecular de 100pb (Invitrogen), 1: oligonucleotídeo 5' 1A+1B, 2: 2A, 3: 2B, 4: 2C, 5: 3A, 6: 3B+3C e 7: 3D. (B) Produtos das amplificações dos genes LC usando o oligonucleotídeo Mok 3' e os seis oligonucleotídeos 5'. M: Marcador de massa molecular de 100 pb (Promega), 1: oligonucleotídeo 5' κ1, 2: κ2, 3: κ3, 4: κ4, 5: κ5 e 6: κ6. A sequência dos oligonucleotídeos encontrase na Tabela 1.



O repertório de genes da LC foi o primeiro a ser clonado no vetor pComb3X para a construção da biblioteca LC. A biblioteca LC foi construída através de dupla digestão do repertório de genes LC e do vetor pComb3X com enzimas de restrição Sacl e Xbal seguido de eletroforese em gel de agarose 1% para extração e purificação das bandas e ligação dos mesmos. A biblioteca obtida foi transformada em *E.coli* XL1-Blue. O seu tamanho foi estimado em 3x10<sup>5</sup> clones. Foram escolhidos 10 clones ao acaso para extração do DNA e a presença do inserto LC foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, após digestão com as enzimas de restrição Sacl e Xbal. Dos 10 clones analisados, apenas o clone 8 não apresentou uma banda de aproximadamente 700 pb, correspondente ao inserto LC (Figura 10). De acordo com a amostragem que foi analisada, 90% dos clones da biblioteca LC apresentou o inserto LC. A biblioteca LC foi amplificada para a clonagem do repertório de genes HC neste vetor e obtenção da biblioteca combinatória de fragmentos Fab.

Figura 10 – Análise de restrição da biblioteca LC construída a partir da clonagem do repertório dos genes LC no vetor pComb3X para verificar presença do inserto LC.

Dez clones (numerados de 1 a 10) da bibliteoca LC selecionados ao acaso e o vetor pComb3XTT, usado como controle (**C**), foram digeridos com as enzimas de restrição SacI e XbaI e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. **M**: Marcador de massa molecular de 1 kb (Invitrogen).



A biblioteca LC e o repertório de genes da HC foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição Spel e Xhol e submetidos à eletroforese. As bandas foram extraídas, purificadas e ligadas para a obtenção da biblioteca combinatória. A biblioteca obtida teve o tamanho estimado em 5 x 10<sup>6</sup> clones. Foram escolhidos 10 clones ao acaso para verificar a presença dos insertos HC e LC pela digestão com enzimas de restrição específicas. Após eletroforese em gel de agarose, verificou-se que, dos 10 clones analisados, 6 apresentaram bandas de aproximadamente 700 pb, relativas aos insertos HC (Figura 11A) e LC (Figura 11B). Os 10 clones

selecionados também foram digeridos com a enzima de restrição BstNI para analisar a diversidade da biblioteca combinatória obtida. Observando os 6 clones que apresentaram os dois insertos, não foi possível notar diferenças aparentes no padrão de restrição entre os clones 2, 3, 6, 8 e 10 (Figura 12). O clone 4 apresentou um perfil diferente dos demais.

Figura 11 – Análise de restrição da biblioteca combinatória de fragmentos Fab construída no vetor pComb3X para verificar presença dos insertos LC e HC.

Dez clones (numerados de 1 a 10) da biblioteca combinatória foram selecionados ao acaso, digeridos com as enzimas de restrição Spel e Xhol para verificar a presença do inserto HC (**A**) e com Sacl e Xbal para verificar a presença do inserto LC (**B**). As amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, **M**: Marcador de massa molecular de 1 kb (Invitrogen).



Figura 12 - Análise de restrição da diversidade da biblioteca combinatória construída no vetor pComb3X pela digestão com a enzima de restrição BstNI. Os dez clones selecionados ao acaso e analisados na Figura 11 e o vetor pComb3XTT, usado como controle (C), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% após digestão com a enzima de restrição BstNI. M: Marcador de massa molecular de 100 pb (Promega).



Os seis clones que apresentaram os genes LC e HC foram sequenciados. A partir das sequências nucleotídicas obtidas de cada clone, foram deduzidas as sequências de resíduos de aminoácidos e foram detectados códons de parada nos genes da LC de todos os clones analisados, indicando que nenhum dos clones era funcional, todos eram pseudogenes. O clone 3 também possuía um códon de parada no gene da HC. Os clones 2, 6, 8 e 10 apresentaram sequências de aminoácidos idênticas na HC. O clone 4 possuía um resíduo de ácido glutâmico (E) na região CDR2, enquanto os demais possuíam uma lisina (K) (dados não mostrados). Apesar de não conseguirmos verificar grande diversidade de clones na biblioteca combinatória de fragmentos Fab, decidimos prosseguir os experimentos utilizando esta biblioteca.

# 4.4 Phage display e enriquecimento da biblioteca Fab anti-digoxina

A biblioteca combinatória de fragmentos Fab anti-digoxina obtida pela clonagem sequencial dos repertórios de genes da LC e HC foi enriquecida após algumas rodadas de *phage display* e *panning*, que selecionaram os fagos expondo fragmentos Fab anti-digoxina através da ligação ao antígeno Dig-BSA. Os fagomídeos da biblioteca foram transformados em células *E. coli* XL1-Blue, que foram infectadas pelo fago auxiliar VCSM13. Os fagos expondo anticorpos foram

recuperados da cultura e selecionados em rodadas de *panning* com Dig-BSA imobilizada em placa. O número de UFC antes e após seleção com o antígeno foi calculado em cada rodada, para estimar o fator de enriquecimento da biblioteca. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Um aumento de cerca de 36 vezes no fator de enriquecimento pode ser notado na segunda rodada e apenas cerca de 1 vez na terceira rodada, indicando que duas rodadas de *panning* foram suficientes para obter o enriquecimento da biblioteca Fab anti-digoxina.

- Tabela 2 Títulos dos fagomídeos antes e depois de cada rodada de panning e determinação da eficiência do panning (% ligação) e do enriquecimento da biblioteca
  - a: número de UFC de fagomídeos incubados com Dig-BSA.
  - b: número total de UFCs de fagos contidos nos eluatos
  - c: (fagos depois do *panning* / fagos antes do *panning*) x 100.
  - d: Enriquecimento da biblioteca comparado à rodada anterior de panning.

Rodada <i>panning</i>	Fagos antes do <i>panning</i> (UFC) <sup>a</sup>	Fagos depois do <i>panning</i> (UFC) <sup>b</sup>	% Ligação (10 <sup>-4</sup> ) <sup>c</sup>	Enriquecimento <sup>d</sup>
1	5,37x10 <sup>12</sup>	4,13x10 <sup>6</sup>	0,77	-
2	1,70x10 <sup>11</sup>	4,72x10 <sup>6</sup>	27,83	36,14
3	4,40x10 <sup>11</sup>	1,10x10 <sup>7</sup>	25	0,90

Após a terceira rodada de *panning*, 10 clones foram selecionados aleatoriamente e a presença dos insertos HC e LC foi verificada através da digestão com as enzimas de restrição e analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. Dos 10 clones analisados, 6 apresentaram os dois insertos (Figura 13A e 13B). Esses 10 clones também foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% após a digestão com a enzima de restrição BstNI para verificar a diversidade da biblioteca. Observando os 6 clones que apresentaram os dois insertos, não foi possível notar diferenças aparentes no padrão de restrição entre os clones 1, 2, 5, 9 e 10 (Figura 14). O clone 3 apresentou um perfil diferente dos demais clones.

Figura 13 – Analise de restrição da biblioteca de fragmentos Fab anti-digoxina após 3 rodadas de *phage display* seguido de *panning* para verificar presença dos genes LC e HC.

Dez clones (numerados de 1 a 10) selecionados aleatoriamente da biblioteca e o vetor pComb3XTT, usado como controle (**C**) foram digeridos com as enzimas de restrição Spel e Xhol para verificar a presença do inserto da HC (**A**) e com Sacl e Xbal para verificar a presença do gene LC (**B**) e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. **M**: Marcador de massa molecular de 1 kb (Invitrogen).



Figura 14 – Análise de restrição da diversidade da biblioteca de fragmentos Fab anti-digoxina após 3 rodadas de phage display seguido de panning pela digestão com a enzima de restrição BstNI.

Os dez clones (numerados de 1 a 10) referem-se aos clones analisados na Figura 13, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. **M**: Marcador de massa molecular de 100 pb (Promega).



Os clones que continham os insertos HC e LC (clones 1, 2, 3, 5, 9, 10) foram analisados por sequenciamento dos genes HC e LC. As sequências dos aminoácidos deduzidos foram alinhadas usando o programa ClustalW2. A numeração dos aminoácidos e dedução dos CDRs teve como base o esquema de Kabat et al. (1991). Todos os clones apresentaram sequências de aminoácidos idênticas na HC. A análise do sequenciamento da LC revelou que o clone 3 era um pseudogene e ao compararmos sua sequência nucleotídica com sequências depositadas no GenBank utilizando o programa BLASTn, encontramos 100% de identidade com o gene Mus musculus immunoglobulin aberrantly rearranged kappa chain mRNA, partial sequence (GenBank: U56414.1). Os clones 5 e 10 apresentaram seguências de aminoácidos da LC idênticas. O clone 9 possui um resíduo de glutamina (Q), na posição 54 da região CDR2 da LC, enquanto os outros clones possuem uma arginina (R). Os clones 1, 2, 9 e 10 apresentaram variações na sequência de aminoácidos da região do framework1 (Figura 15). As sequências dos aminoácidos deduzidos da LC e HC dos clones 1, 2, 9 e 10 foram analisadas quanto à homologia pelo programa BLASTp, comparando com sequências depositadas no GenBank. As sequências que apresentaram maior identidade com os clones estão apresentadas na Tabela 3 (LC) e Tabela 4 (HC), em porcentagem de identidade (quantidade de aminoácidos idênticos/quantidade de aminoácidos totais das

sequências). Comparando os CDRs da LC, observamos mais de 77,8% de identidade em todos os CDRs, chegando o CDR2 dos clones 1, 2 e 10 a apresentarem 100% de identidade com as três sequências encontradas (Tabela 3), enquanto os CDRs da HC dos clones apresentaram porcentagens mais baixas de identidade com as sequências encontradas, ficando abaixo de 80%, chegando a apenas 18,2% de identidade no CDR3 em uma das sequências (Tabela 4).

 Figura 15 – Representação simbólica das sequências de aminoácidos deduzidos da LC dos clones 1, 2, 9 e 10, selecionados após *phage display*.
 Os resíduos de aminoácidos foram substituídos por símbolos nas regiões FR1 e CDR2 para destacar as diferentes sequências. As demais regiões possuem sequências idênticas entre si.

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	CL
Clone 2	□▪▪◊♠▫ー▲ー♣☆ー♥▫▪ー	=	=	0	=	=	=	=
Clone 10	♥▪▪◊♠▫ー▲ー♣☆ー♥▫♦ー	=	=	0	=	=	=	=
Clone 1	<b>☆▼□■☆−</b> ▲− <b>□</b> ○−■▲♥−	=	=	0	=	=	=	=
Clone 9	□╅▼▫▫╅╼□╼घ०╼◾▲♥╼	=	=		=	=	=	=
	: :: * *::*:: *			****				

LC kappa IgM MP-18-3-117 [Mus musculus] <sup>(1)</sup>						
	Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
Clone 1	96% (149/156)					
Clone 2	92% (144/157)	90,9% (10/11)	100% (7/7)	88,9% (8/9)		
Clone 10	92% (159/172)					
Clone 9	95% (164/173)	90,9% (10/11)	85,7% (6/7)	88,9% (8/9)		
LC AcMo aglutinador [Mus musculus] <sup>(2)</sup>						
	Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
Clone 1	96% (149/156)					
Clone 2	91% (145/160)	81,8% (9/11)	100% (7/7)	77,8% (7/9)		
Clone 10	92% (159/172)					
Clone 9	94% (165/175)	81,8% (9/11)	85,7% (6/7)	77,8% (7/9)		
kappa imunoglobulina anti-YGNNV [Mus musculus] <sup>(3)</sup>						
	Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
Clones 1	95% (148/156)					
Clone 2	91% (143/157)	81,8% (9/11)	100%	88,9% (8/9)		
Clone 10	92% (158/172)					
Clone 9	94% (163/173)	81,8% (9/11)	85,7% (6/7)	88,9% (8/9)		

**Tabela 3** - Análise de homologia da LC dos fragmentos Fab dos quatro clones anti-<br/>digoxina utilizando BLASTp.

 $^{(1)}$  GenBank: AAG12167.1 (não publicado);  $^{(2)}$  GenBank: CAA72328.1 (BONG et al., 1998);  $^{(3)}$  GenBank: AAN86781.1 (LAI et al., 2002)

Tabela 4 - Análise de homologia (	da HC dos fragmentos Fab dos quatro clones anti-
digoxina utilizando BLA	ASTp.

HC, Estrutura Cristalográfica II-18 Humano Complexado ao Anticorpo de Referência Murina 125-2h Fab <sup>(1)</sup>					
Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
86% (148/173)	80% (8/10)	58,8% (10/17)	27,3% (3/11		
HC, Anticorpo Catalítico 4b2 em Complexo com seu Hapteno Amidino <sup>(2)</sup>					
Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
87% (150/174)	70% (7/10)	64,7% (11/17)	18,2% (2/11)		
HC, região variável da imunoglobulina anti-TSHr [Mus musculus] <sup>(3)</sup>					
Identidade	CDR1	CDR2	CDR3		
84% (144/173)	50% (5/10)	70,6% (12/17)	36,4% (4/11)		

<sup>(1)</sup> PDB:2VXT\_H (ARGIRIADI et al., 2009); <sup>(2)</sup> PDB: 1F3D\_H (GONÇALVES et al., 2000; GOLINELLI-PIMPANEAU et al., 2000); <sup>(3)</sup> GenBank: AAU816647.1 (COSTAGLIOLA et al., 2004).

# 4.5 Expressão e caracterização da ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina

Os clones 1, 2, 9 e 10, que apresentaram sequências de aminoácidos distintas na região FR1 da LC, foram escolhidos para expressar Fab solúvel usando a linhagem XL1-Blue de *E. coli.* Para isso, foi necessário remover o gene III do vetor pComb3X de cada clone através da digestão com as enzimas de restrição Spel e *Nhel*, permitindo que os fragmentos Fab fossem expressados na forma solúvel sem a pIII. As bandas dos vetores (~ 4 kb) foram separados da banda do gene III (612 pb) através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 16).

Figura 16 – Perfil eletroforético dos clones 1, 2, 9 e 10 digeridos com as enzimas de restrição Spel e Nhel para a remoção do gene III que codifica a proteína pIII.

As bandas de aproximadamente 4 kb (vetores) e 612 pb (gene III) foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1% e a banda do vetor foi purificada do gel para a obtenção do vetor de expressão do fragmento Fab solúvel. **M**: Marcador de massa molecular de 1 kb (Invitrogen).



O DNA plasmidial de cada clone foi purificado, transformado em *E. coli* XL1-Blue e a expressão de Fab solúvel foi induzida pela adição de IPTG. Após a indução, as bactérias foram lisadas por sonicação e os extratos brutos contendo os fragmentos Fab dos diferentes clones foram utilizados nos ensaios de ELISA, Western blotting e SPR.

Inicialmente foi feita a expressão dos fragmentos Fab em 100 mL de meio para verificar a ligação dos anticorpos à digoxina por ELISA e a quantidade de anticorpo expresso por cada clone (dados não apresentados). Em seguida foi realizada a expressão dos fragmentos Fab em 1 L de meio para obter quantidade de anticorpo para a realização dos ensaios de ligação ao antígeno. Os resultados apresentados neste trabalho referem-se aos fragmentos Fab da segunda expressão. Um ensaio de Western blotting foi realizado para verificar a expressão dos fragmentos Fab nos extratos brutos dos quatro clones. As amostras não reduzidas do extrato bruto dos clones foram diluídas 1/2, aplicadas em gel de poliacrilamida 12% e submetidas à eletroforese. O gel foi transferido para uma membrana de PVDF, que foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado a peroxidase. Em todos os clones foi reconhecida uma banda de aproximadamente 50 kDa, correspondente ao tamanho do fragmento Fab e também bandas de 25 kDa, mesmo tamanho da Fd e LC (Figura 17).

Figura 17 – Western blotting de extratos brutos contendo fragmentos Fab antidigoxina dos clones 1, 2, 9 e 10 expressos em *E. coli* XL1-Blue.
Os extratos foram diluídos 1/2 e aplicados no gel de poliacrilamida 12% na forma não reduzida. Após eletroforese, o gel foi transferido para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado a peroxidase e detectada com o sistema *ECL*.



Após a confirmação da expressão dos fragmentos Fab nos extratos brutos, foi feito um Western blotting para verificar a ligação do anticorpo anti-digoxina dos 4 clones ao antígeno. O conjugado Dig-BSA e o controle negativo BSA foram aplicados em géis de poliacrilamida 7,5% e submetidos a eletroforese. Os géis foram transferidos para membranas de PVDF, que foram incubadas com os extratos brutos dos 4 clones. O anticorpo anti-digoxina presente nos 4 extratos reconheceu uma banda de aproximadamente 67 kDa, correspondendo ao conjugado Dig-BSA, mas não apresentou ligação à BSA, como esperado (Figura 18).

Figura 18 – Imunodetecção do antígeno Dig-BSA e BSA pelos fragmentos Fab antidigoxina expressos em *E. coli* pelos 4 clones selecionados após phage display.

(A) Análise por SDS-PAGE 7,5% da Dig-BSA e BSA (controle) na forma reduzida. Após a eletroforese o gel foi corado por prata. **M**: HMW marker (GE Healthcare); **1**: Dig-BSA 0,025 mg/mL; **2**: Dig-BSA 0,0125 mg/mL; **3**: Dig-BSA 0,0063 mg/mL; **4**: BSA 0,01 mg/mL. (B) Western blotting para verificar ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina dos extratos brutos dos 4 clones ao antígeno Dig-BSA. Quatro géis com as mesmas amostras usadas em (A), foram transferidos para membranas de PVDF e cada membrana foi incubada com o extrato bruto de *E.coli* contendo fragmentos Fab anti-digoxina de cada um dos 4 clones. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado a peroxidase e reveladas com o sistema *ECL*.



A concentração dos fragmentos Fab expressados pelos clones foi determinada por ELISA sanduíche, imobilizando o anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> em microplacas. O fragmento Fab de camundongo foi utilizado para a construção da curva-padrão. As concentrações de fragmentos Fab, após a segunda indução, foram calculadas a partir da curva-padrão, resultando em: clone  $1 - 6,67 \mu g/mL$ , clone  $2 - 10,08 \mu g/mL$ , clone  $9 - 0,61 \mu g/mL$  e clone  $10 - 1,73 \mu g/mL$ . O clone 9 apresentou o menor rendimento entre os clones.

A ligação dos fragmentos Fab dos diferentes clones ao antígeno foi analisada por ELISA. O conjugado Dig-BSA e a BSA (controle) foram imobilizados a 4 µg/mL em microplacas, incubados com os extratos brutos contendo os fragmentos Fab dos clones, diluídos serialmente 1/2 com concentração inicial de 50 ng/mL, e incubados com anticorpo anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado à peroxidase. Os valores das absorbâncias foram plotados em gráfico em função da titulação das concentrações dos fragmentos Fab dos clones. Os resultados mostram

ligação específica dos quatro clones à Dig-BSA, sem evidência de ligação à BSA (Figura 19).

Figura 19 – Perfil da ligação dos fragmentos Fab anti-digoxina expressos em *E. coli* pelos 4 clones à Dig-BSA e BSA pelo teste de ELISA. A microplaca foi sensibilizada com Dig-BSA ou BSA a 4 μg/mL. Os fragmentos Fab presentes no extrato bruto de culturas de *E. coli* foram diluídas serialmente 1:2, iniciando com a concentração do anticorpo em 50 ng/mL. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo específico para fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado a peroxidase.



Pelos resultados dos imunoensaios não foi encontrada diferença de ligação entre os quatro fragmentos Fab, quando analisados em relação ao antígeno.

O ranqueamento foi possível através da análise por SPR no BIAcore, um sistema que apresenta alta sensibilidade para análises de interações biomoleculares em tempo real. Este sistema mede a alteração do ângulo do índice de refração conforme a massa da molécula presente na superfície de um chip.

Antes de realizar o ensaio de ligação, foi verificada a ausência de ligação inespecífica dos fragmentos Fab à dextrana contida na superfície do chip.

Após o teste acima, o conjugado Dig-BSA foi imobilizado no chip com alvo de 10.000 RU e teve como resultado final a densidade de proteína imobilizada de 9.259,8 RU. Os extratos brutos dos quatro clones, contendo os fragmentos Fab na concentração de 2,0 µg/mL, foram aplicados nas canaletas do chip, interagindo com a Dig-BSA e gerando uma resposta, medida em unidades de ressonância (RU, *ressonance units*). As RUs, medidas 5 segundos após o término da aplicação dos

fragmentos no chip imobilizado com Dig-BSA foram: clone 1 - 495,9 RU; clone 2 - 476,3 RU; clone 9 - 206,9 RU; clone 10 – 1.023,5 RU (Figura 20). O clone 9, que possui em sua sequência de aminoácidos deduzidos, um resíduo de aminoácido diferente na região CDR2 da LC em relação aos demais clones, apresentou a resposta mais baixa entre os clones analisados. Os quatro clones diferem entre si nas sequências de aminoácidos na região FR1 da LC.

Figura 20 - Sensorgrama do BIAcore do ensaio de ligação dos fragmentos Fab expressos em *E.coli* pelos 4 clones ao antígeno Dig-BSA. Dig-BSA foi imobilizada em um sensor chip CM5 a 9259,8 RU. Os extratos brutos dos clones contendo os fragmentos Fab expressos em *E. coli* foram injetados a uma concentração de 2,0 μg/mL. A resposta relativa foi medida 5 segundos após o término da aplicação do analito, no ponto indicado pela seta vermelha (clone 1 – 495,9 RU; clone 2 – 476,3 RU; clone 9: 206,9 RU; clone 10 – 1.023,5 RU.



# 5 DISCUSSÃO

Este estudo descreve a obtenção de fragmentos Fab do anticorpo monoclonal anti-digoxina pela utilização da tecnologia de *phage display*. Após o enriquecimento da biblioteca de fagos, 10 clones foram selecionados aleatoriamente e destes, 6 apresentaram os insertos LC e HC e tiveram as regiões dos genes LC e HC analisadas por sequenciamento. Quatro clones apresentaram diferenças na sequência de aminoácidos da LC, todos na região do framework 1. Esses clones.foram expressados e apresentaram ligação ao antígeno Dig-BSA, em ensaios de ELISA, Western blotting e SPR. Nenhum dos clones apresentou ligação à BSA isolada.

A tecnologia de *phage display* apresenta muitas vantagens, como a seleção de anticorpos monoclonais a partir de biblioteca de genes variáveis humanos (MARKS et al., 1991) e identificação de marcadores terapêuticos "in vivo" (ARAP, 2005). Fragmentos Fab podem ser expressados em *Escherichia coli* em grandes quantidades e a tecnologia de DNA recombinante fornece a oportunidade para a introdução de mutações que podem otimizar o Fab, aumentando a quantidade expressada, estabilidade, solubilidade e facilitando a humanização e a maturação de afinidade (KWONG, RADER, 2009).

A quantidade de Fab obtida por litro de cultura em *E. coli* depende principalmente da sequência de aminoácidos do Fab (KWONG, RADER, 2009), isto explicaria as variações nas quantidades de fragmentos Fab expressados pelos clones. Outras possíveis causas do baixo rendimento podem ser solubilidade baixa e agregação. Estudos mostraram que esse problema foi contornado pelo isolamento de genes *trans-acting*, que melhoram a expressão de fragmentos scFv solúveis no ambiente oxidante do citoplasma da bactéria mutante *E. coli trxB gor*, usando  $\lambda$ phage display (LEVY et al., 2007). Grandes quantidades de fragmentos Fab, da ordem de 3-15 mg/mL também foram obtidos pela expressão sem o fago auxiliar, em incubações longas a baixa temperatura (KUBA et al., 2008). Estas possibilidades não foram exploradas nesse trabalho, cujo objetivo principal foi gerar fragmentos Fab com alta ligação à digoxina.

Para a expressão de proteínas solúveis em *E.coli* XL1-Blue utilizando o vetor pComb3X, foi preciso remover o gene III do vetor e com isso, a cauda de histidina que possibilitaria a purificação por cromatografia de metais quelados foi perdida.

Apesar desta desvantagem, esta estratégia foi escolhida por permitir a obtenção do fragmento Fab isolado, sem a necessidade da retirada da cauda de histidina após a expressão. Tentamos a purificação utilizando cromatografia de afinidade em proteína G, que se liga fortemente à porção Fc do anticorpo (região não presente nos Fabs) e potencialmente pode se ligar à região constante da cadeia pesada (C<sub>H</sub>1). Esta abordagem não foi eficiente para purificar os Fabs produzidos (dados não mostrados). Assim, os ensaios de afinidade foram realizados com os extratos brutos dos clones, contendo Fab solúvel. Existe uma resina para purificação por captura da região *kappa* que será testada futuramente para a purificação dos fragmentos Fab.

O ensaio de Western blotting realizado para detectar fragmentos Fab, na forma não reduzida presentes nos extratos brutos dos clones, apresentou bandas de 25 kDa, que podem indicar uma degradação dos fragmentos Fab, uma vez que tanto a cadeia leve (V<sub>L</sub>, C<sub>L</sub>) como o fragmento Fd (V<sub>H</sub>, C<sub>H</sub>1) possuem 25 kDa. Outra hipótese seria a expressão das cadeias LC e HC de forma separada. Segundo Kwong, Rader (2009), o desafio principal na expressão de Fab em *E. coli* é a formação de quatro pontes dissulfetos intra-cadeia e uma intercadeia requeridas para a integridade estrutural e funcional da molécula de Fab. Pode haver também uma variação de formas no extrato bruto, o que poderá ser resolvido quando for aplicado um método de purificação. A futura otimização da expressão dos fragmentos Fab também poderá resultar numa fração maior de fragmentos íntegros. Neste trabalho não há a proposta de otimização ou purificação, o que será realizado num projeto posterior.

Metodologias convencionais como ELISA e Western blotting confirmaram a especificidade da ligação dos fragmentos Fab ao antígeno Dig-BSA, mas não foram capazes de discriminar diferenças entre as ligações dos 4 clones. Uma técnica mais poderosa e sensível como a SPR permitiu mostrar diferenças e classificar os clones. BlAcore é um sistema que apresenta alta sensibilidade para análises de interações biomoleculares em tempo real. SPR mede a alteração do ângulo do índice de refração conforme a massa da molécula presente. A detecção ocorre na superfície de um chip, onde é imobilizado um ligante. O analito passa através de canais do chip, interagindo com o ligante e gerando uma resposta, medida em unidades de ressonância (RU, *resonance units*) (SCHASFOORT, TUDOS, 2008). A resposta relativa não pode ser medida durante a aplicação do analito, pois pode haver uma

alteração do índice de refração provocada pelo extrato bruto na superfície (efeito de bulk), e não uma interação específica entre ligante e analito. Esta diferença é anulada quando a resposta relativa é medida após 5 segundos do término da injeção do analito. Uma célula de fluxo contendo BSA imobilizado como referência foi utilizada para análise de ligação dos clones anti-digoxina, com resultado negativo. O ensaio indicou diferenças na ligação entre os clones anti-digoxina e o antígeno, com resultados variando de 206,9 RU a 1023,5 RU. O clone 9, que possui uma glutamina (Q) substituindo uma arginina (R) na posição 54 na região CDR2 da LC, apresentou a ligação mais baixa entre os clones analisados. BIAcore foi a tecnologia usada recentemente para selecionar o melhor clone para scFv anti- VEGF-C, iniciando pela biblioteca de fagos, antes e depois da maturação por afinidade. Bloqueios da ligação do VEGF-C ao VEGF-R2 e VEGF-R3 também foram realizados em ensaios de neutralização por SPR (RINDERKNECHT et al., 2010). Nosso grupo pretende realizar ensaios de cinética no futuro, após purificação de grande quantidade de fragmentos Fab anti-digoxina. Com os extratos brutos a alta velocidade de associação dos analitos não se refere somente à afinidade entre fragmentos de anticorpos e a digoxina, e sim de toda e qualquer proteína presente no extrato que tenha alguma afinidade com a digoxina. Além disso, em ensaios cinéticos em estado estacionário, não é possível atingir a capacidade máxima de ligação do analito à superfície com as concentrações de analito utilizadas, o que gera resultados incertos para a definição das constantes cinéticas. Contudo, o uso do BIAcore neste estágio possibilitou a comparação da ligação entre os clones obtidos, indicando que variações na região FR1 foram determinantes nas interações.

Foi realizado um ensaio de ligação, por SPR, comparando a afinidade de ligação dos clones obtidos neste trabalho com o hibridoma original. Nesse ensaio, não apresentado, todos os clones apresentam afinidade aumentada em relação à lgG secretada pelo hibridoma. Contudo, não é possível confirmar esse resultado pela natureza diversa entre as moléculas. O anticorpo está purificado enquanto os clones foram analisados em extrato bruto. Outro ponto a considerar é a diferença de massa molecular entre a IgG e os fragmentos Fab, dificultando a comparação direta.

Em estudos anteriores, outros hibridomas anti-digoxina foram gerados (HUNTER, et al., 1982; MUDGETT-HUNTER, et al., 1985) e variantes do hibridoma 26-10 foram isoladas, produzindo anticorpos com afinidade pela digoxina drasticamente reduzida devido à substituição de 1 ou 2 aminoácidos na região

CDR2 da HC (SCHILDBACH et al., 1991). As variantes foram usadas como modelo em estudos de complementaridade entre antígeno e anticorpo, análises de afinidade e especificidade dos anticorpos anti-digoxina através de engenharia de proteínas. A digoxina é um hapteno bem definido quimicamente, sem carga, que possui tamanho aproximado do sítio combinatório do anticorpo e possui muitos análogos, sendo um bom candidato a esse objetivo. Outros mutantes do hibridoma anti-digoxina 26-10 foram manipulados e expressados. Um estudo indicou que a posição 50 na região CDR2 da HC é determinante para a afinidade e especificidade fina para o anticorpo 26-10 (SCHILDBACH et al., 1993). Outro estudo usando modelagem e ligação, mostrou que uma asparagina na posição 35 (Asn35) na região CDR1 da HC é um importante resíduo de contato e elemento estrutural do anticorpo 26-10 (SCHILDBACH et al., 1994). Avanços nesses estudos foram obtidos pela introdução de mutações na HC usando phage display (SHORT et al., 1995; KRYKBAEV et al., 2001; SHORT et al., 2002).

Variações na região framework levando a alterações na afinidade de anticorpos também foram relatadas. Em uma variante espontânea do hibridoma antidigoxina 40-150, a substituição de uma serina por uma arginina na posição 94 na região FR3 da HC causou uma diminuição da afinidade e especificidade pela digoxina (PANKA et al., 1988). As regiões framework da LC podem alterar a afinidade em outros anticorpos, como demonstrado em um anticorpo monoclonal anti-CD18 humanizado, na posição 37 do FR2 (CALDAS et al., 2003). Os aminoácidos do FR1 também podem influenciar a secreção da cadeia leve. Três cadeias leve quiméricas pouco secretadas tiveram os FR1 substituídos pelos aminoácidos presentes em cadeias leves altamente secretadas. Em duas delas os níveis de secreção aumentaram aproximadamente 30 e 100 vezes. A substituição dos aminoácidos asparagina e prolina (NP) presentes nas posições 11 e 12 no FR1 de uma das cadeias leves pouco secretada pelos aminoácidos leucina e serina (LS), aumentaram cerca de 7 vezes a secreção da cadeia leve em relação à forma nativa da cadeia leve pouco secretada (HORWITZ et al., 1994). No presente trabalho as diferenças nas ligações dos clones são provavelmente devidas às múltiplas variações encontradas no FR1 da LC dos fragmentos Fab e da única alteração na posição 54 na região CDR2 da LC do clone 9, que apresentou a resposta mais baixa entre os clones, no ensaio de ligação à Dig-BSA realizado no BIAcore.

Os fragmentos Fab anti-digoxina disponíveis comercialmente para reverter a intoxicação causada pela digoxina são policionais. Além disso, seu alto custo limita seu uso a todos os pacientes que poderiam se beneficiar com a medicação (GHEORGHIADE et al., 2006). Acreditamos na possibilidade de gerar fragmentos Fab anti-digoxina monocionais com maior afinidade e especificidade do que os policionais fornecidos pelo soro de animais. Para atingir este objetivo a tecnologia de phage display foi usada. Este trabalho irá continuar através de melhoramentos na capacidade de expressão para gerar material para desenvolver um protocolo de purificação. BIAcore será usado para validação cinética dos ciones para digoxina e seus análogos. Fragmentos Fab monocionais representam potencial de um produto com potência específica e dose mais precisa para a desintoxicação de pacientes sob tratamento de digoxina.

# 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O objetivo de produzir fragmentos Fab anti-digoxina pela tecnologia de *phage display* foi plenamente alcançado. Foram gerados clones apresentando variabilidade na sequência de aminoácidos da LC, que demonstraram, em análise com os extratos brutos, capacidades variáveis de ligação ao antígeno, conjugado Dig-BSA. Estão disponíveis sequências que apresentam afinidade maior que a original e que serão objeto de estudos adicionais para otimização das condições de expressão no sistema bacteriano. A melhor produtividade vai permitir ensaios de condições cromatográficas de purificação para determinação das constantes cinéticas, em relação à digoxina e seus análogos. Os resultados futuros de caracterização serão determinantes para propor um produto para um possível uso terapêutico.

Neste trabalho de mestrado foram atingidas as duas propostas: instalação da tecnologia de *phage display* e obtenção de fragmentos Fab anti-digoxina.

# **REFERÊNCIAS\***

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**, 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 576 p.

AGGARWAL, S. What's fueling the biotech engine—2009–2010. **Nat. Biotechnol.,** v. 28, p. 1165–1171, 2010.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANDRÉS, V. L. G. Revisión sistemática sobre la efectividad e indicaciones de los anticuerpos antidigoxina en la intoxicación digitálica. **Rev Esp Cardiol.**, v. 53, p. 49-58, 2000.

ANTMAN, E. M.; SMITH, T. W. Digitalis toxicity. **Annu. Rev. Med.**, v. 36, p. 357-367, 1985.

ANTMAN, E. M.; WENGER, T. L.; BUTLER, V. P. JR.; HABER, E.; SMITH, T. W. Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. **Circulation**, v. 81, p.1744-1752, 1990.

ARAP, M. A. Phage display technology – Applications and innovations. **Genet. Mol. Biol.**, v. 28, p. 1-9, 2005.

ARGIRIADI, M. A.; XIANG, T.; WU, C.; GHAYUR, T.; BORHANI, D. W. Unusual water-mediated antigenic recognition of the proinflammatory cytokine interleukin-18. **J. Biol. Chem.**, v. 36, p. 24478-4489, 2009.

BARBAS, C. F. 3RD.; KANG, A. S.; LERNER, R. A.; BENKOVIC, S. J. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. **Proc. Natl.** Acad. Sci. U. S. A., v. 88 p. 7978-7982, 1991.

BARBAS, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. **Phage display: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 736 p.

BONG, Y. S.; CHO, S. H.; NHAM, S. U.; LEE, Y. I. Cloning and characterization of cDNAs coding for heavy and light chains of agglutinating monoclonal antibody (HAG12isIrh) specific for human red blood cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 10, p. 156-158, 1998.

BUTLER, JR, V. P.; CHEN, J. P. Digoxin-specific antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**., v. 57, p. 71-78, 1967.

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUTLER, JR, V. P.; SCHMIDT, D. H.; SMITH, T. W.; HABER, E.; RAYNOR, B. D.; DEMARTINI, P. Effects of sheep digoxin-specific antibodies and their Fab fragments on digoxin pharmacokinetics in dogs. **J. Clin. Invest.**, v. 59, p. 345-359, 1977.

CALDAS, C.; COELHO, V; KALIL, J.; MORO, A. M.; MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Humanization of the anti-CD18 antibody 6.7: an unexpected effect of a framework residue in binding to antigen. **Mol. Immunol.**, v. 39, p. 941–952, 2003.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem**., v.162, p. 156-159, 1987.

CLACKSON, T.; HOOGENBOOM, H. R.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G. Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature**, v. 352, p. 624-628, 1991.

COSTAGLIOLA S, BONOMI M, MORGENTHALER NG, VAN DURME J, PANNEELS V, REFETOFF S, VASSART G. Delineation of the discontinuous-conformational epitope of a monoclonal antibody displaying full in vitro and in vivo thyrotropin activity. **Mol Endocrinol.**, v. 18, p. 3020-3034, 2004.

EICHHORN, E. J.; GHEORGHIADE, M. Digoxin. **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 44, p. 251-266, 2002.

ERLANGER, B. F.; BEISER, S. M. Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 52, p. 68-74, 1964.

FLANAGAN, R. J.; JONES, A. L. Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology. **Drug Saf.**, v. 27, p.1115-1133, 2004.

GHEORGHIADE, M.; VAN VELDHUISEN, D. J.; COLUCCI, W. S. Contemporary use of digoxin in the management of cardiovascular disorders. **Circulation**, v. 113, p. 2556-2564, 2006.

GOLINELLI-PIMPANEAU, B.; GONCALVES, O.; DINTINGER, T.; BLANCHARD, D.; KNOSSOW, M.; TELLIER, C. Structural evidence for a programmed general base in the active site of a catalytic antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,** v. 18, p. 9892-9895, 2000.

GONÇALVES, O.; DINTINGER, T.; LEBRETON, J.; BLANCHARD, D.; TELLIER, C. Mechanism of an antibody-catalysed allylic isomerization. **Biochem. J.**, v. 3, p. 691-698, 2000.

HORWITZ AH, NADELL R, PREUGSCHAT F, BETTER M. Chimeric immunoglobulin light chains are secreted at different levels: influence of framework-1 amino acids. **Mol. Immunol.**, v. 31, p. 683-692, 1994.

HUNTER, M. M.; MARGOLIES, M. N.; JU, A.; HABER, E. High-affinity monoclonal antibodies to the cardiac glycoside, digoxin. J. Immunol., v. 129, p. 1165-1172, 1982.
HUSE, W. D.; SASTRY, L.; IVERSON, S. A.; KANG, A. S.; ALTING-MEES, M.; BURTON, D. R.; BENKOVIC, S. J.; LERNER, R. A. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. **Science**, v. 246, p. 1275-1281, 1989.

KABAT, E. A.; WU, T. T.; PERRY, H. M.; GOTTESMAN, K. S.; FOELLER, C. **Sequences of proteins of immunological interest**, 5. ed. Bethesda, MD: National Institute of Health, 2001. 2597 p.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256 p.495-497, 1975.

KRYKBAEV, R. A.; LIU, W. R.; JEFFREY, P. D.; MARGOLIES, M. N. (2001) Phage display-selected sequences of the heavy-chain CDR3 loop of the anti-digoxin antibody 26-10 define a high affinity binding site for position 16-substituted analogs of digoxin. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 8149-8158, 2001.

KRYKBAEV, R. A.; TSANTILI, P.; JEFFREY, P. D.; MARGOLIES, M. N. Modifying specificity of antidigoxin antibodies using insertional mutagenesis. **Protein Sci**., v. 11, p. 2899-2908, 2002.

KUBA, H.; FURUKAWA, A.; OKAJIMA, T.; FURUKAWA, K. Efficient bacterial production of functional antibody fragments using a phagemid vector. **Protein Expr. Purif.**, v. 58, p. 292-300, 2008.

KWONG, K. Y.; RADER, C. *E. coli* expression and purification of Fab antibody fragments. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, v. 55:, p. 6.10.1-6.10.14, 2009. Cap.6

LAI, Y. S.; JOHN, J. A.; GUO, I. C.; CHEN, S. C.; FANG, K.; CHANG, C. Y. In vitro efficiency of intra- and extracellular immunization with mouse anti-YGNNV antibody against yellow grouper nervous necrosis virus. **Vaccine**, v. 20, p. 3221-3229, 2002.

LAPOSTOLLE, F.; BORRON, S. W.; VERDIER, C.; TABOULET, P.; GUERRIER, G.; ADNET, F.; CLEMESSY, J. L.; BISMUTH, C.; BAUD, F. J. Digoxin-specific Fab fragments as single first-line therapy in digitalis poisoning. **Crit. Care Med.,** v. 36, p. 3014-3018, 2008.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. ClustalW and ClustalX version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, p. 2947-2948, 2007.

LEVY, R.; MOLINEUX, I. J.; IVERSON, B. L.; GEORGIOU, G. Isolation of transacting genes that enhance soluble expression of scFv antibodies in the E. coli cytoplasm by lambda phage display. **J Immunol. Meth.,** v. 321, p. 164-173, 2007.

MARKS, J. D.; HOOGENBOOM, H. R.; BONNERT, T. P.; MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. **J. Mol. Biol.**, v. 222, p. 581-597, 1991.

MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G.; CHISWELL, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552-554, 1990.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A. Anticorpos monoclonais para a clínica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 22, p. 32-35, 2001.

MUDGETT-HUNTER, M.; ANDERSON, W.; HABER, E.; MARGOLIES, M. N. Binding and structural diversity among high-affinity monoclonal anti-digoxin antibodies. **Mol. Immunol.**, v. 22, p. 477-488, 1985.

ORLANDI, R.; GÜSSOW, D. H.; JONES, P. T.; WINTER, G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 86, p. 3833-3837, 1989.

PANKA, D. J.; MUDGETT-HUNTER, M.; PARKS, D. R.; PETERSON, L. L.; HERZENBERG, L. A.; HABER, E.; MARGOLIES, M. N. Variable region framework differences result in decreased or increased affinity of variant anti-digoxin antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, p. 3080-3084, 1988.

PAULA, F. J. DE. Fração sérica de pacientes urêmicos expandidos com atividade digoxina-símile inibidora da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase: isolamento, efeitos biológicos e caracterização com anticorpos monoclonais. 152 f. Tese (Doutorado em Nefrologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

RINDERKNECHT, M.; VILLA, A.; BALLMER-HOFER, K.; NERI, D.; DETMAR, M. Phage-derived fully human monoclonal antibody fragments to human vascular endothelial growth factor-C block its interaction with VEGF receptor-2 and 3. **PLoS One.**, v. 5, p. e11941, 2010.

SCHASFOORT, R. B. M.; TUDOS, A. J. **Handbook of surface plasmon resonance**. Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing, 2008. 403 p.

SCHILDBACH, J. F.; PANKA, D. J.; PARKS, D. R.; JAGER, G. C.; NOVOTNY, J.; HERZENBERG, L. A.; MUDGETT-HUNTER, M.; BRUCCOLERI, R. E.; HABER, E.; MARGOLIES, M. N. Altered hapten recognition by two anti-digoxin hybridoma variants due to variable region point mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 4640-4647, 1991.

SCHILDBACH, J. F.; NEAR, R. I.; BRUCCOLERI, R. E.; HABER, E.; JEFFREY, P. D.; NG, S. C.; NOVOTNY, J.; SHERIFF, S.; MARGOLIES, M. N. Heavy chain position 50 is a determinant of affinity and specificity for the anti-digoxin antibody 26-10. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 21739-21747, 1993.

SHORT, M. K.; JEFFREY, P. D.; KWONG, R. F; MARGOLIES, M. N. Contribution of antibody heavy chain CDR1 to digoxin binding analyzed by random mutagenesis of phage-displayed Fab 26-10. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 28541-28550, 1995.

SHORT, M. K.; KRYKBAEV, R. A.; JEFFREY, P. D.; MARGOLIES, M. N. Complementary combining site contact residue mutations of the anti-digoxin Fab 26-10 permit high affinity wild-type binding. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 16365-16370, 2002.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SMITH, T. W.; BUTLER, V. P. JR.; HABER, E. Characterization of antibodies of high affinity and specificity for the digitalis glycoside digoxin. **Biochemistry**, v. 9, p. 331-337, 1970.

SMITH, T. W.; HABER, E.; YETMAN, L.; BUTLER, JR. Reversal of advanced digoxin intoxication with Fab fragments of digoxin-specific antibodies. **N. Eng J. Med.**, v. 294, p. 797-800, 1976.

STRACHAN, G.; MCELHINEY, J.; DREVER, MR.; MCINTOSH, F.; LAWTON, L. A.; PORTER, A. J. Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 210, p. 257-261, 2002.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, p. 575-581, 1983.

TSURUTA, L. R.; TOMIOKA, Y.; HISHINUMA, T.; KATO, Y.; ITOH, K.; SUZUKI, T.; OGURI, H.; HIRAMA, M.; GOTO, J.; MIZUGAKI, M. Characterization of 11-dehydrothromboxane B2 recombinant antibody obtained by phage display technology. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, p. 273-284, 2003.

WITHERING, W. An account of the foxglove and some of its medical uses; with practical remarks on the dropsy, and some other diseases In: Willins FA, Keys TE, eds. **Classics of Cardiology**. New York, NY: Henry Schyuman, Dover Publications; 1941; cap. 1, p. 231–252.