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

RESUMO

MURATA, V. M. **Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina 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 policlonal anti-digoxina 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 *framework*1 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 *framework*1 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 anti-digoxin antibody by phage display technology**. 2012. 75 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

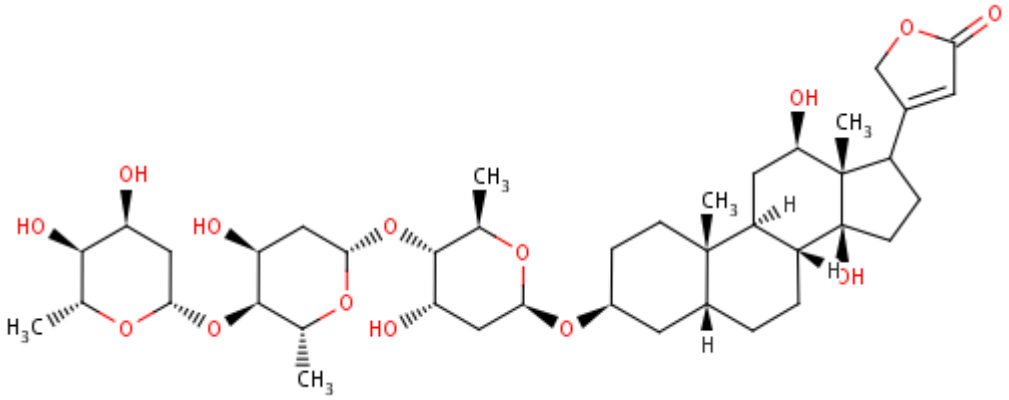
Digoxin is a pharmaceutical used in the control of cardiac dysfunction. Its therapeutic window is narrow, with therapeutic dosage very close to the toxic dosage. To counteract the toxic effect, polyclonal anti-digoxin Fab fragments are commercially available. Our work is based on monoclonal anti-digoxin 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.

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 continuam em uso em práticas clínicas contemporâneas (EICHHORN, 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 α da enzima Na^+ K^+-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 β-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 ($C_{41}H_{64}O_{14}$), 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 policlonais 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 anticorpos é a principal terapia para reverter a intoxicação (ANTMAN et 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 policlonal anti-digoxina gerado em ovelha (Digibind®) 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 policlonal ovina é comercializada na Europa com o nome de Digidot, produzida pela Boehringer Mannheim e em 2001, uma outra preparação DigiFab® (Protherics) recebeu a aprovação do FDA.

No Brasil o anticorpo anti-digoxina Fab (Digibind®) 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).

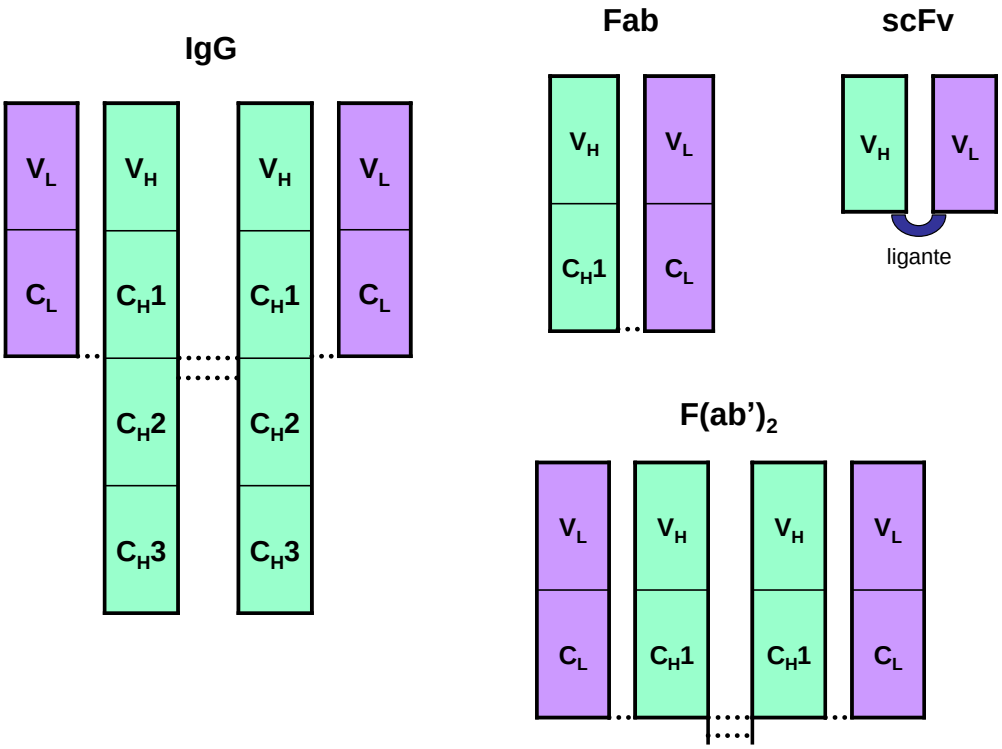
Os anticorpos são glicoproteínas com peso molecular de aproximadamente 150 kDa, formados por duas cadeias leves (LC, *light chain*) idênticas de aproximadamente 24 kDa cada, e duas cadeias pesadas (HC, *heavy chain*) idênticas de 55 a 70 kDa cada. Uma cadeia leve está ligada covalentemente a uma cadeia 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* (λ) e *kappa* (κ) que se diferenciam por suas regiões constantes. A cadeia λ 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).

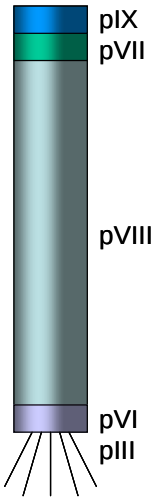
Os fragmentos de anticorpos mantêm os sítios de ligação ao antígeno, são menos imunogênicos do que o IgG inteiro, se difundem melhor no espaço intersticial, são facilmente eliminados via filtração glomerular e são mais estáveis em estoques do que o IgG (FLANAGAN, JONES, 2004). Podem ser obtidos pela digestão da imunoglobulina com a enzima pepsina que produz dois fragmentos Fab ligados por ponte dissulteto, $F(ab')_2$ 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.

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 (HAG12islrh) 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 trans-acting 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^+K^+ 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-dehydro-thromboxane 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.