

**ANDRÉ LUÍS INOCENCIO**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FRAGMENTO FAB ANTI-DIGOXINA  
OBTIDO PELA TÉCNICA DE *PHAGE DISPLAY***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Maria Moro

Co-orientadora: Dra. Lilian Rumi Tsuruta

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2016

## RESUMO

INOCENCIO, A. L. **Purificação e caracterização do fragmento Fab anti-digoxina obtido pela técnica de *phage display***. 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A digoxina é um dos medicamentos indicados para o tratamento da insuficiência cardíaca. Possui janela terapêutica estreita, sendo responsável por casos de intoxicação. O único antídoto disponível para a desintoxicação é o anticorpo policlonal – DigiFab<sup>®</sup>, no formato Fab. O seu uso é eficaz, porém de custo elevado. Clones bacterianos produtores de fragmento Fab monoclonal anti-digoxina foram obtidos previamente pelo nosso grupo, pela técnica de *phage display*. Neste trabalho as variantes Fab dos 4 clones foram expressas em *E.coli* para estabelecer o método para a purificação. Com a obtenção dos fragmentos Fab purificados, foi caracterizada a sua afinidade ao antígeno e especificidade, em ensaios de inibição por digoxina, digitoxina, digoxigenina e ouabaina. Os parâmetros cinéticos da ligação dos fragmentos Fab dos 4 clones e do DigiFab<sup>®</sup> foram avaliados por ressonância plasmônica de superfície. Nas condições experimentais, não foram verificadas diferenças significativas entre os produtos dos 4 clones e o comercial, demonstrando o potencial dos fragmentos Fab monoclonais obtidos como antídoto à digoxina.

**Palavras-chave:** Digitálicos. Cromatografia. Fragmento Fab monoclonal. *Phage display*. Digoxina. Ressonância plasmônica de superfície.

## ABSTRACT

INOCENCIO, A. L. **Purification and characterization of anti-digoxin Fab fragments obtained by phage display technology.** 2016. 92 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Digoxin is a medication indicated for heart failure treatment. Its therapeutic window is narrow, being responsible for intoxication cases. The only antidote available for the detoxification is a polyclonal antibody - DigiFab<sup>®</sup> in Fab format. Its use is effective, but costly. Bacterial clones producing anti-digoxin monoclonal Fab fragments were previously obtained by our group using phage display technology. In this work the Fab variants of the 4 clones were expressed in *E.coli* to establish the purification method. The purified fragments were characterized regarding the affinity to the antigen and the specificity through inhibition assays with digoxin, digitoxin, digoxigenin and ouabain. The binding kinetic parameters of Fab fragments of the 4 clones and the commercial product to Dig-BSA conjugate were assessed by surface plasmon resonance. Under the experimental conditions no significant differences were observed among the 4 clones and the commercial product, demonstrating the potential of monoclonal Fab fragments as an antidote to digoxin.

**Keywords:** Digitalics. Chromatography. Monoclonal Fab fragment. Phage display. Digoxin. Surface plasmon resonance.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Insuficiência cardíaca**

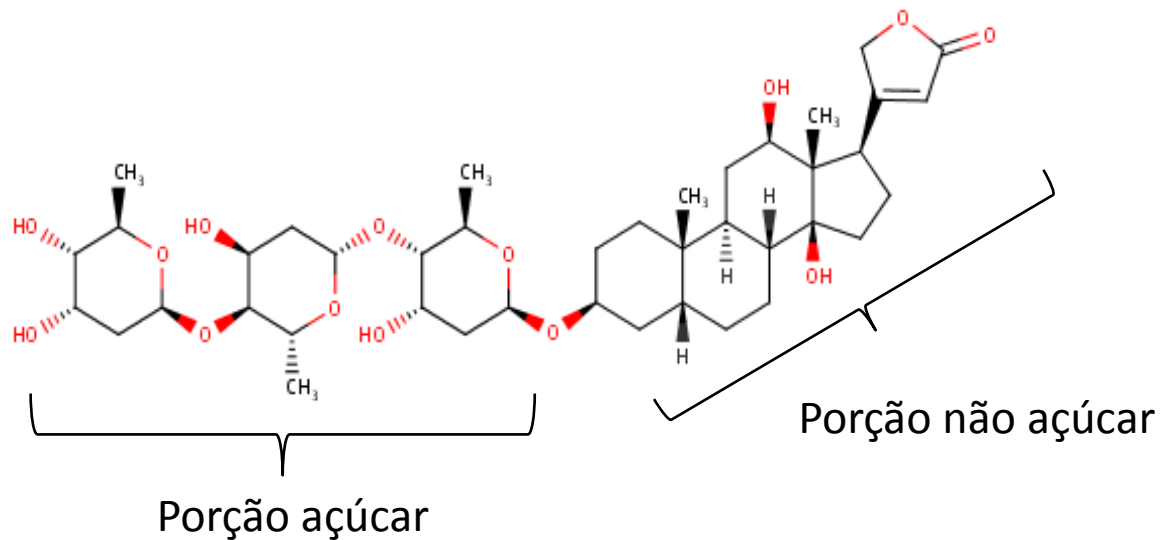
Define-se insuficiência cardíaca como síndrome clínica onde ocorre a modificação funcional ou estrutural do coração que acarreta na incapacidade cardíaca de realizar a ejeção e/ou acomodação do sangue em valores pressóricos fisiológicos. Estima-se que 23 milhões de pessoas são portadoras de insuficiência cardíaca, sendo que 2 milhões de novos casos são diagnosticados no mundo anualmente (BARROS, 2008). A falta de estudos epidemiológicos a respeito da incidência da insuficiência cardíaca no Brasil dificulta o levantamento do número de pacientes que sofrem com esta patologia. De acordo com dados de outros países, estima-se que a incidência desta patologia no Brasil possa ser de até 6,4 milhões de pessoas (GUIMARÃES et al., 2002).

No ano de 2007 o Sistema Único de Saúde (SUS) registrou 111.309.325 internações. As doenças cardiovasculares, com 1.156.136 internações, foram a terceira causa das hospitalizações, sendo a insuficiência cardíaca crônica o tipo mais frequente (BOCCHI et al., 2009).

## **1.2 Glicosídeos cardíacos**

Digitálicos são glicosídeos cardíacos prescritos para o tratamento de doenças cardíacas, sendo a digoxina o mais usado. Os digitálicos são formados por uma porção açúcar (glicona) e uma porção não açúcar (aglicona) composta por um esteroide e uma lactona (Figura 1). A solubilidade em água e as propriedades farmacocinéticas dos digitálicos são influenciadas pela porção glicona da molécula, enquanto a porção aglicona é responsável pela atividade farmacológica (HUNTER et al., 1982; SMITH et al., 1984). Os digitálicos diferem entre si no tamanho da cadeia de açúcar ou no número de grupos hidroxila na porção não açúcar da molécula. A digoxina, por exemplo, possui um grupo hidroxila a mais que a digitoxina e essa pequena alteração é responsável por características farmacocinéticas diferentes (KATZ et al., 2010).

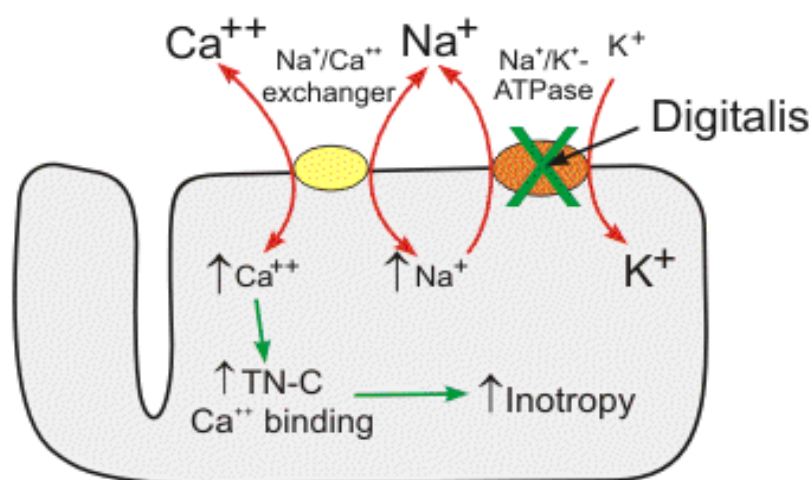
Figura 1 — Estrutura química da digoxina ( $C_{41}H_{64}O_{14}$ ).



Fonte: adaptado de <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00390>

O uso terapêutico dos digitálicos em humanos iniciou com uma publicação de Willian Withering em 1785 (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Os digitálicos foram inicialmente utilizados no tratamento de estados edematosos e insuficiência cardíaca crônica. De acordo com Withering os digitálicos diminuíam a frequência cardíaca, em particular dos pacientes com pulsos irregulares, e aumentava a diurese (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). A partir de 1927 muitos estudos em animais e em humanos demonstraram as propriedades inotrópicas positivas dos digitálicos no miocárdio (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Este efeito inotrópico positivo está relacionado com a capacidade dos digitálicos de inibir a atividade da enzima  $Na^+K^+ATPase$  (GHEORGHIADÉ; PITT, 1997), conhecida como bomba de sódio-potássio, através da ligação da digoxina à subunidade  $\alpha$  desta enzima. A inibição da enzima  $Na^+K^+ATPase$  causa um aumento na concentração de sódio intracelular, estimulando o intercâmbio da bomba de sódio-cálcio, que tem como consequência o aumento da concentração do cálcio intracelular. Este cálcio é utilizado pelas proteínas contráteis e gera um aumento na força de contração do miocárdio (EICHORN; GHEORGHIADÉ, 2002) (Figura 2).

Figura 2 — Esquema da inibição da bomba de sódio/potássio pelos glicosídeos cardíacos.



A ligação dos digitálicos cardíacos à subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio-potássio eleva o nível intracelular de sódio, o que estimula o intercâmbio pela bomba de sódio-cálcio, aumentando a concentração do cálcio intracelular utilizado pelas proteínas contráteis. Isto aumenta a força de contração do miocárdio.

Fonte: <http://www.cvpharmacology.com/cardiostimulatory/digitalis>

Em 1998 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso da digoxina para o tratamento da insuficiência cardíaca e fibrilação atrial, com base nos testes clínicos realizados pela PROVED (*Prospective Randomized Study of Ventricular Function and Efficacy of Digoxin*), RADIANCE (*Randomized Assessment of Digoxin on Inhibitors of the Angiotensin Converting Enzyme*) e DIG (*Digoxin Investigation Group*) (GHEORGHIADÉ et al., 2006). Apesar da aprovação da digoxina, o seu uso em pacientes com insuficiência cardíaca vem diminuindo (GOLDBERGER; ALEXANDER, 2014). Um dos fatores é o desenvolvimento de novos medicamentos como  $\beta$ -bloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), bloqueador de receptor da angiotensina (ARBs, *angiotensin receptor blockers*) e bloqueadores de aldosterona. Os estudos clínicos mostraram que a digoxina, em combinação com as drogas recentes, melhorou o estado clínico e reduziu a hospitalização do paciente, confirmando a sua importância no tratamento da insuficiência cardíaca crônica (GHEORGHIADÉ et al., 2006). A análise conjunta dos testes clínicos RADIANCE e PROVED sugeriu que a associação tripla formada pela digoxina, um inibidor ECA e um diurético diminuiu o risco de agravamento do quadro clínico da insuficiência cardíaca (< 5%) e também se verificou uma significativa redução do custo relacionado com a hospitalização dos pacientes (GHEORGHIADÉ et al., 2006). No ensaio clínico DIG observou-se que os pacientes com insuficiência

cardíaca crônica acima de 65 anos e tratados previamente com inibidores de ECA e diuréticos, ao receber digoxina apresentaram redução de 34% na readmissão hospitalar no intervalo de 30 dias, independente da causa, em comparação aos pacientes que receberam placebo (BOURGE et al., 2013).

A digoxina, por ser uma droga de baixo custo, tem sua importância aumentada em países em desenvolvimento onde os pacientes têm acesso limitado aos medicamentos de última geração. Quando a digoxina é administrada em doses apropriadas é bem tolerada e segura (GHEORGHIADÉ et al., 2006). No Brasil o uso da digoxina é descrito na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) para o tratamento da insuficiência cardíaca (BRASIL, 2015).

### **1.3 Intoxicação digitálica**

A janela terapêutica dos digitálicos é estreita, sendo sua toxicidade a principal reação adversa verificada pelos clínicos (ANDRES, 2000). No ensaio clínico DIG a concentração sérica da digoxina foi considerada terapêutica na faixa entre 0,5 e 2 ng/mL. Entretanto, os guias mais recentes recomendam que a concentração sérica da digoxina deva ser entre 0,5 e 0,9 ng/mL, após análise posterior do DIG e dos resultados de outros ensaios clínicos (AMBROSY et al., 2014). No ensaio clínico PROMISE - PROSPECTIVE RANDOMIZED MILRINONE SURVIVAL EVALUATION foi verificado um aumento de 38% da mortalidade em pacientes com concentração sérica de digoxina superior a 1,1 ng/mL (EICHHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). Foi observada em outro estudo uma redução da mortalidade e da hospitalização em pacientes acima de 65 anos quando a concentração sérica da digoxina era baixa (0,5 a 0,9 ng/mL) (AHMED, 2007). A concentração sérica da digoxina não é determinada somente pela quantidade administrada, mas também em função de interações com outros medicamentos e das condições renais do paciente, visto que a eliminação predominante da digoxina é efetuada por esta via (ANTMAN; SMITH, 1985; EICHHORN; GHEORGHIADÉ, 2002). A maior incidência na intoxicação causada pela digoxina foi verificada em pacientes com a função renal debilitada (SMITH; BUTLER; HABER, 1970).

A incidência de toxicidade da digoxina observada tem sido menor que 1% e no máximo 5% e em mais de 95% dos casos ocorreram em pacientes com concentração sérica de digoxina maior que 2 ng/mL (AMBROSY et al., 2014). Em

2010 foram registrados nos Estados Unidos 2.458 casos de intoxicação por glicosídeos cardiogênicos, sendo 166 casos graves e 32 óbitos (GALVÃO et al., 2013). Espera-se um aumento na exposição aos digitálicos no Brasil, uma vez que os casos de insuficiência cardíaca com a indicação de tratamento farmacológico são crescentes (GALVÃO et al., 2013).

A intoxicação por digitálicos pode ser fatal, principalmente em pacientes com disfunção cardíaca grave, pela ingestão acidental de alta dose de digitálicos ou pela intenção de suicídio. Os efeitos causados pela intoxicação são hipercalemia, bloqueio atrioventricular e taquiarritmia ventricular maligna (ANTMAN et al, 1990). O tratamento de primeira linha recomendado atualmente nas intoxicações graves por digitálicos é a utilização de anticorpos policlonais anti-digoxina na forma de fragmentos Fab (*fragment antigen binding*). Infelizmente este tratamento é indicado somente quando outras opções de tratamento falham, devido ao seu alto custo (FLANAGAN; JONES, 2004).

Para o tratamento da intoxicação por digoxina, há tempos buscou-se desenvolver um antídoto, na forma de anticorpos neutralizantes. Por possuir apenas 780,92 Daltons, a digoxina não é antigênica, sendo necessária a ligação covalente a um carreador proteico para a produção de anticorpos específicos anti-digoxina. Em 1967, a digoxina foi conjugada com albumina sérica bovina, para a obtenção de anticorpos específicos em coelhos (BUTLER; CHEN, 1967). Para a produção comercial dos anticorpos anti-digoxina, os autores imunizaram ovelhas, obtendo anticorpos policlonais com alta afinidade e especificidade, que foram purificados e clivados pela enzima papaína, para gerar os fragmentos Fab (PROTHERICS, 2001).

O uso de fragmentos Fab anti-digoxina como tratamento da intoxicação causada pela digoxina foi reportado inicialmente em 1976 (ANTMAN et al., 1990). Estes fragmentos Fab quando administrados por via intravenosa em pacientes com intoxicação digitálica, ligam-se tanto aos glicosídeos circulantes livres como também removem os glicosídeos ligados à bomba de sódio e potássio. Isso ocorre porque a afinidade dos fragmentos Fab anti-digoxina à digoxina é superior à afinidade de ligação entre o receptor endógeno (subunidade  $\alpha$  da bomba de sódio e potássio) e a digoxina, formando complexos estáveis antígeno-Fab. Tanto estes complexos quanto os fragmentos Fab livres são excretados de forma relativamente rápida pela urina, resultando em uma rápida reversão da toxicidade, sendo portanto um produto adequado para o tratamento da intoxicação ocasionada pelo excesso de digitálicos.



Não obstante, o processo de excreção é menos eficiente em pacientes com função renal comprometida (CHAN; BUCKLEY, 2014; FLANAGAN; JONES, 2004).

#### **1.4 Cenário econômico para o fragmento Fab anti-digoxina**

Nos EUA até o ano de 2011 existiam dois produtores comerciais do fragmento Fab policlonal anti-digoxina gerado em ovelha, o Digibind<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline, Parma, Itália) e o DigiFab<sup>®</sup> (BTG, Londres, Inglaterra) com preços similares (Digibind<sup>®</sup> US\$ 797,00 por frasco contendo 38 mg e DigiFab<sup>®</sup> US\$ 786,00 por frasco contendo 40 mg). Entretanto, a GlaxoSmithKline descontinuou a venda do seu produto em 2011. A BTG com a obtenção do monopólio da comercialização do fragmento Fab policlonal anti-digoxina, neste mesmo ano, elevou o preço do DigiFab<sup>®</sup> em 15% (US\$ 903 por frasco contendo 40 mg). Diante deste cenário a falta de concorrência permitiu que a BTG continuasse a elevar o preço do seu produto. Em março de 2014 o produto atingiu o valor de US\$ 2.370,00 o frasco com 40 mg (JOHNSON et al, 2015). Para a reversão de casos agudos de intoxicação o fabricante recomenda a utilização de até 20 frascos do antídoto, correspondendo a US\$ 47.400,00. A utilização de um número maior de frascos pode ser necessária, dependendo da quantidade de digoxina consumida (BTG, 2012).

Para a utilização dos fragmentos Fab anti-digoxina no Brasil é necessária a importação, que é autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária conforme resolução RDC n° 28, de 09 de maio de 2008 atualizada pela RDC n.º 8, de 28 de fevereiro de 2014, destinado exclusivamente para uso hospitalar ou sob prescrição médica, sendo sua importação vinculada a uma entidade hospitalar ou entidade civil representativa. A importação para fins comerciais é proibida (BRASIL, 2008; BRASIL, 2014).

O futuro no uso dos fragmentos Fab anti-digoxina não está limitado a casos de intoxicação por digitálicos, uma vez que estes fragmentos têm capacidade de neutralizar moléculas endógenas denominadas esteroides cardiotônicos, ou *digitalis like* através da reação cruzada. Estas moléculas endógenas possuem efeitos semelhantes aos glicosídeos cardíacos, inibindo a bomba de sódio-potássio e aumentando a pressão arterial. Verificou-se um aumento dos níveis circulantes destas moléculas em grávidas com hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia. Apesar da pré-eclâmpsia ocorrer em apenas 3 a 5% do total de grávidas, trata-se de uma

complicação grave, podendo causar mortalidade materna e fetal (BAGROV et al., 2009; ZAZERSKAYA et al., 2013). Em 2012 a empresa Glenveigh Medical, que possui a licença intelectual do fragmento Fab anti-digoxina – DigiFab<sup>®</sup>, recebeu do FDA a designação de “*Fast track*” o que possibilita a redução no tempo para a aprovação do uso deste medicamento para o tratamento da pré-eclâmpsia (REUTERS, 2012).

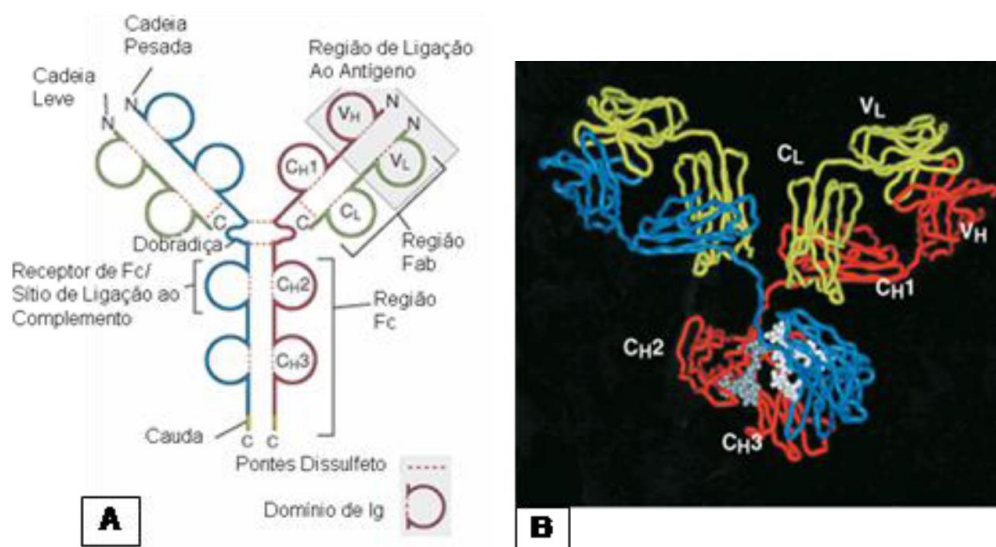
## 1.5 Anticorpos

Anticorpos ou imunoglobulinas são glicoproteínas estruturalmente semelhantes produzidas pelos linfócitos B, que possuem como principais funções: ligar-se especificamente a antígenos e recrutar células e/ou moléculas capazes de eliminar o patógeno ao qual foi apresentado. O anticorpo possui sequência única, permitindo a ligação a um epítipo específico presente no antígeno. Estruturalmente eles possuem as mesmas características básicas, mas apresentam elevada variabilidade na região de ligação aos antígenos.

Os anticorpos são representados em classes determinadas pelo tipo de cadeia pesada presente, podendo ser divididos em IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A classe mais frequente em humanos é a IgG, subdividido em várias subclasses (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4). Existem 2 classes de cadeias leves: *lambda* ( $\lambda$ ) e *kappa* ( $\kappa$ ). Uma molécula de anticorpo apresenta 2 cadeias leves idênticas  $\kappa$  ou  $\lambda$ , não sendo possível a coexistência dos 2 tipos a uma mesma molécula de anticorpo. Em seres humanos, 60% dos anticorpos apresentam cadeia leve do tipo  $\kappa$  e cerca de 40%, cadeias leves  $\lambda$ . Em camundongos os anticorpos contendo cadeia  $\kappa$  são cerca de 10 vezes mais abundantes do que os portadores da cadeia leve  $\lambda$  (ABBAS, 2011).

O peso molecular do anticorpo da classe IgG é de aproximadamente 150 kDa, com variações conforme o isotipo. São formados por cadeias polipeptídicas leves (LC, *light chain*) idênticas com peso aproximado de 25 kDa e duas cadeias pesadas (HC, *heavy chain*) idênticas de 50 kDa. Ambas possuem uma região aminoterminal variável ( $V_H$ , *Variable Heavy* e  $V_L$ , *Variable Light*) de reconhecimento e ligação ao antígeno e regiões carboxiterminais constantes ( $C_H$ , *Constant Heavy* e  $C_L$ , *Constant Light*) (Figura 3).

Figura 3 — Estrutura da imunoglobulina da classe IgG.



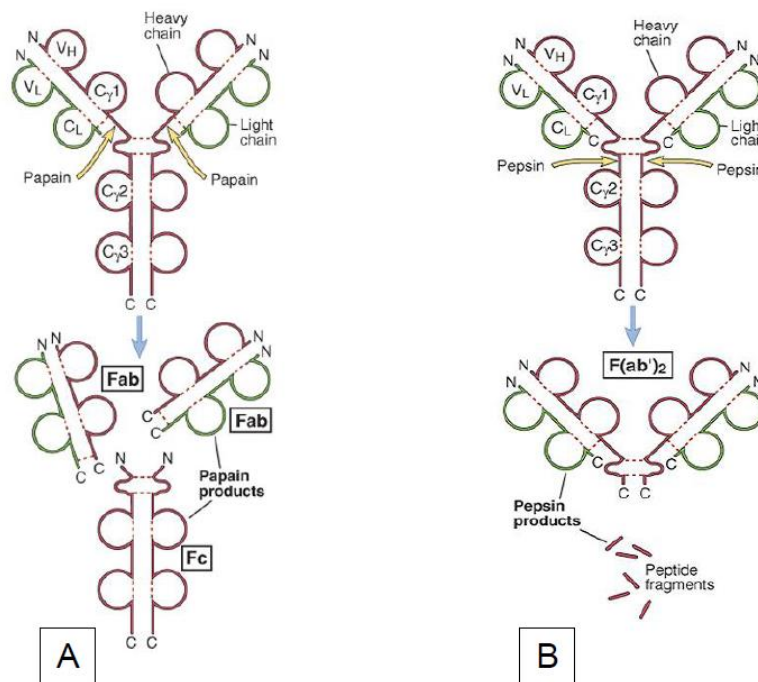
A) diagrama esquemático de uma IgG secretada; B) cristalografia de raios X, cadeias pesadas em azul e vermelho, cadeias leves em verde; os carboidratos em cinza.  
FONTE: ABBAS et al., 2011.

As 2 cadeias pesadas de cada molécula de anticorpo são ligadas covalentemente por pontes de dissulfeto. As cadeias leves e pesadas são também unidas por pontes de dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína na região carboxiterminal da cadeia leve e o domínio C<sub>H1</sub> da cadeia pesada. Ambas as cadeias possuem unidades de estrutura semelhante, com cerca de 110 aminoácidos, que se dobram de maneira independente em um formato globular, nomeado de domínio da imunoglobulina. As cadeias leves possuem 2 domínios (V<sub>L</sub> e C<sub>L</sub>) enquanto as cadeias pesadas contêm 4 (V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> e C<sub>H3</sub>) para as imunoglobulinas G (ABBAS, 2011).

As regiões variáveis pesadas e leves possuem 3 regiões hipervariáveis, também conhecidas como regiões determinantes de complementariedade (CDRs, *complementarity determining regions*), nomeadas a partir da porção aminoterminal de CDR1, CDR2 e CDR3, sendo o CDR3 a mais variável. Entre estas regiões estão presentes sequências mais conservadas chamadas de arcabouço ou *framework regions*. A ligação do anticorpo ao alvo ocorre pelas regiões de CDR das cadeias leve e pesada. As cadeias pesadas também determinam as funções efetoras dos anticorpos, pela interação da região carboxiterminal com receptores presentes na superfície de alguns tipos celulares.

Em 1972, Rodney Porter tratou imunoglobulinas G de coelhos com enzimas proteolíticas, resultando na clivagem da mesma em fragmentos com estrutura e funções diferentes. Quando utilizada a enzima papaína, originaram-se três fragmentos. O fragmento formado pelos domínios C<sub>H2</sub> e C<sub>H3</sub> da molécula de IgG, ligados entre si por pontes dissulfeto, era capaz de se auto-associar e cristalizar, por isso denominado Fc (*Fragment cristalizável*). Dois fragmentos idênticos formados pela cadeia leve completa (V<sub>L</sub> e C<sub>L</sub>) associada a um fragmento V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub> da cadeia pesada, foram chamados de Fab (*Fragment antígeno binding*) e apresentaram como características a manutenção da capacidade de ligação ao antígeno por conterem os domínios V<sub>L</sub> e V<sub>H</sub> pareados (Figura 4A). Porter realizou o mesmo experimento, com a substituição da papaína pela pepsina, resultando em apenas um fragmento denominado F(ab')<sub>2</sub>, o qual continha a região de ligação ao antígeno e pontes dissulfeto intercaladas e intactas, sendo o restante da molécula degradada (Figura 4B) (ABBAS, 2011). Entre outras características, os fragmentos Fab são menos imunogênicos do que a IgG inteira, possuem melhor difusão no espaço intersticial e são facilmente eliminados por filtração glomerular (FLANAGAN; JONES, 2004).

Figura 4 — Resultados da digestão enzimática de anticorpos.



A) Fragmentos de uma molécula de IgG submetida ao tratamento com papaína, resultando em dois fragmentos Fab (V<sub>L</sub>, C<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> e C<sub>H1</sub>) e um fragmento Fc (C<sub>H2</sub> e C<sub>H3</sub>). B) Tratamento com pepsina resultando em um fragmento F(ab')<sub>2</sub>.

FONTE: ABBAS et al., 2011.

Em 1975 Milstein e Köhler desenvolveram a metodologia para obtenção de anticorpos monoclonais (AcMos), sendo laureados pelo prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1984. Esta técnica se baseia na imunização de animais com o antígeno de interesse seguido do isolamento das células B do baço ou linfonodos do animal e a fusão destas células às células de mielomas, originando híbridos produtores de AcMo (KÖHLER; MILSTEIN, 1975).

O primeiro AcMo aprovado pelo FDA para uso terapêutico em humanos foi o anticorpo murino Muromab-CD3 (Orthoclone-OKT3, Johnson & Johnson) com aplicação na prevenção e controle da rejeição aguda a transplantes. O sucesso obtido pelo OKT3 estimulou o desenvolvimento de outros AcMos para tratamento ou diagnóstico de doenças humanas, obtidos pelas técnicas de humanização dos AcMos murinos através da engenharia de anticorpos (MORO; RODRIGUES, 2001). Uma das ferramentas disponíveis para a seleção dos AcMos recombinantes e fragmentos de anticorpos é a técnica de *phage display*.

## **1.6 *Phage display***

A tecnologia de *phage display* foi descrita por George Smith em 1985 como um método de apresentação de polipeptídios exógenos em fusão com uma proteína da superfície do bacteriófago (fago), correlacionando o genótipo e o fenótipo dos fagos (SMITH, 1985). Neste trabalho a construção da biblioteca de polipeptídeos permitiu a apresentação dos mesmos pelos fagos e a seleção de ligantes específicos para um determinado anticorpo (SMITH, 1985). Desde então a tecnologia de *phage display* tem sido bastante utilizada em estudos que envolvem peptídeos e proteínas tanto na área acadêmica como em diagnóstico e na terapêutica. A técnica pode ser utilizada nos estudos de interação proteína-ligante, análise dos sítios de ligação do receptor e para aumentar ou alterar a afinidade das proteínas pelos seus ligantes. Além disso, esta tecnologia pode ser aplicada na obtenção de AcMos e para aumentar a afinidade entre o anticorpo e seu antígeno (BAZAN, 2012). Em relação à obtenção de AcMos, inicia-se pela construção de bibliotecas de genes de fragmentos de anticorpos no formato Fab ou scFv, provenientes de diversas fontes, animal ou humana (após imunização ou não), hibridoma, entre outras. Antes de selecionar os clones que expressam um anticorpo específico, a biblioteca pode ser enriquecida com clones que apresentam afinidade

ao antígeno através de algumas rodadas de *panning*. Este processo é composto das seguintes etapas: amplificação da biblioteca, ligação dos fragmentos expressos pelo fago ao antígeno imobilizado numa superfície, eluição dos fagos que se ligaram ao antígeno e amplificação da nova biblioteca para uma nova rodada de enriquecimento (WINTER et al., 1994).

## 1.7 Purificação

Para o uso clínico de biomoléculas é imprescindível à obtenção de alto grau de pureza, fazendo-se necessário a utilização de variadas técnicas de purificação para alcançar o nível exigido.

A purificação de biomoléculas pode ser realizada por diversas técnicas, tais como precipitação, centrifugação, eletroforese, cromatografia líquida dentre outros. O fator determinante para o uso de uma técnica ou outra, ou até mesmo o conjunto de técnicas, recai no tipo de aplicação da molécula de interesse, por exemplo, proteínas com fins terapêuticos requerem elevado grau de pureza, assim como algumas finalidades acadêmicas como estudos de cristalização.

As características físico-químicas das moléculas biológicas, como afinidade biológica, carga elétrica, tamanho molecular, hidrofobicidade podem ser exploradas nos processos cromatográficos. Atualmente está disponível comercialmente uma vasta gama de resinas cromatográficas com diferentes metodologias para a separação dos contaminantes. Os métodos cromatográficos com maior utilização são: cromatografia de afinidade, troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica (Tabela 1) (SILVA, 2004).

Tabela 1 — Técnicas Cromatográficas e seus princípios.

<b>Técnica</b>	<b>Princípio</b>
Afinidade	Ligação específica
Troca iônica	Carga elétrica
Exclusão molecular	Tamanho
Interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
Fase reversa	Hidrofobicidade

### 1.7.1 Métodos cromatográficos

A cromatografia de afinidade baseia-se na interação específica e reversível entre uma proteína a ser purificada e um ligante, acoplado a uma matriz (ROY;

GUPTA, 2003). Esta metodologia permite a obtenção de proteínas com elevado grau de pureza em apenas uma etapa cromatográfica (HERMANS; ADAMS; DETMERS, 2014).

A cromatografia de troca iônica permite a separação de proteínas explorando as diferenças entre as cargas superficiais líquidas das proteínas. A carga superficial da proteína, que pode variar em função do pH da solução onde se encontra, interage com a carga oposta presente no meio cromatográfico (KARLSSON; RYDEN; BREWER, 1998). Quando uma proteína está presente em um ambiente com pH acima do seu ponto isoelétrico (pI) ela estará carregada negativamente permitindo a sua interação com resinas de troca aniônica, enquanto que, quando presente em um ambiente com pH inferior ao seu pI, estará carregada positivamente, possibilitando o uso de resinas com troca catiônica para a separação.

O processo cromatográfico de exclusão molecular ou também chamado de gel filtração explora o tamanho molecular para proceder à separação. Para tanto, a substância a ser purificada é aplicada à matriz cromatográfica, a qual é composta por grânulos (“beads”) com poros de tamanhos diferentes; as substâncias que possuem maior tamanho molecular são eluídas antes da coluna cromatográfica por não penetrarem nos poros, e as substâncias de tamanhos menores penetram nos poros presentes nos grânulos retardando a sua eluição.

As características de hidrofobicidade das moléculas são exploradas pela cromatografia de interação hidrofóbica, a qual se baseia na interação entre os ligantes hidrofóbicos (presentes no meio cromatográfico) e os resíduos hidrofóbicos na superfície das proteínas (ERIKSSON, 1998). Em ambientes com elevadas concentrações salinas as proteínas expõem seus grupamentos hidrofóbicos, conferindo maior adsorção com o meio cromatográfico, para a reversão da interação obtida nesta estratégia, é realizada a redução da concentração de sal (força iônica), podendo chegar à total ausência de sal (passagem de água) (GHOSE et al., 2009). Usualmente, esta metodologia é realizada como um passo de purificação posterior aos métodos que resultam na eluição em grandes concentrações de sais, como exemplo, precipitação por sulfato de amônio ou eluatos contendo altas concentrações de sais oriundos de cromatografias de troca iônica. Uma variante desta metodologia que também tem por princípio a interação hidrofóbica é a cromatografia de fase reversa que possui um meio cromatográfico com alta hidrofobicidade promovendo uma forte interação entre a resina cromatografia e a

molécula, sendo necessário o uso de solventes orgânicos para a reversão desta interação. Os solventes orgânicos representam condições drásticas que podem alterar a conformação das proteínas (WHEELWRIGHT, 1991).

### **1.7.2 Purificação de anticorpos monoclonais**

Com o isolamento e a caracterização de proteínas bacterianas capazes de interagir com as imunoglobulinas, foi possível a utilização destas proteínas para o isolamento de anticorpos. A proteína A oriunda dos *Staphylococcus aureus* e a proteína G obtida dos *Streptococcus grupos C e G* são as de maior aplicação para o isolamento das imunoglobulinas da classe G, estas duas proteínas ligam-se predominantemente na porção Fc das imunoglobulinas (NILSON et al., 1993).

O processo de purificação de AcMos terapêuticos é tradicionalmente realizado pelo uso de colunas cromatográficas intercalado com o uso de etapas de concentração e troca de tampão (diafiltração) (CHON; ZARBIS-PAPASTOITSIS, 2011). Tipicamente, a purificação de AcMos é composta pela etapa de clarificação do sobrenadante da cultura celular, seguido pelas etapas cromatográficas de:

- Afinidade em resina de proteína A ou G – captura dos anticorpos e redução do volume;
- Catiônica - remoção de resíduos de proteína A, proteínas da célula hospedeira e DNA;
- Aniônica - remoção de vírus, proteínas da célula hospedeira, endotoxinas e DNA;

Também são realizadas etapas de inativação viral que podem ser efetuadas com a exposição dos AcMos a condições de pH ácido, seguida de neutralização (pH *shifting*), geralmente realizada durante a cromatografia por afinidade em proteína A, visto o uso de tampões com pH ácido para a remoção do material adsorvido na coluna cromatográfica. Outros métodos utilizados para a inativação viral incluem tratamentos com detergentes/solventes ou filtração (MARQUES; ROUSH; GÖKLEN, 2009).

### **1.7.3 Purificação de fragmentos Fab de anticorpos**

As resinas de afinidade proteína A e G, além de serem vastamente utilizadas para a purificação de anticorpos, também podem ser utilizadas para a purificação de



fragmentos Fab, apesar da diminuída atividade de interação que possuem com os fragmentos Fab. A proteína A é restrita à porção V<sub>H</sub>III, e a especificidade da proteína G é dirigida ao C<sub>H</sub>1 da imunoglobulina. Outra proteína obtida de bactérias que possui interação com os fragmentos de anticorpos é a proteína L, obtida da espécie bacteriana *Peptostreptococcus magnus*, com especificidade para a região variável da cadeia leve das imunoglobulinas, sem interferência no sítio de ligação ao antígeno (NILSON, 1993; RODRIGO; GRUVEGARD; ALSTINE, 2015).

Na purificação de fragmentos Fab de anticorpos existem alguns aspectos que devem ser levados em conta, como a forma de obtenção do fragmento (digestão dos anticorpos inteiros por papaína ou obtidos pelo uso de técnicas de engenharia genética), a espécie de origem (humano, murino, etc.) e a existência ou não de caudas ou marcadores que facilitariam o isolamento com a utilização de resinas de afinidade, como por exemplo, a purificação de proteínas contendo cauda de histidina com o uso de resinas de afinidade por metal.

A purificação dos fragmentos de anticorpos também pode ser realizada com a utilização de resinas de troca catiônica, as quais em situações bem estabelecidas, permitem a obtenção de níveis dinâmicos de ligação dos fragmentos de anticorpos superiores a 100 g/L (RODRIGO; GRUVEGARD; ALSTINE, 2015).

## **1.8 Obtenção dos fragmentos Fab monoclonal anti-digoxina**

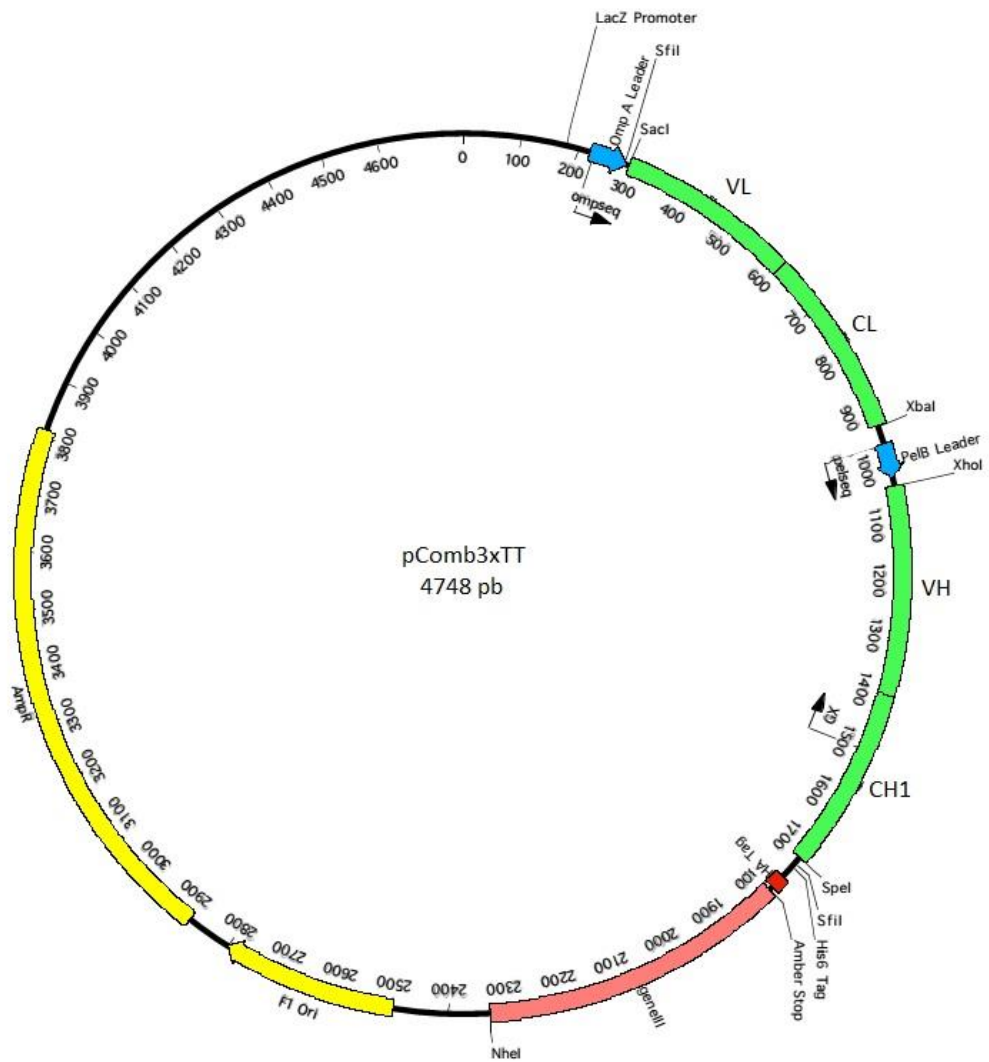
A tecnologia de *phage display* foi utilizada em um trabalho anterior do nosso laboratório para a seleção de clones do fragmento Fab anti-digoxina, expressos em *Escherichia coli* (*E. coli*). Para a obtenção desses clones, partiu-se da extração do RNA total do hibridoma anti-digoxina. Os genes da cadeia leve e pesada dos fragmentos Fab foram amplificados com oligonucleotídeos específicos após síntese de cDNAs e clonados sequencialmente em vetor fagomídeo para a construção da biblioteca combinatória anti-digoxina. Em seguida, a biblioteca foi enriquecida por rodadas de *panning* através da ligação do fragmento Fab expresso pelo fago à digoxina conjugada com BSA (Dig-BSA). Após o enriquecimento, 10 clones foram selecionados aleatoriamente e a presença dos insertos da cadeia leve e pesada nos clones foi avaliada. Dos clones analisados, 6 apresentaram os 2 insertos e tiveram os genes das 2 cadeias sequenciados. Os clones sequenciados apresentaram seqüências de aminoácidos idênticas para a cadeia pesada. Quatro clones

apresentaram diferenças na sequência de aminoácidos na região do *framework* 1 da cadeia leve. O clone 9 apresentou um resíduo de aminoácido diferente no CDR2 da cadeia leve em relação aos outros clones. O fragmento Fab solúvel dos 4 clones foi expresso em *E. coli* e o anticorpo presente no lisado bacteriano foi quantificado e avaliado em relação à afinidade ao antígeno (MURATA, 2012; MURATA et al., 2013).

O vetor fagomídeo pComb3XTT (BARBAS et al., 2001) (Figura 5), utilizado para clonagem dos fragmentos Fab, foi obtido do Instituto Scripps (*The Scripps Research Institute*, EUA). Este vetor pertence à família pComb3X (*Genbank* AF268281) e é composto pelos genes da cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC) do fragmento Fab humano para a toxina tetânica “TT”, por um promotor *lacZ*, pela origem de replicação *F1 Ori*, resistência à ampicilina *ampR*, cauda de seis histidinas (His6) e de 10 hemaglutininas (HA) que facilitam a detecção e purificação do fragmento Fab. As cadeias polipeptídicas são direcionadas para o espaço periplasmático pela existência de dois peptídeos sinais, *ompA* (*outer membrane protein*) para LC e (*pelB*) *pectate lyase B* para HC. Possui também um códon de terminação âmbar (TAG), que com o uso de linhagens bacterianas não supressoras permite a expressão da proteína solúvel sem a proteína p3. A existência dos sítios de restrição *SpeI* e *NheI* possibilita a remoção do gene da proteína p3, através da digestão pelas respectivas enzimas de restrição e religação do vetor, permitindo a expressão da proteína solúvel com o uso de bactérias supressoras. Neste trabalho optou-se pelo uso de bactérias supressoras, com a remoção do gene da proteína p3. Como consequência da estratégia usada para a expressão dos fragmentos Fab, perdeu-se a região contendo a cauda de histidinas.

No presente trabalho os fragmentos Fab anti-digoxina dos 4 clones anteriormente selecionados foram expressos em cultivos bacterianos para estabelecer o método de purificação dos fragmentos Fab e proceder à sua caracterização. A presença do anticorpo foi verificada tanto no lisado bacteriano como no sobrenadante do cultivo, sendo observada maior quantidade de fragmento Fab no sobrenadante. Foram testadas várias estratégias de purificação como a utilização de resinas de afinidade, de troca catiônica e aniônica, para a obtenção de fragmentos Fab anti-digoxina purificados.

Figura 5 — Vetor fagomídeo pComb3XTT.



Os genes das cadeias LC e HC do fragmento humano para a toxina tetânica “TT”, foram clonados nos sítios de restrição SacI - XbaI e XhoI – SpeI, respectivamente.  
FONTE: [http://www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb\\_images/pcomb\\_image\\_files/pComb\\_Maps/pComb3X\\_Maps.pdf](http://www.scripps.edu/mb/barbas/content/pcomb_images/pcomb_image_files/pComb_Maps/pComb3X_Maps.pdf), adaptado.

## 2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os experimentos de purificação e caracterização realizados com os fragmentos Fab dos 4 clones selecionados permitem a escolha do clone mais adequado para otimizar o processo *upstream*, visando escalonamento do produto.

A estratégia de purificação utilizada traz vantagens como a aplicação direta do sobrenadante do cultivo bacteriano sem a necessidade de diafiltração e a aplicação direta do eluato da troca iônica na resina de afinidade, que proporciona concentração do produto no eluato. O conjunto de procedimentos *downstream* realizado proporciona fácil escalonamento.

A existência de especificidade entre os fragmentos Fab produzidos e a digoxigenina (metabólito ativo da digoxina) permite a utilização também no mercado da pesquisa e diagnóstico, visto que o uso da digoxigenina como marcador para detecção de ácidos nucleicos e proteínas vem aumentando fortemente nos últimos anos. Este aumento deve-se à necessidade de evitar o uso de sistemas de detecção por radioatividade, tanto em pesquisa quanto em laboratórios clínicos. A utilização deste método com digoxigenina possui diversas vantagens, destacando o curto tempo de desenvolvimento do ensaio, alta resolução histológica e alta sensibilidade de detecção. A sonda de digoxigenina marcada tem menor custo do que as sondas marcadas com radioisótopos, que necessitam de instalações especiais, além do acúmulo de lixo radioativo e o risco causado pela radiação. Este método de detecção de ácidos nucleicos utiliza anticorpos com alta afinidade pela digoxigenina, conjugados ou não, para a identificação por quimioluminescência ou colorimetria (HART, BASU, 2009; McCREERY, 1997), podendo ser uma segunda aplicação do produto obtido no presente projeto.

As vantagens obtidas pelo produto gerado por engenharia genética em relação ao fragmento Fab anti-digoxina comercial são: ser um produto monoclonal, portanto, possível de ser produzido com homogeneidade, e não utilizar animais para a produção, contribuindo para evitar a contaminação por agentes infectantes de origem animal.

Os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados, porém, para tornar viável a produção em maior escala dos fragmentos Fab obtidos, é necessária a realização de ensaios de otimização do nível de expressão do fragmento Fab anti-

digoxina na cultura bacteriana, como: a avaliação de diferentes vetores e linhagens bacterianas; otimização das condições de expressão, pelo ajuste nas concentrações de IPTG, temperatura e tempo de indução; utilização de biorreatores, permitindo o controle do pH e o aumento da aeração.

O conjunto de resultados obtidos indica a possibilidade de desenvolvimento de um fragmento Fab monoclonal, obtido por fermentação bacteriana, como antídoto para a toxicidade da digoxina, seja no controle da medicação utilizada na cardiologia como em outros acidentes causados por ingestão, deliberada ou não, de plantas contendo digitálicos.

## REFERÊNCIAS\*

- ABBAS, A. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 592 p.
- AHMED, A. Digoxin and reduction in mortality and hospitalization in geriatric heart failure: importance of low doses and low serum concentrations. **Journal of Gerontology: Medical Sciences**, v. 62<sup>a</sup>, p. 323-329, 2007.
- AMBROSY, A. P. et al. The use of digoxin in patients with worsening chronic heart failure: reconsidering an old drug to reduce hospital admissions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, p. 1823-1832, 2014.
- ANDRÉS, V. L. G. Revisión sistemática sobre la efectividad e indicaciones de los anticuerpos antidigoxina en la intoxicación digitalica. **Revista Española de Cardiología**, v. 53, p. 49-58, 2000.
- ANDREW, S. M.; TITUS, J. A. Purification of immunoglobulin G. **Current protocols in cell biology**, p. 16.3.1-16.3.12, 2000.
- ANTMAN, E. M. et al. 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.
- ANTMAN, E. M.; SMITH, T. W. Digitalis toxicity. **Annual Review of Medicine**, v. 36, p. 357-367, 1985.
- BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology and novel therapeutic targets. **Pharmacology Reviews**, v. 61, n. 9, p. 9-38, 2009.
- BARBAS, C. F. et al. **Phage display: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BARROS, I. C. M. **Monitorização terapêutica das concentrações plasmáticas da digoxina em pacientes com insuficiência cardíaca**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, 2008.
- BAZAN, J.; CALKOSINSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display – A powerful technique for immunotherapy. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1817-1828, 2012.

\*De acordo com:

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

BOCCHI, E. A. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, p. 1-71, 2009. Supl. 1.

BOURGE, R. C. et al. Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in older patients with chronic systolic heart failure. **The American Journal of Medicine**, v. 126, p. 701-708, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n.º 8, de 28 de fevereiro de 2014**. Brasil, 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba66ce00433dbaa5a974ab9a53009513/RDC\\_7\\_2014+\(suspens%C3%A3o\\_arq\\_temp\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ba66ce00433dbaa5a974ab9a53009513/RDC_7_2014+(suspens%C3%A3o_arq_temp).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 18 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n.º 28, de 09 de maio de 2008**. Brasil, 2008. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0028\\_09\\_05\\_2008.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0028_09_05_2008.html)>. Acesso em: 18 dez. 2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME**. Brasil, 2015. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao\\_nacional\\_medicamentos\\_essenciais\\_rename\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_essenciais_rename_2014.pdf)>. Acesso em: 18 dez. 2015.

BTG. **DigiFab® Technical Leaflet**, London, 2012

BUTLER, V. P. JR; CHEN, J. P. Digoxin-specific antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 57, p. 71-78, 1967.

CANZIANI, G. A.; KLAKAMP, S.; MYSZKA, D. G. Kinect screening of antibodies from crude hybridoma sample using Biacore. **Analytical Biochemistry**, v. 325, p. 301-307, 2004.

CHAN, B. S.; BUCKLEY, N. A. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 52, n. 8, p. 824-836, 2014.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 625-635, 2004.

EICHHORN, E. J.; GHEORGHIADÉ, M. Digoxin. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 44, n. 4, p. 251-266, 2002.

ERIKSSON, K.-O. Hydrophobic interaction chromatography. In: JANSON, J.-C.; RYDEN, L. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 283-309.

FLANAGAN, R. J.; JONES A. L. Fab antibody fragments. **Drug Safety**, v. 27, n. 14, p. 1115-1133, 2004.

GALVÃO, T. F. et al. Antídotos e medicamentos utilizados para tratar intoxicações no Brasil: necessidades, disponibilidade e oportunidades. **Caderno de Saúde Pública**, v. 29, S167-S177, 2013. Sup.

GHEORGHIADÉ, M. et al. Contemporary use of digoxin in the management of cardiovascular disorders. **Circulation**, v. 113, p. 2556-2564, 2006.

GHEORGHIADÉ, M.; PITT B. Digitalis Investigation Group (DIG) trial: a stimulus for further research. **American Heart Journal**, v. 134, p. 3-12, 1997.

GHOSE, S. et al. Integrated polishing steps for monoclonal antibody purification. In: GOTTSCHALK, U. (Ed.) **Process scale purification of antibodies**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. p. 145-167.

GIL, D.; SCRUM, A. Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 73-84, 2013.

GOLDBERGER, Z. D.; ALEXANDER, G. C. Digitalis use in contemporary clinical practice: refitting the foxglove. **JAMA Internal Medicine**, v. 174, n. 1, p. 151-154, 2014.

GUIMARÃES, J. I. et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 79, n. 4, p. 1-30, 2002.

HAHNEFELD, C.; DREWIANKA, S.; HERBERG, F. W.; DECKER, J (Ed); REISCHL, E(Ed), Determination of kinetic data using surface resonance biosensors. **Molecular Diagnosis of infectious Diseases**, v. 94 2 ed, p. 299-320, 2004.

HART, S. M.; BASU, C. Optimization of a Digoxigenin-based Immunoassay System for Gene Detection in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of biomolecular techniques**, v. 20, p. 96-100, 2009.

HERMANS, P; ADMAS, H; DETMERS, F. Purification of antibodies and antibody fragments using CaptureSelect™ affinity resins. In: OSSIPOV, V.; FISCHER, N. (Ed.). **Monoclonal antibodies methods and protocols**. 2nd ed. New York: Humana Press, 2014. p. 297-314.

JALALIRAD, R. Efficient chromatographic processes for elevated purification of antibody fragment (Fab D1.3) from crude *Escherichia coli* culture. **Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 74-80, 2013.



JOHNSON, A. R.; CROUCH, B.; ZANE HOROWITZ, B. Discrepancies in reported US pricing information for digoxin-Fab. **Clinical Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 71, 2015.

KARLSSON, E.; RYDEN, L.; BREWER, J. Ion-Exchange Chromatography. In: JANSON, J.-C.; RYDEN, L. (Ed.). **Protein purification: principles, high resolution methods, and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 145-205.

KATZ, A. et al. Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na, K-ATPase. **Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19582-19592, 2010.

KOHLER, G.; MILSTEIN, G. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 7, n. 256, p. 495-497, 1975.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 3, p. 457-470, 2014.

MARQUES, B. F.; ROUSH, D. J.; GÖKLEN, K. E. Virus filtration of high-concentration monoclonal antibody solutions. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 483-491, 2009.

McCREERY, T. Digoxigenin labeling. **Molecular Biotechnology**, v. 7, p. 121-124, 1997.

MORO, A. M.; RODRIGUES, M. T. A. Anticorpos monoclonais para a clínica. **Biociência Ciência & Desenvolvimento**, v. 4, n. 22, p. 32-35, 2001.

MURATA, V. M. et al. Anti-Digoxin Fab variants generated by Phage Display. **Molecular Biotechnology**, v. 54, p. 269-277, 2013

MURATA, V. M. **Produção e caracterização da porção Fab do anticorpo anti-digoxina utilizando a tecnologia de *phage display***. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2012.

PERCHIACCA, J. M.; TESSIER, P. M. Engineering aggregation-resistant antibodies. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, p. 263-286, 2012.

PROTHERICS. **DigiFab™ Digoxin Immune Fab (Ovine) Clinical Product Monograph**. Brentwood, 2001.

PULLEN, M. A. et al. Comparison of non-digitalis binding properties of digoxin-specific Fabs using direct binding methods. **Journal of Immunological Methods**, v. 336, n. 1, p. 235-241, 2008.

REUTERS. Glenveigh medical receives FDA fast track designation for development of preeclampsia drug. 2012. Disponível em: <<http://www.reuters.com/article/idUS193020+12-Nov-2012+BW20121112>>. Acesso em: 15 set. 2014.

ROUET, R. et al. Expression of high-affinity human antibody fragments in bacteria. **Nature Protocols**, v. 7, n. 2, p. 364-373, 2012.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Selectivity in affinity chromatography. In: HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. (Ed.). **Isolation and purification of proteins**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 57-94.

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 442-453, 2004.

SHUKLA, A. A. et al. Strategies to address aggregation during protein A chromatography. **BioProcess International**, v. 3, n. 5, p. 36-45, 2005.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma Flag® E. coli expression system manual**. EUA. 2005.

SILVA, G. J. JR. **Cromatografia de proteínas guia teórico prático**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 111 p.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, 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.

SPITALI, M.; GOTTSCHALK, U. (Ed.) Downstream processing of monoclonal antibody fragments. **Process scale purification of antibodies**, p. 349-372, 2009.

THORSTENSON, Y. R. et al. Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5333-5339, 1997.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification design and scale up of downstream processing**. New York: John Wiley & Sons, 1991. 228 p.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford University Press, 2007. 583 p.

WINTER, G. et al. Making antibodies by phage display technology. **Annual Review of immunology**, v. 12, p. 433-455, 1994.

YOON, S. H. et al. Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 4, p. 23-29, 2009.

ZAZERSKAYA, I. E. et al. Magnesium sulfate potentiates effect of Digifab on marinobufagenin-induced Na/K-ATPase inhibition. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 11, p. 1269-1272, 2013.