

CAROLINA GEORG MAGALHÃES

**Seleção de anticorpo humano anti-FGF2 a partir do hibridoma
secretor do anticorpo monoclonal 3F12E7**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Moro

Coorientadora: Dra. Lilian Rumi Tsuruta

Versão Corrigida

**São Paulo - SP
2021**

RESUMO

MAGALHÃES, C.G. **Seleção de anticorpo humano anti-FGF2 a partir do hibridoma secretor do anticorpo monoclonal 3F12E7.** 2021. 125f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) é considerado uma proteína chave no desenvolvimento do melanoma, sendo responsável por desempenhar papel importante no crescimento do tumor, angiogênese e metástase. O anti-FGF2 3F12E7, um anticorpo monoclonal (mAb) murino, foi previamente obtido por colaboradores e mostrou ser uma estratégia antitumoral promissora para melanoma, quando testado em camundongos. Considerando o potencial terapêutico do mAb anti-FGF2 3F12E7, somado à limitação do uso deste anticorpo murino em humanos, nosso objetivo foi a humanização deste anticorpo pela técnica de seleção guiada utilizando *phage display*, para a obtenção de anticorpos humanos correspondentes ao mAb murino anti-FGF2 3F12E7. Para o processo de humanização foram construídas três bibliotecas de fragmento de ligação ao antígeno (Fab): murino, híbrido e humano. As técnicas de *phage display*, *panning*, e ELISA foram realizadas, em cada etapa da humanização, para a seleção de Fab com afinidade pelo antígeno recombinante FGF2 (rFGF2). A estratégia de seleção guiada utilizada não possibilitou a seleção de clones Fab humanos funcionais, porém resultou na seleção de cadeias leves (LC) e pesadas (fragmento Fd – região variável e primeiro domínio constante da cadeia pesada) humanas funcionais. Seguiu-se para a estratégia de clonar as regiões variáveis das LC e Fd humanas em vetores AbVec (contendo os genes da região constante da LC e HC de imunoglobulina humana) e combinar cada uma das LC com as HC humanas selecionadas para expressão de anticorpos no formato IgG1 por cotransfecção transitória em células HEK293-F. Sete anticorpos expressos mostraram ligação ao rFGF2 por ressonância plasmônica de superfície (SPR). Em ensaios *in vitro* de proliferação e migração celular utilizando células endoteliais humanas (HUVEC) e células de melanoma humano (SK-Mel-28), os anticorpos humanos anti-FGF2 62K98H e 85L117H foram capazes de reduzir, de forma significativa, o número de células viáveis e a migração celular, nas duas linhagens celulares, em comparação ao controle negativo (IgG irrelevante). Esses resultados foram similares ao observado anteriormente com o mAb murino anti-FGF2 3F12E7 utilizado como modelo para a

humanização e são encorajadores para seguir avaliando o potencial terapêutico dos anticorpos humanos anti-FGF2 62K98H e 85L117H.

Palavras-chave: Humanização de anticorpos. Fragmento de ligação ao antígeno. Seleção guiada. *Phage display*. Melanoma.

ABSTRACT

MAGALHÃES, C.G. **Selection of human anti-FGF2 antibody from hybridoma producing 3F12E7 monoclonal antibody.** 2021. 125f. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is considered a key protein in melanoma development and is responsible to play an important role in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. The anti-FGF2 3F12E7, a murine monoclonal antibody (mAb), was previously obtained by collaborators, showing a promising antitumor strategy for melanoma when tested in mice. Considering the therapeutic potential of anti-FGF2 3F12E7 mAb, as well as its limited use in humans due to its murine origin, the aim of this study was its humanization by guided selection technique using phage display to obtain human antibodies corresponding to the murine anti-FGF2 3F12E7 mAb. For the humanization process, three libraries of fragment antigen binding (Fab) were constructed: murine, hybrid, and human. The phage display, panning, and ELISA techniques were performed, in each step of humanization, for the selection of a Fab with affinity to recombinant FGF2 antigen (rFGF2). The guided selection strategy used did not produce functional human Fab clones, however, it resulted in the selection of functional human light chain (LC) and heavy chain (Fd fragment – variable region and first constant domain of the heavy chain). The next strategy was the cloning of the human LC and Fd variable regions into AbVec vectors (containing the constant region genes of LC and HC human immunoglobulin) and combining each LC with each HC for IgG1 expression by transient co-transfection into HEK293-F cells. Seven expressed antibodies showed binding to rFGF2 by surface plasmon resonance (SPR). In *in vitro* cell proliferation and migration assays using human endothelial cells (HUVEC) and human melanoma cells (SK-Mel-28), the human anti-FGF2 antibodies 62K98H and 85L117H were able to significantly reduce the number of viable cells and to attenuate cell migration, in both cell lines, compared to the negative control (irrelevant IgG). These results were similar to those previously observed with the murine anti-FGF2 3F12E7 mAb used as a template for the humanization process and are encouraging to further evaluate the therapeutic potential of the human anti-FGF2 antibodies 62K98H and 85L117H.

Keywords: Antibody humanization. Fragment antigen binding. Guided selection. Phage display. Melanoma.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fator de crescimento de fibroblastos 2

O fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), também conhecido como fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), é um dos membros da família FGF responsável por vários processos biológicos, incluindo regeneração tecidual, migração, proliferação e diferenciação celular (BIKFALVI, 1997; COMPAGNI et al., 2000). O FGF2 está entre os primeiros fatores angiogênicos identificados (SHING et al., 1984; MOSCATELLI; PRESTA; RIFKIN, 1986), sendo capaz de, além de induzir o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, atuar como um fator oncogênico no crescimento de tumores (POWERS; MCLESKEY; WELLSTEIN, 2000).

Existem 5 isoformas do FGF2, geradas a partir de um mesmo mRNA (PRATS et al., 1989). O FGF2 de 18 kDa, conhecido como isoforma de baixo peso molecular, é traduzido a partir do códon de iniciação convencional (AUG) e representa a sequência comum a todas as isoformas de FGF2. As outras isoformas, de alto peso molecular, são extensões amino-terminais do FGF2-18 kDa e são traduzidas a partir de códons de iniciação CUG localizados *upstream* ao códon AUG (ANDREUCCI et al., 2017).

O FGF2-18 kDa, ao contrário das isoformas de alto peso molecular, é liberado extracelularmente e exerce sua ação através da ligação ao receptor FGF (FGFR: FGFR-1b, FGFR-1c, FGFR-2c, FGFR-3c e FGFR-4) (KORC; FRIESEL, 2009). Para iniciar a sinalização, o FGF2 interage com o FGFR e com heparan sulfato proteoglicanas (HSPGs) em um complexo ternário. O FGF2 não é capaz de ativar FGFRs sozinho, por isso utiliza HSPGs para estabilizar a interação FGF2-FGFR (AKL et al., 2016).

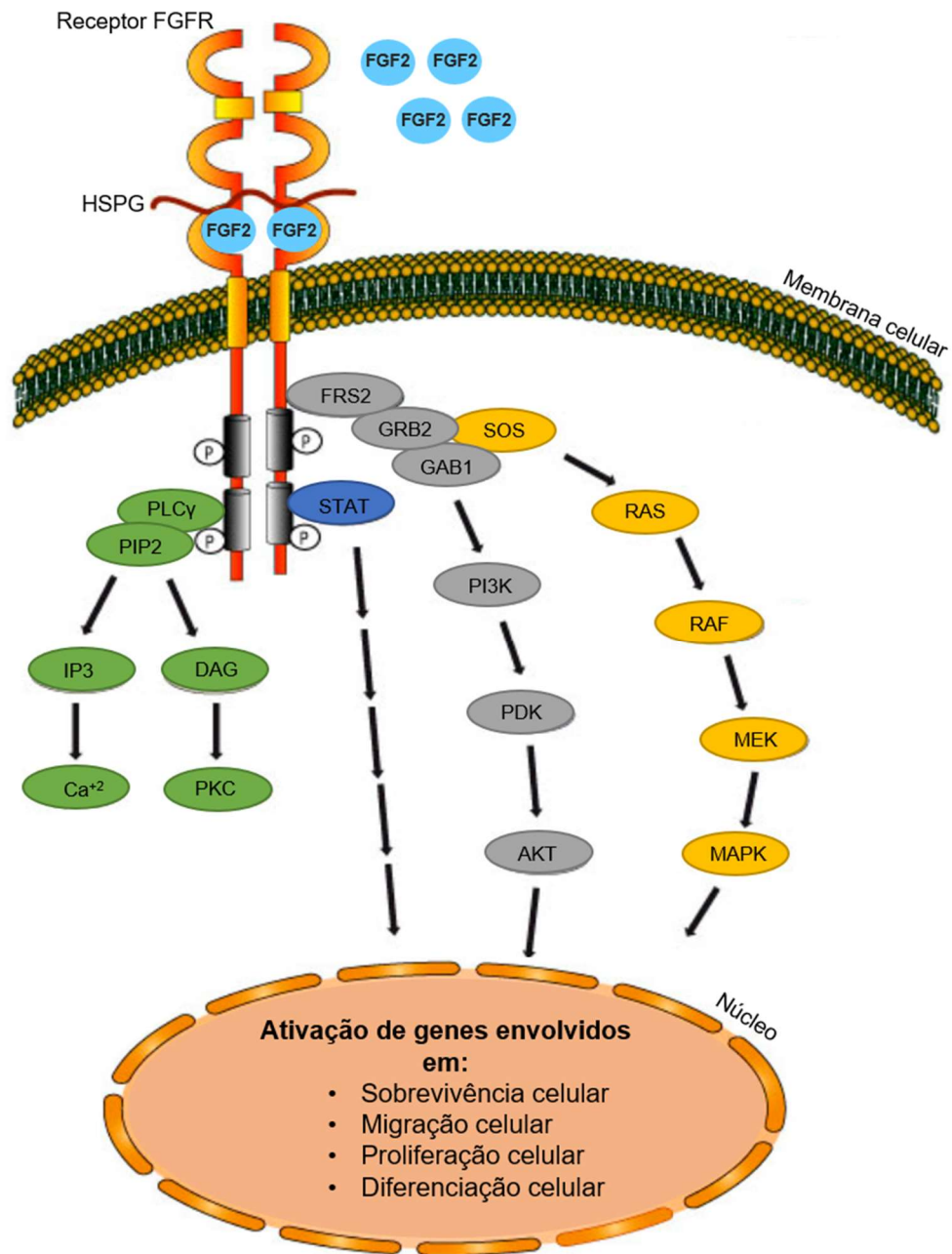
Após a formação do complexo ternário FGF2-FGFR-HSPG, os FGFRs dimerizam, levando a alterações conformacionais na estrutura do receptor e fosforilação de múltiplos resíduos citoplasmáticos de tirosina, o que resulta na ativação de vias de sinalização *downstream* (Figura 1). Os resíduos de tirosina fosforilados servem como locais para encaixe e ativação das proteínas de sinalização: PLC γ , STAT e FRS2. (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005; AKL et al., 2016; POREBSKA et al., 2018).

Após a fosforilação de FRS2, as vias de sinalização Ras/MAPK e PI3K/Akt são iniciadas a partir da formação dos complexos FRS2-GRB2-SOS e FRS2-GRB2-GAB1, respectivamente. A via Ras/MAPK modula a proliferação, migração e diferenciação celular, enquanto que a via PI3K/Akt regula a divisão, sobrevivência e determinação do destino da célula (JANKU; YAP; MERIC-BERNSTAM, 2018; POREBSKA et al., 2018). A sinalização via PLC γ é iniciada pela hidrólise de PIP2, gerando DAG e IP3. DAG ativa PKC, enquanto que IP3 altera os níveis celulares de cálcio. Essa via modula processos celulares como divisão celular, homeostase de cálcio, remodelação das membranas celulares e citoesqueleto (BLACK; BLACK, 2012). A ativação da sinalização via STAT ocorre a partir da fosforilação de STAT1, 3 e 5 e é responsável por modular funções celulares, como sobrevivência e proliferação celular (HART et al., 2000; POREBSKA et al., 2018).

Além da sua ação através da ligação ao FGFR, o FGF2 pode interagir com integrinas $\alpha\beta 3$ expressas na superfície celular e promover a adesão, migração e angiogênese pela via de sinalização Ras/MAPK (ELICEIRI et al., 1998; RUSNATI; PRESTA, 2007). O FGF2 desempenha um papel importante na angiogênese tumoral, processo necessário para o crescimento tumoral e metástase (JIANG et al., 2020). Nos tecidos tumorais, o FGF2, assim como outros fatores angiogênicos, além de induzir a proliferação de células endoteliais para formar novos vasos sanguíneos, pode estimular as células tumorais a formarem estruturas tubulares semelhantes a vasos sanguíneos, mecanismo chamado de mimetismo vascular, que é observado em tumores de melanócitos (MANIOTIS et al., 1999; RONCA et al., 2013).

A ação do FGF2 em células normais é regulada através da internalização do FGFR ao término da sinalização (AKL et al., 2016). Entretanto, a sinalização mitogênica excessiva através da via FGF2/FGFR, pela expressão aumentada de FGF2, está associada a fenótipos agressivos de câncer, com indução de angiogênese tumoral, desenvolvimento de vasculatura desorganizada, crescimento tumoral e indução de metástases, gerando resultados clínicos desfavoráveis (TAKASE et al., 2016; GORDON-WEEKS et al., 2017). A expressão de FGF2 é aumentada ao longo da progressão do tumor (KWABI-ADDU; OZEN; ITTMANN, 2004), o que é um indicativo de pior prognóstico para os pacientes (HU et al., 2016). Em câncer de próstata, foi observada o aumento de quase 2,5 vezes na concentração de FGF2 no tecido tumoral, em comparação ao tecido normal, com uma concentração média de 271 ng/g de FGF2 no tecido tumoral (GIRI; ROPIQUET; ITTMANN, 1999).

Figura 1. Vias de sinalização do FGF2/FGFR.



A cascata de sinalização começa com a ligação do FGF2 e heparan sulfato proteoglicanas (HSPG) ao FGFR para a formação de um complexo ternário. A ligação de FGF2 estimula a dimerização de FGFRs, levando à autofosforilação do receptor e à ativação de vias de sinalização *downstream*. A via de sinalização STAT é iniciada através da fosforilação de STAT1, 3 e 5. A via Ras/MAPK é ativada após a formação do complexo FRS2-GRB2-SOS, enquanto que a via PI3K/Akt é iniciada pela formação do complexo FRS2-GRB2-GAB1. A sinalização de PLC γ ativa DAG-PKC e IP3-Ca $^{+2}$. Em conjunto, essas vias de sinalização desempenham papel importante em vários processos celulares incluindo proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular. FONTE: Adaptado de POREBSKA et al., 2018.

1.1.1 FGF2 no microambiente tumoral

O microambiente tumoral é composto por células tumorais, células endoteliais, células do sistema imune, fibroblastos, matriz extracelular (MEC) ao redor ou infiltrando os tecidos tumorais, e moléculas solúveis, como citocinas e fatores de crescimento (BHOME et al., 2015). O FGF2 é expresso por diferentes tipos celulares dentro do microambiente tumoral, e é capaz de interagir com receptores de membrana celular e moléculas solúveis ligadas à MEC para controlar a sua biodisponibilidade, estabilidade e concentração no microambiente (PRESTA et al., 2005).

O FGF2 é capaz de atuar de maneira autócrina ou parácrina para promover a progressão do câncer (LIEU et al., 2011; AKL et al., 2016). Em um primeiro momento, acredita-se que o FGF2 seja expresso pelas células do estroma tumoral, e atue de forma parácrina induzindo a proliferação das células tumorais, e que, ao longo da progressão do tumor, as células tumorais comecem a expressar o FGF2 e passem a ser ativadas por via de sinalização autócrina (GLEAVE et al., 1991; KWABI-ADDO; OZEN; ITTMANN, 2004).

Nas células endoteliais, o FGF2 atua estimulando a proliferação celular e desempenhando papel importante na angiogênese e remodelação vascular (YU et al., 2017; HOSAKA et al., 2018). Os fibroblastos dentro do microambiente tumoral podem ser ativados pelo FGF2 e passar a produzir proteases, como as metaloproteinases de matriz (MMPs) que, além de facilitar o processo de invasão e metástase, degradam a MEC e promovem a liberação de fatores de crescimento, incluindo FGF2, aumentando a concentração desse fator no microambiente tumoral (AKL et al., 2016).

Além das células endoteliais, fibroblastos e células tumorais, as células do sistema imune também atuam como fonte de FGF2.

1.1.2 Relação do FGF2 com as células do sistema imune

Os macrófagos, neutrófilos, células mieloides supressoras (MDSCs), mastócitos, linfócitos T e B, são células do sistema imune encontradas no microambiente tumoral capazes de expressar FGF2 (KUJAWSKI et al., 2008; TAKASE et al., 2016; GORDON-WEEKS et al., 2017; IM et al., 2020; KOMI; REDEGELD, 2020; VAN DE VEEN et al., 2020), sendo os macrófagos associados ao tumor (TAM) as células que mais expressam FGF2 (IM et al., 2020). O FGF2 expresso

pelas células do sistema imune atua principalmente nas células endoteliais, via sinalização parácrina de FGFR, e está envolvido na indução da proliferação, migração, sobrevivência e remodelamento dessas células para promover a angiogênese tumoral e a indução de metástases (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017).

O FGF2 desempenha um papel fundamental na diferenciação dos macrófagos para um fenótipo semelhante a M2, pró-tumorigênico e imunossupressor (TAKASE et al., 2016; IM et al., 2020). Em linfócitos T, o FGF2 é capaz de aumentar a expressão das moléculas reguladoras PD-1, CTLA-4 e Tim-3 na superfície celular (DENG et al., 2020) e, induzir a diminuição da produção de IFN γ , TNF α e granzima B por linfócitos T CD8 $^+$, o que resulta na redução da capacidade citotóxica dessas células (CHEN et al., 2020). Ainda, o FGF2 é responsável por diminuir a ativação, proliferação, e o recrutamento de linfócitos T CD4 $^+$ e CD8 $^+$ para o local do tumor (IM et al., 2020) e, por recrutar células com propriedades imunomoduladoras para o infiltrado tumoral, como MDSCs (LIU et al., 2014), sendo associado à regulação da resposta imune no microambiente tumoral (IM et al., 2020). Assim, abordagens que visam diminuir a ação do FGF2 no microambiente tumoral podem ser importantes estratégias terapêuticas antitumorais.

A expressão aumentada de FGF2 é relacionada com vários tipos de câncer: gliomas (TAKAHASHI et al., 1990), câncer pancreático (YAMANAKA et al., 1993), carcinoma pulmonar de células não pequenas (BREMNES; CAMPS; SIRERA, 2006), tumores de próstata (DOW; DEVERE WHITE, 2000), carcinoma hepatocelular (FINN, 2010), além de ser um fator chave para o desenvolvimento e crescimento de melanomas (WANG; BECKER, 1997).

1.2 Opções para tratamento de melanoma

O melanoma é o tipo mais agressivo e letal de câncer de pele (SCHADENDORF et al., 2015). A incidência dessa neoplasia tem aumentado em praticamente todos os países, sendo estimados 8.450 casos no Brasil em 2020 (INCA, 2021).

Em estágio avançado os melanomas são difíceis de tratar, porque os tumores desenvolvem resistência à maioria das terapias (SCHADENDORF et al., 2015). Nos últimos anos, tratamentos tendo como alvos a via de sinalização MAPK (inibidores de BRAF e MEK) (LARKIN et al., 2014; LONG et al., 2015) e *checkpoints* imunológicos,

anti-PD-1 (ROBERT et al., 2015) e anti-CTLA-4 (HODI et al., 2010), foram aprovados para melanoma avançado, com base em ensaios clínicos de fase III que mostraram melhora na taxa de sobrevida global e sobrevida livre de progressão (SILVA; LONG, 2017).

A terapia com inibidores de BRAF induz respostas rápidas na maioria dos pacientes, no entanto, grande parte desses pacientes desenvolve resistência dentro de 6 a 8 meses (WELSH et al., 2016). Uma alternativa é o uso de anticorpos monoclonais (mAbs) inibidores de *checkpoints* imunológicos (antagonistas de PD-1 e CTLA-4, por exemplo) (EMENS et al., 2017) que bloqueiam as interações inibitórias que atuam como supressoras da resposta antitumoral, ativando a resposta imunológica do próprio paciente para identificar e destruir os tumores (ALSAAB et al., 2017). Os inibidores de PD-1 induzem respostas em 40-55% dos pacientes quando usados sozinhos em monoterapia ou quando combinados com anti-CTLA-4 (SILVA; LONG, 2017), entretanto, apenas um terço dos pacientes com melanoma mostram respostas duradouras a essas terapias (SOMASUNDARAM; HERLYN, 2015).

Assim, ainda persiste um prognóstico ruim para pacientes com melanoma metastático, com uma expectativa de vida de cinco anos para 5 a 19% dos casos e uma média de sobrevida de 5,3 meses (SANDRU et al., 2014), apesar das tentativas terapêuticas mais recentes (HODI et al., 2010; LARKIN et al., 2014; LONG et al., 2015; ROBERT et al., 2015; SILVA; LONG, 2017).

Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novas opções de tratamento, potencialmente mais eficazes, ou que possam ser combinadas no combate a essa neoplasia. Inibidores angiogênicos têm se mostrado promissores no tratamento de múltiplos tipos de câncer e apresentam melhores resultados em pacientes com metástases (LIEU et al., 2011). Em 2004, o mAb anti-VEGF (bevacizumab) foi aprovado pelo FDA como terapia de primeira linha em combinação com a quimioterapia padrão em pacientes com câncer colorretal avançado. Desde então, o uso do bevacizumab foi estendido a outros tipos de câncer, incluindo melanoma (ALESSI et al., 2009). No entanto, muitos pacientes que respondem a essa terapia antiangiogênica também desenvolvem resistência (LIEU et al., 2011). Evidências experimentais indicam que a regulação positiva da via FGF2/FGFR atua como mecanismo compensatório de escape à terapia anti-VEGF, com indução de angiogênese independente de VEGF, em modelos de tumor experimental (CASANOVAS et al., 2005; HOSAKA et al., 2020; ICHIKAWA et al., 2020) e em

pacientes (ALESSI et al., 2009; WILLETT et al., 2009; KOPETZ et al., 2010). A expressão aumentada de FGF2 também foi relacionada com recidiva tumoral após falha na terapia com inibidor do receptor VEGF (BATCHELOR et al., 2007).

Terapias combinadas vem sendo propostas para o tratamento de melanoma metastático (HOELLER, 2020), como a inibição de VEGF e FGF2 em combinação, ou de forma sequencial, visando a inibição da angiogênese tumoral de forma sinérgica (LIEU et al., 2011; GORDON-WEEKS et al., 2017) e, a combinação de terapias antiangiogênicas com a inibição de *checkpoints* imunológicos para potencializar a imunidade antitumoral (PALAKURTHI et al., 2019; DENG et al., 2020; LEE et al., 2020). No entanto, terapias eficazes com alvo no FGF2 ainda não foram aprovadas (HOSAKA et al., 2020).

1.3 Interferências na via de sinalização do FGF2 em melanoma

A inibição da sinalização do FGFR mediada por FGF2 pode ser uma alternativa de tratamento para pacientes com melanoma avançado ou refratário, porque o FGF2 além de estimular a angiogênese, aumenta diretamente a proliferação de células de melanoma (EMMETT; DEWING; PRITCHARD-JONES, 2011; AKL et al., 2016). Em estudo anterior, a inibição da expressão de FGF2 ou FGFR-1 foi suficiente para impedir o crescimento de melanomas humanos, primários e metastáticos em camundongos (VALESKY et al., 2002). Isso ocorreu devido à indução de apoptose massiva das células de melanoma e à capacidade de bloquear a neovascularização, sem ativação ou aumento da expressão de outra molécula angiogênica (VALESKY et al., 2002), sugerindo que a via de sinalização FGF2/FGFR-1 tem papel fundamental no melanoma humano. Experimentos com uso de cDNA anti-sense para FGF2 ou FGFR-1 (WANG; BECKER, 1997), ou estratégias de vacinação utilizando peptídeos com alvo no FGF2 ou com domínios de ligação ao FGFR (PLUM et al., 2000; AGUZZI et al., 2011; YU et al., 2012; XIAO et al., 2015), também apresentaram resultados promissores, acarretando em redução da angiogênese e do crescimento tumoral em modelos experimentais de melanoma.

A interferência na ação do FGF2 através de um mAb, conceito da terapia alvo-dirigida, foi abordada no desenvolvimento de um hibridoma produtor do mAb murino anti-FGF2 3F12E7, gerado pela Dra. Jane Zveiter de Moraes, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e caracterizado em

colaboração com o Dr. Roger Chammas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e nosso grupo de pesquisa. Esse anticorpo murino teve seu potencial explorado em modelo experimental e apresentou capacidade de diminuição da densidade vascular tumoral, comprometimento do desenvolvimento do tumor e redução do número e tamanho de focos metastáticos nos pulmões de camundongos experimentalmente inoculados com células de melanoma murino B16-F10, sendo considerado, pelos resultados obtidos, um agente promissor no auxílio do tratamento de melanoma (DE AGUIAR et al., 2016). Mais recentemente, uma molécula de fragmento variável de cadeia única (scFv) foi gerada pelo mesmo grupo de pesquisa, a partir do mAb murino anti-FGF2 3F12E7. O scFv 3F12E7, apesar de formar agregados, foi capaz de reconhecer especificamente o FGF2 e inibir o crescimento do tumor em modelo experimental de melanoma murino de forma semelhante ao mAb 3F12E7 (DE AGUIAR et al., 2021).

1.4 Anticorpos monoclonais (mAbs)

A tecnologia de hibridoma desenvolvida na década de 1970 por Köhler e Milstein (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) provou ser um meio eficiente para produzir anticorpos de especificidade única e em quantidades ilimitadas. Outras tecnologias e metodologias de produção de mAbs foram desenvolvidas posteriormente para a obtenção de mAbs humanizados e humanos (DOS SANTOS et al., 2018). Devido à sua excelente especificidade e alta afinidade, os mAbs têm sido considerados moléculas atraentes para o diagnóstico e terapia de múltiplas doenças, incluindo vários tipos de câncer, doenças autoimunes, metabólicas e infecciosas.

Estruturalmente, os anticorpos são glicoproteínas formadas por 4 cadeias polipeptídicas: 2 cadeias pesadas (HC) idênticas e 2 cadeias leves (LC) também idênticas. Cada HC é ligada a uma LC por ligação dissulfeto (PORTER, 1973). As cadeias são compostas por domínios variáveis e constantes: as LC possuem um domínio variável (VL) e um constante (CL), enquanto que as HC, possuem um domínio variável (VH) e 3 ou 4 constantes (CH1, CH2, CH3 e/ou CH4), dependendo da classe do anticorpo (AMZEL; POLJAK, 1979; SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

A região constante da LC pode ser do tipo kappa (κ) ou lambda (λ). E a região constante da HC pode ser α , μ , γ , δ e ϵ , determinando o isotipo ou classe do anticorpo: IgA, IgM, IgG, IgD ou IgE (AMZEL; POLJAK, 1979). Cada região variável (VH e VL)

possui 3 regiões hipervariáveis, denominadas regiões determinantes de complementariedade (CDRs), que formam uma estrutura de ligação ao antígeno. As diferenças de especificidade de cada anticorpo se dá principalmente a partir de diferenças nessas regiões (WU; KABAT, 1970; KABAT; WU, 1971; KEHOE; CAPRA, 1971; PADLAN, 1994).

As regiões VH e VL mais o domínio CH1 e a CL formam o fragmento de ligação ao antígeno (Fab). O Fab existe em pares idênticos formando o fragmento bivalente $F(ab')_2$ que é ligado ao fragmento cristalizável (Fc) através de um segmento denominado de dobradiça, responsável por conferir flexibilidade ao anticorpo (PADLAN, 1994). A eficiência clínica dos anticorpos terapêuticos depende de dois tipos de características funcionais: ligação específica ao antígeno conferida principalmente pelas CDRs dentro das regiões VH e VL e funções efetoras mediadas pelo Fc.

Atualmente, anticorpos terapêuticos, e produtos relacionados a anticorpos, como proteínas de fusão ao Fc, fragmentos de anticorpos, e conjugados, representam a classe de produto dominante no mercado biofarmacêutico, com vendas mundiais de quase US\$ 163 bilhões em 2019, o que representa cerca de 70% das vendas do setor (ECKER; CRAWFORD; SEYMOUR, 2020). O aumento desse setor é impulsionado principalmente pelo alto crescimento nas vendas e aprovação de mAbs na área oncológica (AGGARWAL, 2014; LU et al., 2020).

Até o momento, 126 anticorpos foram aprovados pelo FDA e/ou EMA para uso terapêutico, sendo 8 deles aprovados no ano de 2021 (ANTIBODY SOCIETY, 2021), quase 300 mAbs terapêuticos iniciaram a fase II de ensaios clínicos e mais de 450 iniciaram estudos de fase I, sem levar em consideração anticorpos contra a COVID19 (KAPLON; REICHERT, 2021).

Anticorpos monoclonais contra vários fatores de crescimento ou seus receptores, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), estão sendo usados no tratamento de diferentes tipos de câncer com sucesso considerável (WANG et al., 2012). A associação da expressão aumentada de FGF2 com muitos tipos de câncer, incluindo o melanoma, sugere que o FGF2 também possa ser um excelente alvo para o desenvolvimento de um mAb terapêutico.

Apesar da tecnologia de hibridoma representar uma fonte efetiva para o desenvolvimento de mAbs com potencial terapêutico, anticorpos de origem murina, podem induzir resposta imunogênica (HWANG; FOOTE, 2005; PRESTA, 2008), diminuindo assim a eficácia terapêutica (CABILLY et al., 1984) e podendo ocasionar efeitos adversos (MIRICK et al., 2004).

1.4.1 Imunogenicidade de anticorpos murinos

Em 1986, foi aprovada a primeira utilização terapêutica de um mAb, muromonab (Orthoclone OKT3), que reconhece o receptor CD3 de linfócitos T e atua modulando a resposta imune para controlar a rejeição celular aguda nos transplantes renais (EMMONS; HUNSICKER, 1987). Mesmo sendo de origem murina este mAb obteve sucesso por se tratar de uso pontual, suficiente para a reversão do processo de rejeição celular aguda. No entanto, os pacientes que receberam OKT3 desenvolveram uma porcentagem significativa de anticorpos antidrogas (ADA). Aproximadamente 84% dos pacientes tratados com mAbs murinos desenvolveram anticorpos humanos anti-camundongo (HAMA) (HWANG; FOOTE, 2005; PRESTA, 2008).

A resposta HAMA leva à inativação e eliminação do anticorpo murino (SHAWLER et al., 1985) e impede o uso de múltiplas administrações do anticorpo, necessário para terapias antitumorais, por exemplo. As questões de imunogenicidade, diminuição da eficácia terapêutica (CABILLY et al., 1984), farmacocinética desfavorável (OBER et al., 2001) e indução de efeitos adversos (MIRICK et al., 2004), impossibilitam o uso de anticorpos de origem murina na terapia humana (SHAWLER et al., 1985). Além disso, os anticorpos murinos pouco interagem com o sistema efetor imune humano. As funções efetoras do anticorpo murino mediadas pelo fragmento Fc, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) são diminuídas ou ausentes em humanos (BRUHNS; JÖNSSON, 2015). Isso também se aplica à interação com o receptor Fc neonatal (FcRn) que pode resultar em uma meia vida muito curta de anticorpos murinos quando usados para terapia humana (OBER et al., 2001). Tendo em vista a problemática do uso de mAbs murinos para terapia em humanos, técnicas de humanização de anticorpos foram desenvolvidas com o objetivo de tornar essas moléculas mais semelhantes às sequências humanas.

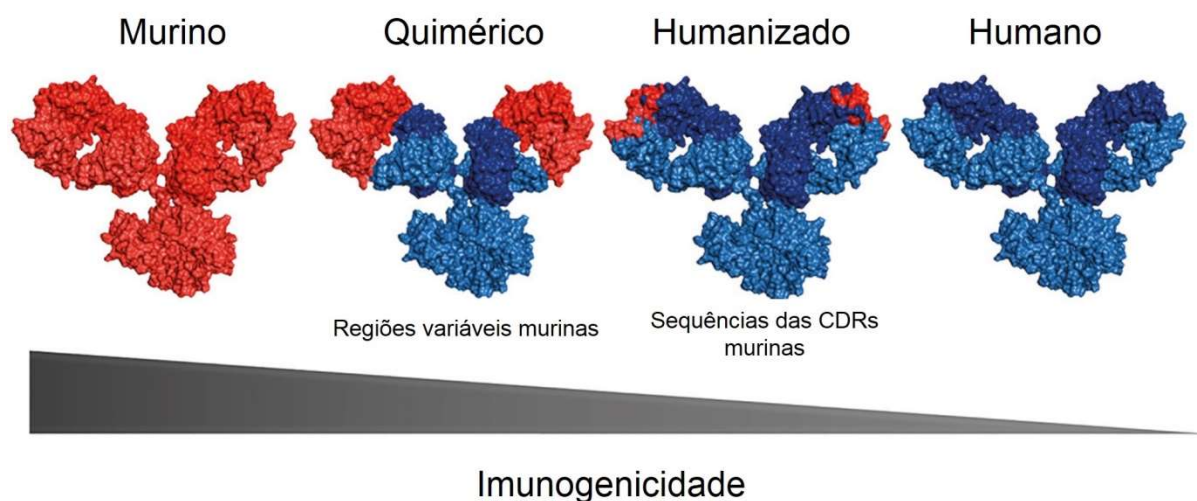
1.4.2 Humanização de anticorpos

As técnicas de humanização de anticorpos surgiram com a finalidade de produzir anticorpos com imunogenicidade mínima quando administrados em humanos e com retenção da afinidade e especificidade do anticorpo parental de origem não humana.

No final da década de 1980, o conhecimento acerca da tecnologia do DNA recombinante e das técnicas de biologia molecular, juntamente com os avanços em relação à compreensão da estrutura do anticorpo, foram usados para substituir sequências de anticorpos murinos por sequências de anticorpos humanos (HWANG; FOOTE, 2005; PRESTA, 2008). Inicialmente apenas a sequência dos domínios constantes do anticorpo murino foi substituída por homólogos humanos, resultando em anticorpos quiméricos com aproximadamente 70% de conteúdo humano (MORRISON et al., 1984) (Figura 2). Essa técnica foi capaz de diminuir a imunogenicidade dos anticorpos e manter a especificidade do anticorpo parental. Entretanto, os domínios variáveis murinos geraram anticorpos humanos anti-quiméricos (HACA) em aproximadamente 40% dos pacientes (HWANG; FOOTE, 2005).

Tendo em vista essa problemática, foi necessário reduzir o conteúdo murino dos anticorpos por sequências humanas com estruturas mais próximas (GÜSSOW; SEEMANN, 1991) o que resultou em anticorpos humanizados. A técnica de transplante de CDR foi a primeira técnica de humanização desenvolvida (JONES et al., 1986). Nessa técnica, as sequências das CDRs, que medeiam a maior parte da interação com o antígeno, do anticorpo parental murino são transplantadas para um *framework* humano (Figura 2). É uma das técnicas mais utilizadas para humanização de anticorpos, e tornou viável o uso clínico dos mAbs de origem murina. No entanto, apesar do sucesso inicial do transplante de CDR, a maioria dos anticorpos obtidos por esta técnica apresentou acentuada redução da afinidade de ligação ao antígeno em relação ao anticorpo parental murino, com a necessidade de manter alguns aminoácidos murinos no *framework* para não desestabilizar a estrutura de ligação do anticorpo (VERHOEYEN; MILSREIN; WINTER, 1988; TEMPEST et al., 1991).

Figura 2. Representação esquemática da humanização de anticorpos.



Domínios vermelhos representam regiões de origem murina e domínios azuis representam regiões totalmente humanas. FONTE: DOS SANTOS et al., 2018.

Atualmente são descritos vários métodos de humanização de anticorpos baseados na construção de variantes pela análise da estrutura e sequência dos anticorpos parentais, na substituição dos resíduos expostos na superfície dos anticorpos (DOS SANTOS et al., 2013) e na seleção de clones a partir da construção de bibliotecas combinatórias.

Bibliotecas combinatórias de anticorpos humanos são construídas pela amplificação de genes de LC e HC, geralmente a partir de linfócitos do sangue periférico, mas também podem ser construídas a partir de amostras de linfonodos, baço ou medula, e são geradas no formato de fragmentos de anticorpos: scFv ou Fab (BARBAS et al., 2001). As bibliotecas não representam o repertório de pares de genes de anticorpos produzidos pelo sistema imune porque os genes da LC e HC são amplificados separadamente e depois clonados formando pares aleatórios. Esta característica aumenta a diversidade da biblioteca e conseqüentemente a chance de obter clones de anticorpos com a especificidade desejada (TSURUTA; DOS SANTOS; MORO, 2018).

As tecnologias de *in vitro display* representam plataformas de seleção de fragmentos de anticorpo específicos a uma determinada molécula utilizando uma biblioteca combinatória (TSURUTA; DOS SANTOS; MORO, 2018). A tecnologia de *phage display* foi a primeira plataforma de *in vitro display* desenvolvida através da apresentação de um peptídeo exógeno na superfície de um bacteriófago (fago) filamentoso (SMITH, 1985). No *phage display* de fragmentos de anticorpos, o

repertório de anticorpos é apresentado na superfície de fagos, no formato mono ou polivalente, ligado geralmente à proteína pIII de superfície do fago. Esse repertório é concentrado em clones que se ligam ao antígeno de interesse através da incubação com o mesmo pelo processo denominado de *panning*. Em seguida, os clones são isolados e caracterizados para a escolha daqueles que possuem maior afinidade ao antígeno alvo. Os clones selecionados podem ser induzidos para a expressão dos fragmentos de anticorpo na forma solúvel e depois purificados para a caracterização (WINTER et al., 1994). As sequências codificadoras dos fragmentos de anticorpos (Fab ou scFv) selecionados podem também ser clonadas em outros vetores de expressão, para inserção da região Fc, e expressas em diferentes sistemas de expressão (HUST et al., 2011; FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016).

Os principais avanços da plataforma de *phage display* de anticorpos foram: a geração de repertório de anticorpos utilizando processos totalmente *in vitro*, independente da resposta imune *in vivo*; a seleção de anticorpos com conteúdo totalmente humano; a obtenção de mAbs contra qualquer tipo de antígeno como auto antígenos, antígenos tóxicos, instáveis e não imunogênicos; e a possibilidade de maturação de afinidade dos anticorpos selecionados (FRENZEL; SCHIRRMANN; HUST, 2016).

1.4.2.1 Seleção guiada

A abordagem de humanização de anticorpos por seleção guiada utiliza a tecnologia de *phage display* para conduzir a seleção de clones de fragmentos de anticorpos humanos com características fenotípicas correspondentes ao anticorpo parental não humano (OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005). Nessa técnica de humanização não é levada em consideração a estrutura tridimensional do anticorpo de origem, nem é necessária qualquer sequência proteica da molécula parental murina na obtenção do produto final, sendo possível isolar um fragmento de anticorpo totalmente humano (BEIBOER et al., 2000).

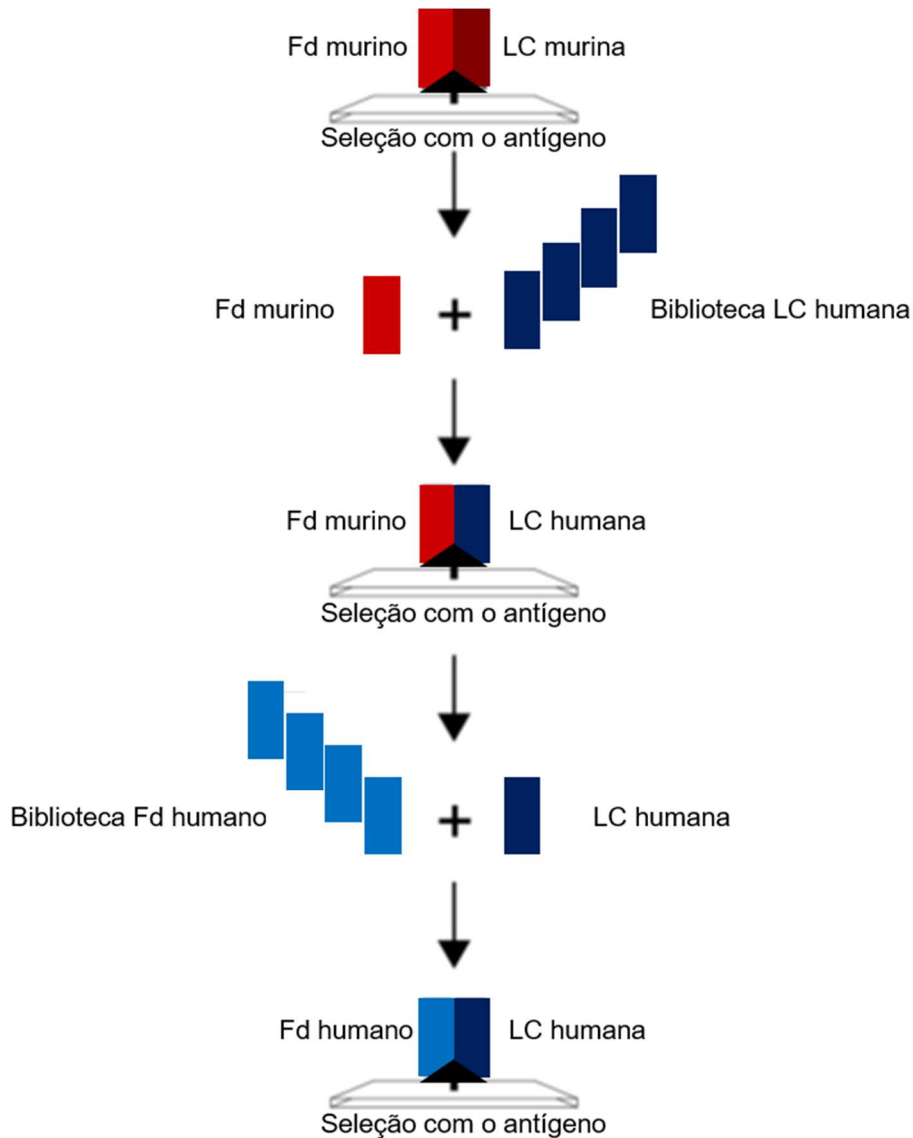
Anticorpos totalmente humanos são considerados atualmente a melhor opção para terapia uma vez que apresentam o menor risco de imunogenicidade (HWANG; FOOTE, 2005). O primeiro anticorpo totalmente humano aprovado pelo FDA em 2002 foi o anti-TNF- α Humira (adalimumab), com indicação para o tratamento de artrite

reumatoide e doença de Crohn, e foi obtido pela técnica de seleção guiada (OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005).

A técnica de seleção guiada permite o isolamento de um ou mais clones de fragmentos de anticorpos humanos a partir da combinação entre os genes de um clone de fragmento de anticorpo parental murino (ou de outra espécie), que serve como molde de seleção, e uma biblioteca de genes de LC ou HC de origem humana para a obtenção de clones com afinidade ao antígeno (JESPERS et al., 1994). O gene da LC e HC do anticorpo parental murino é substituído, de forma sequencial ou paralela, por genes de anticorpos humanos (OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005).

A estratégia de seleção guiada utilizada neste trabalho foi a sequencial e está esquematizada na Figura 3. Resumidamente, ocorre a construção de uma biblioteca combinatória Fab formada pelos genes da região VH e o domínio CH1, que juntos formam o fragmento Fd do anticorpo murino, e pelos genes da LC murina. A biblioteca murina é apresentada na superfície de fagos e selecionada contra o antígeno alvo do anticorpo parental murino. Em seguida, a sequência Fd do Fab murino selecionado é utilizada para a construção de uma biblioteca combinatória Fab híbrido formada pelo fragmento Fd do Fab murino e por um repertório de genes LC humanos. A biblioteca híbrida também é apresentada na superfície de fagos e selecionada contra o alvo. Em seguida, a sequência LC humana que foi selecionada é clonada em vetor contendo uma biblioteca de genes de fragmentos Fd humanos e a nova biblioteca combinatória Fab é selecionada contra o antígeno de interesse. Posteriormente, clones com sequências humanas são isolados e os Fab destes clones são expressos e caracterizados em relação à afinidade ao antígeno. Ao final deste processo é obtido um ou mais clones com sequências de fragmentos de anticorpos totalmente humanos que se ligam ao mesmo alvo contra o qual foi gerado o anticorpo de origem não humana (WATZKA; PFIZENMAIER; MOOSMAYER, 1998).

Figura 3. Modelo representativo da geração de Fab humano a partir da técnica de seleção guiada sequencial.



Primeiramente, ocorre a construção de uma biblioteca combinatória de fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) murino formada pelos genes da região variável da cadeia pesada (VH) e o primeiro domínio constante da cadeia pesada (CH1), que juntos formam o fragmento Fd, do anticorpo murino, e pelos genes da cadeia leve (LC) murina. Essa biblioteca é apresentada na superfície de fagos e selecionada contra o antígeno alvo do anticorpo parental murino. A sequência Fd do Fab murino selecionado é utilizada para a construção de uma biblioteca combinatória Fab híbrido formada pelo gene Fd do Fab murino e por um repertório de genes LC humanos. A biblioteca híbrida é apresentada na superfície dos fagos e selecionada contra o alvo. Por fim, a sequência LC humana selecionada é clonada no vetor contendo uma biblioteca de genes de fragmentos Fd humanos e a biblioteca combinatória Fab humano é selecionada contra o antígeno de interesse para seleção de clones com sequências de fragmentos de anticorpos totalmente humanos que se ligam ao mesmo alvo do anticorpo parental murino. FONTE: Adaptado de OSBOURN; GROVES; VAUGHAN, 2005.

A técnica de seleção guiada é uma metodologia vantajosa para a humanização de anticorpos candidatos que mostraram a atividade biológica esperada em ensaios prévios, tendo em vista que permite a seleção de anticorpos totalmente humanos e utiliza o antígeno de interesse em todas as etapas de seleção para obter clones com afinidade ao alvo (KIM; HONG, 2007). Por isso o mAb murino anti-FGF2 3F12E7, que mostrou resultados promissores para utilização como adjuvante na terapia para o melanoma (DE AGUIAR et al., 2016), foi utilizado como modelo para sua humanização através da técnica de seleção guiada.

CONCLUSÕES

- Foi possível selecionar um Fab murino utilizando *phage display/panning* de uma biblioteca combinatória Fab murino construída a partir do hibridoma anti-FGF2 3F12E7;
- Os Fab murinos, expressos no sobrenadante do lisado de *E. coli* TOP10F', foram capazes de se ligar ao antígeno rFGF2 por ELISA;
- O fragmento Fd murino do clone Fab murino 15 selecionado foi capaz de guiar a seleção de três Fab híbridos provenientes de uma biblioteca combinatória Fab híbrido utilizando *phage display/panning*;
- Os Fab híbridos, expressos no sobrenadante do lisado de *E. coli* TOP10F', foram capazes de se ligar ao antígeno rFGF2 por ELISA;
- As LC humanas dos clones Fab híbridos 32, 62 e 85 selecionados não foram capazes de guiar a seleção de Fab humanos provenientes de bibliotecas combinatórias Fab humano utilizando *phage display/panning* nas condições utilizadas neste trabalho;
- Não foi possível identificar clones Fab humanos, com as duas cadeias (LC e Fd) humanas funcionais ao longo da técnica de humanização por seleção guiada nas condições utilizadas neste trabalho;
- Foram selecionados 9 clones com fragmentos Fd humanos funcionais provenientes das bibliotecas combinatórias Fab humano utilizando *phage display/panning*;
- Através da cotransfecção transitória em células HEK293-F utilizando vetores AbVec, foi possível a obtenção de 20 anticorpos humanos e 1 anticorpo quimérico anti-FGF2;
- Sete anticorpos humanos anti-FGF2 apresentaram ligação ao antígeno rFGF2 em ensaio de ligação por SPR;
- Em ensaios de proliferação e migração com células HUVEC e SK-Mel-28, os anticorpos humanos anti-FGF2 62K98H e 85L117H, e o anticorpo quimérico anti-FGF2, foram capazes de reduzir, de forma significativa, o número de células viáveis e a migração celular em comparação aos grupos controles tratados com anticorpos humanos irrelevantes, resultado semelhante ao obtido com o mAb murino anti-FGF2 3F12E7 utilizado neste trabalho como modelo de humanização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDICHE, Y. N. et al. Label-free epitope binning assays of monoclonal antibodies enable the identification of antigen heterogeneity. **Journal of Immunological Methods**, v. 382, n. 1–2, p. 101–116, 2012.
- AGGARWAL, R. S. What's fueling the biotech engine—2012 to 2013. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 32–39, 2014.
- AGHEBATI-MALEKI, L. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of novel anti-ROR1 single-chain antibodies in hematological malignancies. **SLAS Discovery**, v. 22, n. 4, p. 408–417, 2017.
- AGUZZI, M. S. et al. The FGF-2-derived peptide FREG inhibits melanoma growth in vitro and in vivo. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 2, p. 266–273, 2011.
- AKL, M. R. et al. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, 2016.
- ALESSI, P. et al. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: Long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. **European Cytokine Network**, v. 20, n. 4, p. 225–234, 2009.
- ALMAGRO, J. C. et al. Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. **Antibodies**, v. 8, n. 3, p. 44, 2019.
- ALSAAB, H. O. et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–15, 2017.
- AMZEL, L. M.; POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of immunoglobulins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, p. 961–997, 1979.
- ANDREUCCI, E. et al. Roles of different IRES-dependent FGF2 isoforms in the acquisition of the major aggressive features of human metastatic melanoma. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 1, p. 97–108, 2017.
- ANDRIS-WIDHOPF, J. et al. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display. **Journal of Immunological Methods**, v. 242, n. 1–2, p. 159–181, 2000.
- ANTIBODYSOCIETY. **Antibody Society**. Disponível em: <<https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>>. Acesso em: 3 set. 2021.
- BAO, G. Q. et al. Isolating human antibody against human hepatocellular carcinoma by guided-selection. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n. 12, p. 1374–1380, 2005.
- BARBAS, C. F. et al. **Phage display: a laboratory manual**. [s.l.: s.n.]

BATCHELOR, T. T. et al. AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 83–95, 2007.

BEIBOER, S. H. W. et al. Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original antibody and its human equivalent. **Journal of Molecular Biology**, v. 296, n. 3, p. 833–849, 2000.

BHOME, R. et al. A top-down view of the tumor microenvironment: Structure, cells and signaling. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, n. MAY, p. 1–9, 2015.
BIKFALVI, A. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 26–45, 1997.

BLACK, A. R.; BLACK, J. D. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–18, 2012.

BOADO, R. J. et al. Humanization of Anti-Human Insulin Receptor Antibody for Drug Targeting Across the Human Blood–Brain Barrier. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 381–391, 2007.

BRADBURY, A. R. M. et al. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. **mAbs**, v. 10, n. 4, p. 539–546, 2018.

BREMNES, R. M.; CAMPS, C.; SIRERA, R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. **Lung Cancer**, v. 51, n. 2, p. 143–158, 2006.

BRUHNS, P.; JÖNSSON, F. Mouse and human FcR effector functions. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 25–51, 2015.

CABILLY, S. et al. Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 11, p. 3273–3277, 1984.

CAO, L. et al. In vitro screening for angiostatic potential of herbal chemicals. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 51, n. 12, p. 6658–6664, 2010.

CARMEN, S.; JERMUTUS, L. Concepts in antibody phage display. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 1, n. 2, p. 189–203, 2002.

CASANOVAS, O. et al. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. **Cancer Cell**, v. 8, n. 4, p. 299–309, 2005.

CHEN, Q. Y. et al. Tumor fibroblast–derived FGF2 regulates expression of SPRY1 in esophageal tumor–infiltrating T cells and plays a role in T-cell exhaustion. **Cancer Research**, v. 80, n. 24, p. 5583–5596, 2020.

COMPAGNI, A. et al. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 60, n. 24, p. 7163–7169, 2000.

COWAN, R.; UNDERWOOD, P. A. Steric effects in antibody reactions with polyvalent antigen. **Journal of Theoretical Biology**, v. 132, n. 3, p. 319–335, 1988.

DE AGUIAR, R. B. et al. Blocking FGF2 with a new specific monoclonal antibody impairs angiogenesis and experimental metastatic melanoma, suggesting a potential role in adjuvant settings. **Cancer Letters**, v. 371, n. 2, p. 151–160, 2016.

DE AGUIAR, R. B. et al. Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FGF2 3F12E7 monoclonal antibody. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457–474, 2017.

DENG, H. et al. Dual Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Fibroblast Growth Factor Receptor Inhibition Elicits Antitumor Immunity and Enhances Programmed Cell Death-1 Checkpoint Blockade in Hepatocellular Carcinoma. **Liver Cancer**, v. 9, n. 3, p. 338–357, 2020.

DENNISON, S. M. et al. Qualified Biolayer Interferometry Avidity Measurements Distinguish the Heterogeneity of Antibody Interactions with Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Antigens. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 4, p. 1315–1326, 2018.

DING, G. et al. Identification of two aberrant transcripts derived from a hybridoma with amplification of functional immunoglobulin variable genes. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 7, n. 5, p. 349–354, 2010.

DOS SANTOS, M. L. et al. Rebma200, a Humanized Monoclonal Antibody Targeting the Sodium Phosphate Transporter NaPi2b Displays Strong Immune Mediated Cytotoxicity against Cancer: A Novel Reagent for Targeted Antibody Therapy of Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

DOS SANTOS, M. L. et al. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 1–15, 2018.

DOW, J. K.; DEVERE WHITE, R. W. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. **Urology**, v. 44, n. 6, p. 800–806, 2000.

ECCLES, S. A.; BOX, C.; COURT, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, n. SUPPL., p. 391–421, 2005.

ECKER, D. M.; CRAWFORD, T. J.; SEYMOUR, P. The therapeutic monoclonal

antibody product market. **BioProcess International**, v. 18, n. 10, 2020.

ELICEIRI, B. P. et al. Integrin $\alpha\beta 3$ requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 5, p. 1255–1263, 1998.

EMENS, L. A. et al. Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. **European Journal of Cancer**, v. 81, p. 116–129, 2017.

EMMETT, M. S.; DEWING, D.; PRITCHARD-JONES, R. O. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. **American journal of cancer research**, v. 1, n. 7, p. 852–68, 2011.

EMMONS, C.; HUNSICKER, L. G. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. **Iowa Med**, v. 77, n. 2, p. 78–82, 1987.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2 SPEC. ISS., p. 139–149, 2005.

EYVAZI, S. et al. Identification of a novel single chain fragment variable antibody targeting CD24-expressing cancer cells. **Immunology Letters**, v. 190, n. August, p. 240–246, 2017.

FINN, R. S. Development of molecularly targeted therapies in hepatocellular carcinoma: Where do we go now? **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 2, p. 390–397, 2010.

FRENZEL, A.; SCHIRRMANN, T.; HUST, M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. **mAbs**, v. 8, n. 7, p. 1177–1194, 2016.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–374, 2003.

GIRI, D.; ROPIQUET, F.; ITTMANN, M. Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. 1063–1071, 1999.

GLEAVE, M. et al. Acceleration of Human Prostate Cancer Growth in Vivo by Factors Produced by Prostate and Bone Fibroblasts. **Cancer Research**, v. 51, n. 14, p. 3753–3761, 1991.

GOODWIN, A. M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2–3, p. 172–183, 2007.

GORDON-WEEKS, A. N. et al. Neutrophils promote hepatic metastasis growth through fibroblast growth factor 2-dependent angiogenesis in mice. **Hepatology**, v. 65, n. 6, p. 1920–1935, 2017.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4^a ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

GÜSSOW, D.; SEEMANN, G. [5] Humanization of monoclonal antibodies. **Methods in Enzymology**, v. 203, p. 99–121, 1991.

HAKAMI, A. R.; BALL, J. K.; TARR, A. W. Non-ionic detergents facilitate non-specific binding of M13 bacteriophage to polystyrene surfaces. **Journal of Virological Methods**, v. 221, n. October 2017, p. 1–8, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HART, K. C. et al. Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. **Oncogene**, v. 19, n. 29, p. 3309–3320, 2000.

HODI, F. S. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 8, p. 711–723, 2010.

HOELLER, C. The future of combination therapies in advanced melanoma. **Memo - Magazine of European Medical Oncology**, v. 13, n. 3, p. 309–313, 2020.

HOSAKA, K. et al. Dual roles of endothelial FGF-2-FGFR1-PDGF-BB and perivascular FGF-2-FGFR2-PDGFR β signaling pathways in tumor vascular remodeling. **Cell Discovery**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 2018.

HOSAKA, K. et al. Therapeutic paradigm of dual targeting VEGF and PDGF for effectively treating FGF-2 off-target tumors. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

HU, M. et al. Prognostic value of basic fibroblast growth factor (bFGF) in lung cancer: A systematic review with meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2016.

HUST, M. et al. A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 4, p. 159–170, 2011.

HWANG, W. Y. K.; FOOTE, J. Immunogenicity of engineered antibodies. **Methods**, v. 36, n. 1, p. 3–10, 2005.

ICHIKAWA, K. et al. Activated FGF2 signaling pathway in tumor vasculature is essential for acquired resistance to anti-VEGF therapy. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 2939, 2020.

IM, J. H. et al. FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/>>. Acesso em: 2 set. 2021.

JANKU, F.; YAP, T. A.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 5, p. 273–291, 2018.

JESPERS, L. S. et al. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. **Bio/Technology**, v. 12, n. 9, p. 899–903, 1994.

JIANG, X. et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 1–19, 2020.

JONES, P. T. et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. **Nature**, v. 21, p. 522–525., 1986.

KABAT, E. A. et al. **Sequences of proteins of immunological interest**. 5. ed. [s.l.: s.n.]

KABAT, E. A.; WU, T. T. Attempts To Locate Complementarity-Determining Residues in the Variable Positions of Light and Heavy Chains. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 190, n. 1, p. 382–393, 1971.

KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2021. **mAbs**, v. 13, n. 1, p. 1–34, 2021.

KAZEMI-LOMEDASHT, F. et al. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. **Molecular Immunology**, v. 65, n. 1, p. 58–67, 2015.

KEHOE, J. M.; CAPRA, J. D. Localization of two additional hypervariable regions in immunoglobulin heavy chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 9, p. 2019–2021, 1971.

KIGUCHI, Y. et al. The VH framework region 1 as a target of efficient mutagenesis for generating a variety of affinity-matured scFv mutants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.

KIM, S. J.; HONG, H. J. Guided selection of human antibody light chains against TAG-72 using a phage display chain shuffling approach. **J Microbiol**, v. 45, n. 6, 2007.

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

KOMI, D. E. A.; REDEGELD, F. A. Mast Cells in the Tumor Microenvironment. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, p. 313–325, 2020.

KONTSEK, P.; NOVÁK, M.; KONTSEKOVÁ, E. Karyotype analysis of hybridomas producing monoclonal antibodies against different antigens. **Folia biologica (Praha)**, v. 34, n. 2, p. 99–104, 1988.

KOPETZ, S. et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab

for metastatic colorectal cancer: Efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 3, p. 453–459, 2010.

KORC, M.; FRIESEL, R. E. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, p. 639–651, 2009.

KREBBER, A. et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. **Journal of Immunological Methods**, v. 201, n. 1, p. 35–55, 1997.

KUJAWSKI, M. et al. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3367–3377, 2008.

KWABI-ADDU, B.; OZEN, M.; ITTMANN, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, n. 4, p. 709–724, 2004.

LARKIN, J. et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma . **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867–1876, 2014.

LEE, W. S. et al. Combination of anti-angiogenic therapy and immune checkpoint blockade normalizes vascular-immune crosstalk to potentiate cancer immunity. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1475–1485, 2020.

LI, D. et al. Monoclonal antibodies targeting basic fibroblast growth factor inhibit the growth of B16 melanoma in vivo and in vitro. **oncology reports**, v. 24, p. 457–463, 2010.

LIEU, C. et al. Beyond VEGF: Inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6130–6139, 2011.

LIM, S. Y. et al. The molecular engineering of an anti-idiotypic antibody for pharmacokinetic analysis of a fully human anti-infective. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2015.

LIU, L. et al. Reductions in myeloid-derived suppressor cells and lung metastases using AZD4547 treatment of a metastatic murine breast tumor model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 633–645, 2014.

LONG, G. V. et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: A multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 386, n. 9992, p. 444–451, 2015.

LU, R. M. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1–30, 2020.

MAKABE, K. et al. Thermodynamic consequences of mutations in vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor murine antibody, 528. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 2, p. 1156–1166, 2008.

MANIOTIS, A. J. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, p. 739–752, 1999.

MEINKE, G. et al. Synthesis of libraries and multi-site mutagenesis using a PCR-derived, dU-containing template. **Synthetic Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2021.

MIRICK, G. R. et al. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, n. 4, p. 251–217, 2004.

MORRISON, S. L. et al. Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. **Immunology**, v. 81, n. November, p. 6851–6855, 1984.

MOSCATELLI, D.; PRESTA, M.; RIFKIN, D. B. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 7, p. 2091–2095, 1986.

MURATA, V. M. et al. Anti-digoxin fab variants generated by phage display. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 269–277, 2013.

NATHAN, S.; RADER, C.; BARBAS, C. F. Neutralization of Burkholderia pseudomallei Protease by Fabs Generated through Phage Display. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2302–2311, 2005.

NEELAKANTAM, B. et al. Recombinant human antibody fragment against tetanus toxoid produced by phage display. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 4, n. 1, p. 45–55, 2014.

OBBER, R. J. et al. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: Implications for therapeutic antibodies. **International Immunology**, v. 13, n. 12, p. 1551–1559, 2001.

OLIVEIRA, M. L. S. et al. Site-directed mutagenesis of bovine FGF-2 cDNA allows the production of the human-form of FGF-2 in Escherichia coli. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 14, p. 1151–1157, 2001.

OSBOURN, J.; GROVES, M.; VAUGHAN, T. From rodent reagents to human therapeutics using antibody guided selection. **Methods**, v. 36, n. 1, p. 61–68, 2005.

PADLAN, E. A. Anatomy of the antibody molecule. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 3, p. 169–217, 1994.

PALAKURTHI, S. et al. The Combined Effect of FGFR Inhibition and PD-1 Blockade Promotes Tumor-Intrinsic Induction of Antitumor Immunity. **Cancer Immunology Research**, v. 7, n. 9, p. 1457–1471, 2019.

PANKA, D. J. et al. Variable region framework differences result in decreased or increased affinity of variant anti-digoxin antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 9, p. 3080–3084, 1988.

PAUZA, M. E.; REHMANN, J. .; LEBIEN, T. W. Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains. **Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 139–149, 1993.

PLUM, S. M. et al. Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. **Vaccine**, v. 19, n. 9–10, p. 1294–1303, 2000.

POREBSKA, N. et al. Targeting Cellular Trafficking of Fibroblast Growth Factor Receptors as a Strategy for Selective Cancer Treatment. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 1, p. 7, 2018.

PORTER, R. R. Structural Studies of Immunoglobulins. **Science**, v. 180, n. 4087, p. 713–716, 1973.

POWERS, C. . J.; MCLESKEY, S. W.; WELLSTEIN, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-Related Cancer**, v. 7, p. 165–197, 2000.

PRATS, H. et al. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 6, p. 1836–1840, 1989.

PRESTA, L. G. Molecular engineering and design of therapeutic antibodies. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 460–470, 2008.

PRESTA, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 16, n. 2 SPEC. ISS., p. 159–178, 2005.

RAUM, T. et al. Anti-self antibodies selected from a human IgD heavy chain repertoire: A novel approach to generate therapeutic human antibodies against tumor-associated differentiation antigens. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 50, n. 3, p. 141–150, 2001.

ROBERT, C. et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 26, p. 2521–32, 2015.

RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-Mesenchymal transition in melanoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, n. 12, p. 2760–2771, 2013.

ROUET, R. et al. Next-generation sequencing of antibody display repertoires. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–5, 2018.

RUSNATI, M.; PRESTA, M. Fibroblast Growth Factors/Fibroblast Growth Factor Receptors as Targets for the Development of Anti-Angiogenesis Strategies. **Current**

Pharmaceutical Design, v. 13, n. 20, p. 2025–2044, 2007.

SANDRU, A. et al. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. **Journal of medicine and life**, v. 7, n. 4, p. 572–576, 2014.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, 2015.
SCHROEDER, H. W. J.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S41-52, 2010.

SCHWIMMER, L. J. et al. Discovery of diverse and functional antibodies from large human repertoire antibody libraries. **Journal of Immunological Methods**, v. 391, n. 1–2, p. 60–71, 2013.

SHAHI, B. et al. Random mutagenesis of BoNT/E Hc nanobody to construct a secondary phage-display library. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 528–536, 2014.

SHARIFZADEH, Z. et al. Development of oligoclonal nanobodies for targeting the tumor-associated glycoprotein 72 antigen. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 590–601, 2013.

SHAWLER, D. L. et al. Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. **The Journal of Immunology**, v. 135, p. 1530–1535, 1985.

SHING, Y. et al. Heparin affinity: Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. **Science**, v. 223, n. 4642, p. 1296–1299, 1984.

SILVA, I. P.; LONG, G. V. Systemic therapy in advanced melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 484–492, 2017.

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

SOMASUNDARAM, R.; HERLYN, M. Nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of melanoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 15, n. 10, p. 1135–1141, 2015.

STEINBERGER, P. et al. Generation and Characterization of a Recombinant Human CCR5-specific Antibody. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 36073–36078, 2000.

TAKAHASHI, J. A. et al. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 15, p. 5710–5714, 1990.

TAKASE, N. et al. NCAM- and FGF-2-mediated FGFR1 signaling in the tumor microenvironment of esophageal cancer regulates the survival and migration of tumor-associated macrophages and cancer cells. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 47–58, 2016.

TAO, J. et al. Selection and characterization of a human neutralizing antibody to human fibroblast growth factor-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 3, p. 767–773, 2010.

TEMPEST, P. R. et al. Reshaping a human monoclonal antibody to inhibit human respiratory syncytial virus infection in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 266–271, 1991.

THIE, H. et al. Affinity Maturation by Phage Display. **Methods in molecular biology**, v. 525, n. 3, p. 309–322, 2009.

TILLER, T. et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. **Journal of Immunological Methods**, v. 329, n. 1–2, p. 112–124, 2008.

TSUIJI, M. et al. A checkpoint for autoreactivity in human IgM+ memory B cell development. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 2, p. 393–400, 2006.

TSURUTA, L. R. et al. Characterization of 11-dehydro-thromboxane B2 recombinant antibody obtained by phage display technology. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 4, p. 273–284, 2003.

TSURUTA, L. R.; DOS SANTOS, M. L.; MORO, A. M. Display Technologies for the Selection of Monoclonal Antibodies for Clinical Use. In: BÖLDICKE, T. (Ed.). **Antibody Engineering**. [s.l: s.n.]

VALESKY, M. et al. Noninvasive Dynamic Fluorescence Imaging of Human Melanomas Reveals that Targeted Inhibition of bFGF or FGFR-1 in Melanoma Cells Blocks Tumor Growth by Apoptosis. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 2, p. 103–112, 2002.

VAN DE VEEN, W. et al. A novel proangiogenic B cell subset is increased in cancer and chronic inflammation. **Science Advances**, v. 6, n. 20, 2020.

VERHOEYEN, M.; MILSREIN, C. E.; WINTER, G. Reshaping Human Antibodies: Grafting an Antilysozyme Activity. **Science**, v. 239, n. 4847, p. 1534–1536, 1988.

WANG, L. et al. A Novel Monoclonal Antibody to Fibroblast Growth Factor 2 Effectively Inhibits Growth of Hepatocellular Carcinoma Xenografts. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 864–872, 2012.

WANG, S. et al. Construction of a human monoclonal antibody against bFGF for suppression of NSCLC. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 11, p. 2003–2011, 2018.

WANG, Y.; BECKER, D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 887–893, 1997.

WANG, Z. et al. Humanization of a mouse monoclonal antibody neutralizing TNF- α by guided selection. **Journal of Immunological Methods**, v. 241, n. 1–2, p. 171–184,

2000.

WARDEMAN, H.; KOFER, J. Expression cloning of human B cell immunoglobulins. **Methods in Molecular Biology**, v. 971, p. 93–111, 2013.

WATZKA, H.; PFIZENMAIER, K.; MOOSMAYER, D. Guided selection of antibody fragments specific for human interferon γ receptor 1 from a human VH- and VL-gene repertoire. **Immunotechnology**, v. 3, n. 4, p. 279–291, 1998.

WELSH, S. J. et al. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? **European Journal of Cancer**, v. 62, p. 76–85, 2016.

WILLETT, C. G. et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: A multidisciplinary phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 18, p. 3020–3026, 2009.

WINTER, G. et al. Making Antibodies By Phage Display Technology. **Annu.Rev.Immunol**, v. 12, p. 433–455, 1994.

WOLLWEBER, L. et al. Early phase karyotype analysis of chromosome segregation after formation of mouse-mouse hybridomas with chromosome painting probes. **Chromosome Research**, v. 8, n. 1, p. 37–44, 2000.

WU, T. T.; KABAT, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. **The Journal of experimental medicine**, v. 132, n. 2, p. 211–250, 1970.

XIA, J. et al. Isolation, identification and expression of specific human CD133 antibodies. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–9, 2013.

XIAO, L. et al. Endostar attenuates melanoma tumor growth via its interruption of b-FGF mediated angiogenesis. **Cancer Letters**, v. 359, n. 1, p. 148–154, 2015.

XU, L. et al. Precision therapeutic targeting of human cancer cell motility. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018.

YAMANAKA, Y. et al. Overexpression of Acidic and Basic Fibroblast Growth Factors in Human Pancreatic Cancer Correlates with Advanced Tumor Stage. **Cancer Research**, v. 53, n. 21, p. 5289–5296, 1993.

YANG, Y. et al. Production of bFGF monoclonal antibody and its inhibition of metastasis in Lewis lung carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 4, p. 4015–4021, 2017.

YU, P. et al. FGF-Dependent Metabolic Control of Vascular Development. **Journal of Vascular Surgery**, v. 66, n. 3, p. 959, 2017.

YU, Y. et al. The FGF2-binding peptide P7 inhibits melanoma growth in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 138, n. 8, p. 1321–

1328, 2012.

YUAN, Z. N. et al. Construction of human Fab library and screening of a single-domain antibody of amyloid-beta 42 oligomers. **Neural Regeneration Research**, v. 8, n. 33, p. 3107–3115, 2013.

ZHANG, Q. et al. Guided selection of an anti-gamma-seminoprotein human Fab for antibody directed enzyme prodrug therapy of prostate cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 4, p. 477–489, 2007.

ZHU, Z.; DIMITROV, D. S. Construction of a Large Naïve Human Phage-Displayed Fab Library Through One-Step Cloning. **Methods in molecular biology**, v. 525, p. 1–12, 2009.