

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)

CAIO CESAR NOGUEIRA CAMBUI

***Phage Display* de peptídeos e de anticorpos: uma  
combinação para a engenharia de biofármacos  
para doenças com um componente angiogênico**

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**30/05/2023**

CAIO CESAR NOGUEIRA CAMBUI

**Phage Display de peptídeos e de anticorpos: uma  
combinação para a engenharia de biofármacos  
para doenças com um componente angiogênico**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências - Ciências Biológicas  
(Bioquímica)*

*Área: Bioquímica*

*Orientador (a): Prof. Dr. Ricardo José Giordano*

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C174p Cambui, Caio Cesar Nogueira  
Phage Display de peptídeos e de anticorpos: uma combinação para a engenharia de biofármacos para doenças com um componente angiogênico / Caio Cesar Nogueira Cambui. - São Paulo, 2023.  
81 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.  
Orientador: Giordano, Ricardo José

1. Angiogênese. 2. Desenho racional de anticorpos. 3. Phage display. 4. Yeast display. 5. Receptores tirosina quinase. I. T. II. Giordano, Ricardo José, orientador.



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

*"Phage Display de peptídeos e de anticorpos: uma combinação para a engenharia de biofármacos para doenças com um componente angiogênico"*

**CAIO CESAR NOGUEIRA CAMBUI**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências obtido no Programa Ciências Biológicas (Bioquímica) - Área de Concentração: Bioquímica.

---

Prof. Dr. Ricardo José Giordano  
(Orientador e Presidente)

**APROVADO(A) POR:**

---

Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères  
IQ - USP

---

Profa. Dra. Nathalie Cella  
ICB - USP

---

Profa. Dra. Juliana Dreyfuss Regatieri  
UNIFESP

SÃO PAULO  
21 de agosto de 2023

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desse projeto (Processo FAPESP nº 2019/19620-5).

Ao meu orientador, Dr. Ricardo José Giordano, por ter me recebido em seu laboratório e por toda dedicação, apoio e paciência, fatores que foram essenciais para o desenvolvimento do projeto, assim como para meu amadurecimento científico e profissional.

A todos os membros do laboratório, pelos bons e maus momentos passados juntos. Ao Luis, pelas pizzas, broas, corridas (me lembre de sempre esperar o ônibus, especialmente de madrugada) e conversas que compartilhamos. À Erika, pelas conversas e ensinamentos, além de seu exemplo de dedicação. Ao Alex e à Samantha, por sua companhia e amizade.

À minha família por todo o suporte prestado e por estar sempre presente. Em especial aos meus pais, Adriana, por ser uma mãe tão carinhosa, e William, por sempre ter se dedicado em ser um ótimo pai. Obrigado pelo suporte e amor incondicional que me dão. Amo muito vocês.

À minha companheira e amada namorada, Lilian, pela paciência, amor e carinho, por estar comigo tanto nos bons, quanto nos maus momentos e por ter me ajudado a ser menos “cabeça dura”.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma maneira participaram dessa trajetória, muito obrigado.

“A vida se divide em três períodos: aquilo que foi, o que é e o que será. O que fazemos é breve, o que faremos, dúbio, o que fizemos, certo.” Sêneca.

"Sem aquela ocasião, suas qualidades especiais se teriam apagado, e sem essas virtudes a ocasião lhes teria sido vã." O Príncipe – Maquiavel

“Failure is the foundation of success and success is the lurking-place of failure; but who can tell when the turning point will come?” Somerset, The Painted Veil.

## Resumo

Cambui, C. C. N., ***Phage Display* de peptídeos e de anticorpos: uma combinação para a engenharia de biofármacos para doenças com um componente angiogênico**. 2023. 83p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Anticorpos são proteínas usadas pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar corpos estranhos como bactérias, vírus ou células tumorais. O uso de anticorpos, especialmente anticorpos monoclonais, encontra aplicações que se estendem desde o seu uso como ferramentas científicas, até biofármacos para o tratamento das mais diversas doenças. A produção de anticorpos monoclonais, todavia, é um processo árduo. As principais técnicas para a produção dessas biomoléculas, como o hibridoma ou *phage display* de anticorpos são dependentes da imunização de animais, um fator limitante, especialmente se o antígeno a ser utilizado for pouco imunogênico, um antígeno próprio ou altamente tóxico. Nesse trabalho, estabelecemos um método alternativo para a produção racional de anticorpos utilizando uma combinação de *phage display* de peptídeos e *phage display* de anticorpos. A primeira técnica permite o isolamento de ligantes bioativos. Esses ligantes podem então ser inseridos em estruturas de anticorpos nas regiões de reconhecimento do antígeno para a produção de bibliotecas de anticorpos direcionados contra o alvo em estudo, permitindo, deste modo, a seleção de imunoglobulinas específicas e direcionadas a regiões biologicamente importantes do alvo. Demonstramos a viabilidade desse processo isolando anticorpos anti-Tie1. Tie1 é um receptor tirosina quinase expresso em células endoteliais que é importante no processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (angiogênese). Esse receptor pertence a uma família composta por apenas um outro membro, o receptor Tie2. Apesar do extenso conhecimento a respeito dos ligantes e vias de sinalização ativadas por Tie2, Tie1 continua a ser, até o momento, um receptor órfão. Utilizando a tecnologia de *phage display* de peptídeos, isolamos um ligante de Tie1 capaz de inibir a angiogênese em um modelo murino de retinopatia induzida por oxigênio. Esse peptídeo foi então utilizado como base para a construção de

bibliotecas de anticorpos direcionados contra a porção extracelular de Tie1. Mostramos que nosso método é eficiente para o isolamento de anticorpos monoclonais no formato de *single chain* (scFv). Além disso, utilizando a tecnologia de *phage display* de peptídeos, isolamos um peptídeo contra o receptor gp130, um receptor transmembrânico que atua na inflamação, na angiogenese e em diversos outros processos biológicos. Esse peptídeo poderá ser explorado, futuramente, em vias relacionadas à resposta imune, inflamação, assim como na angiogênese.

**Palavras chave:** Angiogênese, Receptores Tirosina quinase, *phage display*, Tie1, gp130, desenho racional de anticorpos.



## ABSTRACT

Cambui, C. C. N., 2023. **Peptide and antibody phage display: a combination for engineering biodrugs against diseases with an angiogenic component.** 83p PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Antibodies are biomolecules used by the immune system to identify and neutralize foreign bodies such as bacteria, viruses and/or tumor cells. Monoclonal antibodies have a broad range of applications, being used as scientific tools and even as biodrugs to treat a variety of diseases. However, the production of antibodies is challenging. The main techniques used in this process are the hybridoma technology and antibody phage display. These techniques, however, rely on animal immunization, which is a limiting factor, especially when the antigen used is toxic, non-immunogenic or a self-antigen. In this study, we combined peptide and antibody phage display to develop an alternative method to generate antibodies. Peptide phage display allows the isolation of bioactive peptides. These peptides can be engineered in an antibody scaffold, allowing the construction of libraries directed against any target. Therefore, these libraries allow the isolation of immunoglobulins that bind biological active sites located on the antigen. We demonstrated the viability of this process by isolating antibodies against Tie1. Tie1 is a tyrosine receptor kinase (RTK) expressed by endothelial cells. This receptor plays a key role in angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones. Tie1 is a member of a family of RTKs composed by only two members: Tie1 and Tie2. Tie2 is an extensively studied receptor. Its ligands and pathways are well known. However, little is known about Tie1, which stills an orphan receptor. We isolated a peptide directed against the extracellular region of Tie1 using peptide phage display. This peptide displayed an antiangiogenic activity on a murine model of oxygen-induced retinopathy and was used to construct an antibody library directed against Tie1. The isolation of specific single-chain antibodies against Tie1 demonstrates the efficiency of our method. As a second part of this work, we isolated a peptide directed against the extracellular portion of gp130, a pleiotropic glycoprotein receptor that plays important roles in several biological processes, such as inflammation and

angiogenesis. We hope that this peptide may be used to investigate pathways related to the immune response, inflammation and angiogenesis.

**Key words:** Angiogenesis, Tyrosine Receptor Kinase, Phage Display, Tie1, gp130, Rational Antibody Design.

## Sumário

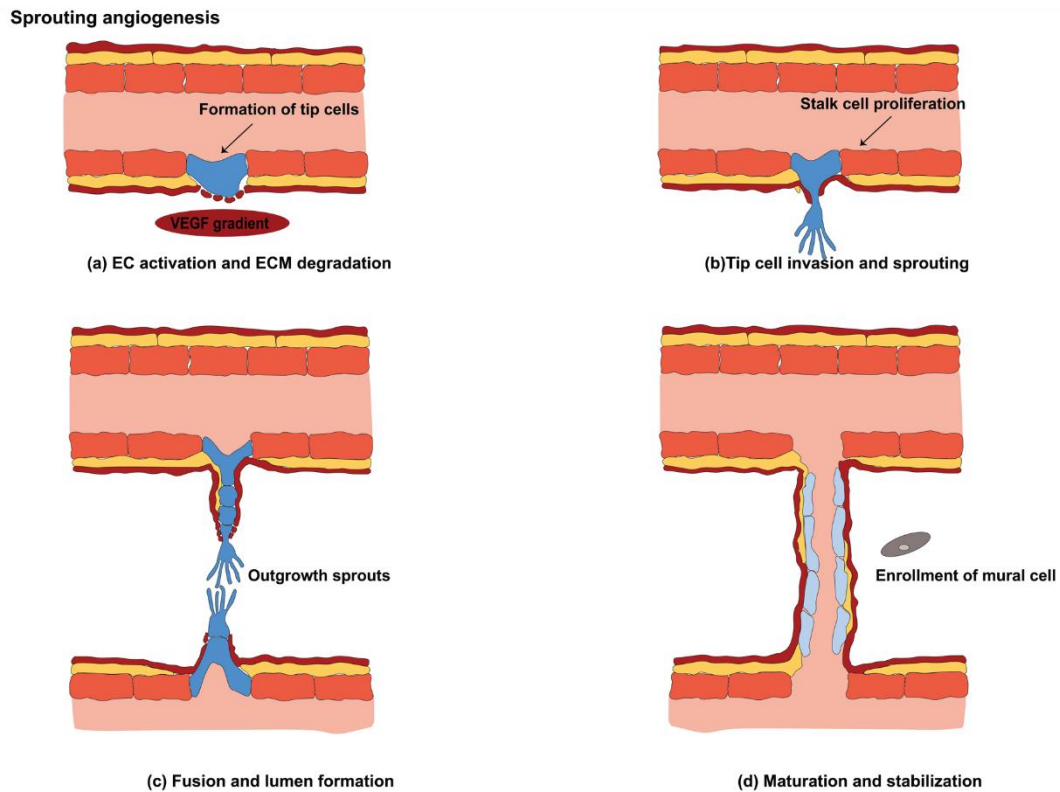
<b>1. Introdução</b> .....	10
1.1 Angiogênese .....	10
1.2 Família de Receptores Tie .....	13
1.3 Desenvolvimento de anticorpos .....	15
<b>2. Objetivos</b> .....	24
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	25
<b>4. Resultados</b> .....	33
Parte 1 - Criar uma plataforma para o desenvolvimento racional de biofármacos do tipo anticorpos monoclonais .....	33
4.1 Vetor fagemídeo (pHigh) para a construção de uma biblioteca de anticorpos .....	33
4.2 Design e construção da biblioteca de scFv direcionada contra Tie1 .	34
4.3 Isolamento de scFvs direcionados contra a porção extracelular de Tie1 .....	38
4.4 Validação dos scFvs isolados .....	40
4.5 Maturação de afinidade .....	45
4.6 <i>Yeast Display</i> .....	49
Parte 2 - Identificar e validar novos moduladores da angiogênese patológica .....	60
4.7 Validação do peptídeo ômega .....	65
<b>5. Discussão</b> .....	67
<b>6. Conclusão</b> .....	74
<b>7. Referências</b> .....	76

# 1. Introdução

## 1.1 Angiogênese

Angiogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos já pré-existentes. Tal processo é fundamental para a reprodução humana, organogênese (atuando em conjunto com a vasculogênese), reparo de feridas e reparo tecidual (FALLAH et al., 2019). Em adultos, os vasos sanguíneos permanecem quiescentes e raramente formam novas ramificações em condições fisiológicas. Todavia, em situações que envolvem reparo tecidual (LI; ZHANG; KIRSNER, 2003), durante o ciclo menstrual (DEMIR; YABA; HUPPERTZ, 2010), assim como no processo de formação da placenta (CHEN; ZHENG, 2014), ou em doenças dependentes de angiogênese (câncer, retinopatia diabética, aterosclerose, dentre outras) (CHEN; ZHENG, 2014), tal processo possui um papel crítico. O conceito de doenças dependentes de angiogênese foi primeiramente descrito por Judah Folkman em 1971, que demonstrou que o bloqueio da formação de vasos sanguíneos ocasionava a supressão do crescimento tumoral e diminuição da metástase (FOLKMAN, 1971).

De um modo simplificado, a angiogênese pode ser dividida em quatro estágios (**FIGURA 1**): a) Desestabilização dos vasos sanguíneos, promovida por sinais angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular-VEGF (*vascular endothelial growth factor*), resultando no desprendimento dos pericitos da lâmina basal e na degradação proteolítica da matriz extracelular; b) Diferenciação de células endoteliais em *tip cells* (células migratórias que detectam e migram em direção a um gradiente de fatores angiogênicos) e *stalk cells* (células que irão se dividir e proliferar, acompanhando as *tip cells*); c) Formação do lúmen; e d) Maturação do vaso sanguíneo (VIALARD; LARRIVÉE, 2017).

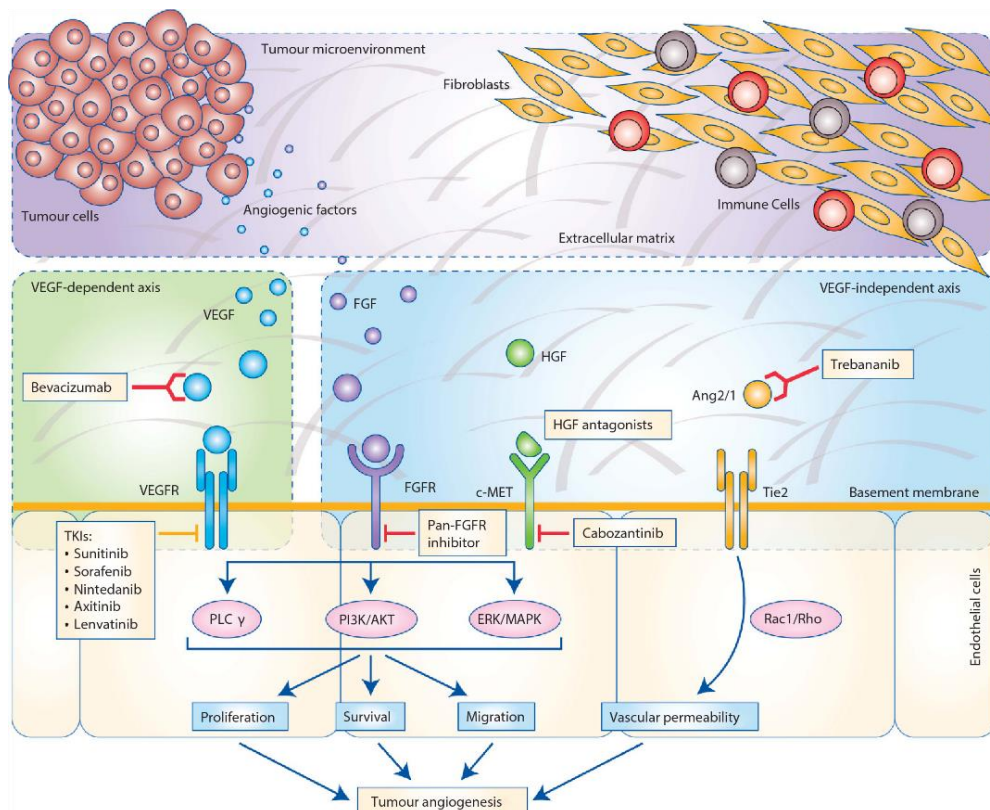


**FIGURA 1: Modelo esquemático da angiogênese por brotamento.** A angiogênese é regulada pelo balanço entre fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. A iniciação da angiogênese requer a ocorrência de degradação da matriz extracelular e ativação de algumas células endoteliais. a e b) As *tip cells* são caracterizadas pela presença de filopoidias e comportamento migratório em direção a fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, ao passo que as *stalk cells* são caracterizadas pelo alto potencial proliferativo. c) Diferentes brotamentos se conectam para formar o lúmen d) Após a formação de um novo vaso, as células endoteliais entram em um estado de quiescência; células murais são recrutadas e a matriz extracelular, depositada. Figura retirada de AHMADI; REZAIE, 2020.

A angiogênese é ativada pela ação de fatores angiogênicos via diversos mecanismos, sendo a ativação via VEGF a via mais estudada (UCUZIAN et al., 2010). Sua relevância é tamanha que diversos dos fármacos anti-angiogênicos utilizados clinicamente são direcionados contra tal fator e seus receptores (SHIBUYA, 2011). Um exemplo de fármaco direcionado contra este fator é o anticorpo monoclonal Bevacizumab (Avastin), que bloqueia a ligação do VEGF aos receptores VEGFRs e aumenta a sensibilidade dos tumores à quimioterapia (ADAMS; WEINER, 2005).

Todavia, a terapia anti-VEGF não é isenta de problemas. Alguns dos efeitos adversos incluem hipertensão e proteinúria (HURWITZ et al., 2004). Além

disso, Bevacizumab causa a destruição de veias imaturas dependentes de VEGF (BENJAMIN et al., 1999), além de trombose e hemorragia (CARDONES; BANEZ, 2006). Soma-se a isso a ocorrência de resistência a fármacos anti-angiogênicos, que ocorre na maioria das terapias sistêmicas e que pode se originar por dois modos diferentes: resistência intrínseca ou resistência adquirida (JAIN, 2014). A resistência intrínseca é caracterizada pela não resposta do tumor à terapia. Em pacientes recebendo biofármacos como o bevacizumab ou moléculas de baixo peso molecular que inibem a porção tirosina quinase dos receptores de VEGF, como sorafenib e sunitinib, os tumores continuam crescendo, a despeito do tratamento (EDELMAN; MAO, 2013). No caso da resistência adquirida, o tumor se adapta à terapia. Mecanismos pró-angiogênicos alternativos são ativados (**FIGURA 2**), promovendo a ocorrência da angiogênese mesmo na presença do fármaco anti-angiogênico (JIMÉNEZ-VALERIO; CASANOVAS, 2016), fato este que demonstra que, apesar do VEGF e seu principal receptor, VEGFR2, serem uma das principais vias angiogênicas, esta não é a única alternativa para se interromper a angiogênese (CABRAL et al., 2017).



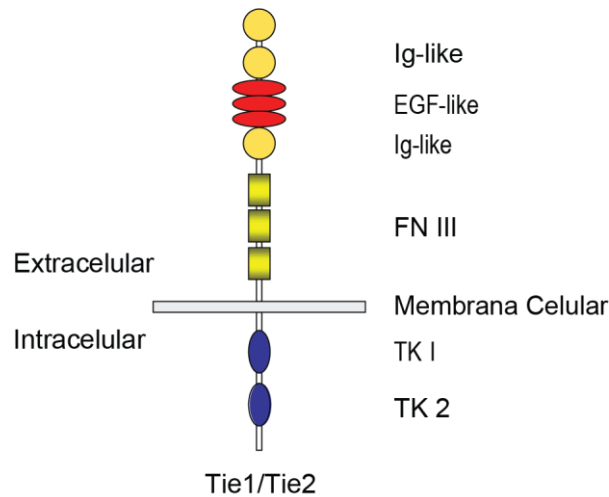
**FIGURA 2: Angiogênese tumoral e algumas de suas vias.** A via do VEGF é uma das principais vias de sinalização que promovem a angiogênese. A inibição crônica dessa via pode ocasionar a emergência de vias alternativas que sustentam o processo angiogênico. Algumas dessas vias

independentes de VEGF são promovidas de FGF/FGFR, Tie1,2/ANG1,2 e outros fatores. Figura retirada de BUENO; MOURON; QUINTELA-FANDINO, 2017.

A angiogênese, portanto, é um processo coordenado no tempo e no espaço e que conta com a participação de vários outros fatores além da família do VEGF. Outros receptores tirosina quinase, como o receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptores beta do fator de crescimento transformador (TGFR) e receptor tirosina quinase com domínios semelhantes a imunoglobulinas e domínios semelhantes a EGF (Tie) também são importantes e participam desse processo (**FIGURA 2**). Por ser objetivo de estudo dessa tese, um maior destaque será dado a família de receptores Tie.

## 1.2 Família de Receptores Tie

Os receptores *Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor (EGF) Homology domains-1 (Tie-1) and -2 (Tie-2)* foram isolados no começo dos anos 1990 (DUMONT et al., 1992; PARTANEN et al., 1992) e formam uma família de receptores tirosina quinase que possuem uma estrutura extracelular característica, formada por domínios de imunoglobulina (Ig), domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF) e domínios de fibronectina tipo III, além dos domínios transmembrânicos e tirosina quinase (**FIGURA 3**). Os dois receptores da família Tie compartilham estrutura geral similar, com cerca de 30% de identidade de aminoácidos na porção extracelular e 76% na porção intracelular. Além disso, são bastante conservados entre as espécies, sendo que Tie1 apresenta cerca de 96% de identidade em relação ao seu homólogo murino (SATO et al., 1993). Ambos os receptores são quase que exclusivamente expressos por células endoteliais, porém, há certa expressão em algumas células hematopoiéticas (EKLUND; SAHARINEN, 2013; PARTANEN et al., 1992). Angiopoetinas (ANGPT1, ANGPT2, ANGPT4, também chamadas ANG1, ANG2, ANG4 em humanos) são glicoproteínas ligantes de Tie2.



**FIGURA 3: Esquema dos receptores Tie.** Os domínios extracelulares dos receptores Tie1 e Tie2 consistem em três domínios Ig-like, três domínios EGF-like e três domínios de Fibronectina tipo III (FN III). A porção intracelular contém os domínios tirosina quinase.

ANG1 é expresso por células mesenquimais e atua de maneira parácrina. É uma agonista de Tie2 que atua promovendo a sobrevivência celular, estabilidade dos vasos sanguíneos e função da barreira endotelial (KOH, 2013), via ativação da via PI3K/Akt. ANG2, por sua vez, pode atuar como um agonista fraco de Tie2 ou como um antagonista do sistema ANG1-Tie2, dependendo do contexto celular. ANG2 é expresso por células endoteliais e armazenado em estruturas denominadas corpos de *Weibel-Palade* (FIEDLER et al., 2004; MAISONPIERRE et al., 1997). Em situações em que ocorre remodelamento vascular, com estímulo de células endoteliais por VEGF e hipóxia, há um aumento da expressão de ANG2 que, diferentemente de ANG1, atua promovendo a desestabilização das monocamadas endoteliais (HAKANPAA et al., 2015).

Apesar do extenso conhecimento a respeito das vias que envolvem ANG1/ANG2/Tie2, pouco é conhecido sobre o receptor Tie1. Tie1 continua sendo um receptor órfão, embora, mais recentemente, duas proteínas tenham sido sugeridas como possíveis ligantes de Tie1 - svep1 e LECT2 (HUßMANN et al, 2023; XU et al, 2019).

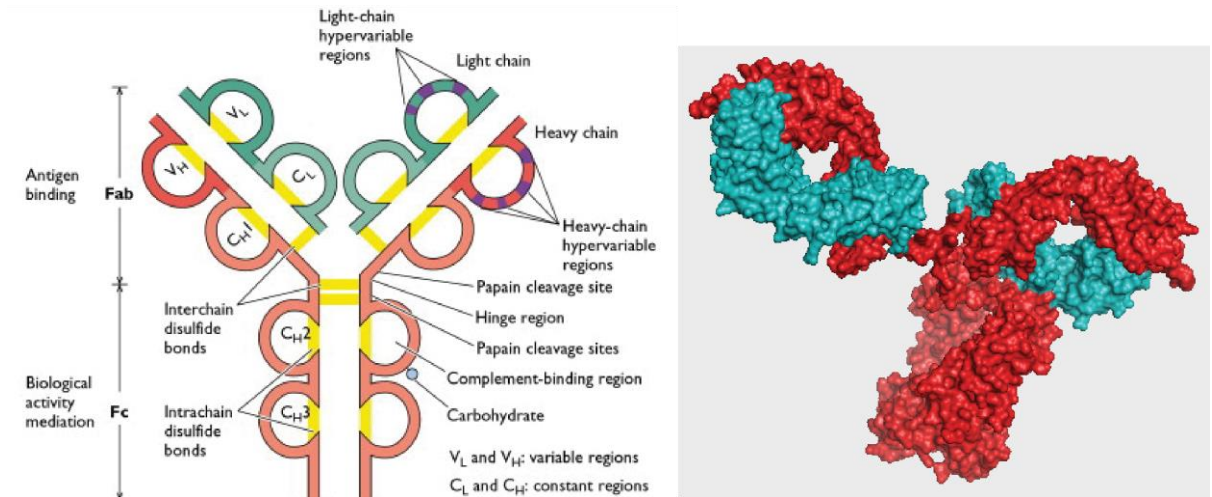


Todavia, sua importância pode ser demonstrada pelo fato de que esse receptor é essencial para o desenvolvimento e função vascular normais (PURI et al., 1995). Camundongos deficientes em Tie1 morrem antes do nascimento devido a edema disseminado e perda da integridade de microvasos, além de defeitos no sistema linfático (D'AMICO et al., 2010). Além disso, Tie1 também exerce funções relevantes na vasculatura patológica, regulando a angiogênese tumoral e a progressão aterosclerótica (WOO et al., 2011).

### 1.3 Desenvolvimento de anticorpos

Terapias baseadas em anticorpos monoclonais (mAb) são promissoras e estão crescendo cada vez mais como escolhas para o tratamento clínico de diversas doenças. mAbs são anticorpos produzidos por um único clone de um linfócito B, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas. Nas últimas décadas, o avanço das tecnologias associadas à descoberta, otimização e engenharia de anticorpos permitiu que essa área recebesse bastante atenção. Mais de 70 produtos baseados em anticorpos e moléculas derivadas já estão no mercado, aprovados tanto para terapia como para exames de imagem por agências como FDA e EMA (KUMAR et al., 2019). Em 2022, terapias baseadas em mAbs compreenderam 3 dos *top ten* produtos farmacêuticos mais vendidos (Humira, em terceiro lugar, Keytruda, em quarto e Stelara, em nono lugar) (STATISTA, 2022). Além disso, no campo de medicina de biossimilares, cerca de 50% dos produtos são baseados em mAbs (WALSH, 2018).

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são biomoléculas com formato em Y (**FIGURA 4**) formadas por quatro cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Essa estrutura permite que essas moléculas desempenhem duas funções diferentes: são capazes de se ligar a um antígeno, assim como mediar funções (imuno)biológicas.



**FIGURA 4: Componentes estruturais e funcionais de um anticorpo.** Anticorpos possuem uma estrutura complexa formada por quatro cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. A região Fc está relacionada à mediação de funções biológicas, ao passo que os domínios variáveis ( $V_H$  e  $V_L$ ) formam o sítio de ligação ao antígeno. Representação em superfície de um anticorpo IgG PDB = 1HZH.

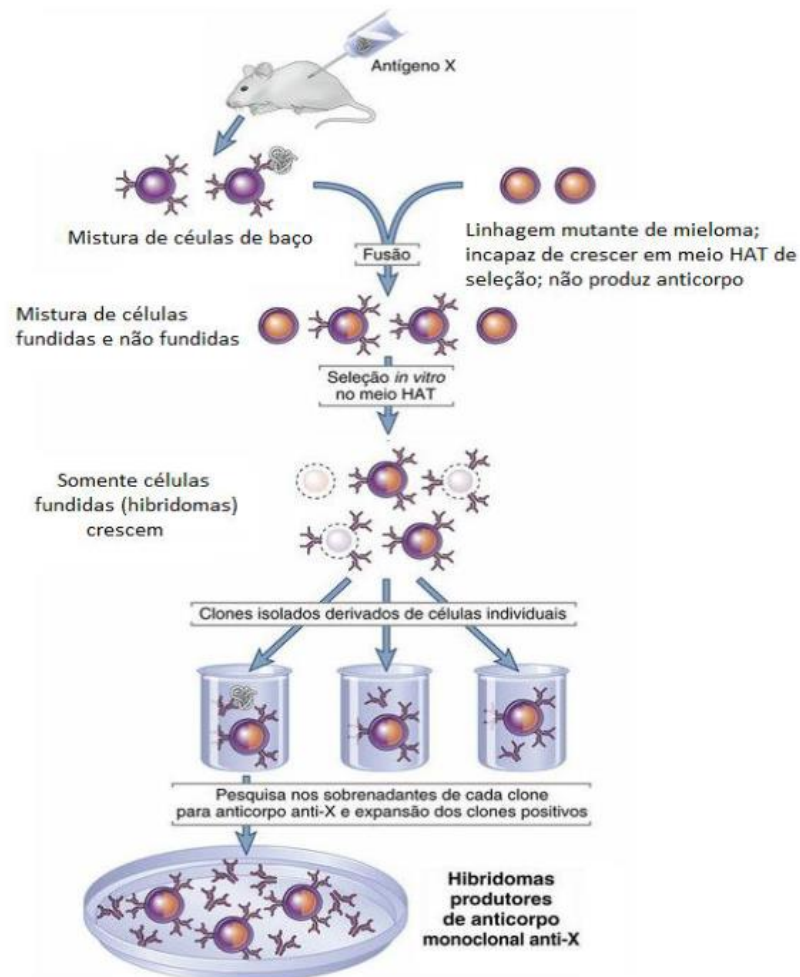
Cada uma dessas funções é desempenhada por diferentes partes do anticorpo. A região do fragmento cristalizável (*fragment crystallizable region* - Fc) é a região do anticorpo que interage com receptores de Fc presentes em algumas células, assim como a região que interage com algumas proteínas do sistema complemento. Essa propriedade permite com que os anticorpos ativem o sistema imune. Existem cinco classes distintas de anticorpos, as quais são chamadas de IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, sendo que o Fc de IgGs possuem um sítio de N-glicosilação altamente conservado.

A segunda região é a chamada região Fab. Essa região é a que se liga ao antígeno. Ela é formada por um domínio constante e um domínio variável de cada uma das cadeias leves e pesadas.

Avanços no desenvolvimento e viabilidade comercial de reagentes baseados em anticorpos e o potencial clínico dos mesmos deu ímpeto ao desenvolvimento de terapias baseadas em anticorpos. Os mAbs podem ser desenvolvidos via diferentes plataformas, como hibridoma, estratégias recombinantes (*phage* e *yeast display*), sorteamento de células B específicas e

cultura de células B, além de animais transgênicos (que por serem proprietários, não iremos abordar nesta introdução).

A tecnologia de hibridoma (**FIGURA 5**) é um método tradicional de isolamento de mAbs e foi inventado por Georges Köhler e Cesar Milstein em 1975, pesquisadores agraciados com o Nobel em Fisiologia e Medicina (1984) pelo desenvolvimento dessa técnica (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). O hibridoma é o produto de fusão de uma célula de mieloma com um linfócito B normal. Em geral, usam-se célula de camundongos, nos quais os mielomas são gerados através da fusão de linfócitos B de camundongos imunizados com um antígeno contra o qual se deseja obter os mAbs.



**FIGURA 5: Tecnologia de hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais.** Na tecnologia de hibridoma, as células B de animais previamente imunizados com o antígeno de interesse são fusionadas a células pertencentes a uma linhagem de mieloma incapaz de crescer em meio HAT de seleção. Apenas células híbridas (hibridomas) são capazes de proliferar nesse

meio. Após *screening*, as células produtoras do anticorpo de interesse são identificadas e clonadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Uma característica das células de mieloma é que elas são de linhagens mutantes, não secretoras de anticorpos e que não expressam o gene para a enzima Hipoxantina guanina fosforribosil transferase, HGPRT (do inglês, *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*). Para o crescimento do hibridoma, emprega-se meio de cultura HAT que contém hipoxantina, aminopterina e timidina. Como as células de mieloma não possuem a enzima HGPRT, elas não são capazes de utilizar a hipoxantina na síntese de DNA e, portanto, morrem em meio HAT. Por sua vez, os linfócitos B normais não conseguem sobreviver em meio de cultura além de algumas semanas e, dessa forma, também morrem. Sendo assim, somente as células híbridas conservam a propriedade de imortalidade proveniente das células de mieloma e, como adquirem o gene codificante da HGPRT do linfócito B parental normal, podem sobreviver em cultura.

Após o crescimento no meio HAT, os híbridos são selecionados e a presença do anticorpo de interesse é detectada, usualmente via ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Os hibridomas assim identificados são clonados e os anticorpos monoclonais, isolados.

O primeiro mAb aprovado para uso clínico e isolado via tecnologia de hibridoma foi o OKT3 (muromonab). Esse biofármaco é um mAb anti-CD3, utilizado no tratamento a rejeição a transplantes, atuando via inibição da ativação de células T (liga-se ao antígeno CD3 e gera uma resposta imunossupressora). Por ser de origem murina, seu uso, todavia, é limitado, pois um número significativo de pacientes desenvolvem anticorpos anti-OKT3, o que compromete a terapia (KIMBALL et al., 1995). É a chamada resposta HAMA (*human anti-mouse antibody*).

No final dos anos 80, adotando a tecnologia de DNA recombinante, moléculas quiméricas de anticorpos que continham a região constante de origem humana e a parte variável de origem murina foram desenvolvidas. Tais anticorpos quiméricos diminuem o risco de ocorrência de resposta de anticorpos

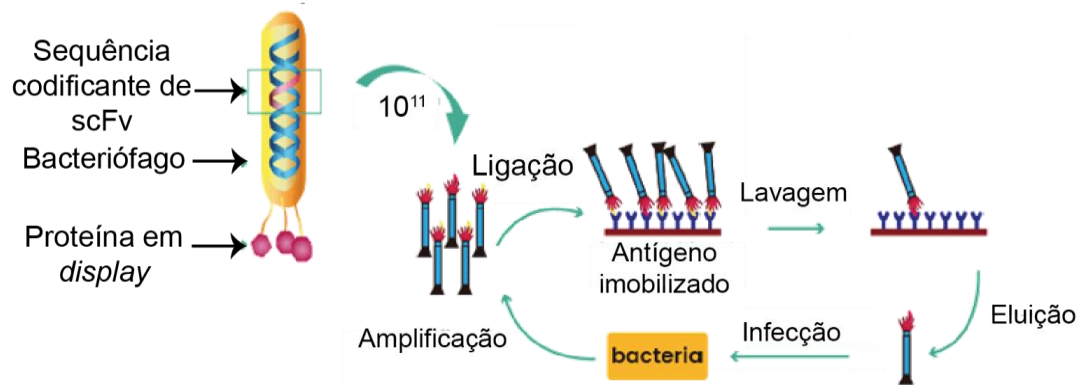
humanos contra aqueles de origem murina (HAMA). Com o objetivo de diminuir ainda mais as respostas do tipo HAMA, anticorpos humanizados foram desenvolvidos através do enxerto de Regiões Determinantes de Complementariedade (CDRs) de origem murina nas regiões variáveis de anticorpos humanos. Apesar de não eliminar por completo a ocorrência de respostas do tipo HAMA, o processo de humanização ajuda a reduzir significativamente esse efeito indesejado (STEPHENS et al., 1995).

Além do problema relacionado à resposta HAMA, uma outra limitação da tecnologia de hibridoma consiste na dependência de imunização do animal com o antígeno alvo. Caso esse antígeno seja pouco imunogênico ou altamente tóxico, o processo de imunização poderá gerar uma resposta imune fraca ou ocasionar a morte do animal. Em ambos os casos, haverá a impossibilidade de se isolar anticorpos de alta afinidade.

Outras tecnologias alternativas para o isolamento de mAbs consistem em métodos de *display*, como o *phage display* de anticorpos (PhDA). A técnica de *phage display* foi desenvolvida em 1985 por George Smith (GP, 1985) e, em 1990, McCafferty e colaboradores demonstraram o uso dessa técnica na produção de anticorpos (MCCAFFERTY et al., 1990). Desde então, essa tecnologia vem sendo amplamente utilizada, resultando na descoberta de anticorpos de aplicação clínica (NAGANO; TSUTSUMI, 2021). Por terem estabelecido a tecnologia do *phage display* e do *display* de anticorpos, George P. Smith e Gregory P. Winter, respectivamente, foram laureados com o Prêmio Nobel em química em 2018.

O PhDA (**FIGURA 6**) consiste na criação de um repertório combinatorial de cadeias variáveis leves e pesadas de anticorpos e a expressão desse repertório em fusão com proteínas de superfície de bacteriófagos. Essas bibliotecas são então varridas contra um alvo molecular que pode estar imobilizado em placas de poliestireno e, após sucessivas lavagens, apenas os bacteriófagos que apresentam anticorpos que se ligam ao alvo em estudo são retidos. Estes são recuperados e amplificados via infecção bacteriana. Vários ciclos de seleção são realizados, de modo a amplificar e enriquecer a população de fagos que apresentam afinidade ao alvo em estudo. Esse sistema permite a fusão de

informações genóticas e fenóticas de um anticorpo a uma única partícula viral.



**FIGURA 6: Phage display de anticorpos.** Ilustração do processo de seleção via *phage display*. Os fagos apresentando diferentes anticorpos (cerca de  $10^{11}$  partículas virais) no formato scFv são incubados com o alvo de interesse. Os scFvs que interagem com o alvo são preferencialmente selecionados.

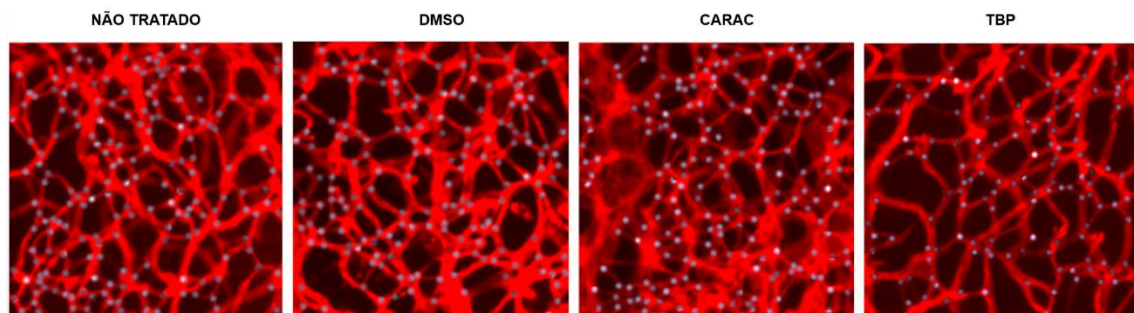
Além disso, a natureza robusta e alta estabilidade de bacteriófagos permite com que condições mais adversas, como valores extremos de pH, salinidade, temperatura, etc. possam ser empregadas durante o processo de isolamento de anticorpos, já que as partículas virais não perdem sua infectividade sob tais condições.

Uma das principais limitações do PhDA consiste em gerar uma biblioteca ou ter acesso a uma biblioteca, sendo a diversidade, ou seja, o número estimado de elementos distintos presentes nessa coleção, o principal parâmetro para se avaliar a complexidade de uma biblioteca.

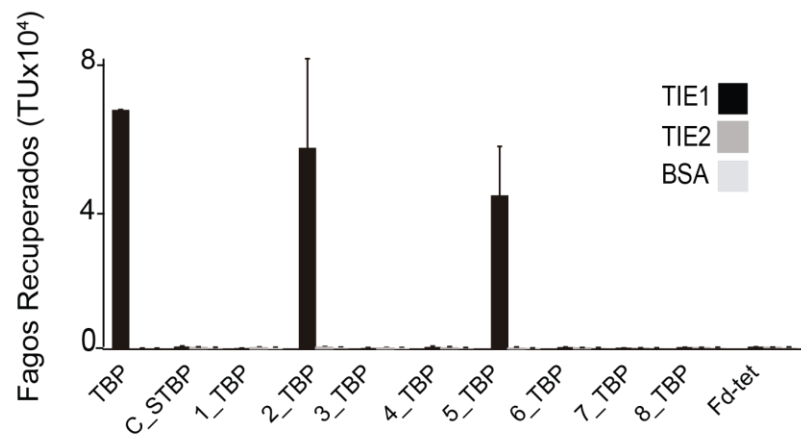
Visando contornar as limitações encontradas no processo de geração de anticorpos monoclonais, assim como desenvolver novas moléculas capazes de modular o processo angiogênico, nosso trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte, desenvolvemos um método alternativo para gerar anticorpos monoclonais partindo de um peptídeo ligante da porção extracelular de Tie1. Esse método de desenho racional de anticorpos (SORMANNI et al., 2015; SORMANNI; APRILE; VENDRUSCOLO, 2018) é baseado na combinação de *phage display* de peptídeos e *phage display* de anticorpos. Ligantes selecionados via *phage display* de peptídeos tendem a ser biologicamente

ativos, assim como costumam ser direcionados a sítios biologicamente relevantes presentes nas proteínas alvo (MOLEK; STRUKELJ; BRATKOVIC, 2011). Esses peptídeos podem então ser engenheirados dentro da estrutura de anticorpos, de modo a se desenvolver bibliotecas de anticorpos. Essas bibliotecas possuem a vantagem de serem pré-direcionadas ao alvo em estudo e, além disso, por serem baseados em peptídeos com atividade biológica, os anticorpos isolados por essa metodologia tendem a reter essa atividade.

Nosso grupo isolou por *phage display* um peptídeo ligante da porção extracelular de Tie1 (TBP). Esse peptídeo é derivado de uma biblioteca CX8C (onde C indica o aminoácido cisteína, e X, qualquer aminoácido), portanto, é um peptídeo cíclico que apresenta 8 resíduos de aminoácidos em sua composição. A caracterização desse peptídeo, realizada pela Dra. Leila (MAGALHÃES, 2016) mostrou duas características importantes para esse trabalho: o peptídeo possui ação de inibição da angiogênese em um modelo animal de retinopatia induzida por oxigênio (OIR) (**FIGURA 7**) e os resíduos localizados nas posições 2 e 5 não são críticos para a ligação à porção extracelular de Tie1 (**FIGURA 8**).



**FIGURA 7: O peptídeo TBP reduz a angiogênese *in vivo*.** Camundongos C57Bl/6 do modelo OIR em P15 foram tratados com uma única injeção intraocular (1  $\mu$ L) de DMSO (Veículo), peptídeo controle CARAC (100  $\mu$ g) ou com o peptídeo TBP (100  $\mu$ g). As retinas foram coradas com isolectina-B4 conjugada a Alexa-594. Pontos brancos indicam bifurcações de vasos sanguíneos.



**FIGURA 8: Identificação dos resíduos importantes para a interação do peptídeo TBP com Tie1.** O fago TBP, assim como os demais fagos contendo mutações (substituições individuais de cada resíduo de aminoácido por uma alanina ou, no caso das cisteínas, por serinas) foram incubados com Tie1, Tie2 ou BSA, imobilizados em placa. Após lavagem, os fagos ligados aos receptores foram quantificados por infecção bacteriana. O fago Fd-tet (fago selvagem que não apresenta peptídeos) foi utilizado como controle negativo para o ligante e Tie2 e BSA foram utilizados como controles da proteína. O *input* de fagos foi  $10^8$  por poço. O gráfico mostra a média de três experimentos independentes. Barras representam o desvio padrão de experimentos feitos em triplicata.

Na segunda parte de nosso estudo, buscamos isolar ligantes de receptores celulares que possam estar envolvidos no processo de angiogênese, utilizando, como base, dados gerados em nosso grupo ao estudar o transcriptoma de retinas de camundongos submetidos a um modelo de retinopatia induzido por oxigênio (GUARISCHI-SOUSA et al., 2019).

A retinopatia induzida por oxigênio (*Oxygen-induced retinopathy* - OIR) mimetiza uma doença humana, a retinopatia da prematuridade, assim como outras retinopatias isquêmicas que ocorrem em humanos. Por isso, o modelo murino se tornou um dos mais utilizados e mais importantes para o entendimento da angiogênese da retina. Nesse modelo, camundongos recém-nascidos (7 dias pós-nascimento – P7) são colocados em um ambiente com 75% de oxigênio até o 12º dia pós nascimento (P12). P7-P12 define a fase em que ocorre a regressão dos vasos imaturos. Em P12, os camundongos são reinsertos em um ambiente de normóxia, fato este que resulta em hipóxia nas regiões que sofreram vaso-obliteração e, simultaneamente, há a produção de fatores pró-angiogênicos. Esses fatores induzem uma neovascularização patológica na retina. Essa



neovascularização, iniciada em P12, tem seu pico em P17. O reparo vascular continua e, com a diminuição dos fatores pró-angiogênicos, a neovascularização começa a regredir e é resolvida em P25. Em geral, a vaso-obliteração é estudada em P8 ou P12, ao passo que a neovascularização é examinada em P17 (KIM; D'AMORE; CONNOR, 2016).

A descoberta de novos fármacos é um processo multifacetado que requer a análise de milhares de candidatos em potencial utilizando ferramentas adequadas de *screening in vitro*. Dada a alta reprodutibilidade do processo de síntese, baixos custos de produção além de sua biocompatibilidade, peptídeos estão recebendo uma crescente atenção da indústria farmacêutica (OBEXER; WALPORT; SUGA, 2017). O mercado global de peptídeos terapêuticos foi avaliado em \$ 35 bilhões em 2021 e é estimado que atinja \$ 74 bilhões em 2028 (ZION MARKET RESEARCH, 2022). Peptídeos são biomoléculas formadas por 2-50 aminoácidos que são úteis no estudo de interações proteína-proteína graças à sua alta seletividade.

Um dos avanços mais importantes no descobrimento de novos fármacos está relacionado à farmacologia reversa, que consiste em identificar um alvo em particular (receptor, via ou gene) que está envolvido no desenvolvimento e progressão de uma doença. Após essa seleção, é realizado um *screening* de bibliotecas de compostos contra esse alvo, o que permite a identificação de um *pool* de moléculas que interagem especificamente com esse receptor. Nesse sentido, a técnica de *phage display* de peptídeos é uma ótima ferramenta para a descoberta de novos fármacos.

Nesse contexto, buscamos utilizar os dados do transcriptoma de retinas de camundongos submetidos ao modelo OIR para selecionar possíveis alvos moleculares relevantes no processo angiogênico e, utilizando a técnica de *phage display*, isolar peptídeos que, ao interagirem com tais alvos, possam modular esse processo.

## 2. Objetivos

Tendo em vista a importância da angiogênese em diversos processos patológicos, o papel do Sistema Ang/Tie na angiogênese patológica, a escassez de fármacos direcionados a esse sistema e a falta de conhecimento acerca do receptor Tie1, o presente estudo tem como objetivo os seguintes pontos:

### OBJETIVO GERAL:

Desenvolver biofármacos anti-angiogênicos para o tratamento de doenças dependentes de angiogênese.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Criar uma plataforma para o desenvolvimento racional de biofármacos do tipo anticorpos monoclonais.

Identificar e validar novos moduladores da angiogênese patológica.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Construção da biblioteca TBPpHigh

Um total de 10 µg de oligonucleotídeos, obtidos da empresa Exxtend, foram anelados (5 min – 95 °C, 5 min – 75 °C, 5 min – 65 °C, 5 min – 37 °C) e os *overhangs* 5' preenchidos via reação com a enzima Klenow (extensão realizada de acordo com protocolo do vendedor - Thermo Fisher Scientific). O inserto foi então purificado via etanol/acetato de sódio e digerido com as enzimas KpnI e XhoI (segundo o procedimento recomendado pelo fabricante). O vetor pHigh também foi digerido com as mesmas enzimas. Para a ligação, 30 µg de vetor e 1,7 µg de inserto foram ligados (protocolo de acordo com protocolo da enzima ligase). Para mais detalhes, verifique figuras 9 e 10. O produto de ligação foi precipitado via etanol/acetato e eletroporado na cepa TG1, que foi recuperada em meio SOC e plaqueada em LB-AGAR com ampicilina 50 µg/mL e glicose 3%. As colônias então foram coletadas e crescidas em meio 2xTY com ampicilina 50 µg/mL e glicose 3% a 37 °C, 200 rpm até DO 0,6 e infectadas com o fago *Helper* (10<sup>10</sup> PFU/mL) por 30 minutos. Após isso, as células foram centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos) e o meio substituído por 2xTY com ampicilina 50 µg/mL e Kanamicina 50 µg/mL. A cultura foi então mantida a 30°C, 200 rpm por 20 horas para a produção dos fagos. No dia seguinte, os fagos foram precipitados conforme GIORDANO, et al, 2001. Para mais detalhes, verifique figuras 9 e 10 nas páginas 34 e 35, respectivamente.

#### 3.2 Titulação de fagos

Os fagos foram titulados por diluição seriada em PBS, por meio de infecção em *E. coli* TG1, e semeados em LB-Agar contendo ampicilina 50 µg/mL. O número de unidades transdutoras de bactérias (TU) foi calculado contando-se as colônias obtidas.

#### 3.3 Seleção de scFvs ligantes de Tie1

Poços de placas de 96 poços foram sensibilizados com 200 ng do receptor (obtido comercialmente pela R&D Systems) a 4°C, durante a noite. No dia

seguinte, a solução PBS/receptor foi removida, os poços foram lavados com 200 µL de PBS 1X e então bloqueados com 200 µL de BSA 5% durante 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e adicionado fagos da biblioteca de scFv. Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, a solução de fagos foi removida e os poços lavados com 200 µL de PBS dez vezes, sendo a eluição dos fagos realizada por eluição ácida (GLICINA, 0,1M, pH 2.1, e neutralização com tampão TRIS 1M, pH 8,0). Os fagos ligantes aos receptores foram recuperados por infecção de 200 µL de bactéria TG1 (Densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 0,5) durante 30 minutos e plaqueados em LB-AGAR com ampicilina 50 µg/mL e glicose 3%. As colônias então foram coletadas e crescidas em meio 2xTY com ampicilina 50 µg/mL e glicose 3% a 37 °C, 200 rpm até DO 0,6 e infectadas com o fago *Helper* ( $10^{10}$  PFU/mL) por 30 minutos. Após isso, as células foram centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos) e o meio substituído por 2xTY com ampicilina 50 µg/mL e Kanamicina 50 µg/mL. A cultura foi então mantida a 30°C, 200 rpm por 20 horas para a produção dos fagos. No dia seguinte, os fagos foram precipitados. Esse ciclo foi repetido duas vezes.

### **3.4 Ensaio de ligação dos scFVs selecionados para verificação de especificidade.**

Ensaio de ligação, a partir do(s) fago(s) selecionado(s), foram realizados em placas de 96 poços com as proteínas Tie1, Tie2, VEGFR1,2 e 3, todos humanos, além de BSA, imobilizadas (200 ng, durante a noite). Os fagos foram incubados com as proteínas mencionadas nas mesmas condições em que o *panning* foi realizado. Após 1 hora e 30 minutos, a solução de fagos foi removida e os poços foram lavados com 200 µL de PBS dez vezes. Os fagos ligantes foram recuperados por infecção em bactéria TG1 (Densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 1,8) durante 30 minutos, plaqueados em LB ágar (kanamicina 50 µg/mL e tetraciclina 40 µg/mL) e incubados a 37°C durante a noite. As unidades transformantes foram contadas no dia seguinte. O número de Unidades Transformantes (TUs) foi obtido a partir do plaqueamento dos fagos recuperados em cada ensaio.

### 3.5 ELISA de fago (FLISA)

Placas de 96 poços foram sensibilizadas durante a noite com 100 ng das proteínas. Os fagos foram incubados com as proteínas mencionadas nas mesmas condições em que o *panning* foi realizado. Após 1 hora, a solução de fagos foi removida e os poços foram lavados com 200 µL de PBS TWEEN20 0,1% três vezes. Um anticorpo anti-bacteriófago Fd conjugado à biotina (1:1000) (Sigma-Aldrich) foi incubado por 2 horas a temperatura ambiente, sendo a solução removida e os poços lavados com 200 µL de PBS três vezes. A detecção foi realizada com streptavidina conjugada ao fluoróforo CW680nm, incubado por 1 hora a temperatura ambiente, sendo a solução removida e os poços lavados com 200 µL de PBS três vezes, 1 vez com água destilada e secos a 37 °C.

### 3.6 Produção, purificação e biotilação de anticorpo *single chain*

A cepa C41 foi transformada com o plasmídeo TBPHigh1 e crescida em meio 2xTY com ampicilina 50 µg/mL a 37 °C, 200 rpm até DO 0,6. A indução foi realizada com 1 mM de IPTG. A cultura foi então mantida a 30°C, 200 rpm por 20 horas para a produção dos anticorpos *single chain*. A proteína foi extraída da fração periplasmática segundo iGEM 2014 e purificada via coluna de níquel. Após purificação, a proteína foi biotinilada com o kit da EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit - Thermo Fisher e dialisada contra tampão 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl.

### 3.7 ELISA de anticorpo *single chain*

Protocolo semelhante ao FLISA, as lavagens foram realizadas apenas com PBS.

### 3.8 Produção de scFv-Fc em levedura

Para a produção dos anticorpos no formato de scFv-Fc, utilizamos a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* YVH10. As cepas transformadas com os plasmídeos para a expressão de nossas construções foram crescidas em meio

mínimo, contendo 20 µg/mL de uracila e 2% de glicose, a 300 rpm e 30°C. No dia seguinte, a cultura foi diluída para a DO final de 0,1 em meio *drop out* de triptofano, contendo 2% de frutose e crescida durante a noite a 300 rpm e 30°C. No dia seguinte, a cultura foi transferida para um novo meio *drop out* de triptofano, contendo 2% de frutose e 2% de galactose e crescida por 48h a 300 rpm e 20°C. Após esse período, o meio de cultura foi coletado, dialisado contra 20mM TRIS-HCl, pH 8,0 e 200 mM NaCl e purificado via proteína G (GE healthcare).

### **3.9 Ensaio de ligação com competidores.**

Para validar a interação entre peptídeos específicos e a proteína alvo, realizamos ensaios de ligação (Giordano et al., 2001). Fagos apresentando peptídeos específicos selecionados nos *pannings* e fagos controle foram incubados com 200 ng dos receptores (Tie1 ou gp130) (disponíveis comercialmente R&D Systems). Inicialmente, 200 ng de proteína solubilizada em 50 µl de PBS foram imobilizadas em poços de placa de 96 poços durante a noite a 4 °C. A proteína foi removida e o poço foi lavado com PBS, duas vezes; bloqueado com PBS contendo 3% BSA por 1 hora a temperatura ambiente e incubado com partículas de fagos apresentando peptídeos específicos ( $10^8$  TU em 50 µl de PBS contendo 3% BSA), juntamente com quantidades variáveis de competidores: peptídeo TBP ou ômega e peptídeo controle CARAC (Bachem Company) em diferentes concentrações. Após 2 horas a temperatura ambiente, o poço foi lavado com PBS, 10 vezes. Os fagos ligantes foram recuperados por infecção com *E. coli* K91kan (GIORDANO et al., 2001) e plaqueados em diluições apropriadas em meio LB-ágar contendo tetraciclina (40 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL), no caso do fago ômega, ou por infecção com *E. coli* TG1 (Densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 0,4) durante 30 minutos, plaqueados em LB ágar com ampicilina 50 µg/mL e incubados a 37°C durante a noite para a contagem das colônias individuais, no caso dos fagos scFv.

### **3.10 Yeast Display**

Para a realização do *Yeast Display*, utilizamos a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100. As cepas transformadas com os plasmídeos para a

expressão de nossas construções foram crescidas em meio mínimo, contendo 20 µg/mL de leucina e 2% de glicose (agitação, 300 rpm a 30°C). No dia seguinte, a cultura foi diluída para a DO final de 0,1 em meio *drop out* de triptofano, contendo 2% de frutose e crescida durante a noite (300 rpm a 30°C). No dia seguinte, a cultura foi transferida para um novo meio *drop out* de triptofano, contendo 2% de frutose e 2% de galactose e crescida por 48h a 300 rpm e 20°C. Após esse período, as células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com anticorpo primário anti-B13 por 1 hora. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário marcado CW 800nm por 1 hora, lavadas três vezes com PBS, colocadas em uma lâmina e visualizadas em microscópio fluorescente.

### 3.11 Construção do vetor pHigh2

A sequência de clonagem múltipla do vetor pCTcon2 foi clonada com os primers forward 5'-TATATAACGCGTTCAGAAATAAGCTTTTG-3' e reverse 5'-TATATAGACGTCCTCGAGTTAGGCGGTAGCGGAGGCGGAG-3'. O amplicon foi então purificado via etanol/acetato de sódio e digerido com as enzimas MluI e AatII (seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante). O vetor pHigh também foi digerido com as mesmas enzimas. O amplicon foi então clonado no vetor. Este novo vetor foi então digerido com as enzimas Sall e NheI. O linker presente no vetor pHigh foi amplificado utilizando os primers *forward* 5'-TATATAGTCGACGGTGGTGGTGGTAG-3' e *reverse* 5'-TATATAGCTAGCGCTACCTCCGCCACC-3'. O amplicon foi então purificado via etanol/acetato de sódio e digerido com as enzimas Sall e NheI e inserido no vetor previamente digerido, resultando, desde modo, no vetor final.

### 3.12 Amplificação de Cadeias leves de anticorpos humanos

O sangue (venoso) de quatro indivíduos foi coletado em tubo heparinizado e os PBMCs purificados via gradiente de Ficoll (SAPKOTA; ABSTRACT, 2016). O RNA total das células foi extraído via TRIzol (RIO et al., 2010) e convertido em cDNA utilizando a enzima SuperScript III da Invitrogen conforme indicado pelo fabricante. A amplificação das duas cadeias foi realizada com a enzima PCR BIO HiFi Polymerase. Para a cadeia leve variável do tipo lambda, cada primer *forward*

foi misturado com um mix dos primers *reverse* nas concentrações indicadas pelo fabricante. A reação utilizada foi a seguinte: 95 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 95 °C-15 segundos, 75 °C-15 segundos e 72 °C-15 segundos. Para a cadeia leve variável do tipo kappa, cada primer *forward* foi misturado com um mix dos primers *reverse* nas concentrações indicadas pelo fabricante. A reação utilizada foi a seguinte: 95 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 95 °C-15 segundos, 70 °C-15 segundos e 72 °C-15 segundos. O material foi clonado no vetor pHigh2\_TBPHigh1.

Primers *FORWARD* para Cadeia Variável Humana Leve Kappa (com sítio de MluI)

VK1\_F\_(MluI): TATATAACGCGTGACATCCRGDTGACCCAGTCTCC

VK2\_F\_(MluI): TATATAACGCGTGATATTGTGMTGACBCAGWCTCC

VK3\_F\_(MluI): TATATAACGCGTGAAATTGTRWTGACRCAGTCTCC

VK4\_F\_(MluI): TATATAACGCGTGAAACGACACTCACGCAGTCTC

Primers *FORWARD* para Cadeia Variável Humana Leve Lambda (com sítio de MluI)

VL1\_F\_(MluI): TATATAACGCGTCAGTCTGTSBTGACGCAGCCGCC

VL2\_F\_(MluI): TATATAACGCGTCAGCCTGTGCTGACTCARYC

VL3\_F\_(MluI): TATATAACGCGTCAGCCWKGCTGACTCAGCCMCC

VL4\_F\_(MluI): TATATAACGCGTCAGTCTGYCTGAYTCAGCCT

VL5\_F\_(MluI): TATATAACGCGTTCCTATGWGCTGACWCAGCCAA

VL6\_F\_(MluI): TATATAACGCGTTCCTCTGAGCTGASTCAGGASCC

VL7\_F\_(MluI): TATATAACGCGTTCCTATGAGCTGAYRCAGCYACC

VL8\_F\_(MluI): TATATAACGCGTAATTTTATGCTGACTCAGCCCC



VL9\_F\_(MluI): TATATAACGCGTCAGDCTGTGGTGACYCAGGAGCC

Primers *REVERSE* para Cadeia Variável Humana Leve Kappa (com sítio Sall)

VK1\_R(Sall): TATATAgtcgac ACC TTT GAT YTC CAC CTT GGT CCC

VK2\_R(Sall): TATATAgtcgac ACC TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC

VK3\_R(Sall): TATATAgtcgac ACC TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC

VK4\_R(Sall): TATATAgtcgac ACC TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC

Primers *REVERSE* para Cadeia Variável Humana Leve Lambda (com sítio Sall)

VL1\_R(Sall): TATATAgtcgac GCC TAG GAC GGT CAS CTT GGT SCC

VL1\_R(Sall): TATATAgtcgac GCC TAA AAT GAT CAG CTG GGT TCC

VL1\_R(Sall): TATATAgtcgac GCC GAG GAC GGT CAG CTS GGT SCC

### **3.13 Seleção de peptídeo ligante a OSMR $\beta$ , LIFR e gp130 por *Phage Display***

Placa de 96 poços foi sensibilizada com 200 ng dos receptores (obtidos comercialmente pela R&D Systems) a 4°C, durante a noite. No dia seguinte, a solução PBS/receptor foi removida, os poços foram lavados com 100  $\mu$ L de PBS 1X e então bloqueados com 200  $\mu$ L de BSA 5% durante 2 horas, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida e adicionado fagos da biblioteca CX8C OU X6 (onde X representa qualquer aminoácido e C, o aminoácido cisteína). Após 2 horas de incubação a temperatura ambiente, a solução de fagos foi removida e os poços lavados com 200  $\mu$ L de PBS nove vezes. Os fagos ligantes aos receptores foram recuperados por infecção de 200

$\mu\text{L}$  de bactéria K91 (Densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 1,8) durante 30 minutos e posteriormente transferidos para 20 mL de LB (Kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e Tetracilina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubados durante 18-20 horas em incubador, sob agitação de 100 rpm, 37°C. Para controle da infectividade, a bactéria foi infectada, em paralelo, pelo fago Fd e plaqueada em placa de LB Ágar (Kan/Tet). No dia seguinte, os fagos foram precipitados (conforme (GIORDANO, et al, 2001) e mais 2 rounds de *Phage Display* foram realizados.

#### **3.14 Ensaio de ligação do(s) peptídeo(s) selecionado(s) para verificação de especificidade.**

Ensaio de ligação, a partir do(s) fago(s) selecionado(s), foram realizados em placas de 96 poços com as proteínas OSMR $\beta$  humano, gp130 humano, LIFR humano e BSA imobilizadas (200 ng/poço durante a noite). Os fagos foram incubados com as proteínas mencionadas nas mesmas condições em que o *panning* foi realizado. Após 1 hora e 30 minutos, a solução de fagos foi removida e os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS nove vezes. Os fagos ligantes foram recuperados por infecção em bactéria K91 (Densidade ótica de 600 nanômetros em torno de 1,8) durante 30 minutos, plaqueados em LB ágar (kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e tetraciclina 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubados a 37°C, durante a noite. As unidades transformantes foram contadas no dia seguinte. O número de Unidades Transformantes (TUs) foi obtido a partir do plaqueamento dos fagos recuperados em cada ensaio.

#### **4.15 Análises Estatísticas**

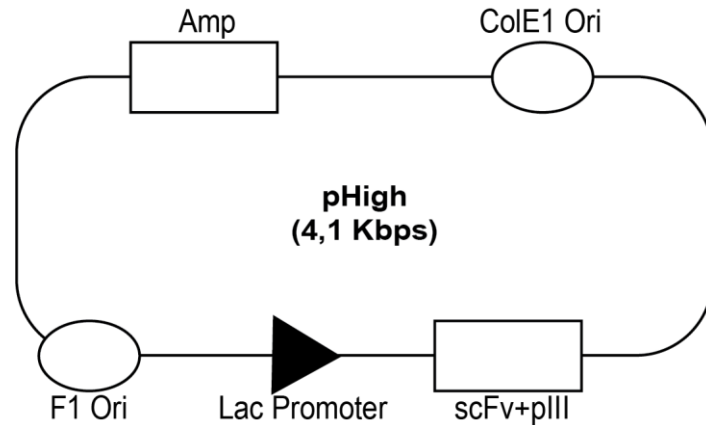
A significância estatística foi determinada por ANOVA *Tukeys multiple comparison test* ou teste *Student's t*. As comparações foram feitas utilizando o programa *Prism GraphPad* e a significância estatística foi configurada para um *p value* menor que 0,05.

## 4. Resultados

### Parte 1 - Criar uma plataforma para o desenvolvimento racional de biofármacos do tipo anticorpos monoclonais.

#### 4.1 Vetor fagemídeo (pHigh) para a construção de uma biblioteca de anticorpos.

Nosso laboratório desenvolveu um vetor fagemídeo, denominado pHigh, que codifica uma cadeia variável leve e uma cadeia variável pesada de uma IgG consenso humana, unidas por uma ponte de glicina/serina (formando um *single chain* - scFv) e fusionadas à proteína pIII truncada do bacteriófago Fd, sob o controle do promotor Lac. Entre as sequências codificantes do *single chain* e da pIII existe um códon amber, de modo com que a construção pode ser expressa em cepas supressoras para a montagem das partículas virais e execução do *phage display*, assim como expresso em células não-supressoras, de modo a produzir apenas anticorpos no formato de scFv. A construção desse vetor foi feita pelo Dr. André Teixeira de tal modo que as sequências que codificam as regiões determinantes de complementariedade 3 da cadeia variável pesada (HCDR3) possam ser removidas e substituídas por qualquer sequência de interesse. Além disso, a presença do peptídeo sinal da proteína DsbA permite com que o scFv seja exportado para região do periplasma pelo sistema de secreção bacteriano Sec e uma sequência de seis histinas na região C-terminal do scFv permite que a construção seja prontamente purificada por cromatografia de afinidade a metal (**FIGURA 9**).

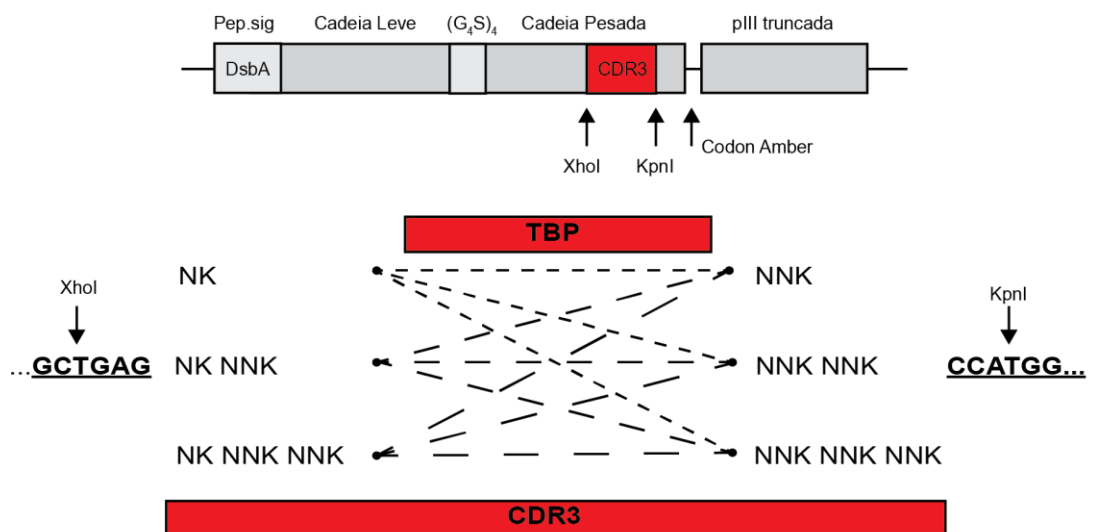


**FIGURA 9: Desenho do vetor pHigh.** O vetor pHigh é um vetor fagemídeo construído em nosso laboratório para a realização de *phage display* de anticorpos. A expressão do scFv (cadeia variável leve e uma cadeia variável pesada de uma IgG consenso humana) está sob controle do promotor Lac. A construção pode ser expressa em cepas supressoras para a montagem da partículas virais e execução do *phage display*, assim como expresso em células não supressoras, de modo a produzir anticorpos no formato de scFv.

#### 4.2 Design e construção da biblioteca de scFv direcionada contra Tie1.

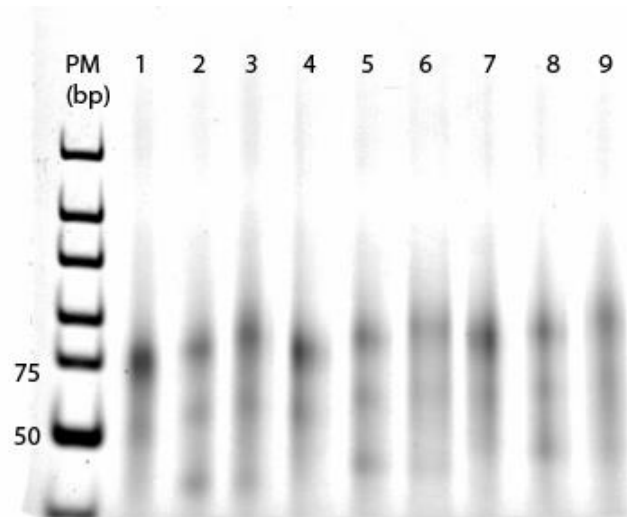
O desenvolvimento de anticorpos, como citado anteriormente, é um processo que depende da utilização do sistema imune e/ou de bibliotecas complexas para se isolar anticorpos contra determinado alvo. Nosso trabalho se iniciou com o intuito de criar uma plataforma para o desenvolvimento racional de biofármacos do tipo anticorpos monoclonais, de modo a simplificar tanto o processo de produção de bibliotecas, quanto a reduzir/eliminar a necessidade de utilização de componentes do sistema imune para tal feito. Iniciamos nosso trabalho com o peptídeo TBP e o design de scFv baseados nesse peptídeo. Como o CDR3 da cadeia pesada (HCDR3) é a região do anticorpo que promove contatos mais extensivos entre antígeno e anticorpo, essa região foi selecionada para se inserir a sequência codificante do peptídeo TBP, de modo a pré-direcionar o scFv ao receptor Tie1. Além disso, sequências codificando um, dois ou três aminoácidos antes ou depois da sequência de TBP foram inseridas de modo a permitir com que o peptídeo TBP atingisse um melhor ajuste dentro do HCDR3, tanto em relação ao tamanho da alça, quanto em relação à sua composição de aminoácidos. Além disso, como os resíduos 2 e 5 de TBP não

eram críticos para a ligação à porção extracelular de Tie1, códons degenerados codificando para qualquer um dos 20 aminoácidos naturais foram inseridos nessas duas posições. Uma outra degeneração também foi inserida para substituir as duas cisteínas presentes na sequência de TBP por serinas ou treoninas. Isso foi feito pois cisteínas não são comumente encontradas no HCDR3 (**FIGURA 10**). Considerando todas as possibilidades de construtos em *frame*, nossa biblioteca poderia gerar, teoricamente, cerca de  $7,1 \times 10^9$  diferentes scFv.



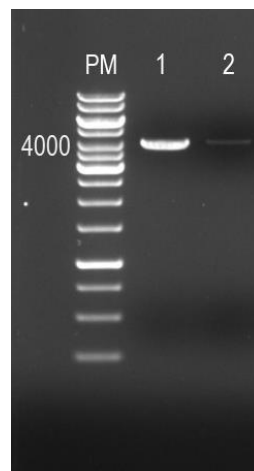
**FIGURA 10: Design de scFv baseados no peptídeo TBP.** A sequência codificante do peptídeo TBP foi inserida dentro do CDR3 da cadeia pesada do nosso vetor pHigh, utilizado para o *phage display* de anticorpos. Nosso design permitia a obtenção de cerca de  $7,1 \times 10^9$  diferentes scFv. N = nucleotídeos guanina (G), adenina (A), citosina (C) ou timina (T). K = nucleotídeos guanina (G) ou timina (T).

Uma vez tendo concluído o design da nossa biblioteca, iniciamos sua construção. Oligonucleotídeos codificando as sequências desenhadas foram encomendados, misturados e tratados com o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase para a obtenção de DNA fita dupla (**FIGURA 11**). Isso foi possível porque os oligonucleotídeos se anelavam entre si, servindo de primer para a DNA polimerase Klenow.



**FIGURA 11: Preparo dos insertos a serem clonados.** Os diferentes oligonucleotídeos foram combinados e tratados com o fragmento Klenow da enzima DNA polimerase para a obtenção de DNA fita dupla. PM = peso molecular (pares de base - bp), 1 = Primer 1F/1R; 2 = Primer 1F/2R; 3 = Primer 1F/3R; 4 = Primer 2F/1R; 5 = Primer 2F/2R; 6 = Primer 2F/3R; 7 = Primer 3F/1R; 8 = Primer 3F/2R; 9 = Primer 3F/3R; Gel de poliacrilamida 8%.

Após a obtenção de DNA fita dupla, o material foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e KpnI, assim como o vetor pHigh (**FIGURA 12**). Adicionalmente, o vetor foi desfosforilado para impedir sua recircularização.



**FIGURA 12: Preparo do vetor pHigh.** O vetor pHigh, cujo tamanho é de 4141 pares de bases foi digerido com as enzimas de restrição KpnI e XhoI, além de ter sido desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina. PM = peso molecular (pares de bases), 1 = Vetor pHigh; 2 = Vetor pHigh (diluição 10x). Gel de Agarose 1%.

Um total de 20 µg de vetor e 1,7 µg de insertos (proporção molar vetor:inserto de 1:5) foram ligados e transformados na cepa TG1 de *E. coli*. Foram obtidos cerca de  $10^6$  transformantes. Considerando todas as possibilidades de construtos em *frame*, nossa construção poderia gerar cerca de  $7,1 \cdot 10^9$  diferentes scFv. Apesar do número de transformantes obtidos ter sido menor que o total de possibilidades teóricas possíveis, decidimos continuar com o procedimento, cientes de que nossa biblioteca não cobria todos os possíveis clones, porém, apresentava uma diversidade que, dado o pré-direcionamento ao nosso alvo molecular, deveria ser suficiente para o isolamento de scFvs ligantes.

Com o objetivo de realizar uma análise da qualidade de nossa biblioteca, 29 cones foram coletados aleatoriamente e sequenciados. Dos 29 clones, 20 apresentavam sequência *in frame* e, desses, o tipo mais comum foi o que apresentou inserções de 1 aminoácido a N-Terminal e 1 aminoácido a C-Terminal da sequência de TBP (**TABELAS 1 E 2**).

**Tabela 1:** Resultado do sequenciamento de 29 clones da sub biblioteca.

<b>EM FRAME</b>	<b>FORA DE FRAME</b>	<b>STOP CODON</b>
20	4	5

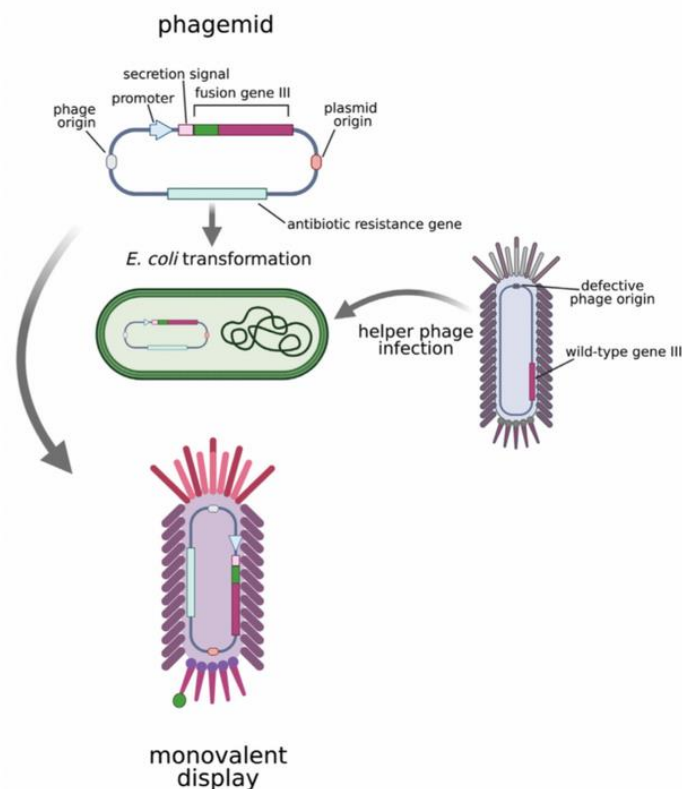
**Tabela 2:** Número de aminoácidos a N e a C terminal de TBP.

	<b>1-C-Terminal</b>	<b>2-C-Terminal</b>	<b>3-C-Terminal</b>
<b>1-N-Terminal</b>	5	1	4
<b>2-N-Terminal</b>	1	1	4
<b>3-N-Terminal</b>	3	0	1

Apesar de nossa biblioteca não ter coberto o total teórico de possibilidades de scFv, consideramos que o número de clones obtidos, juntamente com as informações obtidas com o sequenciamento de alguns clones eram suficientes para atestar que a biblioteca apresentava qualidade suficiente para ser utilizada nas etapas seguintes.

### 4.3 Isolamento de scFvs direcionados contra a porção extracelular de Tie1

Uma vez tendo gerado a biblioteca de scFv, a próxima etapa foi produzir essa biblioteca no formato a ser utilizado no *phage display*. Uma particularidade do sistema de fagemídeo é que, por codificar apenas uma das proteínas que compõem o capsídeo do bacteriófago, é necessário a utilização de um outro bacteriófago, denominado *helper phage*. Esse fago possui em seu genoma as proteínas necessárias para a montagem do *vírion*. Todavia, devido a um defeito em sua sequência de empacotamento, o fagemídeo é a molécula que acaba sendo empacotada dentro da partícula viral. (**FIGURA 13a**)

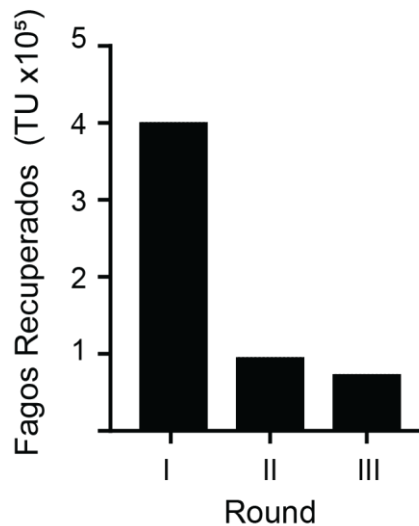


**FIGURA 13a: Uso de fagemídeos em *phage display*.** O vetor fagemídeo contém os elementos necessários para a produção do DNA que será empacotado no bacteriófago. Um *helper phage*, com defeito de empacotamento, é utilizado pra infectar a bactéria *E. coli* com o fagemídeo e produzir vírions que fazem o *display* do anticorpo. Adaptado de JAROSZEWICZ et al., 2022.

Uma vez tendo gerado os fagos, utilizamos a técnica de *phage display* para isolar scFvs direcionados contra a porção extracelular de Tie1. Tie1 foi imobilizado em placas de poliestireno e incubado com a biblioteca de scFv. Os



fagos com afinidade pelo receptor foram recuperados por infecção com bactéria, amplificados e utilizados em mais dois ciclos de seleção (**FIGURA 13b**).

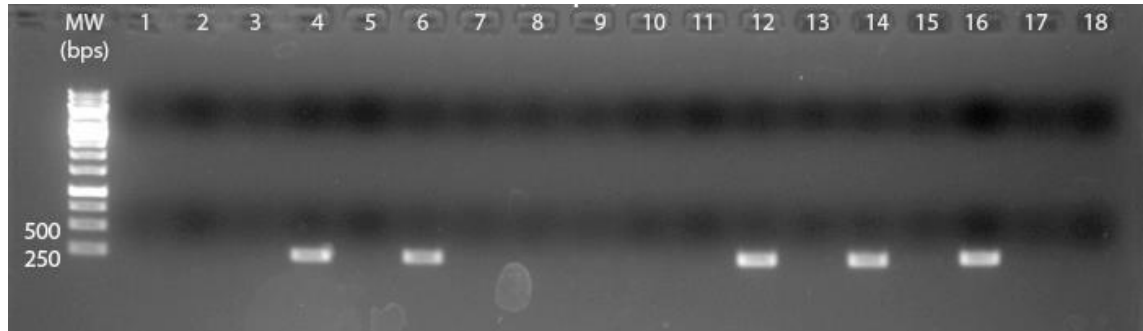


**FIGURA 13b: Isolamento de scFvs ligantes de Tie1.** A biblioteca de scFv baseada no peptídeo TBP foi incubada com Tie1 imobilizado em placa e os fagos ligantes recuperados por infecção bacteriana. O gráfico indica o número de fagos ligantes recuperados em cada ciclo (*round*) de seleção.

Idealmente, durante a execução da técnica de *phage display* há um enriquecimento no número de fagos recuperados a cada ciclo. Esse enriquecimento se dá pelo fato de que, nos ciclos iniciais, há um número pequeno, muitas vezes unitário, de fagos com afinidade ao alvo. Após a recuperação e amplificação, o número desses fagos, em relação à população de fagos, é aumentado e, conseqüentemente, um maior número de fagos é recuperado a cada ciclo de seleção. Diferentemente do esperado, não observamos enriquecimento durante os ciclos de seleção que realizamos.

Para identificar as sequências dos scFvs selecionados ao longo do *panning*, selecionamos algumas colônias aleatórias do terceiro *round* e realizamos PCR da região do fagemídeo que codificava o scFv. Surpreendentemente, apenas alguns clones apresentavam inserto (**FIGURA 14**). A região do HCDR3 desses clones foi sequenciada. De um total de cinco clones positivos, três sequências diferentes foram identificadas, sendo uma das sequências encontrada em dois dos clones positivos, a segunda sequência foi encontrada em dois dos clones isolados e a terceira sequência, em apenas um

dos clones. Esses clones serão denominados, a partir daqui, de TBPHigh1, TBPHigh2 e TBPHigh3.

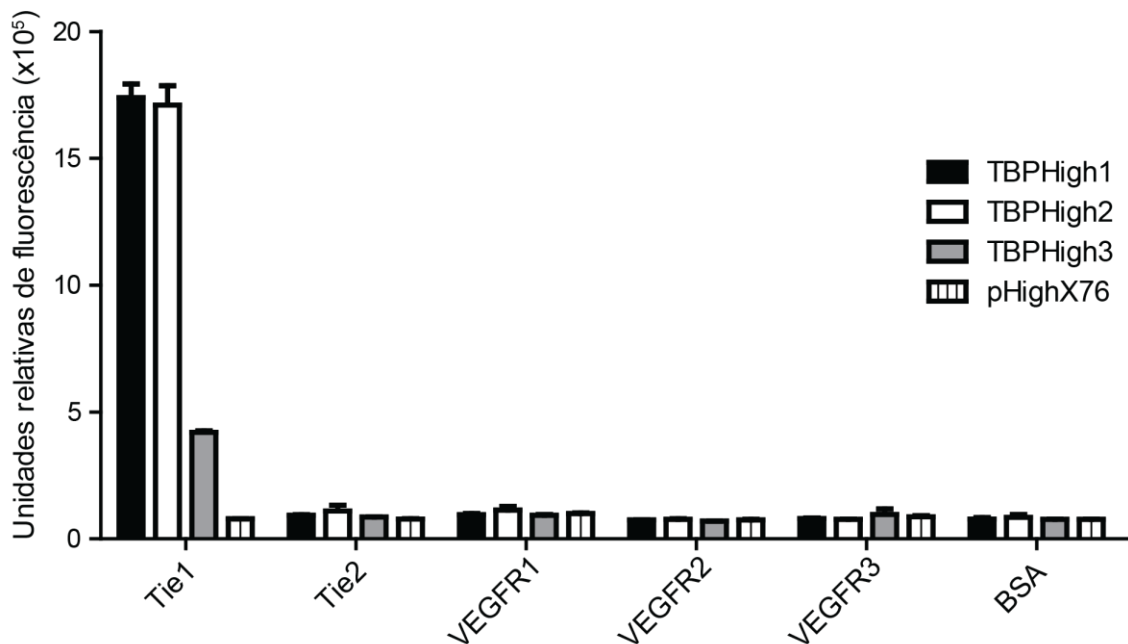


**FIGURA 14: Screening de colônias após o terceiro round.** Um total de 18 colônias foram coletadas e analisadas via PCR para identificar a presença da região em que foi inserido o HCDR3. Apenas os clones 4, 6, 12, 14 e 16 apresentaram reação positiva, indicando a presença de um inserto de scFv. Gel de agarose 2%.

É interessante observar que TBPHigh1 e TBPHigh2, apesar de possuírem sequências diferentes, seus *loops* apresentam o mesmo tamanho, com dois aminoácidos inseridos a N- e a C-Terminal da sequência de TBP. Além disso, curiosamente, o resíduo 5 de TBP, que nos ensaios de *alanine scanning* demonstrava não ser necessário para a ligação a Tie1, aparece conservado em ambos os clones.

#### 4.4 Validação dos scFvs isolados

Para confirmar a interação dos fagos TBPHigh1, TBPHigh2 e TBPHigh3 com Tie1, os mesmos foram produzidos em larga escala e utilizados em ensaios de ligação via ELISA de fagos (FLISA). Como controle negativo, utilizamos o fago pHighX76, selecionado aleatoriamente de uma biblioteca cujo HCDR3 apresenta uma sequência com um total de 7 aminoácidos. Realizamos o ensaio de ligação incluindo o receptor Tie2 e receptores da família do VEGF (VEGFR1, 2 e 3), além de BSA (**FIGURA 15**)



**FIGURA 15: Os scFvs isolados se ligam especificamente a Tie1.** Todos os três scFv isolados se ligam a Tie1 e não se ligam a outros receptores envolvidos na angiogênese. TBPHigh1 e TBPHigh2, que apresentam HCDR3 de mesmo tamanho, apresentam maior ligação a Tie1 que TBPHigh3, cujo HCDR3 é maior. O *input* de fagos foi de  $10^9$  TU que foram incubados com os diferentes receptores imobilizados e, após lavagem, os fagos ligantes foram quantificados por contagem de colônias. Barras representam o erro padrão da média.

Os ensaios de ligação indicam que os três fagos isolados se ligam com especificidade ao receptor Tie1, todavia, apresentam afinidades diferentes. TBPHigh1 e TBPHigh2, que apresentam HCDR3 de mesmo tamanho, se ligam com maior afinidade aparente a Tie1 que TBPHigh3, cujo HCDR3 é maior. Isso pode ser um indicativo de que existem tamanhos de loops que permitem um melhor posicionamento do HCDR3 dentro da estrutura geral do scFv. Isso, por sua vez, se reflete em uma molécula cuja estrutura é mais apta a promover interações com seu alvo molecular.

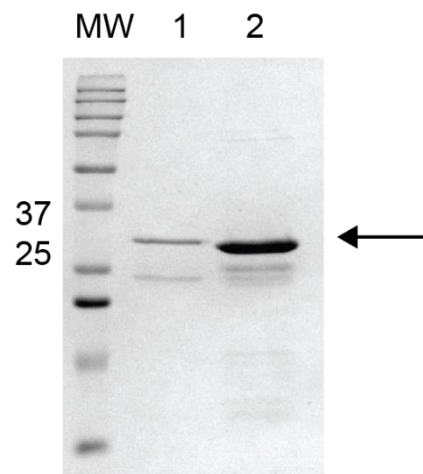
Tendo em vista que os ensaios de ligação foram realizados utilizando fagos que apresentavam o scFv em seu capsídeo, a próxima etapa consistiu em produzir os scFv em sua forma solúvel, isto é, não fusionados à proteína pIII.

Como citado anteriormente, a presença de um códon amber em nosso vetor, entre as sequências codificantes do scFv e do gene da pIII, permite com que a nossa construção possa ser expressa em cepas supressoras, como uma

quimera no formato scFv/pIII, para a realização de *phage display*, ou, em cepas não supressoras, como um scFv.

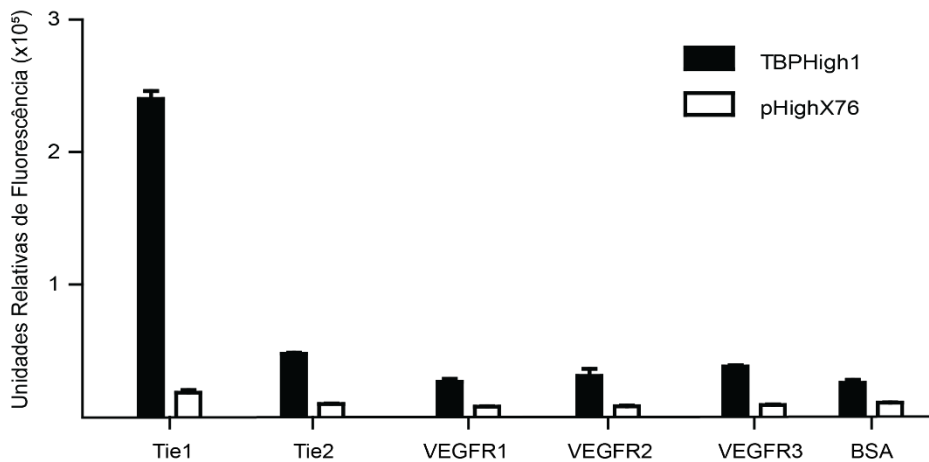
Nossa próxima etapa, portanto, consistiu na produção dos scFv isolados em sua forma solúvel. Dentre as cepas de *E. coli* que testamos, BL12(DE3), Rosetta(DE3)pLysS, ArcticExpress(DE3), C41(DE3) e C43(DE3), apenas a cepa C41(DE3) produziu os scFv de forma consistente. Por sua maior expressão, decidimos trabalhar apenas com o clone TBPHigh1 e, como controle, utilizamos o clone pHighX76. A presença da sequência codificante do peptídeo sinal DsbA permite com que a proteína expressa pela célula seja exportada, pelo sistema de secreção Sec, para a região do periplasma. A exportação para o periplasma apresenta diversas vantagens. O ambiente oxidante facilita a produção de proteínas que apresentam pontes de dissulfeto, como é o caso do scFv. Além disso, a presença da proteína formadora de pontes de dissulfeto (*disulphide bond protein* - Dsb), chaperonas e menor quantidade de proteases são fatores importantes para se obter a proteína de interesse (scFv) em maiores quantidades e corretamente enovelada. Soma-se a isso o fato de que a extração do periplasma resulta em uma mistura menos complexa que o resultante de uma lise celular total, fato este que facilita o processo de purificação. Outra particularidade de nosso sistema é a presença de uma calda de histidina na porção C-Terminal da nossa construção. A ligação níquel-histidina é uma ligação forte que é comumente utilizada em cromatografias de afinidade a metal (*immobilized metal-affinity chromatography* - IMAC). Nesse tipo de cromatografia, um metal, no caso, o níquel, é imobilizado a uma matriz. A mistura que contém a proteína de interesse (scFv) é percolada por essa matriz e, devido às interações níquel-histidina, ela é retida na coluna. Proteínas que interagem fracamente com a matriz podem ser removidas via lavagens com soluções contendo baixas concentrações de imidazol, um composto aromático heterocíclico que compete com a histidina pela ligação ao níquel e a proteína de interesse pode ser eluída da matriz via lavagens com soluções contendo altas concentrações de imidazol. Apesar da cauda de histidina poder, além de ser utilizada diretamente na purificação, ser também utilizada como marcador (detecção utilizando anticorpos anti-His-tag), decidimos marcar nossos anticorpos com biotina, para facilitar sua detecção em ensaios subsequentes. Ao

final do processo de purificação e biotinylação, a pureza do produto final era de cerca de 90%, com um rendimento final variando entre 100-300 ug/L de proteína por litro de cultura inicial (**FIGURA 16**). Acreditamos que os fragmentos proteicos menores que 27 KDa possam ser fragmentos dos scFv que, por ainda preservarem a cauda de histidina intacta, acabaram sendo co-purificados junto à proteína não clivada.



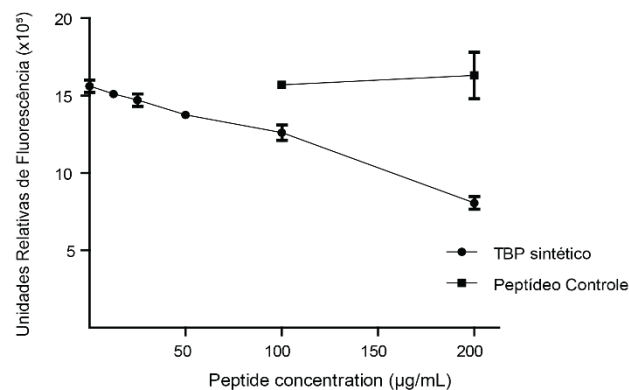
**FIGURA 16: scFv após purificação por IMAC e biotinylação.** Os scFv foram expressos na cepa C41 de *E.coli* e purificados via cromatografia de afinidade a metal. Ambos scFv possuem peso molecular de 27 KDa. Gel SDS-PAGE 12%. MW = Peso molecular (KDa); 1 = scFvTBPHigh1; 2 = 1 = scFvHighX76.

Uma vez tendo produzido o anticorpo controle, assim como o anticorpo isolado, repetimos ensaios de ligação para confirmar que nosso anticorpo, no formato não quimera, mantinha a capacidade de se ligar, com especificidade, a Tie1 (**FIGURA 17**).



**FIGURA 17: O scFv recombinante TBPHigh1 se liga especificamente a Tie1.** Nesse ensaio, ambos os scFv foram incubados com os diferentes receptores imobilizados em placa e o número de fagos ligantes quantificado por contagem de colônias. Barras representam o erro padrão da média. Anticorpos utilizados na concentração de 20 mg/L.

Uma vez confirmado, por diferentes ensaios, que o anticorpo TBPHigh1 se ligava à porção extracelular do receptor Tie1, investigamos se o sítio de ligação dessa molécula era o mesmo sítio de ligação do peptídeo TBP a Tie1. Para isso, realizamos ensaios de ligação do scFv recombinante na presença do peptídeo sintético. Caso ambas as moléculas estivessem se ligando ao mesmo sítio de Tie1, seria possível observar uma competição entre ambas pelo mesmo sítio e, conseqüentemente, ao se aumentar a concentração do peptídeo sintético, haveria um deslocamento do scFv que se ligava a Tie1. Observamos **(FIGURA 18)** que, de fato, o scFv era deslocado, de maneira dose-dependente, pelo peptídeo sintético TBP, ao passo que o peptídeo controle não afetava a ligação do scFv ao receptor Tie1, o que indica que tanto o scFv, quanto o peptídeo TBP compartilham o mesmo sítio de ligação em Tie1.



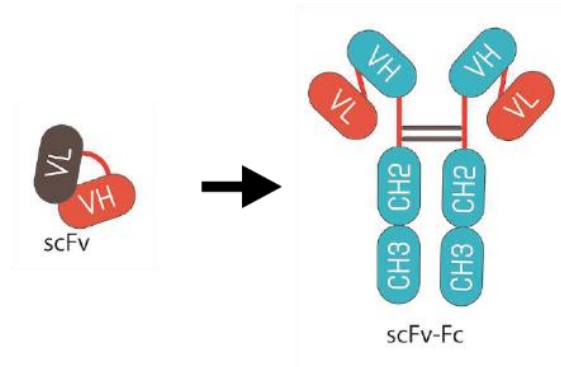
**FIGURA 18:** A ligação do scFv TBPHigh1 é inibida de maneira dose dependente pelo peptídeo sintético TBP. O scFv TBPHigh1 (20 mg/L) foi incubado com Tie1 imobilizado, na presença ou ausência do peptídeo sintético TBP ou do peptídeo controle; o número de fagos ligantes à Tie1 foi quantificado por contagem de colônias. Barras representam o erro padrão da média.

#### 4.5 Maturação de afinidade

O sistema imune, ao gerar uma resposta humoral primária contra um determinado antígeno, produz anticorpos do tipo IgM. Algumas células B responsivas a esse dado antígeno, sofrem um processo de maturação de afinidade e mudança de isótipo, que resulta, dentre outros fatores, na seleção de clones que produzem anticorpos, do tipo IgG, com maior afinidade ao antígeno que o anticorpo gerado na resposta primária. Tendo isso em vista, decidimos tentar reproduzir, *in vitro*, um sistema para aumento de afinidade e também para melhorar as características físico-químicas de nosso anticorpo.

Nossa primeira tentativa consistiu em mudar o formato de nosso anticorpo de scFv para scFv-Fc (**FIGURA 19**). No formato de scFv, o anticorpo apresenta valência igual a 1, ou seja, cada molécula é capaz de ligar-se apenas a uma molécula de Tie1. No formato de scFv-Fc, que consiste em uma químera entre o scFv e os domínios constantes da cadeia pesada (Fc), a valência de cada molécula é igual a 2, ou seja, cada molécula de scFv-Fc é capaz de se ligar a duas moléculas de Tie1. Nesse caso, é esperado que a mudança de afinidade

não seja devido a fatores farmacodinâmicos, mas sim devido a efeitos de aumento de avidéz.

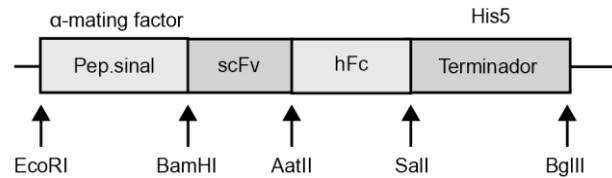


**FIGURA 19: Mudança de formato de scFv para scFv-Fc.** Ao mudar de formato, é esperado que haja um aumento de avidéz do anticorpo por Tie1 dada a presença de dois domínios de ligação à Tie1 na molécula de scFv-Fc.

Tendo em vista a complexidade dessa molécula e a presença de diversas pontes de dissulfeto necessárias para um enovelamento correto da molécula final, decidimos utilizar um sistema de expressão em leveduras.

Iniciamos nosso trabalho pela construção de um sistema que pudesse ser utilizado na conversão de qualquer scFv isolado em scFv-Fc. Nossa construção (**FIGURA 20**) conta com um peptídeo sinal, responsável pela secreção da proteína (a secreção para o meio de cultura é uma etapa que facilita o processo de purificação), o scFv-Fc, onde o Fc utilizado foi uma sequência codificante de IgG1 humana (a presença do Fc facilita tanto o processo de purificação, que pode ser realizado via cromatografia de afinidade a proteína G, quanto o processo de detecção do scFv-Fc, utilizando anticorpos anti-Fc humano). Além disso, inserimos uma sequência de terminação de transcrição, um elemento necessário para dar estabilidade ao mRNA e aumentar o rendimento da proteína expressa. Essa construção foi inserida no vetor de levedura pCTCon2.

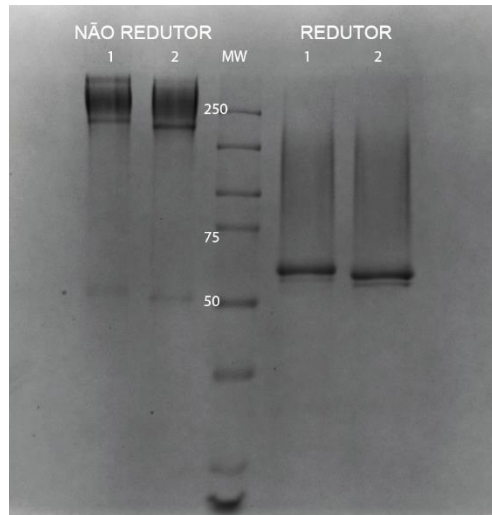




**FIGURA 20: Construção para expressão de scFv-Fc em levedura.** Nossa construção permite que scFv isolados possam ser clonados para serem expressos em levedura como scFv ou como scFv-Fc. Em ambos os casos, a proteína é secretada para o meio de cultura.

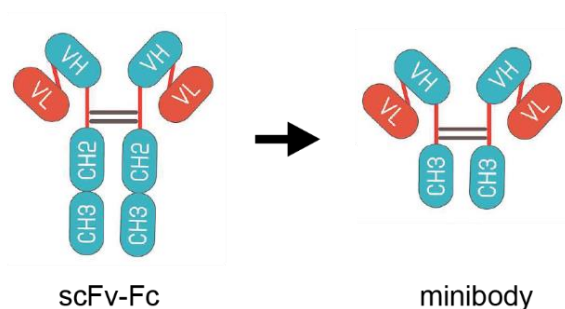
A cepa de levedura utilizada foi a YVH10, que é uma *Saccharomyces cerevisiae* que possui o gene da proteína dissulfeto isomerase (*protein disulfide isomerase* – PDI) sob controle de um promotor endógeno constitutivo. A presença dessa proteína auxilia na formação de pontes de dissulfeto e, conseqüentemente, é importante para o enovelamento correto do scFv-Fc.

TBPHigh1-scFv-Fc, assim como pHighX76-scFv-Fc foram produzidos e purificados via cromatografia de afinidade a proteína G. O monômero de ambas proteínas possui peso molecular de cerca de 51 KDa. Em condições redutoras, ambos migram, em gel de eletroforese, com peso aparente próximo ao esperado. Todavia, em condições não redutoras, ao invés de migrar próximo às bandas de 100 KDa, nossas proteínas migram junto a bandas de cerca de 250 KDa (**FIGURA 21**). Essa migração anômala pode ser devido a dois fatores: uma hipótese é que as pontes de dissulfeto estão se formando incorretamente, de modo que os monômeros, ao invés de formarem dímeros, estão formando tetrâmeros; a segunda hipótese, é que os dímeros estão sendo formados, todavia, estão sendo hiperglicosilados. O domínio CH2 do Fc possui sítios de glicosilação e sistemas de *S.cerevisiae* comumente hiperglicosilam esses sítios de proteínas não endógenas. O *smear* observado em nosso gel, em condições não redutoras, sugere a presença dessa hiper-glicosilação.



**FIGURA 21: Proteínas no formato scFv-Fc, produzidas em levedura, após purificação por cromatografia de afinidade a proteínas G.** Em condições redutoras, cada monômero possui peso aparente de cerca de 51 KDa. Em condições não redutoras, verificamos um peso aparente de cerca de 250 KDa. A presença de um *smear* pode ser um indicativo de que nossas proteínas estão sendo hiper-glicosiladas. 1 = TBPHigh1-scFv-Fc; 2 = pHighX76-scFv-Fc. Gel SDS-PAGE 10%.

Infelizmente, ao testar nossa construção de scFv-Fc, seja por ensaios diretos (ensaio de ligação) ou indiretos (ensaios de competição do scFv-Fc com o fago), não fomos capazes de observar nenhum tipo de interação com Tie1. Tentamos modificar o formato de scFv-Fc para o formato de *minibody* (**FIGURA 22**). Esse formato é semelhante ao scFv-Fc, exceto pelo fato de que o domínio CH2 cadeia pesada está ausente. É nesse domínio que se encontra o sítio de glicosilação. Desafortunadamente, não fomos capazes de expressar as proteínas nesse formato.



**FIGURA 22: Mudança de formato de scFv-Fc para *minibody*.** Uma das hipóteses que levantamos do não funcionamento do scFv-Fc baseava-se na ocorrência de hiperglicosilação do

domínio CH2. A mudança de formato para *minibody*, que não apresenta esse domínio, testaria nossa hipótese. Todavia, não fomos capazes de expressar as proteínas nesse formato.

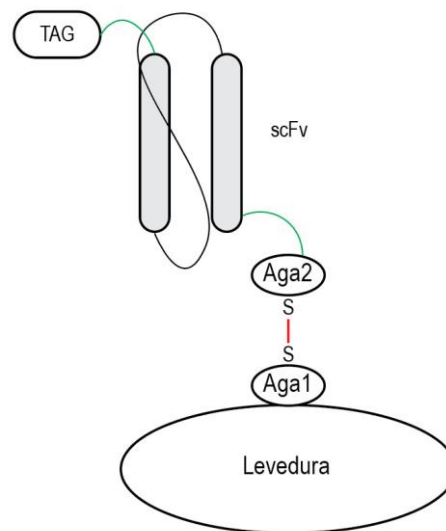
Nossa segunda tentativa de promover modificações estruturais que resultassem em melhorias físico-químicas de nosso anticorpo foi baseada na modificação dos demais CDRs de nosso anticorpo. Como mencionado anteriormente, o HCDR3 é a alça que promove maior contato entre antígeno e anticorpo, todavia, os demais CDRs também participam da interação antígeno/anticorpo. Além disso, as demais regiões que constituem o *framework* da cadeia variável pesada e leve, também são importantes para garantir a estabilidade da molécula como um todo. A estrutura de nosso scFv é derivada de uma sequência genérica de cadeias variáveis leves e pesadas. Isso, portanto, nos leva a acreditar que modificações na sequência dos demais CDRs, assim como nos *frameworks*, poderiam resultar no isolamento de moléculas com melhores características, tanto de afinidade ao alvo, quanto de estabilidade estrutural.

Tendo em vista que imunoglobulinas humanas já passaram por um processo de seleção biológico e apresentam características adequadas para seu funcionamento biológico, decidimos utilizar o repertório humano como ponto de partida para a modificação de nosso scFv. Nossa ideia, portanto, consistiu em gerar uma nova biblioteca de anticorpos, onde a cadeia variável pesada de TBPHigh1 foi mantida, ao passo que a cadeia variável leve seria substituída por cadeias variáveis leves de origem humana.

Para realizar essa etapa, procedemos por duas estratégias distintas: *yeast display* e *phage display* de anticorpos.

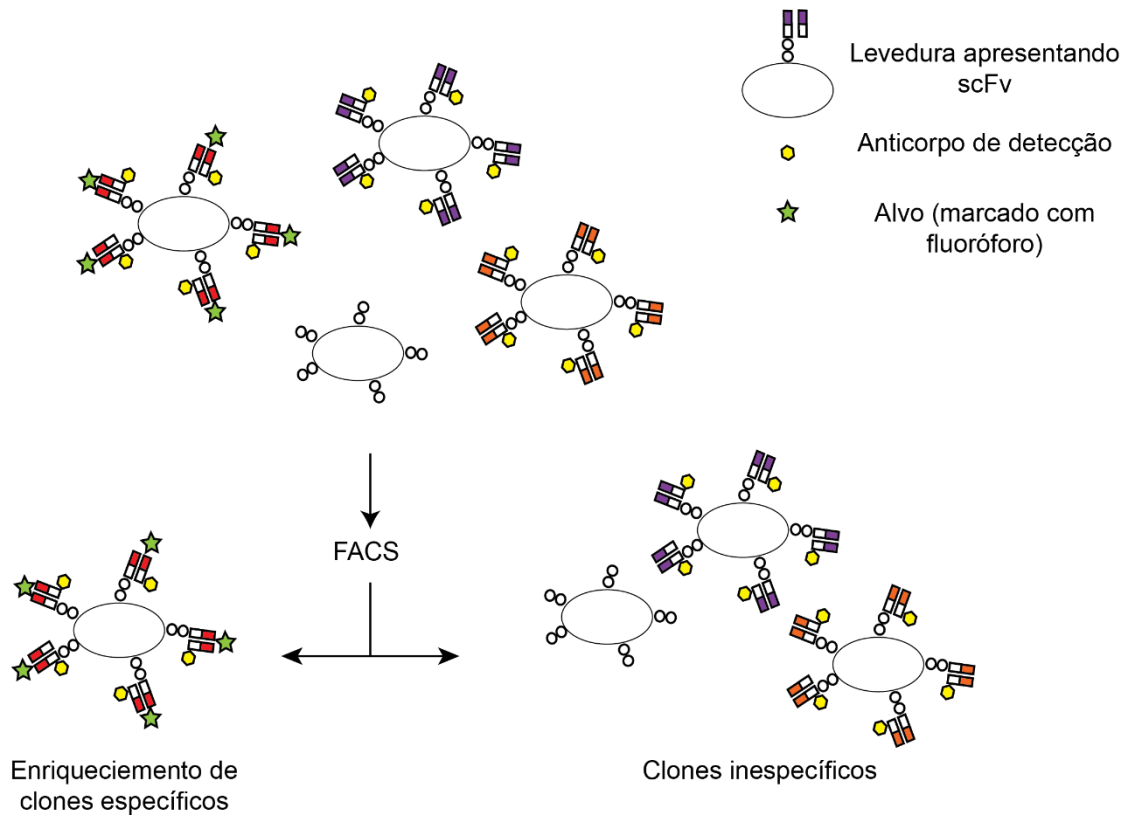
#### **4.6 Yeast Display**

O *yeast display* é uma técnica que permite expressar proteínas recombinantes na superfície de leveduras (TEYMENNET-RAMÍREZ; MARTÍNEZ-MORALES; TREJO-HERNÁNDEZ, 2022; UCHAŃSKI et al., 2019). Em geral, as proteínas são expressas fusionadas à porção C-terminal da proteína Aga-2 (*mating agglutinin protein AGA-2*). Aga-2, por sua vez, liga-se, via pontes de dissulfeto, à proteína integral de membrana Aga-1 (**FIGURA 23**).



**FIGURA 23: Yeast Display.** A técnica de *yeast display* permite apresentar proteínas recombinante que se acoplam na superfície da levedura. A presença de um *Tag* possibilita a marcação e identificação das leveduras que expressam a proteína de interesse. Além disso, em combinação com citometria de fluxo com sorteamento de células, esse sistema pode ser utilizado no isolamento de ligantes de um dado alvo.

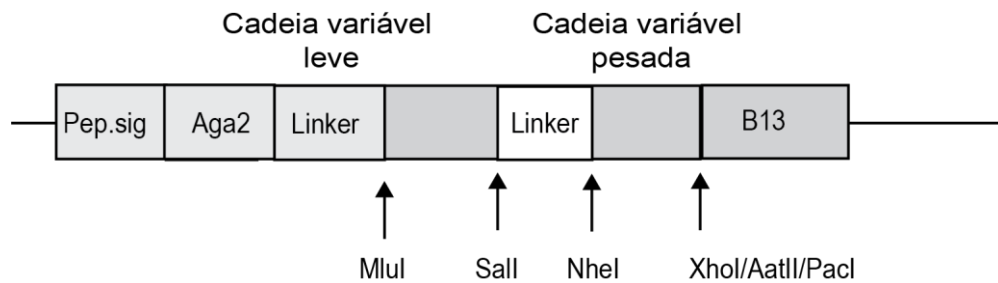
Nossa ideia consistiu, portanto, em expressar a nova biblioteca na superfície de leveduras e realizar o processo de seleção e isolamento de anticorpos ligantes utilizando um citômetro de fluxo com sorteamento de células (*cell sorting*). Nesse sistema, utilizaríamos dois marcadores, um para a detecção do nosso alvo, ou seja, Tie1, e outro para detectar as leveduras expressando anticorpos. Apenas as células marcadas duplamente seriam isoladas e coletadas (**FIGURA 24**). Desta forma, seríamos capazes de selecionar as leveduras que apresentassem anticorpos na superfície e, ao mesmo tempo, fossem capazes de ligar Tie1.



**FIGURA24: Método de yeast display com sorteamento de células.** A biblioteca de anticorpos seria incubada com Tie1 marcado. Após lavagens e utilização de um anticorpo de detecção, direcionado contra um epítipo pré-determinado, as células seriam separadas por citometria de fluxo. Apenas as células duplamente marcadas (um indicador de interação entre scFv e Tie1) seriam isoladas e enriquecidas.

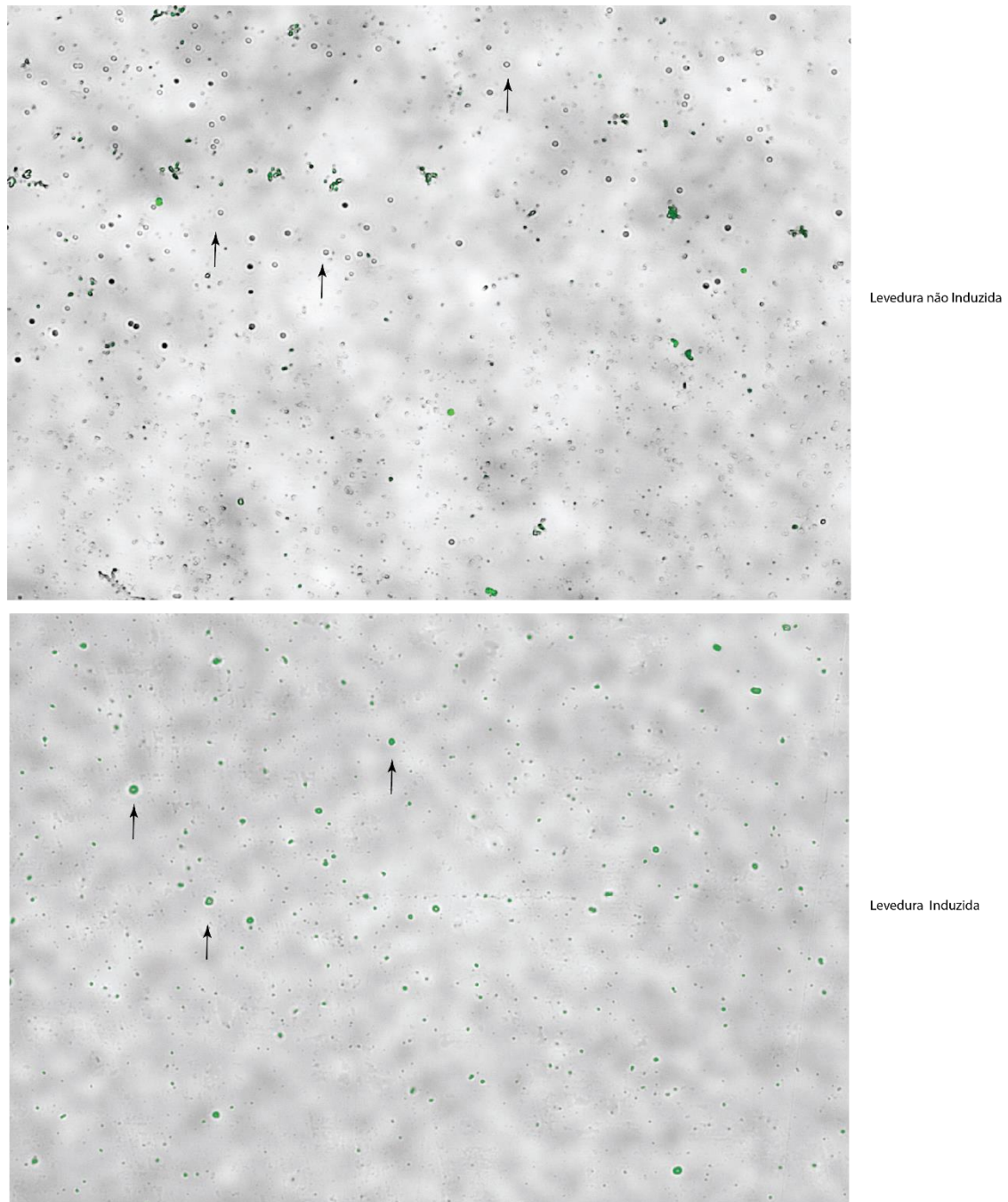
Apesar da existência de vetores comerciais que apresentam epítopos como o *V5 tag*, *MYC*, etc., decidimos optar por utilizar um outro epítipo. Essa escolha foi ocasionada pelo fato de que gostaríamos de um epítipo cuja detecção não dependesse de anticorpos obtidos comercialmente, a altos custos, mas sim de anticorpos que pudessem ser gerados em nosso laboratório. Escolhemos, para tanto, o epítipo B13. O epítipo B13 é um antígeno de *Trypanosoma cruzi* (UMEZAWA; FRANCO DA SILVEIRA, 1999) altamente reativo, o que garante que anticorpos gerados contra esse antígeno apresentem uma boa capacidade de ligação e detecção, com baixa atividade cruzada contra outros antígenos, fato esse importante na escolha de *tags* a serem utilizados para detecção molecular.

Partindo do vetor pYD1, utilizado para *yeast display*, realizamos uma série de modificações, de modo a adaptá-lo às nossas necessidades (**FIGURA 25**). Mantivemos as sequências codificantes de Aga-2 e inserimos um cassete para a clonagem independente das cadeias leves variáveis e pesadas variáveis, separadas por um *linker* de glicina/serina e seguidas pelo epítipo B13.



**FIGURA 25: Design do vetor utilizado em *yeast display*.** Redesenhamos o vetor pYD1 de modo a adequá-lo às nossas necessidades. O cassete para a clonagem independente das cadeias leves variáveis e pesadas variáveis pode ser utilizado tanto em nosso estudo, quanto em outros estudos de *yeast display*.

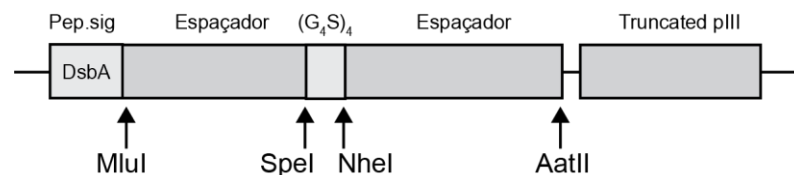
Após a construção do vetor, realizamos a validação do *display* e da detecção do epítipo B13 (**FIGURA 26**) utilizando o anticorpo controle X76.



**FIGURA 26: Validação do display do scFv e da detecção do antígeno B13.** Leveduras não induzidas e induzidas com galactose foram encubadas com anticorpo anti-B13. Um anticorpo secundário marcado foi utilizado na detecção dos anticorpos anti-B13. As células foram dispersas em uma lâmina e observadas em microscópio fluorescente. Magnificação de 460x.

A expressão gênica de nossa construção está sob controle do promotor Gal1. Esse promotor é induzido por galactose e fortemente reprimido por glicose. Verificamos, por microscopia, que na levedura não induzida, a maior parte das células não se encontra marcada, ao passo que, após indução com galactose, a maior parte das células expressa o scFv, como demonstrado pela marcação (**FIGURA 26**). Infelizmente, por motivos técnicos (indisponibilidade temporária de citômetro de fluxo), não pudemos continuar essa parte do projeto. Todavia, demonstramos o funcionamento de nosso sistema, que poderá ser utilizado, futuramente, em outros projetos. Tendo em vista essa limitação, optamos por realizar a mudança de cadeia variável leve utilizando *phage display* de anticorpos.

Recomeçamos nosso trabalho pela modificação do vetor pHigh. Nosso objetivo era modificar o vetor de tal modo a permitir a substituição independente das sequências codificantes das cadeias variáveis leves e pesadas. Como a montagem dos scFvs dependeria de uma dupla clonagem, a seleção das enzimas de restrição a serem utilizadas consistiu em uma etapa crítica, já que alguns sítios de restrição são frequentemente encontrados dentro dos genes de imunoglobulinas humanas. Tendo isso em vista e utilizando estudos previamente realizados em nosso grupo (GOMES, 2018), selecionamos quatro enzimas de restrição para utilizar em nosso vetor: MluI, SpeI, NheI e AatII (**FIGURA 27**). As sequências reconhecidas e clivadas por essas enzimas não são encontradas, com frequência, nos genes de imunoglobulinas humanas.

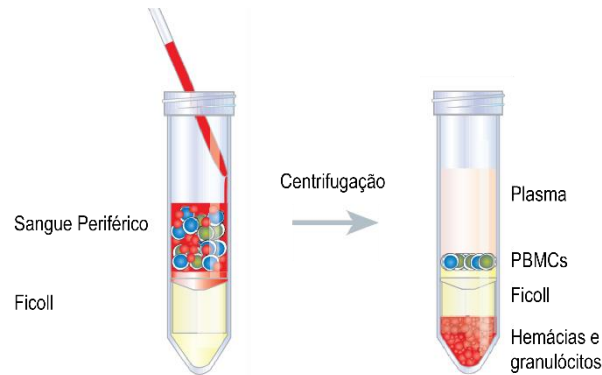


**FIGURA 27: Construção de um novo vetor (pHigh3) para a criação de uma biblioteca de cadeias leves.** Construímos um novo vetor para ser utilizado na criação de uma nova biblioteca, onde a cadeia variável pesada, derivada do clone TBPHigh1 será mantida e a cadeia variável leve será substituída por cadeias de origem humana.

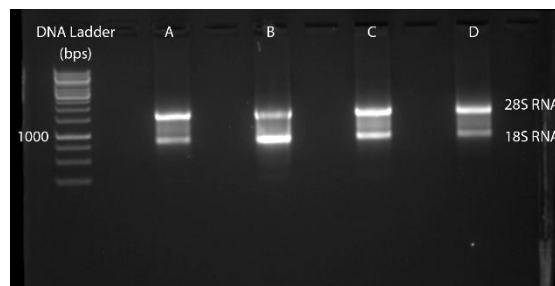
A segunda etapa consistiu na coleta de sangue periférico de indivíduos saudáveis e fracionamento celular via gradiente de Ficoll (**FIGURA 28**). A fração



de células mononucleares (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMCs) foi recolhida e o RNA total dessas células, extraído (**FIGURA 29**).



**FIGURA 28: Extração de PMBCs de sangue periférico.** Cerca de 10 mL de sangue periférico de quatro indivíduos saudáveis foi coletado e separado utilizando gradiente de Ficoll. Após centrifugação, apenas a fração de PBMCs foi recolhida.

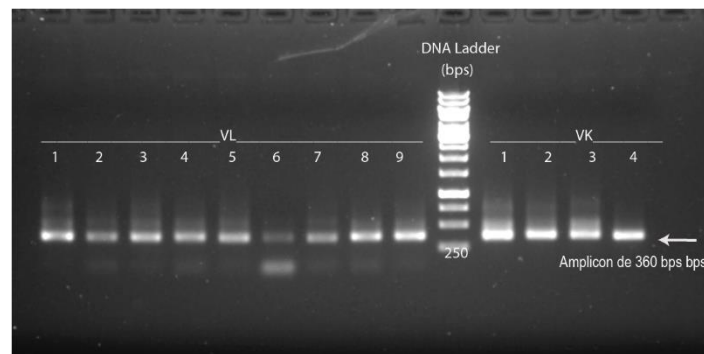


**FIGURA 29: Extração de RNA total.** Os PBMCs coletados foram lisados e o RNA extraído via TRIzol. Um RNA de qualidade é necessário para gerar a biblioteca de cadeias leves variáveis. A, B, C e D representam amostras de 4 doadores. Gel de agarose 1,5%.

A coleta de PBMCs é uma etapa necessária pois é nessa fração que se encontram as células de interesse (linfócitos B). Essa fração possui diversos tipos celulares, como monócitos e linfócitos (B, T e NK). Todas as células possuem os genes que codificam imunoglobulinas, todavia, apenas nos linfócitos B esses genes se encontram rearranjados no DNA genômico e são expressos, levando a produção de RNA mensageiro, que foi utilizado na criação de nossa

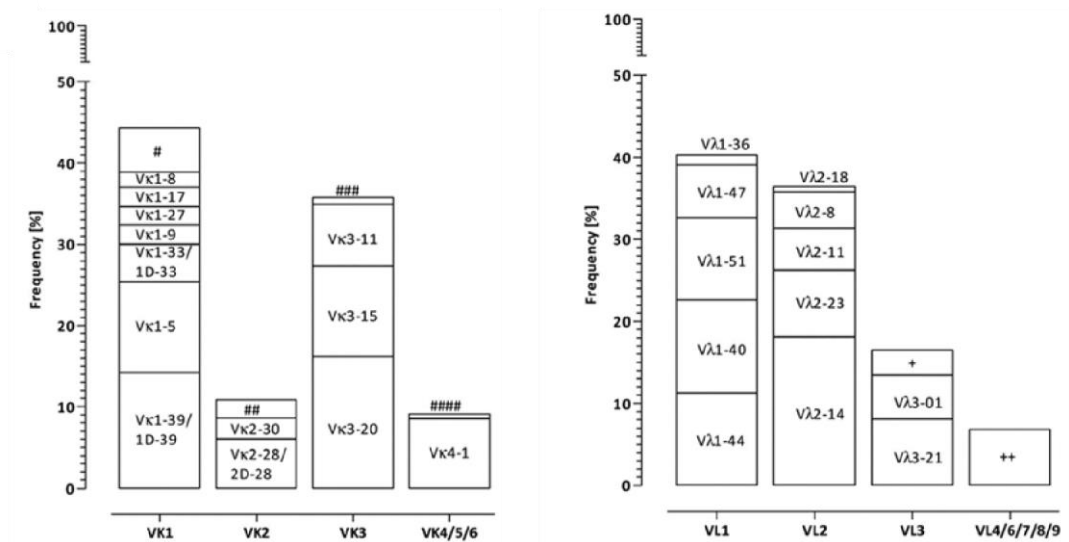
biblioteca. A extração de RNA dessas células, portanto, é uma das etapas críticas de nosso trabalho. A presença de *smear* apenas entre as bandas de RNA ribossômico 28S e 18S (**FIGURA 29**), e a intensidade relativa (2:1) entre essas duas bandas são fortes indicativos de que o material coletado apresentava boa qualidade. Esse material, após ser convertido em DNA complementar (cDNA), foi utilizado para a amplificação das cadeias variáveis leves.

Em humanos, existem duas classes de cadeias leves: kappa e lambda, com a classe kappa sendo a mais comum das duas. Ambas são formadas por diferentes subclasses. Utilizamos diferentes oligonucleotídeos para amplificar as nove subclasses lambda e quatro subclasses kappa (**FIGURA 30**).



**FIGURA 30: Amplificação das cadeias variáveis leves.** As nove subclasses da classe lambda (VL) e as quatro da classe kappa (VK) foram amplificadas individualmente. Gel representativo da amplificação de seqüências provenientes de um dos indivíduos doadores. Gel de agarose 1%.

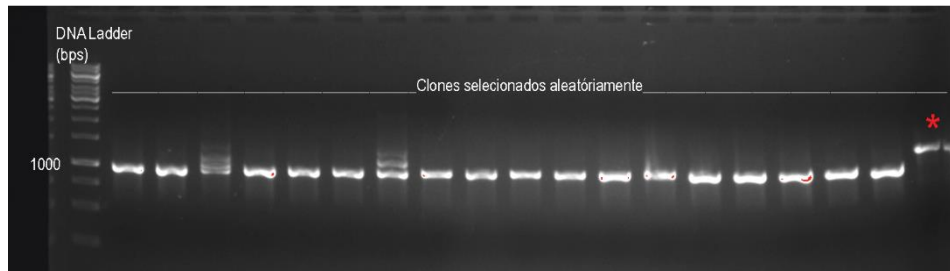
Combinamos o material amplificado de cada uma das diferentes subclasses de modo a tentar refletir as mesmas proporções encontradas em genes humanos (**FIGURA 31**). Esse material foi então ligado no vetor pHigh3+HTBP1, vetor pHigh3 que continha a cadeia variável pesada de TBPHigh1 clonada entre os sítios de NheI e AatII.



**FIGURA 31: Distribuição de frequências de segmentos gênicos de cadeias leves do tipo kappa (A) e lambda (B) no repertório de anticorpos humanos.** Utilizamos essa distribuição, baseada em um estudo (TILLER et al., 2013), para ajustar as proporções entre diferentes subclasses e construir nossa biblioteca de cadeias leves.

Obtivemos cerca de  $7 \cdot 10^7$  transformantes. Novamente, para identificar as sequências dos scFvs selecionados ao longo do *panning*, selecionamos algumas colônias aleatórias do terceiro *round* e realizamos PCR da região do fagemídeo que incluía, além da região que codificava o scFv, partes do vetor.

Novamente, como observado no processo de seleção anterior, a maioria dos clones foram identificados como negativos (**FIGURA 32**). Nessa seleção, apenas um clone apresentou amplicon do tamanho esperado e foi coletado para validação. Esse clone foi denominado TBPHigh1semi.



**FIGURA 32: Screening de colônias após o terceiro round.** Um total de 19 colônias foram coletadas e analisadas via PCR para identificar a presença de um amplicon com tamanho de cerca de 1400 pares de bases. Apenas um clone (\*) apresentou o tamanho esperado e foi coletado para validação.

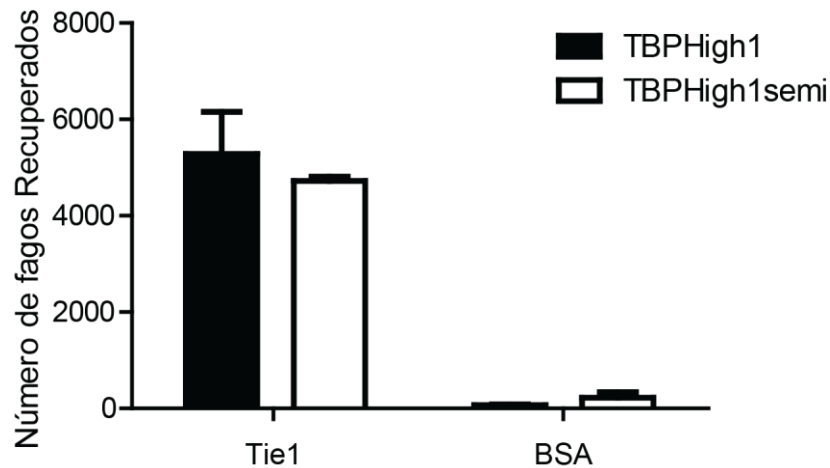
TBPHigh1semi foi sequenciado. A cadeia leve isolada é do tipo lambda e proveniente do gene IGLV1-40. É interessante observar que o gene IGLV1-40 é o segundo par mais comumente associado ao tipo VH3-23 (o *framework* utilizado na cadeia pesada do nosso vetor é baseado nesse gene) (TILLER et al., 2013). Inicialmente, utilizamos a ferramenta *ProtParam* para investigar se a troca da cadeia variável leve resultou em mudanças nos parâmetros físico e químicos de nosso scFv (**TABELA 3**). Os parâmetros índice alifático (aumentos no valor desse parâmetro podem ser entendidos como um aumento da termoestabilidade de proteínas globulares) e índice de estabilidade (que estima a estabilidade de uma proteína em um tubo de ensaio) indicam que a mudança de cadeias produziu uma melhora na estabilidade de nossa molécula, quando comparada com a original. Além disso, o fato de o índice GRAVY, um parâmetro que indica se uma proteína é apolar (índice com valor negativo), ou polar (índice com valor positivo) ter se tornado menos negativo também pode indicar melhora na solubilidade do novo scFv isolado, que se traduziria em menor tendência de agregação e precipitação.

**Tabela 3.:** Utilizamos a ferramenta *on line ProtParam* para comparar mudanças nas propriedades físico químicas ocasionadas pela substituição da cadeia leve.

<b>Parâmetro</b>	<b>TBPHigh1</b>	<b>TBPHigh1semi</b>
<b>Número de aminoácidos</b>	265	270
<b>Peso molecular</b>	28 KDa	28 KDa
<b>pI teórico</b>	8,81	9,14
<b>Índice de instabilidade</b>	46,48	45,32
<b>Índice alifático</b>	61,13	62,48
<b>Índice GRAVY*</b>	-0,459	-0,377

\* *Grand Average of Hydropathicity*

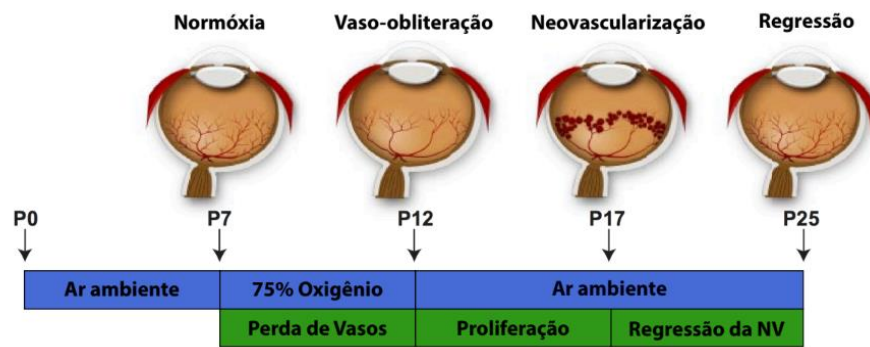
Após confirmar a sequência da cadeia leve isolada, produzimos o fago apresentando TBPHigh1semi e realizamos ensaios de ligação (**FIGURA 33**). BPHigh1semi se liga a Tie1. Não observamos diferença estatística significativa entre a ligação de TBPHigh1e BPHigh1semi a Tie1.



**FIGURA 33: O scFv TBPHigh1semi se liga a Tie1.** O scFv isolado após mudança de cadeia variável leve foi incubado com o receptor Tie1 imobilizado em placa e o número de fagos ligantes quantificados por contagem de colônia. TBPHigh1semi, com a nova cadeia leve, se liga a Tie1. Não foi observada diferença estatística significativa entre a ligação de TBPHigh1e BPHigh1semi a Tie1. O *input* de fagos foi de  $10^9$  TU. Barras representam o erro padrão da média.

## Parte 2 - Identificar e validar novos moduladores da angiogênese patológica.

Nos últimos anos, nosso grupo investiu no estudo do transcriptoma da retinopatia (GUARISCHI-SOUSA et al., 2019). O objetivo desse estudo foi identificar genes envolvidos na angiogênese patológica, em busca de novos alvos para o desenvolvimento de terapias. O modelo animal da retinopatia induzida por oxigênio (OIR) foi utilizado (**FIGURA 34**), uma vez que é muito bem aceito para o estudo da angiogênese patológica e por reproduzir diversos aspectos de doenças humanas, como a retinopatia da prematuridade e, até certo ponto, da retinopatia diabética (CONNOR et al., 2009). Utilizamos os dados do transcriptoma para selecionar possíveis alvos moleculares moduladores da angiogênese.



**Figura 34.: Modelo animal para estudo da retinopatia.** Representação do modelo da retinopatia induzida por oxigênio em camundongos, indicando as diferentes fases (normóxia, vaso-obliteração, neovascularização e regressão). Figura adaptada (CONNOR et al., 2009).

Para a seleção de nossos alvos, nossos critérios de seleção foram os seguintes: aumento do número de transcritos, em relação ao controle (camundongo em P12, não submetido à câmara), ausência de fármacos direcionados contra o alvo em questão, localização celular do alvo (evitamos selecionar componentes intracelulares), disponibilidade comercial e quantidade de estudos relacionando o possível alvo à angiogênese (procuramos selecionar alvos pouco descritos na literatura).

Utilizando esses critérios, chegamos em dois alvos (**TABELA 4**): a citocina Fator Inibidor da Leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor* - LIF) e o receptor de Oncostatina M (*Oncostatin M receptor* – OSMR). LIF, em humanos, pode interagir tanto com seu receptor (*Leukemia inhibitory factor receptor* - LIFR), quanto com OSMR. Além disso, ambos utilizam o receptor glicoproteína 130 (*Glycoprotein 130* – gp130) como co-receptor.

**Tabela 4.:** Genes selecionados após análise do transcriptoma. P12 (12 dias pós nascimento) e P17 (17 dias pós nascimento) se referem aos camundongos que não foram submetidos à câmara de oxigênio. R17 (17 dias pós nascimento) se refere aos camundongos que foram submetidos à câmara de oxigênio. Dados normalizados em relação a P12.

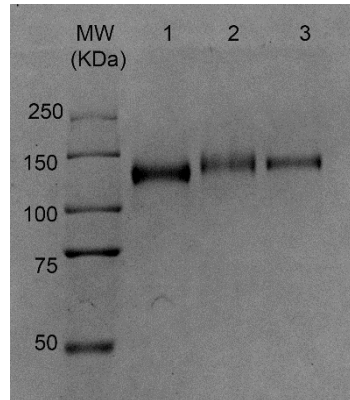
Gene	P12	P17	R17
	(Mudança em Log2)		
Fator Inibidor da Leucemia	0	-0,234	1,948
Receptor de Oncostatina M	0	-0,094	2,496

O fato de LIF pode promover sinalização celular via OSMR e LIFR, e o fato de ambos os receptores utilizarem gp130 como co-receptor fez com que optássemos por tentar isolar, via *phage display* de peptídeos, ligantes da porção extracelular desses receptores.

Como demonstrado anteriormente, a técnica de *phage display* de peptídeos permite selecionar ligantes que possuem afinidade aos alvos de interesse. Nessa parte de nosso trabalho, propomos isolar ligantes das porções extracelulares das proteínas LIFR, OSMR e gp130. Em geral, os ligantes selecionados via *phage display* tendem a se ligar a sítios biologicamente relevantes de seus alvos. Conseqüentemente, os peptídeos derivados dessas bibliotecas geralmente possuem a capacidade de modular a atividade da proteína alvo tanto *in vitro*, quanto *in vivo* e, desse modo, podem ser utilizados como compostos líderes no desenvolvimento de novos fármacos (MOLEK; STRUKELJ; BRATKOVIC, 2011).

As três proteínas foram obtidas comercialmente. Para verificar a integridade e pureza das proteínas obtidas, as mesmas foram analisadas por SDS-PAGE (**FIGURA 35**).

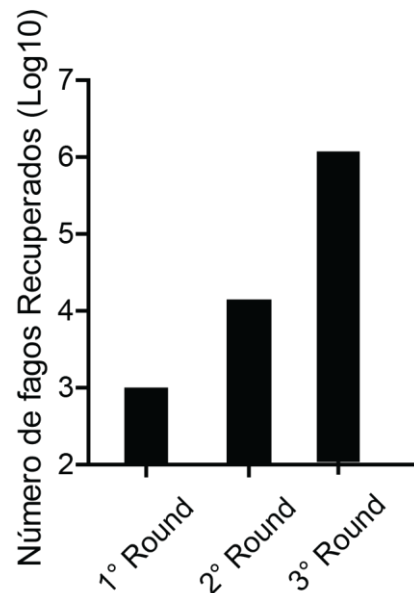




**FIGURA 35: Proteínas obtidas comercialmente.** As proteínas recombinantes obtidas comercialmente foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras. As bandas apresentam tamanho esperado. 1 = gp130; 2 = LIFR $\alpha$ ; 3 = OSMR $\beta$  3. Gel SDS-PAGE 10%.

Uma vez confirmada a qualidade das proteínas obtidas, procedemos para o isolamento de ligantes peptídicos utilizando *phage display* de peptídeos. Para isso, utilizamos as duas bibliotecas presentes em nosso laboratório: X6 e CX8C (onde C indica o aminoácido cisteína e X representa qualquer um dos aminoácidos). A biblioteca X6 é uma biblioteca de peptídeos lineares, ao passo que a CX8C, por apresentar duas cisteínas, apresenta peptídeos circulares e com maiores restrições conformacionais, já que as cisteínas se encontram formando pontes de dissulfeto.

As três proteínas foram imobilizadas, separadamente, em placas de poliestireno em encubadas com as bibliotecas de *phage display*. Os fagos com afinidade pelos alvos foram recuperados por infecção com bactéria, amplificados e utilizados em dois ciclos consecutivos de seleção. Observamos um enriquecimento no número de fagos recuperados (enriquecimento de 1000x em relação ao primeiro *round*/ciclo de seleção) apenas quando utilizamos a biblioteca X6 e somente contra a proteína gp130 (**FIGURA 36**).



**FIGURA 36: *Panning* contra a proteína gp130 utilizando a biblioteca X6.** A biblioteca de X6 foi incubada com gp130 imobilizada em placa e os fagos ligantes recuperados por infecção bacteriana. O gráfico indica o número de fagos ligantes recuperados em cada ciclo (*round*) de seleção.

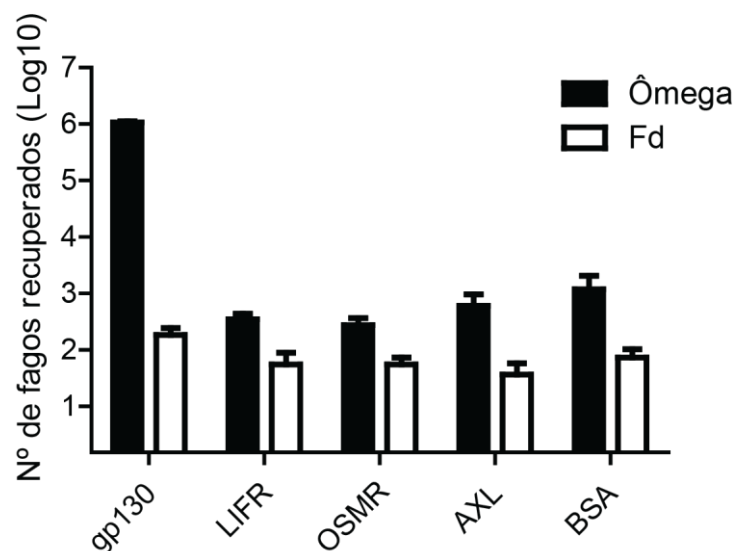
Para identificar as sequências dos peptídeos selecionados ao longo do *panning*, selecionamos algumas colônias aleatórias do terceiro *round* e realizamos PCR da região do fago que codificava o peptídeo. Apesar de não termos observado nenhum enriquecimento nos *pannings* realizados contra as proteínas OSMR e LIFR, também realizamos o sequenciamento de algumas colônias.

No caso dos fagos provenientes do *panning* contra a gp130 utilizando a biblioteca X6, 7 clones foram aleatoriamente selecionados e sequenciados, sendo que 6 desses clones codificavam o mesmo peptídeo. Um fato surpreendente é que, apesar de ser derivado de uma biblioteca X6, o peptídeo isolado é formado por 19 resíduos de aminoácidos. Esse peptídeo foi denominado peptídeo **ômega**. Em relação aos fagos provenientes dos *pannings* contra LIFR e OSMR utilizando ambas as bibliotecas, não observamos nenhuma similaridade entre as sequências peptídicas isoladas após as seleções. O mesmo foi observado no *pannings* contra gp130 utilizando a biblioteca CX8C. Como apenas o *panning* contra a gp130 utilizando a biblioteca X6 apresentou o enriquecimento no número de fagos recuperados a cada ciclo de seleção e sequências idênticas após o sequenciamento de colônias coletadas

aleatoriamente no ciclo final de seleção, decidimos prosseguir nossos estudos utilizando esse peptídeo.

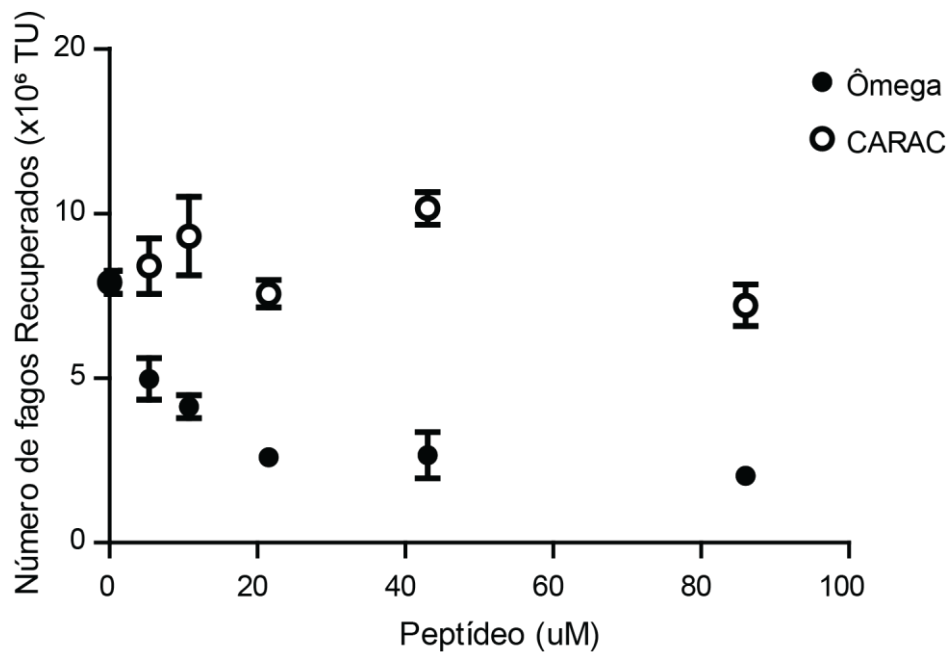
#### 4.7 Validação do peptídeo ômega.

Para melhor caracterizar a interação entre o peptídeo ômega e a proteína gp130, utilizamos ensaios de ligação. Nesse tipo de ensaio, fagos apresentando o peptídeo ômega e fagos selvagens (nesse caso o fago Fd, que não apresenta nenhum peptídeo fusionado à proteína pIII) são incubados com a proteína alvo e proteínas controles. Nesse ensaio, espera-se que o fago apresentando o peptídeo ômega se ligue com afinidade e especificidade à proteína gp130, e não às demais. Utilizamos quatro proteínas como controle em nossos ensaios: LIFR, OSMR (que são, juntamente com a gp130, membros da família de receptores da IL6), AXL (um receptor tirosina quinase não relacionado como a proteína gp130 mas também um receptor quimera com o domínio Fc de IgG humana) e BSA. O fago que apresenta o peptídeo ômega se liga, de modo significativo, apenas à proteína gp130, sendo essa ligação cerca de  $10^3$  maior na proteína gp130 que nas demais proteínas controle (**FIGURA 37**).



**FIGURA 37: O peptídeo ômega se liga especificamente a Tie1.** Fago ômega e controle (Fd) foram incubados individualmente com os diferentes receptores e o número de fagos ligantes quantificados por contagem de colônia. O fago apresentando o peptídeo ômega isolado se liga com especificidade a gp130. Sua ligação ao receptor é cerca de  $10^3$  maior que ligação às proteínas controle utilizadas, um fato que indica alta afinidade do peptídeo pelo alvo. O *input* de fagos foi de  $10^9$  TU. Barras representam o erro padrão da média.

Além disso, para demonstrar que a ligação entre o fago e proteína alvo ocorre devido ao peptídeo apresentado e não devido a outras proteínas presentes na superfície do fago, realizamos ensaios de competição entre o fago e o peptídeo sintético. Observamos que o fago apresentando o peptídeo ômega é deslocado, de maneira dose-dependente, da gp130 em altas concentrações do peptídeo sintético. O peptídeo sintético inibe a interação entre fago e receptor de maneira dose-dependente (**figura 38**), sendo que o peptídeo sintético controle não altera a interação entre o fago e a proteína gp130.



**FIGURA 38:** A ligação do fago apresentando o peptídeo ômega é inibida de maneira dose dependente pelo peptídeo sintético cognato. O fago ômega foi incubado com gp130 imobilizado, na presença ou ausência do peptídeo ômega ou do peptídeo controle e o número de fagos ligantes quantificados por contagem de colônia. Barras representam desvio padrão do plaqueamento em triplicatas.

## 5. Discussão

Anticorpos monoclonais podem ser utilizados em diversas áreas, desde pesquisa básica até em contextos clínicos. Entretanto, o desenvolvimento de mAbs é um processo que costuma ser lento, custoso e, no caso de alvos não imunogênicos ou tóxicos, uma tarefa árdua e, muitas vezes, fadada ao insucesso. Nas últimas décadas, um método alternativo desenvolvido para o isolamento de mAbs se baseia no uso de bibliotecas de anticorpos recombinantes. O estudo apresentado nessa tese mostra que essa tecnologia pode ser adaptada para isolar anticorpos contra um determinado alvo partindo-se de pequenos ligantes peptídicos.

Nossos estudos partem da premissa de que peptídeos ligantes de um determinado alvo podem ser engenheirados na estrutura de anticorpos de modo a direcionar esses anticorpos a um determinado alvo. Em anticorpos, o CDR3 da cadeia pesada (HCDR3) apresenta uma ampla variação em relação ao tamanho, assim como o formato tridimensional (AL-LAZIKANI; LESK; CHOTHIA, 2000). Esse *loop* está associado à especificidade de um anticorpo, todavia, apesar de ser um grande determinante de especificidade, em alguns casos, ele é insuficiente para garantir a especificidade de ligação (D'ANGELO et al., 2018; XU; DAVIS, 2000). Além disso, outro fator determinante tanto da estabilidade, quanto da especificidade de um dado HCDR3 é o seu tamanho (BARRIOS; JIRHOLT; OHLIN, 2004). Em humanos, há uma ampla variação de tamanhos de HCDR3, que variam, inclusive, com o tipo de gene utilizado durante o processo de maturação do linfócito B. Todavia, os tamanhos médios se encontram entre 12 e 16 resíduos (BARRIOS; JIRHOLT; OHLIN, 2004). O peptídeo TBP, derivado de uma biblioteca CX8C, é formado por oito resíduos de aminoácido, sendo que as cisteínas, por formarem pontes de dissulfeto entre si, fazem com que o peptídeo adote uma forma circular e com maior restrição conformacional. Acreditamos que essas duas características foram importantes, pois o tamanho, juntamente com o *design* de *loops* que desenvolvemos, ajudou a tornar o tamanho dos HCDR3 de nossa biblioteca de anticorpos dentro dos tamanhos médios de HCDR3. Além disso, como o peptídeo já possui restrições conformacionais, acreditamos que sua fixação dentro do *framework* de um

anticorpo não resultou em efeitos de impedimento estérico que resultassem na perda de interação e/ou afinidade. Outro ponto que corrobora com a hipótese da importância do tamanho do peptídeo a ser engenheirado dentro do HCDR3 é o fato de que não fomos capazes de isolar scFvs específicos para gp130 quando tentamos reproduzir o processo realizado com o peptídeo TBP utilizando o peptídeo ômega (dados não apresentados). É possível que nossa plataforma de conversão seja mais eficiente para peptídeos de conformação restrita (não lineares), já que peptídeos lineares, por não possuírem nenhuma restrição conformacional, podem sofrer uma certa perda de afinidade por seu alvo quando inseridos dentro do *framework* de um anticorpo. Além disso, o tamanho do peptídeo ômega (19 aminoácidos) possivelmente seria um fator limitante, pois geraria uma alça de HCDR3 de tamanho muito maior que o encontrado no acervo de imunoglobulinas humanas.

Durante nossa seleção com o sistema de *phage display* de anticorpos, observamos que não houve um enriquecimento no número de fagos recuperados a cada ciclo e, ao final da seleção, poucos clones apresentavam insertos codificando o scFv. A produção de anticorpos recombinantes no periplasma de *E. coli* é comumente prejudicada pela toxicidade que essas proteínas ocasionam, resultando em crescimento limitado e lise celular (KNAPPIK; PLÜCKTHUN, 1995; PLÜCKTHUN; SKERRA, 1989). O fato de não observarmos um enriquecimento, assim como o baixo número de clones positivos é um indicativo de que células que são infectadas com fagos que perderam (por deleção, por exemplo) a região codificante do scFv apresentam uma maior vantagem proliferativa, passando a compor uma maior porcentagem da população de bacteriófagos. Esse é um fator limitante da técnica, que a torna mais difícil de ser aplicada para o isolamento de anticorpos. Entretanto, apesar dessa dificuldade, conseguimos demonstrar a possibilidade de isolar anticorpos desenhados a partir de peptídeos.

Uma segunda característica de anticorpos está na sua especificidade. Em nossa validação, o scFv pHighTBP1 se liga em Tie1, mas não se liga a Tie2 (que pertence à mesma família de Tie1 e que possui cerca de 30% de identidade de

aminoácidos na porção extracelular) e a nenhum outro receptor da família do VEGF.

Outra vantagem de nosso sistema consiste no fato de que fomos capazes de produzir nosso scFv em sua forma solúvel. A utilização de fagos apresentando o scFv apresenta diversos problemas técnicos, como a imprecisão da quantificação de fagos, sinal de *background* alto e perda da viabilidade do fago (LØSET; KRISTINSSON; SANDLIE, 2008; MOROHASHI et al., 2006). A produção de scFv recombinante em *E. coli*, por sua vez, muitas vezes resulta na produção de corpos de inclusão (JEVSEVAR et al., 2005; QI; SUN; XIONG, 2015; SINGH et al., 2012), cujo *refolding* é um processo penoso e que demanda muito tempo, atingindo, muitas vezes, um baixo rendimento. Nosso sistema foi capaz de gerar a proteína recombinante solúvel em quantidades suficientes 100-300 ug/L para experimentos em escala laboratorial.

Infelizmente, não fomos capazes de alterar o formato de scFv para scFv-Fc. Alguns estudos citam a perda de afinidade após a conversão de scFv para o formato de IgG completo (STEINWAND et al., 2014). Após buscas na literatura sobre expressão de anticorpos, no formato completo e em outros formatos, como o scFv-Fc, verificamos que a maior parte dos trabalhos utiliza células como HEK293–6E para realizar a expressão da proteína. No nosso caso, utilizamos uma cepa de *S. cerevisiae*. Leveduras comumente hiperglicosilam proteínas recombinantes que possuem sítios de glicosilação. Nosso anticorpo, no formato scFv-Fc apresentou um peso molecular aparente superior ao dobro do peso molecular esperado (em condições não redutoras), ao passo que em condições redutoras, apresentou um peso molecular aparente esperado. Acreditamos que essa diferença seja devido à hiperglicosilação e que isso possa ter afetado negativamente a ligação de nosso scFv-Fc ao receptor Tie1. A verificação dessa hipótese deveria ser realizada com a expressão de nossos anticorpos em outros tipos celulares para, de fato, eliminar a suposição de que a perda de afinidade foi realmente devido à conversão de scFv para scFv-Fc.

Em relação à troca de cadeias leves, demonstramos que essa pode ser uma etapa a ser adicionada em nossa plataforma de desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Nossa cadeia variável pesada pode ser associada ao

gene IGHV3-23. Esse gene é comumente utilizado em imunoglobulinas humanas e pode se associar com diversos genes de cadeia leve do tipo kappa, assim como do tipo lambda. A cadeia leve isolada pertence ao tipo lambda e é proveniente do gene IGLV1-40, que é o segundo gene mais utilizado em combinação com IGHV3-23 (TILLER et al., 2013). Isso é um indicativo de que a substituição de cadeias, além de eficiente, tornou nosso scFv mais semelhante a imunoglobulinas humanas. A troca de cadeias leves, todavia, não apresentou mudanças aparentes de afinidade, já que a recuperação dos fagos apresentando o scFv pHIGHTBP1 após ensaio de ligação foi semelhante. Todavia, houve melhoria em índices de estabilidade de nossa molécula, como atestado pelos parâmetros de índice de estabilidade e índice alifático. O aumento desse índice pode ser associado a uma melhor interação intramolecular, especialmente entre os resíduos hidrofóbicos que formam o núcleo da proteína, fato este que resultaria em uma maior estabilidade da molécula e menor tendência a permanecer em um *molten globule state* (um estado em que a proteína se encontra parcialmente enovelada, porém não possui o empacotamento gerado por aminoácidos que criam um estado mais sólido/compactado, relacionado à estrutura tridimensional de proteínas enoveladas). Isso demonstra que essa etapa é necessária para o processo de melhoramento de anticorpos selecionados. Além disso, nossa construção permite com que modificações na cadeia pesada possam ser realizadas, de modo a substituir as regiões da cadeia variável pesada. Essa modificação permitiria a substituição de parte da cadeia variável pesada, mantendo apenas o HCDR3 isolado, por uma de origem humana. Acreditamos que essa substituição possa gerar moléculas mais estáveis e, também, com maior afinidade ao seu alvo.

Outra inovação importante trazida por esse estudo consiste no fato de que nossa plataforma independe do sistema imune para o desenvolvimento de anticorpos. Diferentemente de técnicas como o hibridoma ou até mesmo *phage display* de anticorpos baseados em bibliotecas imunes, nosso sistema não depende da imunização de animais. Isso se apresenta como uma vantagem, pois é possível contornar as limitações de produção de anticorpos contra alvos pouco imunogênicos, tóxicos, ou antígenos próprios.



Uma das limitações de nosso estudo se encontra na falta de ensaios funcionais (ensaios *in vivo* ou ensaios celulares) que comprovem que nosso scFv possui a mesma atividade biológica do peptídeo TBP. Todavia, como verificamos que ambas as moléculas se ligam ao mesmo sítio em Tie1, como evidenciado em nosso ensaio de competição com o peptídeo sintético TBP, acreditamos que o scFv seja equivalente, em relação à atividade biológica, ao peptídeo TBP e que as diferenças biológicas que possivelmente serão observadas estarão mais associadas a propriedades farmacocinéticas, como distribuição, metabolismo e excreção, ao passo que as atividades farmacodinâmicas, como interação com o receptor e mecanismo de ação, serão mantidas. Além disso, até o presente momento, encontramos apenas um anticorpo anti-Tie1 descrito como inibidor de angiogênese e metástase (KHAN; KERBEL, 2020), fato este que pode colocar nosso scFv como um potencial novo fármaco.

Em relação à descoberta de novos alvos moduladores da angiogênese, encontramos certa dificuldade em isolar peptídeos ligantes da porção extracelular dos receptores LIFR e OSMR. Modelos estruturais da interação de LIFR/LIF e OSMR/OSM (DU; QIAN; XUE, 2020; HUYNON et al., 2007) demonstram que a interação entre citocina e receptor se dá via pontos diferentes da citocina, com o uso de diversos resíduos de aminoácidos, localizados em regiões distintas e distantes da citocina. Com base nisso, acreditamos que o tamanho de nossas bibliotecas de peptídeos (6 ou 8 resíduos) é um limitante, já que áreas extensivas de contato seriam necessárias para que houvesse a seleção e isolamento de peptídeos de alta afinidade. Outro dado que corrobora com essa hipótese é o fato de que o único ligante que conseguimos isolar contra gp130 possui um tamanho muito maior (formado por 19 resíduos de aminoácidos) que o dos peptídeos encontrados na biblioteca de seis resíduos da qual ele foi isolado.

Diversos estudos recentes estão verificando a importância de LIFR/LIF e OSMR/OSM em doenças dependentes de angiogênese (DI MAIRA et al., 2022; FOGLIA et al., 2017; HANLON et al., 2019; LI et al., 2022), o que demonstra que nossa escolha de receptores foi propícia. Apesar de não termos isolado nenhum ligante desses receptores, esses alvos apresentam um grande interesse e

poderão ser melhores investigados em futuros projetos de estudo em nosso laboratório.

Em relação à proteína gp130, conseguimos isolar um peptídeo direcionado contra sua porção extracelular. A proteína gp130 está ubiquamente expressa no corpo humano e é um co-receptor de ao menos nove citocinas (IL-6, OSM, LIF, IL-11, CNTF, CLC, IL-27, CT-1, and NP), estando, portanto, associada a diversas funções biológicas. Desequilíbrios na expressão, ativação ou sinalização de vias associadas à gp130 estão implicados em uma variedade de doenças humanas (JONES et al., 2013; MUKHERJEE; PHILPOTT, 2021; NAKA; KISHIMOTO, 2002; SILVER; HUNTER, 2010; WEI et al., 2019), o que faz com que essa proteína seja interessante tanto no aspecto clínico, para o desenvolvimento de novos fármacos, quanto científico, para a investigação de mecanismo relacionados a doenças.

Dados da literatura mostram que a desregulação da atividade da proteína gp130 resulta em tumorigênese e progressão de câncer. Além disso, a gp130 é altamente expressa em múltiplos tipos de cânceres, além de estar associada ao prognóstico de pacientes que apresentam essa doença, assim como a resistência de certos tipos de câncer ao tratamento farmacológico (SREENIVASAN et al., 2022; XU; NEAMATI, 2013). Dada a ubiquidade da expressão da proteína gp130, assim como sua participação em diversas vias de sinalização, é possível que o peptídeo ômega apresente alguma atividade biológica que influencie uma, ou até mesmo todas as vias dependentes desse receptor, fato este que pode ser benéfico ou problemático, do ponto de vista clínico. A modulação de diversas vias poderia resultar em um forte inibidor, especialmente em um contexto de células tumorais, todavia, dada a ubiquidade de expressão desse receptor, é possível que a atuação desse peptídeo em locais distintos do local de ação desejado possa gerar efeitos adversos, o que talvez venha a ser um fator limitante na aplicação desse peptídeo como um possível fármaco.

Apesar de não termos determinado o Kd do peptídeo pelo receptor, nossos dados permitem estimar indiretamente sua afinidade por gp130. Como sua IC<sub>50</sub> (concentração inibitória 50%) é de aproximadamente 10 µM, como

verificado no ensaio de competição com o fago, podemos supor que sua afinidade por gp130 esteja na faixa de micromolar. Um dos objetivos desta parte do projeto era identificar novos alvos moduladores da angiogênese e isolar ligantes que pudessem interferir nesse processo. Apesar de não termos tido sucesso em isolar ligantes de LIFR e OSMR, o peptídeo ômega, ligante de gp130, poderá ser utilizado futuramente para a verificação de sua atividade biológica.

## 6. Conclusão

Nesse estudo, demonstramos um método alternativo para desenvolver anticorpos monoclonais direcionados a sítios biologicamente relevantes em proteínas. Essa metodologia, portanto, poderá ser utilizada futuramente como alternativa para a geração de anticorpos monoclonais racionalmente desenhados. Sua vantagem, em relação aos métodos tradicionais, como o hibridoma, se fundamenta em dois aspectos: prescindibilidade de imunização prévia de animais, o que contorna problemas relacionados a alvos tóxicos, pouco imunogênicos ou endógenos, assim como a dispensabilidade de humanização do anticorpo gerado. Em relação ao método padrão de *phage display* de anticorpos, nosso método contorna a necessidade de bibliotecas altamente diversas, já que a inserção de uma sequência com afinidade a um dado alvo dentro do HCDR3 direciona os anticorpos provenientes dessa biblioteca para o alvo em estudo, restando, portanto, apenas a necessidade de realizar adaptações na composição e tamanho do HCDR3 para serem inclusas na biblioteca inicial, fato este que possibilita a geração de bibliotecas de menor complexidade.

O anticorpo desenvolvido nesse estudo, direcionado contra um importante alvo envolvido na angiogênese, poderá ter diversas aplicações, uma das quais poderá ser a utilização do mesmo para a identificação do sítio de ligação dessa molécula no receptor Tie1, informação essa que poderá ser futuramente utilizada no desenvolvimento de novas drogas moduladoras da angiogênese, assim como ser utilizado para estudar com mais detalhes as vias celulares que são moduladas por esse anticorpo. Isso poderá contribuir com um melhor entendimento do papel de Tie1 no processo de angiogênese.

Os vetores desenvolvidos durante nosso trabalho poderão ser utilizados pelo grupo como uma ferramenta para o desenvolvimento de novas moléculas, cuja aplicação poderá ser desde a criação de novos reagentes, até o desenvolvimento de novos fármacos contra as doenças estudadas por nosso grupo.

Além disso, demonstramos a versatilidade da tecnologia de *phage display* de peptídeos através do isolamento de um peptídeo ligante da porção extracelular de gp130. Como gp130 é um receptor envolvido em diversas funções celulares, acreditamos que esse peptídeo poderá ter uma função biológica relevante. Tal peptídeo poderá ser explorado futuramente em vias relacionadas à resposta imune, inflamação, assim como na angiogênese.

## Referências

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. [s.l.]: GEN Guanabara Koogan, 2019.
- ADAMS, Gregory P.; WEINER, Louis M. Monoclonal antibody therapy of cancer. **Nature biotechnology**, United States, v. 23, n. 9, p. 1147–1157, 2005. DOI: 10.1038/nbt1137.
- AHMADI, Mahdi; REZAIE, Jafar. Tumor cells derived-exosomes as angiogenic agents: Possible therapeutic implications. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–18, 2020. DOI: 10.1186/s12967-020-02426-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02426-5>.
- AL-LAZIKANI, Bissan; LESK, Arthur M.; CHOTHIA, Cyrus. Canonical structures for the hypervariable regions of T cell  $\alpha\beta$  receptors. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 295, n. 4, p. 979–995, 2000. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3358.
- BARRIOS, Yvelise; JIRHOLT, Pernilla; OHLIN, Mats. Length of the antibody heavy chain complementarity determining region 3 as a specificity-determining factor. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 332–338, 2004. DOI: 10.1002/jmr.679.
- BENJAMIN, L. E.; GOLIJANIN, D.; ITIN, A.; PODE, D.; KESHET, E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 159–165, 1999. DOI: 10.1172/JCI5028.
- BUENO, Maria J.; MOURON, Silvana; QUINTELA-FANDINO, Miguel. Personalising and targeting antiangiogenic resistance: A complex and multifactorial approach. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 116, n. 9, p. 1119–1125, 2017. DOI: 10.1038/bjc.2017.69.
- CABRAL, Thiago; MELLO, Luiz Guilherme M.; LIMA, Luiz H.; POLIDO, Júlia; REGATIERI, Caio V; BELFORT, Rubens Jr; MAHAJAN, Vinit B. Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. **International journal of retina and vitreous**, [S. l.], v. 3, p. 31, 2017. DOI: 10.1186/s40942-017-0084-9.
- CARDONES, Adela R.; BANEZ, Lionel L. VEGF inhibitors in cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, United Arab Emirates, v. 12, n. 3, p. 387–394, 2006. DOI: 10.2174/138161206775201910.
- CHEN, Dong-Bao; ZHENG, Jing. Regulation of placental angiogenesis. **Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 15–25, 2014. DOI: 10.1111/micc.12093.
- CONNOR, Kip M. et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. **Nature protocols**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 1565–1573, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.187.
- D'AMICO, Gabriela; KORHONEN, Emilia Anne; WALTARI, Marika; SAHARINEN, Pipsa; LAAKKONEN, Pirjo; ALITALO, Kari. Loss of endothelial tie1 receptor impairs lymphatic vessel development-brief report. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 207–209, 2010. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.196618.
- D'ANGELO, Sara; FERRARA, Fortunato; NARANJO, Leslie; ERASMUS, M. Frank; HRABER, Peter; BRADBURY, Andrew R. M. Many routes to an antibody heavy-chain CDR3: Necessary, yet insufficient, for specific binding. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. MAR, p. 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00395.
- DEMIR, Ramazan; YABA, Aylin; HUPPERTZ, Berthold. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. **Acta Histochemica**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 203–214, 2010. DOI: 10.1016/j.acthis.2009.04.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2009.04.004>.
- DI MAIRA, Giovanni et al. Oncostatin M is overexpressed in NASH-related hepatocellular carcinoma and promotes cancer cell invasiveness and angiogenesis. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 257, n. 1, p. 82–95, 2022. DOI: 10.1002/path.5871.
- DU, Qingqing; QIAN, Yan; XUE, Weiwei. Molecular Simulation of Oncostatin M and Receptor (OSM–OSMR) Interaction as a Potential Therapeutic Target for Inflammatory Bowel Disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 7, n. March, p. 1–9, 2020. DOI:

10.3389/fmolb.2020.00029.

DUMONT, D. J.; YAMAGUCHI, T. P.; CONLON, R. A.; ROSSANT, J.; BREITMAN, M. L. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. **Oncogene**, England, v. 7, n. 8, p. 1471–1480, 1992.

EDELMAN, Martin J.; MAO, Li. Resistance to anti-angiogenic agents: a brief review of mechanisms and consequences. **Translational lung cancer research, [S. l.]**, v. 2, n. 4, p. 304–307, 2013. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2013.01.02.

EKLUND, Lauri; SAHARINEN, Pipsa. Angiopoietin signaling in the vasculature. **Experimental cell research**, United States, v. 319, n. 9, p. 1271–1280, 2013. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.03.011.

FALLAH, Asghar; SADEGHINIA, Ali; KAHROBA, Houman; SAMADI, Amin; HEIDARI, Hamid Reza; BRADARAN, Behzad; ZEINALI, Sirous; MOLAVI, Ommoleila. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, France, v. 110, p. 775–785, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.022.

FIEDLER, Ulrike; SCHARPFENECKER, Marion; KOIDL, Stefanie; HEGEN, Anja; GRUNOW, Verena; SCHMIDT, Jarno M.; KRIZ, Wilhelm; THURSTON, Gavin; AUGUSTIN, Hellmut G. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. **Blood**, United States, v. 103, n. 11, p. 4150–4156, 2004. DOI: 10.1182/blood-2003-10-3685.

FOGLIA, B. et al. Oncostatin M induces increased invasiveness and angiogenesis in hepatic cancer cells through HIF1 $\alpha$ -related release of VEGF-A. **Digestive and Liver Disease, [S. l.]**, v. 49, n. 1, p. e5, 2017. DOI: 10.1016/j.dld.2017.01.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dld.2017.01.013>.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England journal of medicine**, United States, v. 285, n. 21, p. 1182–1186, 1971. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.

GIORDANO, RICARDO J.; CARDÓ-VILA, MARINA ; LAHDENRANTA, JOHANNA ; PASQUALINI, RENATA ; ARAP, WADIH . Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nature Medicine**, v. 7, n.11, p. 1249-1253, 2001.

GOMES, Carlos Henrique Rodrigues. **Desenvolvimento de novos vetores para a produção de bibliotecas de anticorpos pelo sistema do phage display**. 2018. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2018.

GP, Smith. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science, [S. l.]**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985.

GUARISCHI-SOUSA, Rodrigo et al. A transcriptome-based signature of pathological angiogenesis predicts breast cancer patient survival. **PLoS Genetics, [S. l.]**, v. 15, n. 12, p. 1–23, 2019. DOI: 10.1371/journal.pgen.1008482.

HAKANPAA, Laura et al. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin  $\beta$ 1 activation. **Nature communications, [S. l.]**, v. 6, p. 5962, 2015. DOI: 10.1038/ncomms6962.

HANLON, Megan M.; RAKOVICH, Tatsiana; CUNNINGHAM, Clare C.; ANSBORO, Sharon; VEALE, Douglas J.; FEARON, Ursula; MCGARRY, Trudy. STAT3 mediates the differential effects of oncostatin M and TNF $\alpha$  on RA synovial fibroblast and endothelial cell function. **Frontiers in Immunology, [S. l.]**, v. 10, n. AUG, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02056.

Hußmann, Melina et al. Svp1 is a binding ligand of Tie1 and affects specific aspects of facial lymphatic development in a Vegfc-independent manner. **Elife.**, v. 12:e82969, 2023. doi: 10.7554/eLife.82969.

HURWITZ, Herbert et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The New England journal of medicine**, United States, v. 350, n. 23, p. 2335–2342, 2004. DOI: 10.1056/NEJMoa032691.

HUYTON, Trevor; ZHANG, Jian Guo; LUO, Cindy S.; LOU, Mei Zhen; HILTON, Douglas J.; NICOLA, Nicos A.; GARRETT, Thomas P. J. An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 31, p. 12737–12742, 2007. DOI: 10.1073/pnas.0705577104.

iGEM. Cold Osmotic Shock. iGEM, 2014. Disponível em <[https://static.igem.org/mediawiki/2014/b/bb/Bielefeld-CeBiTec\\_2014-10-14\\_Cold\\_osmotic\\_Shock.pdf](https://static.igem.org/mediawiki/2014/b/bb/Bielefeld-CeBiTec_2014-10-14_Cold_osmotic_Shock.pdf)>. Acesso em Acesso em 2 maio de 2020.

JAIN, Rakesh K. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. **Cancer cell**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 605–622, 2014. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.10.006.

JAROSZEWICZ, Weronika; MORCINEK-ORŁOWSKA, Joanna; PIERZYNOWSKA, Karolina; GAFFKE, Lidia; WĘGRZYN, Grzegorz. Phage display and other peptide display technologies. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 1–25, 2022. DOI: 10.1093/femsre/fuab052.

JEVSEVAR, Simona; GABERC-POREKAR, Vladka; FONDA, Irena; PODOBNIK, Barbara; GRDADOLNIK, Joze; MENART, Viktor. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. **Biotechnology progress**, United States, v. 21, n. 2, p. 632–639, 2005. DOI: 10.1021/bp0497839.

JIMÉNEZ-VALERIO, Gabriela; CASANOVAS, Oriol. Antiangiogenic Resistance: Novel Angiogenesis Axes Uncovered by Antiangiogenic Therapies Research. **Current drug targets**, United Arab Emirates, v. 17, n. 15, p. 1728–1734, 2016. DOI: 10.2174/1389450117666160301101425.

JONES, G. W.; GREENHILL, C. J.; WILLIAMS, J. O.; NOWELL, M. A.; WILLIAMS, A. S.; JENKINS, B. J.; JONES, S. A. Exacerbated inflammatory arthritis in response to hyperactive gp130 signalling is independent of IL-17A. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 1738–1742, 2013. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203771.

KHAN, Kabir A.; KERBEL, Robert S. A new Tie1 targeted antibody blocks tumor cell extravasation and metastasis. **EMBO Molecular Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 10–12, 2020. DOI: 10.15252/emmm.202012355.

KIM, Clifford B.; D'AMORE, Patricia A.; CONNOR, Kip M. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. **Eye and Brain**, [S. l.], v. 8, p. 67–79, 2016. DOI: 10.2147/EB.S94447.

KIM, Kyung Eun; CHO, Chung Hyun; KIM, Hak Zoo; BALUK, Peter; MCDONALD, Donald M.; KOH, Gou Young. In vivo actions of angiopoietins on quiescent and remodeling blood and lymphatic vessels in mouse airways and skin. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 564–570, 2007. DOI: 10.1161/01.ATV.0000256458.82320.be.

KIMBALL, JA A. et al. The OKT3 antibody response study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. **Transplant Immunology**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 212–221, 1995. DOI: 10.1016/0966-3274(95)80027-1.

KNAPPIK, Achim; PLÜCKTHUN, Andreas. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. **Protein engineering**, [S. l.], v. 8 1, p. 81–89, 1995.

KOH, Gou Young. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. **Trends in molecular medicine**, England, v. 19, n. 1, p. 31–39, 2013. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.10.010.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, England, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 1975. DOI: 10.1038/256495a0.

KOIVUNEN, Erkki; ARAP, Wadih; RAJOTTE, Daniel; LAHDENRANTA, Johanna; PASQUALINI, Renata. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. **Journal of Nuclear Medicine**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 883–888, 1999.

KUMAR, Rajesh; PARRAY, Hilal Ahmed; SHRIVASTAVA, Tripti; SINHA, Subrata; LUTHRA, Kalpana. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 135, p. 907–918, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>.

LI, Jie; ZHANG, Yan-Ping; KIRSNER, Robert S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy research and technique**, United States, v. 60, n. 1, p. 107–114, 2003. DOI: 10.1002/jemt.10249.

LI, Pin et al. LIF, a mitogen for choroidal endothelial cells, protects the choriocapillaris: implications for prevention of geographic atrophy. **EMBO Molecular Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 1,



2022. DOI: 10.15252/emmm.202114511.

LØSET, Geir Åge; KRISTINSSON, Solveig G.; SANDLIE, Inger. Reliable titration of filamentous bacteriophages independent of pIII fusion moiety and genome size by using trypsin to restore wild-type pIII phenotype. **BioTechniques**, England, v. 44, n. 4, p. 551-552,554, 2008. DOI: 10.2144/000112724.

MAGALHÃES, Leila S. **Importância do domínio extracelular do receptor tirosina quinase Tie1 na angiogênese**. 2016. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2016.

MAISONPIERRE, P. C. et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 277, n. 5322, p. 55–60, 1997. DOI: 10.1126/science.277.5322.55.

MCCAFFERTY, John; GRIFFITHS, Andrew D.; WINTER, Greg; CHISWELL, David J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, [S. l.], v. 348, n. 6301, p. 552–554, 1990. DOI: 10.1038/348552a0.

MOLEK, Peter; STRUKELJ, Borut; BRATKOVIC, Tomaz. Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors. [S. l.], p. 857–887, 2011. DOI: 10.3390/molecules16010857.

MOROHASHI, Kengo; ARAI, Tsuyoshi; SAITO, Seiich; WATANABE, Madoka; SAKAGUCHI, Kengo; SUGAWARA, Fumio. A high-throughput phage display screening method using a combination of real-time PCR and affinity chromatography. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, United Arab Emirates, v. 9, n. 1, p. 55–61, 2006. DOI: 10.2174/138620706775213840.

MUKHERJEE, Tapas; PHILPOTT, Dana J. gp130 blockade to NOD off Crohn's disease. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 42, n. 7, p. 551–553, 2021. DOI: 10.1016/j.it.2021.05.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.05.007>.

NAGANO, Kazuya; TSUTSUMI, Yasuo. Phage display technology as a powerful platform for antibody drug discovery. **Viruses**, [S. l.], v. 13, n. 2, p. 1–16, 2021. DOI: 10.3390/v13020178.

NAKA, Tetsuji; KISHIMOTO, Tadimitsu. Joint disease caused by defective gp130-mediated STAT signaling. **Arthritis research**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 154–156, 2002. DOI: 10.1186/ar400.

OBEXER, Richard; WALPORT, Louise J.; SUGA, Hiroaki. Exploring sequence space: harnessing chemical and biological diversity towards new peptide leads. **Current Opinion in Chemical Biology**, [S. l.], v. 38, p. 52–61, 2017. DOI: 10.1016/j.cbpa.2017.02.020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.020>.

PARTANEN, J.; ARMSTRONG, E.; MÄKELÄ, T. P.; KORHONEN, J.; SANDBERG, M.; RENKONEN, R.; KNUUTILA, S.; HUEBNER, K.; ALITALO, K. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1698–1707, 1992. DOI: 10.1128/mcb.12.4.1698-1707.1992.

PLÜCKTHUN, A.; SKERRA, A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. **Methods in enzymology**, United States, v. 178, p. 497–515, 1989. DOI: 10.1016/0076-6879(89)78036-8.

PURI, Mira C.; ROSSANT, Janet; ALITALO, Kari; BERNSTEIN, Alan; PARTANEN, Juha. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 14, n. 23, p. 5884–5891, 1995. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00276.x.

QI, Xingmei; SUN, Yifan; XIONG, Sidong. A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. **Microbial cell factories**, [S. l.], v. 14, p. 24, 2015. DOI: 10.1186/s12934-015-0208-6.

RIO, Donald C.; ARES, Manuel Jr; HANNON, Gregory J.; NILSEN, Timothy W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). **Cold Spring Harbor protocols**, United States, v. 2010, n. 6, p. pdb.prot5439, 2010. DOI: 10.1101/pdb.prot5439.

SAPKOTA, Timothy D. Cummins and Gopal P.; ABSTRACT. Characterization of Protein Complexes Using Chemical Cross-Linking Coupled Electrospray Mass Spectrometry. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], n. 1341, p. 257–284, 2016. DOI: 10.1007/7651.

- SATO, T. N.; QIN, Y.; KOZAK, C. A.; AUDUS, K. L. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 90, n. 20, p. 9355–9358, 1993. DOI: 10.1073/pnas.90.20.9355.
- SAVANT, Soniya et al. The Orphan Receptor Tie1 Controls Angiogenesis and Vascular Remodeling by Differentially Regulating Tie2 in Tip and Stalk Cells. **Cell Reports**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1761–1773, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.024.
- SHIBUYA, Masabumi. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes & cancer**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. 1097–1105, 2011. DOI: 10.1177/1947601911423031.
- SILVER, J. S.; HUNTER, C. A. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 88, n. 6, p. 1145–1156, 2010. DOI: 10.1189/jlb.0410217.
- SINGH, Surinder M.; SHARMA, Aparna; UPADHYAY, Arun K.; SINGH, Anupam; GARG, Lalit C.; PANDA, Amulya K. Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. **Protein expression and purification**, United States, v. 81, n. 1, p. 75–82, 2012. DOI: 10.1016/j.pep.2011.09.004.
- SORMANNI, Pietro; APRILE, Francesco A.; VENDRUSCOLO, Michele. Third generation antibody discovery methods:: In silico rational design. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 47, n. 24, p. 9137–9157, 2018. DOI: 10.1039/c8cs00523k.
- SORMANNI, Pietro; APRILE, Francesco A.; VENDRUSCOLO, Michele; TESSIER, Peter M. Rational design of antibodies targeting specific epitopes within intrinsically disordered proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 32, p. 9902–9907, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1422401112.
- SREENIVASAN, Lakshana; LI, Ling Vicky; LECLAIR, Pascal; LIM, Chinten James. Targeting the gp130/STAT3 Axis Attenuates Tumor Microenvironment Mediated Chemoresistance in Group 3 Medulloblastoma Cells. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/cells11030381.
- STATISTA. Leading drugs worldwide based on projected 2023 sales. **STATISTA**, 2022. Disponível em: < <https://www.statista.com/statistics/973523/top-drugs-by-year-on-year-sales-increase/>>. Acesso em 2 maio de 2023.
- STEINWAND, Miriam; DROSTE, Patrick; FRENZEL, Andre; HUST, Michael; DÜBEL, Stefan; SCHIRRMANN, Thomas. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. **mAbs**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 204–218, 2014. DOI: 10.4161/mabs.27227.
- STEPHENS, S. et al. Comprehensive pharmacokinetics of a humanized antibody and analysis of residual anti-idiotypic responses. **Immunology**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 668–74, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558164> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1383798>.
- TEYMENNET-RAMÍREZ, Karla V.; MARTÍNEZ-MORALES, Fernando; TREJO-HERNÁNDEZ, María R. Yeast Surface Display System: Strategies for Improvement and Biotechnological Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. January, p. 1–10, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2021.794742.
- TILLER, Thomas et al. A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. **mAbs**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 445–470, 2013. DOI: 10.4161/mabs.24218.
- UCHAŃSKI, Tomasz et al. An improved yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-37212-3.
- UCUZIAN, Areck A.; GASSMAN, Andrew A.; EAST, Andrea T.; GREISLER, Howard P. Molecular mediators of angiogenesis. **Journal of burn care & research: official publication of the American Burn Association**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 158–175, 2010. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82.
- UMEZAWA, Eufrosina Setsu; FRANCO DA SILVEIRA, José. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined Trypanosoma cruzi Antigens. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 94, n. SUPPL. 1, p. 285–288, 1999. DOI: 10.1590/S0074-

02761999000700051.

VIALARD, Claire; LARRIVÉE, Bruno. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. **Angiogenesis**, Germany, v. 20, n. 4, p. 409–426, 2017. DOI: 10.1007/s10456-017-9562-9.

WALSH, Gary. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 2018. DOI: 10.1038/nbt.4305.

WEI, Jia; MA, Ling; LAI, Yi Hui; ZHANG, Ruijie; LI, Huameng; LI, Chenglong; LIN, Jiayuh. Bazedoxifene as a novel GP130 inhibitor for Colon Cancer therapy. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 1–13, 2019. DOI: 10.1186/s13046-019-1072-8.

WOO, Kel Vin; QU, Xianghu; BABAEV, Vladimir R.; LINTON, MacRae F.; GUZMAN, Raul J.; FAZIO, Sergio; SCOTT BALDWIN, H. Tie1 attenuation reduces murine atherosclerosis in a dose-dependent and shear stress-specific manner. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 121, n. 4, p. 1624–1635, 2011. DOI: 10.1172/JCI42040.

XU, John L.; DAVIS, Mark M. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. **Immunity**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 37–45, 2000. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)00006-6.

Xu, Meng et al. LECT2, a Ligand for Tie1, Plays a Crucial Role in Liver Fibrogenesis. **Cell**, v. 178, n. 6, p. 1478-1492, 2019. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.021.

XU, Shili; NEAMATI, Nouri. Gp130: A promising drug target for cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1303–1328, 2013. DOI: 10.1517/14728222.2013.830105. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2013.830105>.

ZION MARKET RESEARCH. **Peptide Therapeutics Market - Global Industry Analysis**. 2022. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/sample/peptide-therapeutics-market>.

## Súmula Curricular

### Dados Pessoais

Nome: Caio Cesar Nogueira Cambui

Local e data de nascimento: São Paulo, SP, 16 de Setembro de 1991.

### Educação

Ano	Título ou Atividade	Instituição	Status
	Ensino Médio	Colégio Visconde de Porto Seguro	Concluído
2010-2017	Graduação - Farmácia e Bioquímica	Universidade de São Paulo	Concluído
2017-2023	Doutorado Direto em Bioquímica	Universidade de São Paulo	Em andamento

### Histórico Profissional

- 2010-2012 – Instituto Butantan**  
 Estágio em Laboratório de Imunopatologia (Projeto: Avaliação de toxicidade e atividade antimicrobiana de extratos de cianobactérias brasileiras)
- 2013 (01/01 – 31/21) – Instituto de Química - USP**  
 Estágio no Laboratório de Biologia Vasculuar (Projeto: Caracterização de Peptídeos que Interagem com Receptor Tirosina Quinase VEGFR-3)
- 2014 (24/06 – 13/08) – Hospital Universitário da USP**  
 Estágio de 180 horas no Departamento de Farmácia, área de Farmacovigilância do HU-USP
- 2014 (24/06 – 13/08) – Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP**  
 Estágio no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (Projeto: Expressão, Purificação e Caracterização Cinética e Antigênica da proteína CysA2, suposta enzima com atividade rhodanese-like envolvida no metabolismo de enxofre em Mycobacterium tuberculosis)

## Atividades Complementares e premiações

- **2015 – University of Melbourne**  
Intercâmbio de 9 meses via programa Ciências sem Fronteiras (processo 209239/2014-0) em University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Austrália.
- **2018 – Prêmio Paulo Minami**

## Publicações e Patentes

MEZA, A.N; CAMBUI, C.C.N; MORENO, A.C.R; *et al.* Mycobacterium tuberculosis CysA2 is a dual sulfurtransferase with activity against thiosulfate and 3-mercaptopyruvate and interacts with mammalian cells. *Sci Rep* 9, 16791 (2019) doi:10.1038/s41598-019-53069-6

MICHALOSKI, J.S; REDONDO, A.R; MAGALHAES, L.S; CAMBUI, C.C; GIORDANO, R.J. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. *Science Advances*, v. 2, n. 10, 2016

RANGEL, M. ; BRUNETTI, R. L. ; GARCIA, A. N. ; CAMBUI, C. C. N. ; CONSERVA, G. A. A. ; NEVES, A. C. ; SANT'ANNA, C. L. ; CARVALHO, L. R. . Acute effects of three Geitlerinema spp. (Cyanobacteria) extracts administrated in mice: symptoms and histopathological aspects. *Phytochemistry Reviews*, V. 11, p. 1, 2012.

PEPTÍDEOS SINTÉTICOS LIGANTES DE RECEPTORES DE VEGF E SEUS USOS BR1020140231447 - Universidade de São Paulo (USP). Ricardo José Giordano; Jussara Michaloski Souza; Caio Cesar Nogueira Cambui - 18 de setembro de 2014

CAMBUI, C. C. ; TEIXEIRA, ANDRE A ; DA SILVA MAGALHÃES, LEILA ; GIORDANO, R.J. . Peptide and antibody phage display: a combination for antibody engineering. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).