

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA LOPACINSKI

PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO RECOMBINANTES PARA
DETECÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIREGULINA

CURITIBA

2020

AMANDA LOPACINSKI

PRODUÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO RECOMBINANTES PARA
DETECÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIREGULINA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo T. Zanchin

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Lopacinski, Amanda

Produção de fragmentos de anticorpo recombinante para detecção do fator de crescimento epiregulina. / Amanda Lopacinski. – Curitiba, 2020. 76 p.: il.

Orientador: Nilson Ivo T. Zanchin.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Câncer. 2. Anticorpos monoclonais murinos. I. Título. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.0798



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA LOPACINSKI** intitulada: **Produção de fragmentos de anticorpo recombinantes para detecção do fator de crescimento epiregulina**, sob orientação do Prof. Dr. NILSON IVO TONIN ZANCHIN, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 18:04:11.0

NILSON IVO TONIN ZANCHIN

Presidente da Banca Examinadora (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 18:50:26.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/08/2020 16:57:38.0

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 81531-990 - Tel: (41) 3381-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 51032

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 51032

RESUMO

Os anticorpos monoclonais possuem uma alta seletividade pelo seu alvo. Esta propriedade lhes confere com grande potencial biotecnológico e terapêutico, sendo atualmente a principal classe de biofármacos existente. A estrutura tridimensional dos anticorpos é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas unidas entre si por pontes dissulfeto. Cada cadeia possui uma região constante e uma região variável formando o sítio de reconhecimento e ligação ao antígeno. Existem cinco classes de anticorpos em mamíferos: IgA, IgM, IgE, IgD e IgG, sendo a última a mais abundante entre elas. Através do desenvolvimento de novas técnicas e o advento da tecnologia do DNA recombinante, foi possível manipular a sequência das proteínas. A engenharia de anticorpos surgiu para atender as demandas da pesquisa e de tratamentos clínicos e novos formatos de imunoglobulinas foram sendo desenvolvidos. Dentre eles os fragmentos de anticorpos, como o scFv e o Fab, são muito populares devido a sua menor complexidade e tamanho em comparação a imunoglobulina intacta. Além disso, podem ser produzidos em sistemas mais baratos como a bactéria *Escherichia coli*, despertando ainda mais o interesse por essas moléculas. O Fab 9E5 anti-epiregulina humana (EPR) é um fragmento derivado de um anticorpo monoclonal murino e foi o objeto de estudo deste trabalho devido a relevância que a EPR possui no desenvolvimento de diferentes neoplasias. O objetivo deste trabalho então foi produzir fragmentos de anticorpo do tipo scFv e Fab anti-EPR *Escherichia coli*, a fim de testar e comparar suas afinidades e seletividade pela EPR. Para a construção do scFv foram realizadas amplificações dos genes da cadeia leve e pesada utilizando como molde o fragmento de anticorpo anti-EPR do tipo Fab. Testes de expressão foram realizados para determinar as melhores condições de expressão dos anticorpos. A condição escolhida para prosseguir com os testes de purificação foi 16°C - 16 horas. Também foram expressas e purificadas as construções em pET32a, em fusão com a tioredoxina, dos fatores da família EGF: EPR, EPGN, ARG e HB-EGF. Além disso, foi desenvolvido o vetor pETGOF para identificação direta de clones contendo genes de interesse, através da utilização de uma fusão com a proteína repórter SGFP2 e também para a evolução molecular das sequências dos anticorpos. Foi realizada a clonagem da SGFP2 fora da pauta de leitura com o vetor pET28a-TEV. Com isso, a SGFP2 será fluorescente somente quando houver a clonagem correta de insertos, o que restabelece a pauta de leitura do vetor. Com relação a tentativa de construir um sistema genético que utiliza a T7 RNA polimerase para possibilitar a expressão de proteínas ca cepa de *E. coli* TOP10, o gene da enzima foi clonado no vetor para expressão em *E. coli* pTrc-His TOPO-NUP1 e testes de validação do sistema foram realizados. Os resultados obtidos sugerem que a expressão do gene da T7 é tóxico para as células TOP10. Por isso, passamos a usar a cepa BL21-Star (DE3) em combinação com o vetor pETGOF.

Palavras-chave: EPR, scFv, Fab, câncer, anticorpos.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies have a high selectivity for their target. Hence, they are biomolecules with great biotechnological therapeutic potential, currently being the main class of existing biopharmaceuticals. The three-dimensional structure of antibodies is composed of two light chains and two heavy chains joined by disulfide bonds. Each chain has a constant region and a variable region, which forms the antigen recognition site. There are five classes of antibodies in mammals: IgA, IgM, IgE, IgD and IgG, the latter being the most abundant among them. Through the development of new techniques and the advent of recombinant DNA technology, it was possible to manipulate the sequence of proteins, paving the way to generate humanized antibodies and antibody fragments. Antibody engineering emerged to meet the demands of research and clinical treatments and new formats of immunoglobulins were being developed. Among them, antibody fragments, such as scFv and Fab, are very popular due to their less complex structure and size compared to intact immunoglobulins. In addition, they can be produced in cost-effective systems such as *Escherichia coli*. The Fab 9E5 recognizing human epiregulin (EPR) is a fragment derived from a murine monoclonal antibody and was the object of study in this work due to the relevance that EPR has in the development of several neoplasia. The aim of this work was, therefore, to produce antibody fragments of the scFv and Fab types in *E. coli*, in order to compare their affinity and selectivity for EPR. First, for the construction of the scFv, the light and heavy chain genes were amplified using the anti-EPR antibody fragment of the Fab type as a template for the PCR reactions. The heavy and light chains of the Fab were also subcloned into *E. coli* expression vectors. Expression assays were performed to determine the best expression conditions for the antibody fragments. The condition chosen to proceed with the purification tests was 16 °C for 16 hours. The Fab fragment was obtained at a satisfactory purification grade. Constructions of the EGF family factors in pET32a in fusion with thioredoxin, were also expressed and purified: EPR, EPGN, ARG and HB-EGF. In addition, the pETGOF vector was developed for direct identification of clones containing genes of interest, by using a fusion with the SGFP2 reporter protein and also for the molecular evolution of antibody sequences. SGFP2 was cloned frame shifted from the reading frame of the vector pET28a-TEV. Thus, SGFP2 will be fluorescent only when there is the correct cloning of inserts, which reestablishes the vector reading frame. Regarding the attempt to build a genetic system that uses the T7 RNA polymerase to enable the expression of *E. coli* TOP10 protein, the T7 RNA polymerase gene was cloned into the *E. coli* expression vector pTrc-His-TOPO-NUP1 and system validation tests were performed. The results obtained suggest that T7 gene expression is toxic to TOP10 cells. Therefore, we turned to the strain BL21-Star DE3 to be used in combination with vector pETGOF.

Keywords: EPR, scFv, Fab, cancer, antibodies.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
1.1	ANTICORPOS	7
1.1.1	Imunoglobulina G	9
1.2	ENGENHARIA DE ANTICORPOS E O USO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	11
1.2.1	Fragmentos de anticorpo	13
1.2.1.1	Fragmento variável de cadeia única e fragmento de ligação ao antígeno	15
1.3	PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i>	16
1.4	RELEVÂNCIA DA FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL	16
1.4.1	Fatores ligantes dos receptores da família do EGFR	17
1.4.1.1	Fator de crescimento EPR	19
1.5	SISTEMA GENÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS BASEADO NA T7 RNA POLIMERASE	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	TAMPÕES E SOLUÇÕES	22
3.2	MEIOS DE CULTURA	23
3.3	ANTIBIÓTICOS	23
3.4	MARCADORES MOLECULARES	23
3.4.1	DNA	23
3.4.2	Proteína	23
3.5	PRIMERS UTILIZADOS	24
3.6	FATORES DA FAMÍLIA DO EGF	24
3.6.1	Vetores Para Expressão dos Fatores de Crescimento	24
3.7	CONSTRUÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv e Fab	25
3.8	SISTEMA T7 RNA POLIMERASE	26
3.8.1	Vetor para expressão da T7 RNA polimerase	26
3.8.2	Vetor pETGOF	27
3.9	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL E REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	27
3.10	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	27
3.11	REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	28
3.12	ELETROFORESE DE DNA	28
3.13	TRANSFORMAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i>	28
3.14	TESTES DE EXPRESSÃO EM <i>Escherichia coli</i>	29
3.15	PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	30
3.15.1	Purificação por meio de Cromatografia de Afinidade a Metal (IMAC)	30

3.15.2	Purificação por exclusão de tamanho	30
3.16	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	31
3.17	WESTERN BLOTTING	31
3.18	ANTICORPO 9E5	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR pETGOF	32
4.3	EXPRESSÃO DA T7 RNA POLIMERASE NA CEPA DE <i>E. coli</i> TOP10	36
4.4	CONSTRUÇÃO DO scFv	41
4.4.1	Testes de indução da expressão do scFv	44
4.5	SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO Fab EM VETOR DE <i>E. coli</i>	49
4.6	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FATORES DA FAMÍLIA DO EGF	55
4.6.1	Padronização da expressão	55
4.6.2	Testes de purificação	56
4.6.2.1	Purificação EPR e NRG-1	56
4.6.2.2	Purificação EPGN, HB-EGF e AREG	59
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

A seletividade de ligação a um determinado alvo faz dos anticorpos monoclonais uma ferramenta biotecnológica com aplicações em diversas áreas, como no diagnóstico de doenças, em terapias, na pesquisa em biologia molecular, dentre outras (GOLDMAN, 2000; NELSON, 2010). Entretanto, a produção de anticorpos inteiros e humanizados é bastante complexa e cara, dependendo da utilização de células eucarióticas ou animais, e a utilização da estrutura de um anticorpo inteiro não é necessária em determinadas aplicações.

A produção de anticorpos através de técnicas de biologia molecular possibilita a geração de diversos tipos de moléculas e estruturas, cada uma com suas particularidades e vantagens. Alguns exemplos são os fragmentos de domínios variáveis de cadeia única ou scFv (do inglês *single-chain variable domain antibody fragment*), os quais possuem apenas as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas unidas entre si por conectores flexíveis e os Fabs (do inglês *fragment antigen-binding*) ou fragmentos de ligação ao antígeno, compostos por um domínio variável e um domínio constante de cada cadeia (HUDSON & SOURIAU, 2003; QUIROZ & SINCLAIR, 2010; MUYLDERMANS, 2013).

Devido a sua estrutura simples os fragmentos de anticorpos do tipo Fab e scFv são uma alternativa atrativa para produção em sistemas menos complexos e de fácil manipulação, como bactérias e leveduras (BETTER, *et al.*, 1988). Neste contexto, este trabalho visa utilizar esta estratégia de produção de fragmentos de anticorpos recombinantes para tentar obter um fragmento de anticorpo funcional. Como modelo de estudo selecionamos o fator de crescimento epiregulina e o anticorpo monoclonal denominado 9E5, cuja estrutura e sequência de aminoácidos já estavam disponíveis (Kado e colaboradores em 2015). A escolha da epiregulina se deve ao fato dela ser um fator de crescimento associado ao desenvolvimento de diversas neoplasias, de forma que a disponibilidade de um anticorpo de fácil produção poderia ser usado para sua quantificação como marcador molecular ou eventualmente até para sua inibição como forma de terapia.

Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi construir fragmentos de anticorpos do tipo scFv e Fab anti-EPR para expressão em *Escherichia coli*, um sistema de fácil manutenção, manipulação e de baixo custo.

Paralelamente a isso, foi elaborado também um sistema genético baseado na expressão da T7 RNA polimerase na cepa de *E. coli* TOP10, o qual visa a identificação direta de colônias que contenham os genes de interesse em fusão com a proteína fluorescente verde (GFP). Isso será possível devido a fusão da sequência codificadora das proteínas de interesse à da GFP, a qual funcionará como marcador para identificação visual dos clones positivos. Esse sistema torna o processo de clonagem mais rápido e prático, não havendo a necessidade de etapas de *screening*, as quais acabam por consumir muito tempo e trabalho. Além disso, esse sistema será empregado também na seleção dos scFvs mutantes, sendo a intensidade da coloração emitida por colônias contendo GFP um indicador dos clones com maior nível de expressão.

1.1 ANTICORPOS

Anticorpos, ou imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas circulantes encontradas no soro e também em alguns fluidos extracelulares de animais vertebrados. Essas biomoléculas surgiram pela primeira vez na escala evolutiva em peixes cartilaginosos a mais de 500 milhões de anos e atuam na linha de frente do sistema imune fornecendo uma resposta essencial na defesa do organismo contra agentes externos (LIPMAN *et al.*, 2005; FRENZEL *et al.*, 2013; KANYAVUZ *et al.*, 2019).

As imunoglobulinas são produzidas e secretadas pelos plasmócitos, células especializadas derivadas de linfócitos B que expressam em sua superfície a forma do anticorpo ligada a membrana (chamado de receptor da célula B ou BCR), em resposta à exposição aos antígenos, corpos estranhos que na maioria das vezes são externos ao organismo. Devido a isso, os anticorpos são os principais mediadores da imunidade adaptativa humoral, atuando no reconhecimento e combate de toxinas e diferentes microorganismos, como vírus e bactérias (FRENZEL *et al.*, 2013; ABBAS *et al.*, 2018; KANYAVUZ *et al.*, 2019).

Existem cinco classes de imunoglobulinas em mamíferos: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cada classe possui características próprias tanto no formato, porção Fc,

localização e natureza temporal da resposta imune (figura 02), sendo a imunoglobulina G (IgG) a mais abundante das classes (HOLLIGER & HUDSON, 2005; LIPMAN *et al.*, 2005).

Em seres humanos, a molécula clássica IgG, possui uma estrutura tridimensional característica em forma de “Y”, a qual é constituída por duas cadeias leves (CL) e duas cadeias pesadas (CP) idênticas entre si. Cada cadeia leve está associada a uma cadeia pesada através de uma ponte dissulfeto e outras interações não-covalentes formando um heterodímero. A imunoglobulina intacta é constituída por dois heterodímeros conectados por um linker flexível denominado de dobradiça e estabilizados por duas pontes dissulfeto (figura 01) (HUSE *et al.*, 2002; LIPMAN *et al.*, 2005; CHIU & GILLILAND, 2016; SCHMID & NERI, 2019).

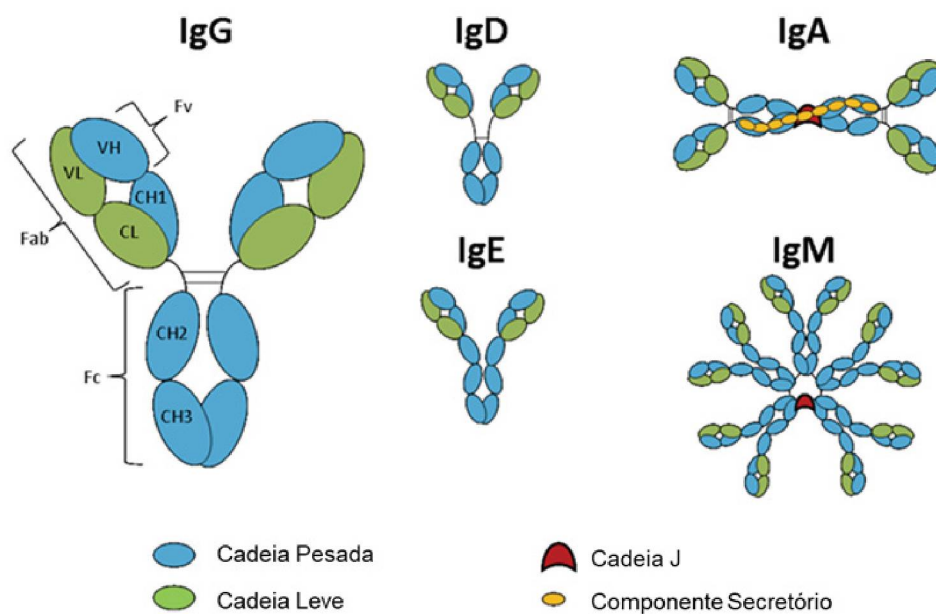


Figura 01. Diferentes classes de imunoglobulinas. Existem cinco classes de imunoglobulinas em mamíferos: A, D, G, E e M. A imunoglobulina G é um monômero, a M possui um domínio constante da cadeia pesada adicional e é formada pela oligomerização de cinco monômeros através da cadeia J, a E possui dois domínios constantes adicionais e a A é dimérica.

As cadeias leves e pesadas possuem um domínio constante (C) e um domínio variável (V). Os domínios variáveis (Fv) de ambas as cadeias estão localizados em suas porções amino-terminal e exibem uma grande diversidade em suas sequências de aminoácidos. Eles formam o sítio responsável pelo reconhecimento e ligação ao antígeno. Essa variação nas extremidades confere aos anticorpos a capacidade de

reconhecer uma grande variedade de antígenos (HUSE *et al.*, 2002, SCHMID & NERI, 2019).

Já os domínios constantes da região carboxi-terminal da cadeia pesada formam a porção Fc da imunoglobulina, a qual é responsável por funções efetoras como a ativação das células NK (do inglês *natural killer*), do sistema complemento e do processo de fagocitose. Essa região possui sequências mais conservadas de aminoácidos e difere somente entre as diferentes classes de anticorpos (figura 02) (HUSE *et al.*, 2002, LIPMAN *et al.*, 2005, KANYAVUZ *et al.*, 2019).

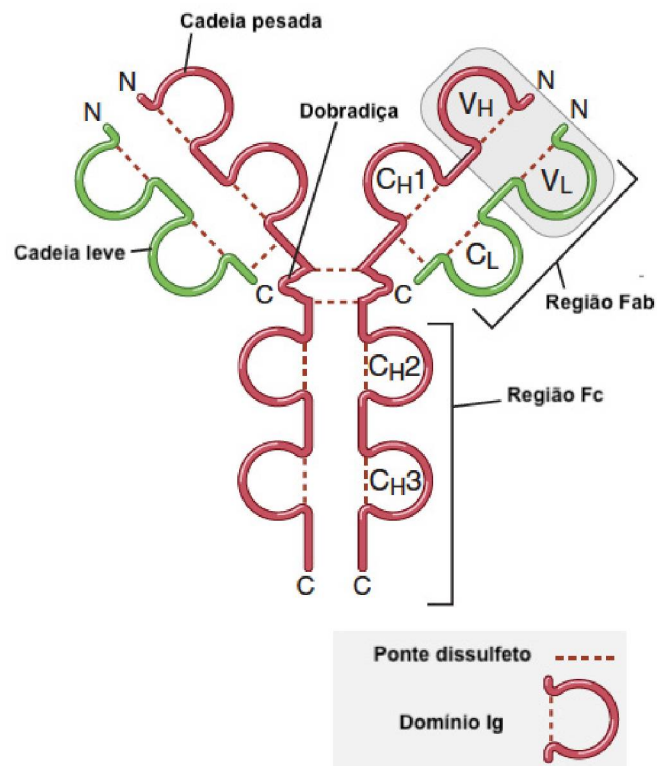


Figura 02. Representação de uma imunoglobulina G. Ilustração demonstrando que a imunoglobulina G é composta por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas interligadas por pontes dissulfeto. A região Fab compreende as regiões variáveis e constantes das duas cadeias e a região Fc compreende somente as regiões constantes da cadeia pesada. Modificado de ABBAS *et al.*, 2018.

1.1.1 Imunoglobulina G

As imunoglobulinas G ou IgG compõem o principal isotipo de anticorpos encontrados no sangue de adultos saudáveis. Essa proteína possui em média um peso molecular de 150 kDa e é a classe preferencialmente empregada em terapia,

especialmente devido a sua longa meia-vida na circulação sanguínea e respostas efectoras fortes (NIWA & SATOH, 2015).

Os anticorpos do isotipo IgG são bivalentes, ou seja, possuem a capacidade de se ligarem a dois antígenos simultaneamente, o que aumenta significativamente a afinidade e avidéz por seu alvo (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

Através da determinação de estruturas tridimensionais (figura 03) juntamente com a análise da sequência primária de aminoácidos de algumas moléculas de anticorpo foi possível identificar dois tipos de regiões que são comuns a essas moléculas: regiões ou sequências hipervariáveis e de *framework* (HOLLIGER & HUDSON, 2005; CHIU & GILLILAND, 2016).

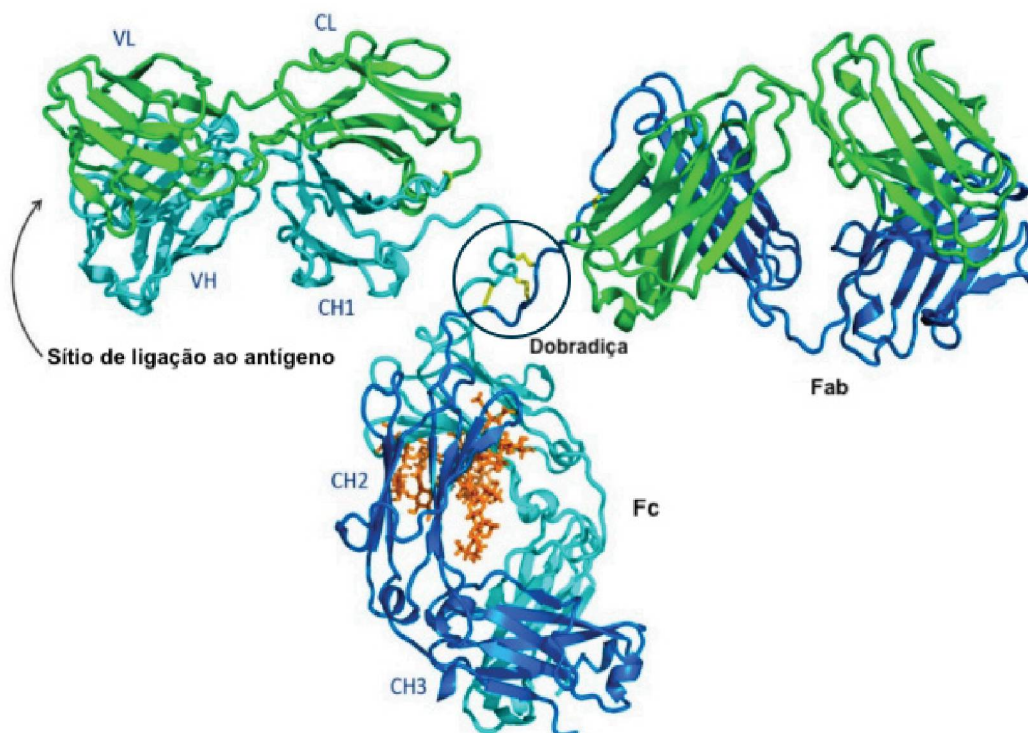


Figura 03. Estrutura cristalográfica de uma imunoglobulina G humana. As cadeias leves estão representadas em verde, as cadeias pesadas em azul e as pontes dissulfeto em amarelo. Modificado de Chiu *et. al*, 2019.

A região variável dos anticorpos consiste em dois domínios imunoglobulares (domínio Ig) não-covalentemente ligados: o domínio variável da cadeia leve (VL) e o da cadeia pesada (VH). O domínio Ig contém aproximadamente 120 aminoácidos e a estrutura de duas folhas beta antiparalelas. As folhas beta são conectadas por alças desestruturadas e a estrutura do domínio é mantida por uma ponte dissulfeto entre

elas. Além disso, cada domínio possui quatro regiões de *framework* (FR1-FR4), e três regiões determinantes de complementaridade (CDR1-CDR3). As CDRs estão localizadas nas alças conectoras das folhas beta que estão expostas na superfície dos domínios variáveis, e as CDRs H3 e L3 são as que apresentam a maior diversidade de sequência entre elas (figura 04) (BIRD *et al.*, 1988; KANYAVUZ *et al.*, 2019).

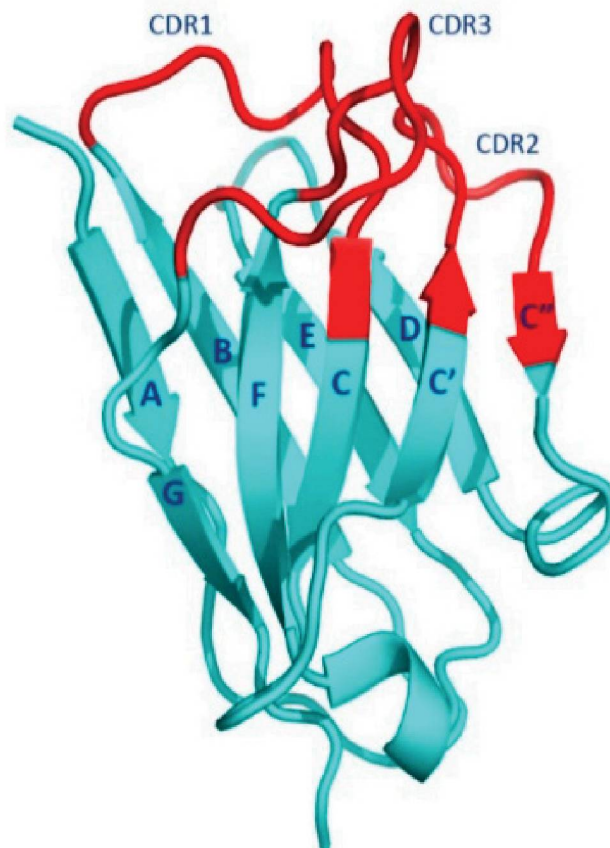


Figura 04. Estruturação de um domínio Ig. O domínio Ig é formado por duas folhas beta antiparalelas conectadas por uma ponte dissulfeto e mantidas através de interações não covalentes. Em azul está representado a região do arcabouço da região variável da cadeia pesada e em vermelho as regiões determinantes de complementaridade (CDRs). FONTE: Chiu *et al.*, 2019.

1.2 ENGENHARIA DE ANTICORPOS E O USO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Os anticorpos são a principal classe de bioterapêuticos. Além do seu emprego na clínica também são essenciais para a pesquisa, sendo aplicados em diversas técnicas como citometria de fluxo, *western blotting*, ELISA, imunohistoquímica,

imunofluorescência, imunoprecipitação e muitas outras. Também são essenciais para o diagnóstico como em kits diagnóstico (FRENZEL *et al.*, 2013).

Em 1890 E. von Behring e S. Kitasato demonstraram que o soro de coelhos e porquinhos-da-índia imunizados contra tétano ou difteria era capaz de proteger camundongos expostos aos agentes causadores dessas doenças. Eles concluíram que naquele soro havia algum fator que era capaz de neutralizar essas toxinas e que poderia ser transmitido a animais não imunes, uma antitoxina. Nos anos que se seguiram a utilização de antitoxinas se tornou cada vez mais popular e os estudos de P. Ehrlich sobre os aspectos químicos e físicos dessas moléculas consolidaram as bases da soroterapia e da imunologia. Mais tarde o termo antitoxina foi substituído por anticorpo (GUO *et al.*, 2015; JOÃO *et al.*, 2018).

Atualmente a soroterapia consiste na administração do soro produzido e purificado de animais, principalmente cavalos, para conferir uma imunização passiva a determinados patógenos ou toxinas. Em humanos a soroterapia é utilizada principalmente no tratamento de envenenamentos, como veneno de serpentes, aranhas e escorpiões (HIFUMI *et al.*, 2017; JOÃO *et al.*, 2018).

Já a utilização terapêutica dos anticorpos só foi possível com o desenvolvimento da técnica do hibridoma por César Milstein e Georges Köhler em 1975. Graças a essa tecnologia o isolamento de anticorpos monoclonais foi possível com a evolução dos estudos para aplicações clínicas e atualmente as imunoglobulinas são a maior classe de biofármacos existente (HUDSON & SOURIAU, 2003; FRENZEL *et al.*, 2013; RAMSLAND *et al.*, 2015).

Apesar de ser a técnica considerada o padrão ouro para a produção de anticorpos monoclonais, ela apresenta limitações (como tempo e custo elevados, é um procedimento laborioso, alguns clones param de expressar anticorpos, grande imunogenicidade) que levaram a busca de alternativas para contornar esses problemas (HUDSON & SOURIAU, 2003; FIELDS *et al.*, 2013; RAMSLAND *et al.*, 2015).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias envolvendo a manipulação genética do DNA foi possível modificar a estrutura dos anticorpos monoclonais, permitindo que as dificuldades encontradas na sua utilização fossem, até certo ponto, superadas. Um exemplo disso foi a humanização dos anticorpos, que consiste na utilização do arcabouço de uma imunoglobulina humana com o enxerto das CDRs do anticorpo murino (HUDSON & SOURIAU, 2003).

A engenharia genética de anticorpos tem como base o conhecimento da estrutura dessas proteínas, mais especificamente em como a estrutura está relacionada com a função que essas moléculas desempenham e visa principalmente o desenvolvimento de biomoléculas que apresentem maior seletividade e afinidade pelo seu alvo, com baixa imunogenicidade e propriedades farmacocinéticas aumentadas (FIELDS *et al.*, 2013; CHIU & GILLILAND, 2016).

A produção de anticorpos recombinantes é uma tecnologia atrativa pois permite um maior controle sobre o processo e a molécula que será produzida, como a seleção dos domínios protéicos que serão expressos, a homogeneidade e a pureza da amostra obtida, a estabilidade (MAKARAVICIUTE *et al.*, 2016).

Devido a diversidade de modificações que a manipulação genética possibilita os anticorpos recombinantes emergiram como a principal classe de agentes terapêuticos levando a um investimento substancial pela indústria biofarmacêutica. Além disso, essas moléculas também possuem papel central no diagnóstico, imunoensaios, imagenologia e como insumos na pesquisa científica (HOLLIGER & HUDSON, 2005; FIELDS *et al.*, 2013).

Tudo isso levou a aprovação de um grande número de anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos para o tratamento de diversas patologias. Até o ano de 2017 eram 72 aprovações, como doenças infecciosas, inflamatórias e câncer (DOS SANTOS *et. al*, 2018).

1.2.1 Fragmentos de anticorpo

Apesar dos anticorpos monoclonais serem as principais moléculas utilizadas atualmente, dependendo da sua aplicação, determinadas funções que eles desempenham não são desejáveis, como a liberação de citocinas através da ligação da porção Fc ao seu receptor o que pode gerar efeitos tóxicos ao organismo (HOLLIGER & HUDSON, 2005).

A necessidade de remover a porção Fc dos anticorpos deu início a geração de porções cada vez menores das imunoglobulinas mas que ainda mantivessem a capacidade de ligação ao antígeno, a afinidade e a seletividade da molécula parental. Os primeiros fragmentos de anticorpos foram obtidos através da digestão da imunoglobulina G com proteases, como a pepsina e a papaína. Entretanto, hoje a

engenharia genética é o método mais utilizado para este fim e diversos formatos de fragmentos existem devido a engenharia de proteínas (figura 05) (HOLLIGER & HUDSON, 2005; MAKARAVICIUTE *et al.*, 2016; MANOUTCHARIAN *et al.*, 2016).

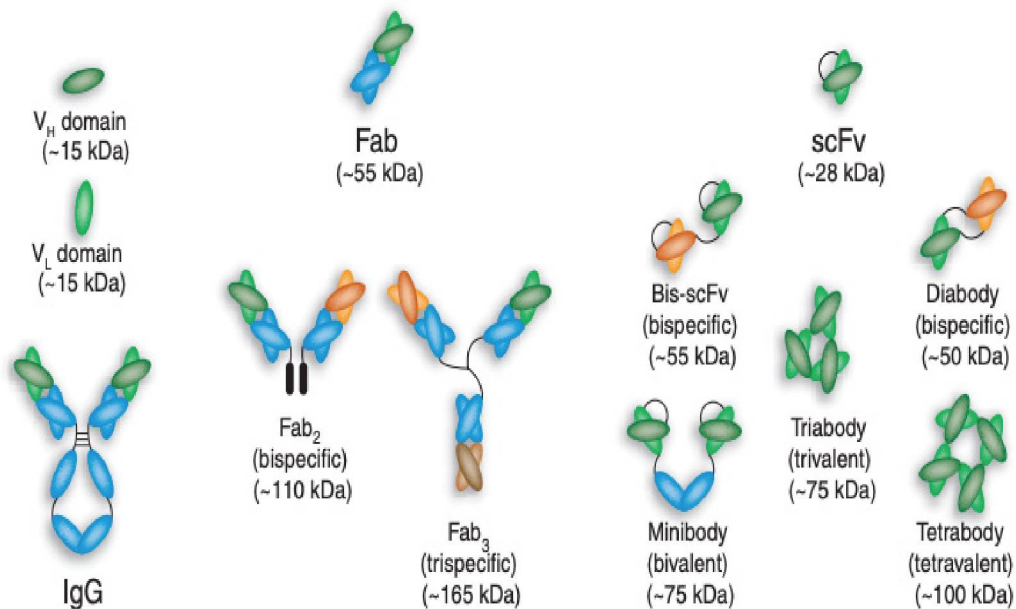


Figura 05. Anticorpos e seus fragmentos. Representação da imunoglobulina G (IgG) intacta e alguns de seus fragmentos e derivados. Adaptado de Holliger & Hudson, 2005.

Devido a resultados promissores obtidos no tratamento de diferentes patologias, com alguns fragmentos já sendo aprovados e comercializados, o interesse na produção dessas moléculas aumentou. O uso de fragmentos de anticorpos no lugar do anticorpo inteiro possui diversas vantagens: menor imunogenicidade, produção em maior escala facilitada e mais barata, propriedades farmacocinéticas mais favoráveis para penetração tecidual são alguns exemplos (BIRD *et al.*, 1988; HOLLIGER & HUDSON, 2005; MANOUTCHARIAN *et al.*, 2017).

Entretanto, apesar de grandes vantagens, existem alguns pontos negativos na utilização de fragmentos como a estabilidade variada dessas proteínas e também os desafios encontrados nas etapas de expressão e purificação das construções recombinantes. Em alguns casos doses altas dessas moléculas são necessárias na terapia podendo exceder gramas por paciente por ano. Isso também implica no desenvolvimento de sistemas capazes de suprir essa necessidade (HOLLIGER & HUDSON, 2005; Reilly, MAKARAVICIUTE *et al.*, 2016).

Dois dos formatos mais populares de fragmentos de anticorpos são o fragmento do tipo scFv (do inglês *single-chain variable fragment*) e o fragmento do tipo Fab (do inglês *fragment antigen-binding*). Através da engenharia genética, os domínios desses fragmentos podem ser modificados a fim de melhorar algumas características como afinidade, solubilidade e imunogenicidade (HUDSON & SOURIAU, 2003; NELSON & REICHERT, 2009; NELSON, 2010).

1.2.1.1 Fragmento variável de cadeia única e fragmento de ligação ao antígeno

Descritos pela primeira vez em 1988 por Bird e colaboradores, os fragmentos variáveis de cadeia única (scFvs) surgiram devido a necessidade da existência de uma molécula menor para ser utilizada na aquisição de imagens de tumor. Quando o anticorpo intacto era utilizado para este fim, um grande *background* era observado nas imagens, o que dificultava muito a interpretação e a qualidade das mesmas.

O scFv possui cerca de 30 kDa e é formado pelas regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada unidas por um conector flexível. É o menor fragmento a conter o sítio de ligação ao antígeno (SIVELLI *et al.*, 2018).

O fragmento do tipo Fab é formado pela cadeia leve em associação com a porção variável e o primeiro domínio da região constante da cadeia pesada. Em 1994 o Fab ReoPro®, inibidor de agregação plaquetária, foi o primeiro fragmento de anticorpo recombinante aprovado para comercialização. Possui maior estabilidade em comparação ao scFv e por isso é a primeira opção de escolha em diferentes aplicações (STROHL & STROHL, 2012; BATES & POWER, 2019; KULMALA *et al.*, 2019).

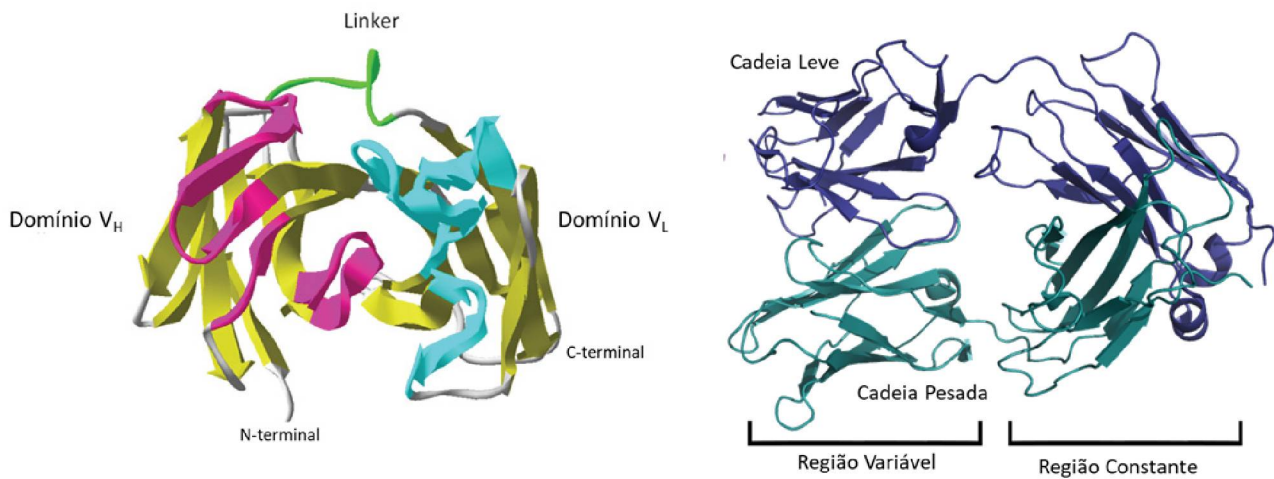


Figura 06. Estrutura tridimensional do scFv e do Fab. A esquerda: estrutura tridimensional de um scFv, em verde o linker, em rosa as regiões determinantes de complementaridade da cadeia pesada e em azul as da cadeia leve. A direita: estrutura tridimensional de um Fab, em verde a cadeia pesada e em roxo a cadeia leve. Adaptado de Villegas, 2013 e Fix, 2016.

1.3 PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli*

A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é o principal sistema utilizado para a produção de proteínas recombinantes. Isso se deve a uma série de fatores como: fácil manipulação e manutenção, crescimento rápido e cultivo simples, baixo custo, vetores de expressão com promotores induzíveis que propiciam alto rendimento, o qual pode atingir até gramas por litros de proteína (FRENZEL *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2019).

O organismo de escolha é favorecido para a expressão dos fragmentos do tipo Fab e scFv pois são moléculas pequenas e que não necessitam de modificações pós-traducionais como a glicosilação por exemplo.

1.4 RELEVÂNCIA DA FAMÍLIA DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL

A família do receptor do fator de crescimento epidermal é uma família de proteínas com atividade tirosina quinase constituída por quatro membros:

EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2/Neu, HER3/ErbB3 e HER4/ErbB4. Esses receptores são encontrados nas membranas celulares de mamíferos e expressos em praticamente todas as células epiteliais, mesenquimais, cardíacas e neuronais desses organismos (ROSKOSKI, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

As proteínas tirosina quinases ErbB/HER estão entre as famílias de receptores mais estudadas, pois possuem um importante papel em diversos processos celulares (como adesão celular, angiogênese, apoptose, progressão do ciclo celular e rearranjo do citoesqueleto) essenciais para a viabilidade de um organismo (HOLBRO & HYNES, 2004; ROSKOSKI, 2014; ZENG & HARRIS, 2014; JACOBI *et al.*, 2017).

Em células normais, a ativação desses receptores é um processo extremamente controlado. Porém a desregulação na sua atividade vem sendo associada ao desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias, como por exemplo a superexpressão do receptor HER2 que leva ao desenvolvimento de um tipo muito agressivo de câncer de mama (GOUTSOULIAK *et al.*, 2019). Isso torna essas proteínas interessantes biomarcadores e importantes alvos na terapia anticâncer (PRENZEL *et al.*, 2001).

1.4.1 Fatores ligantes dos receptores da família do EGFR

Os ligantes dos receptores da família ErbB/HER são fatores de crescimento pertencentes à família do fator de crescimento epidermal. Em mamíferos, esta família é composta por 11 membros: o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento transformador α (TGF α), o EGF de ligação a heparina (HB-EGF), a betacelulina (BTC), a anfiregulina (ARG), a epiregulina (EPR), o epigen (EPG) e as neuroregulinas (NRGs) 1-4 (SINGH *et al.*, 2016; JACOBI *et al.*, 2017).

Existem diferenças na especificidade e afinidade de ligação ao receptor dentre os diferentes fatores. Essas diferenças podem ocorrer devido a alguns fatores, como tempo e padrão de expressão em diferentes tecidos, diferenças nas clivagens e no processamento pós-traducional e modulação das concentrações dessas proteínas. Além disso, existem diferenças também nas funções que cada ligante desempenha quando se liga a um mesmo receptor (PRENZEL *et al.*, 2001; HYNES & MACDONALD, 2009; WILSON *et al.*, 2009).

Os 11 fatores de crescimento, de acordo com a sua especificidade de ligação com os diferentes receptores, podem ser agrupados em 4 grupos (figura 07). O primeiro grupo consiste do EGF, EPG, TGF α e ARG, e todos se ligam ao EGFR. O segundo grupo é formado pela BTC, HB-EGF e EPR, sendo que estes são capazes de interagirem tanto com o EGFR quanto com o receptor ErbB4. No terceiro grupo estão a NRG1 e a NRG2, as quais se ligam ao ErbB3 e ao ErbB4. O último grupo é constituído pela NRG3 e NRG4, fatores que interagem apenas com o receptor ErbB4 (LEMMON *et al.*, 2014; APPERT-COLLIN *et al.*, 2015).

Cada fator possui uma sequência consenso, chamada de domínio do tipo EGF, formada por seis resíduos de cisteína espacialmente conservados (CX7; CX4–5; CX10–13; CXCX8 C), os quais formam três pontes dissulfeto intramoleculares: C1-C3, C2-C4 e C5-C6 originando uma estrutura secundária em forma de *loops*. O domínio do tipo EGF é o domínio responsável pela ligação e ativação dos receptores, e mesmo sendo conservado entre os diferentes fatores de crescimento, pequenas variações em sua sequência são suficientes para alterar a especificidade e seletividade da ligação com os diferentes receptores (HARRIS *et al.*, 2003; SCHNEIDER & WOLF, 2009; LEMMON *et al.*, 2014; ZENG & HARRIS, 2014).

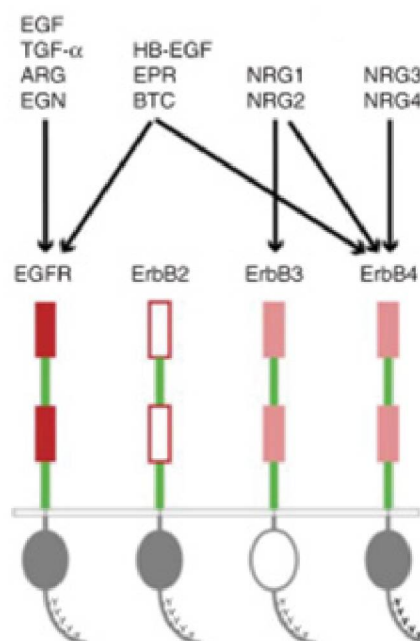


Figura 07. Os receptores da família ErbB/HER e seus ligantes. O EGFR é ativado pelo EGF (fator de crescimento epidermal), TGF α (fator de crescimento transformador α), ARG (anfiregulina) e EPG (epigen). O receptor ErbB2 não possui um ligante conhecido; ambos os receptores ErbB3 e ErbB4 interagem com NRG1 e NRG2 (neuroregulinas 1 e 2) e o ErbB4 também interage com NRG3 e NRG4 (neuroregulinas 3 e 4). Além disso, o EGFR e o ErbB4 são ativados por: HB-EGF (EGF de ligação a heparina), EPR (epiregulina) e pela BTC (betacelulina). Fonte: Modificado de LEMMON *et al.*, 2014.

1.4.1.1 Fator de crescimento EPR

A EPR é um ligante do EGFR que tem sido muito estudado ao longo dos anos. A sua forma madura possui cerca de 46 aminoácidos e desempenha diversas funções tanto em condições biológicas normais quanto em estados patológicos (KADO, *et al.* 2015; SUNAGA & KAIRA, 2015).

Em condições biológicas a EPR é expressa em níveis muito baixos na maioria dos tecidos. Ela está envolvida no processo de angiogênese e no remodelamento vascular, no reparo e regeneração de células do fígado, reações inflamatórias (principalmente na pele), cicatrização de feridas, artrite reumatóide, lesões na córnea e na reprodução. Evidências também apontam que este fator de crescimento participa na regulação da diferenciação e proliferação de células epiteliais das vias respiratórias (RIESE & CULLUM, 2014; SUNAGA & KAIRA, 2015).

Já em condições patológicas, estudos demonstram que a EPR se encontra superexpressa em alguns tipos de câncer como o câncer de bexiga, próstata, mama, fígado, gástrico, colorretal e de pulmão. Ela também está associada ao desenvolvimento de metástases pulmonares em pacientes com carcinoma adenóide cístico (YANG *et al.*, 2016), nas vias de processamento de dores crônicas (MARTIN *et al.*, 2017) Devido a isso, este fator de crescimento é um alvo de intervenção terapêutica em potencial (RIESE & CULLUM, 2014; IJIMA *et al.*, 2017).

1.5 SISTEMA GENÉTICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE COLÔNIAS BASEADO NA T7 RNA POLIMERASE

A T7 RNA polimerase é uma enzima de aproximadamente 100 kDa produzida pelo bacteriófago T7, um fago capaz de infectar a bactéria *Escherichia coli* e que foi descrito em 1945 pelos pesquisadores Demerec e Fano. Desde então, esse bacteriófago foi sendo muito estudado genética e bioquimicamente e suas particularidades, em especial a T7 RNA polimerase, o tornaram de grande interesse para utilização no campo da ciência (STUDIER & DUNN, 1983).

A T7 RNA polimerase tem grande aplicação para uso em vetores de expressão, devido a alta seletividade que possui pelo seu promotor. Além do processo de

transcrição por essa enzima ser muito eficiente, ele ocorre de maneira bastante ativa, cerca de cinco vezes mais rápido em comparação ao realizado pela RNA polimerase de *E. coli*. Todas essas características levaram a utilização da T7 RNA polimerase para produção de altos níveis de expressão de genes de interesse em diversos sistemas celulares, mas principalmente em *E. coli* (DANVALOO, *et al.*, 1984; STUDIER & MOFFATT, 1986).

Em *E. coli*, esse sistema consiste na utilização de plasmídeos contendo o gene de interesse clonado sob o controle de um promotor reconhecido pela T7 RNA polimerase. Esse plasmídeo é então inserido em cepas modificadas geneticamente, que contém em seu genoma o gene para a produção da enzima. A expressão do gene é ativada através da adição de um ativador, o qual libera o sítio do promotor, que estava sendo ocupado por um repressor para evitar a expressão basal dos genes, para reconhecimento e ligação da RNA polimerase (TABOR, 1990).

Esse sistema tem sido muito útil em aumentar o nível de expressão de genes de interesse. Porém, as etapas necessárias para chegar até um clone com um alto nível de expressão são muitas vezes demoradas e laboriosas. Uma alternativa para simplificar essas etapas e selecionar os clones contendo os genes de interesse e, expressando proteínas em maior quantidade, seria a utilização de um sistema que permitisse a seleção direta dessas colônias, ou seja logo após a etapa de clonagem dos genes nos vetores ou na amplificação dos plasmídeos.

Levando isso em consideração, esse projeto propõe o desenvolvimento de um vetor, baseado na utilização da T7 RNA polimerase na cepa de *E. coli* TOP10, para identificação das colônias de interesse. A cepa, é amplamente utilizada na amplificação de DNA plasmideal, uma das primeiras etapas no processo de produção de proteínas recombinantes. Porém, esta cepa não possui o gene da T7 integrado em seu genoma, e por isso, além do plasmídeo contendo o gene de interesse, será introduzido também outro plasmídeo contendo o gene desta enzima.

Outro ponto importante é que a identificação dos clones será realizada visualmente, devido a presença de uma proteína repórter, nesse caso a GFP, em fusão aos genes expressos. Dessa maneira será possível também a seleção das colônias com maiores níveis de expressão, correlacionando esses níveis com a intensidade da fluorescência emitida pela GFP.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente projeto visa o desenvolvimento de fragmentos de anticorpo do tipo scFv e Fab, específicos para detecção da EPR, e a produção de reagentes para avaliar a funcionalidade, seletividade e afinidade entre esses diferentes formatos de proteínas recombinantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Fazer a construção genética de um fragmento de anticorpo no formato scFv a partir da sequência de um anticorpo para EPR e inserir as sequências gênicas nos vetores para expressão em *E. coli* pET28a-TEV, pET28a-TEV em fusão à SGFP2 (*Strongly enhanced green fluorescent protein 2*) e no vetor pET32a em fusão à tioredoxina;
- ✓ Subclonar as cadeias pesada e leve do Fab anti-EPR em vetores de expressão de *E. coli*.
- ✓ Padronização dos protocolos de expressão e purificação do scFv e do Fab em *E. coli*;
- ✓ Construção de um vetor para expressão de proteínas na cepa de *E. coli* TOP10 baseado na utilização da T7 RNA polimerase;
- ✓ Expressão em *E. coli* e purificação fatores de crescimento da família do EGF: AREG, HB-EGF, EPGN, EPR e NRG-1;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TAMPÕES E SOLUÇÕES

- Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x: Tris-base 400 mM, ácido acético 190 mM e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10 mM pH 7,6.
- Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose 6x: azul de bromofenol 0,1% (m/v), xileno cianol 0,1% (m/v) e Ficoll tipo 400 15% (m/v).
- Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x: Tris-HCl 1 mM pH 6,8, SDS (sódio duodecil sulfato) 10% (m/v), azul de bromofenol 0,5% (m/v), glicerol 50% (v/v) e β -mercaptoetanol 14,3 mM.
- Tampão Tris-Glicina para SDS-PAGE 1x: 25 mM Tris-base, 192 mM glicina e 0,1% SDS 10%.
- Solução GET: 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0 e 1% glicose (m/v).
- Solução de lise alcalina: 200 mM NaOH e 1% de SDS (v/v).
- Solução de acetato de potássio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$): 8,6 mL de ácido acético glacial 3 M, 45 mL de acetato de potássio 5 M e 21,4 mL de água destilada.
- Solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250*: *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% (m/v), metanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água destilada 45% (v/v).
- Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosídeo (IPTG): Solução estoque 1 M, concentração para uso em meios líquidos 0,5 mM.
- Tampão de lise para bactérias: 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,2 mM NaCl.
- Tampão de Corrida: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl e 20 mM Imidazol.
- Tampão de Eluição: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 300 mM NaCl e 500 mM Imidazol.

3.2 MEIOS DE CULTURA

- Meio líquido LB (do inglês *Lysogen Broth*): Triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v) e NaCl 1% (m/v).
- Meio sólido LB-ágar: Meio LB e ágar 1,5% (m/v).

3.3 ANTIBIÓTICOS

- Canamicina: concentração estoque 25 mg/mL, concentração de uso em meios líquidos e sólidos 50 µg/mL.
- Ampicilina: concentração estoque 25 mg/mL, concentração de uso em meios líquidos e sólidos 50 µg/mL.

3.4 MARCADORES MOLECULARES

3.4.1 DNA

- *1 kb Molecular Ruler* (BIO-RAD).

3.4.2 Proteína

- *Plus Protein™ Standard Unstained* (BIO-RAD);
- *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (BIO-RAD).

3.5 PRIMERS UTILIZADOS

Primer	Sítio de restrição	Sequência
SGFP213-7-F	HindIII	5' GATCAAGCTTAGCGGCTCTGGTATGGTCTCCAAAGG 3'
SGFP213-7-R	XhoI	5' CTAGCTCGAGGGCTTTATACAGTTCATCCATGCCAGC 3'
EHFab-Reverse	HindIII	5'GATCAAGCTTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCCCACAATCT C 3'
ELFab-Forward	BamHI	5'GATCGGATCCGGACATACAGATGACCCAATCACCAAG 3'
ELFab-Reverse	HindIII/NotI	5'GATCAAGCTTAGAGCCGCCAGAGCCACATTCGTTTCGATTGAA GGACTTTACGATGG 3'
EHscFv-F	NcoI	5'GACTCCATGGAAGTGCAGTTACAGCAATCCGGAGCT 3'
EHscFv-R	EcoRI	5'GACTGAATTCACCACCACCGCTACCACCGCCTGCTGATACCGT TACCAGTGTCCTT 3'
ELscFv-F	EcoRI	5'GACTGAATTCGGCGGTGGCGTTCGTTGGCGGTGGCTCTGA CATACAGATGACCCAATCACCAAG 3'
ELscFv-R	XhoI	5'GACTCTCGAGAGCTCTTTTGATCTCCAACCTGGTTC 3'

Quadro 01. Lista de primers utilizados neste trabalho.

3.6 FATORES DA FAMÍLIA DO EGF

3.6.1 Vetores Para Expressão dos Fatores de Crescimento

Os genes sintéticos dos fatores de crescimento ARG, BTC, EGF, EPGN, HB-EGF e TGF α foram adquiridos em vetor comercial pET32a (Novagen) através da empresa FastBio (Ribeirão Preto, São Paulo-Brasil) e a EPR da empresa GeneCust (Bélgica). Esse vetor foi escolhido por possuir a proteína de fusão de *E. coli* tiorredoxina (*trxA*), a qual auxilia no correto enovelamento protéico. Além disso, a tiorredoxina também contribui para uma maior solubilidade das proteínas a ela fusionadas (LaVALLIE, E. R., *et al.*, 1993).

Os genes da AREG, BTC, EGF, EPGN, HB-EGF e TGF α foram clonados entre os sítios de restrição *NcoI* e *XhoI* e a EPR entre os sítios *BglII* e *EcoRI*.

3.7 CONSTRUÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO scFv e Fab

O scFv foi construído a partir do fragmento de anticorpo do tipo Fab anti-EPR, cujos genes sintéticos foram adquiridos da empresa *GeneCust*. As sequências de aminoácidos das cadeias leve e pesada do Fab são provenientes do trabalho publicado por Kado e colaboradores em 2015 e encontram-se disponíveis no Banco de Dados de Proteína (do inglês *Protein Data Bank – PDB*) sob o código de identificação 5AZ2.

Os genes de cada cadeia foram sintetizados e inseridos separadamente no vetor pUC57, através do sítio de clonagem *SmaI*, pela empresa *Genscript*.

As regiões variáveis da cadeia leve e pesada do Fab foram amplificadas através de uma reação de PCR. Os *primers* utilizados uniram as duas cadeias através da adição de um *linker* entre elas para a formação do scFv. O amplicon resultante foi então clonado nos vetores pET28a-TEV e pET32a utilizando os sítios de *NcoI* e *XhoI*, dando origem às construções scFv-TEV e Trx-scFv. Na tentativa de aumentar a solubilidade da construção e também realizar ensaios de interação utilizando fluorescência, a proteína SGFP2 (KREMERS *et al.*, 2007) foi clonada em fusão ao scFv-TEV na região C-terminal, dando origem a construção scFv-TEV-SGFP2.

Para a construção do Fab foi realizada a subclonagem, a partir do vetor pUC57, da cadeia leve para o vetor pETDuet1 e da cadeia pesada para os vetores pETGOF, pET28a-TEV e pET32a. Primeiramente foi feita a amplificação das cadeias através de uma reação de PCR e em seguida a cadeia leve foi inserida no seu respectivo vetor através dos sítios de restrição de *BamHI* e *HindIII* e a cadeia pesada através de *NcoI* e *HindIII*.

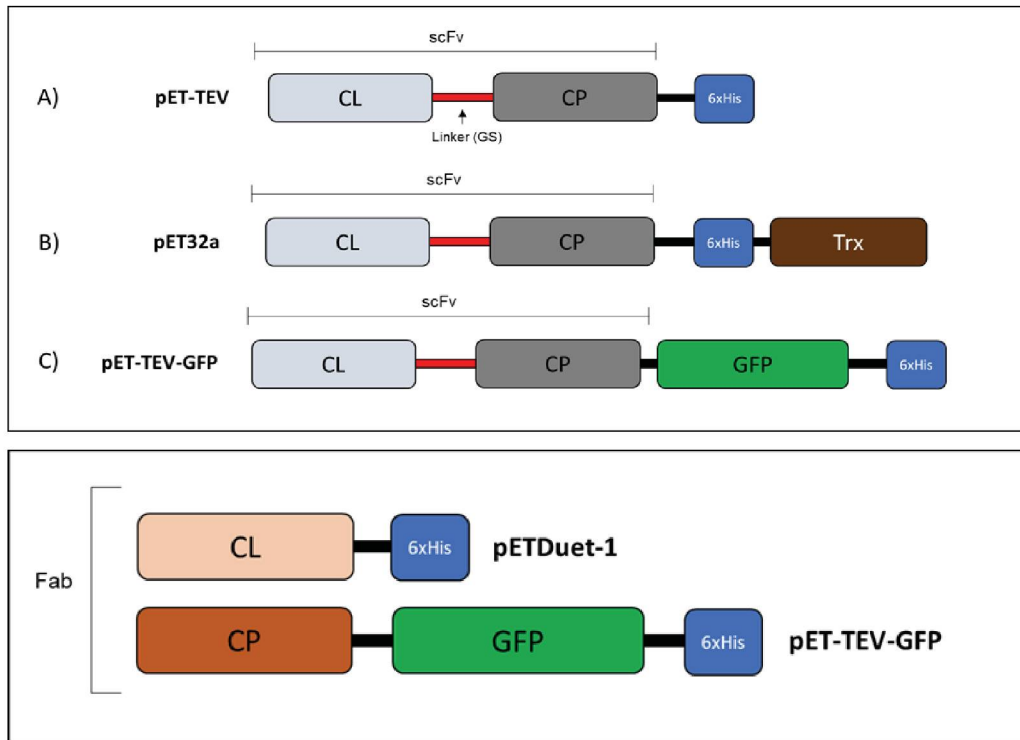


Figura 08: Construções dos fragmentos de anticorpo.

3.8 SISTEMA T7 RNA POLIMERASE

3.8.1 Vetor para expressão da T7 RNA polimerase

O gene da T7 RNA polimerase foi removido do vetor pBEX-T7RNAPol, cedido pelo Dr. Stenio Perdigão Fragoso, pesquisador do Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ/PR, e subclonado no vetor pTrc-His TOPO-NUP1, utilizando os sítios de restrição *NheI* e *HindIII*. Esse vetor foi então transformado na cepa de *E. coli* TOP10 para possibilitar a expressão de proteínas nessa célula, tendo em vista que essa cepa é otimizada para propagação de plasmídeos e não foi desenvolvida para expressão de proteínas.

3.8.2 Vetor pETGOF

Esse vetor foi construído para ser utilizado no sistema genético da T7 RNA polimerase e possibilitar a identificação e seleção mais fácil e rápida de clones positivos de proteínas fusionadas a SGFP2. Nesse vetor a SGFP2 está fora da fase de leitura de iniciação da tradução. A pauta de leitura correta para a SGFP2 é restabelecida somente com a clonagem de um inserto nos sítios de *NcoI* e *HindIII* que restabeleça a pauta de leitura a partir do ATG do sítio de *NcoI* com a sequência codificadora da SGFP2. Dessa maneira, haverá fluorescência exclusivamente nas colônias contendo o plasmídeo de interesse.

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL E REAÇÕES DE DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O DNA plasmideal foi extraído através do sistema comercial *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (QIAGEN). Para as digestões diagnósticas foi utilizada uma unidade de enzima de restrição (New England BioLabs), para até 1 µg de DNA plasmideal, tampão recomendado pelo fabricante na concentração final de 1x e água ultrapura para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas por 04 horas a 37 °C.

Para obtenção dos fragmentos de DNA para ligação foram utilizadas as mesmas condições de reação mencionadas acima com exceção do volume final das reações utilizado, que será de 50 µL.

3.10 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Os DNAs utilizados para as subclonagens foram digeridos e aplicados em gel de agarose conforme descrito no item 3.12 desta seção. Após confirmação visual do padrão de restrição, as bandas referentes aos insertos ou vetores digeridos foram extraídas do gel e purificadas utilizando o kit *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

3.11 REAÇÕES DE LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

As reações de ligação inserto-vetor foram realizadas utilizando uma razão molar de DNA de 3:1 respectivamente, 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*), tampão de ligação (*New England Biolabs*) na concentração final de 1x e água ultrapura para um volume final de 15 µL. As reações foram incubadas por 16 h à 16°C.

3.12 ELETROFORESE DE DNA

Para verificar a integridade dos DNAs plasmideais, bem como confirmar as digestões com enzimas de restrição, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% de acordo com protocolo estabelecido em manual de laboratório (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X a 100 V. Os géis foram expostos a solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), lavados com água e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.13 TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli*

As transformações de *Escherichia coli* foram realizadas utilizando as cepas TOP10 e BL21Star (DE3). Para a reação, foi adicionada quantidade correspondente a 50 ng de DNA plasmideal em uma solução contendo 70 µL de células competentes. Em seguida, a solução foi incubada no gelo por 15 minutos, seguido de choque térmico a 42 °C por 60 segundos e retorno ao gelo por mais 2 minutos. Por fim, foi adicionado 1 mL de meio LB a cada tubo de células transformadas, que foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 1 hora, para recuperação da membrana celular. Em seguida, foram plaqueados 100 µL do volume do tubo em placas de meio LB-ágar contendo os antibióticos adequados. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

Para utilização do sistema contendo a T7 RNA polimerase, foi realizada a preparação de células TOP10 competentes contendo o plasmídeo pTrc-T7 e essas células serão transformadas com plasmídeo contendo o gene de interesse. As células

serão então plaqueadas em meio LB-ágar contendo os antibióticos para seleção de ambos os vetores bem como β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para indução da expressão do gene repórter.

3.14 TESTES DE EXPRESSÃO EM *Escherichia coli*

Para os testes de expressão em pequena escala dos fatores da família EGF e do scFv, colônias isoladas de células BL21Star (DE3) transformadas com os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 2 mL de meio líquido LB, contendo o antibiótico adequado, e incubadas sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm) a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, as culturas foram diluídas numa proporção de 1:100 (volume final de 10 mL) e crescidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm, até atingirem uma absorbância, a 600 nm (A600), de aproximadamente 0,6. Em seguida, IPTG foi adicionado às culturas para uma concentração final de 0,5 mM. A partir desta etapa as culturas foram submetidas a diferentes tempos de cultivo e temperaturas, 16 °C, 25 °C e 37 °C por 16 horas, 6 horas e 4 horas respectivamente, a fim de se encontrar a condição para melhor nível de expressão das proteínas. Para analisar a solubilidade das proteínas recombinantes, os precipitados bacterianos resultantes dos testes de expressão foram ressuspensos utilizando a seguinte proporção: 1 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 100 mM NaCl; 10 mM β -mercaptoetanol; 5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 0,5 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)) por grama de células. As células foram lisadas através da adição de lisozima (0,15 mg/mL) e sonicação (6 ciclos de 10 segundos com intervalos de 30 segundos para resfriar a amostra, amplitude de 40 %). As frações solúveis e insolúveis dos produtos foram separadas por centrifugação durante 10 minutos a velocidade de 7,000 x g e temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o pellet ressuspensado em tampão de lise no mesmo volume utilizado na ressuspensão das células bacterianas. As amostras obtidas foram visualizadas em gel desnaturante de poliacrilamida 13%.

Para os testes em maior volume foram utilizados:

- scFv e Fab: 10 mL de pré-inóculo, 490 mL de meio LB, indução com 0.1 mM de IPTG na D.O. de 0.4 nm. Após adição de IPTG as culturas foram mantidas a 16 °C por 16 horas. Em seguida as células foram centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos e o pellet

ressuspendido em 10 mL de tampão A da cromatografia de afinidade. A lise foi realizada no microfluidificador e o lisado centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a cromatografia.

- Fatores de crescimento: 10 mL de pré-inóculo, 490 mL de meio LB, indução com 0.5 mM de IPTG na D.O. de 0.6 nm. Após adição de IPTG as culturas foram mantidas a 16 °C por 16 horas. Em seguida as células foram centrifugadas a 6.000 x g por 10 minutos e o pellet ressuspendido em 10 mL de tampão A da cromatografia de afinidade. A lise foi realizada no microfluidificador e o lisado centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a cromatografia.

3.15 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

3.15.1 Purificação por meio de Cromatografia de Afinidade a Metal (IMAC)

Os fatores da família do EGF e os anticorpos recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade a níquel, tendo em vista que possuem uma etiqueta de seis histidinas em sua região C-terminal. Foram utilizados 40 mL da fração solúvel do lisado de cultura de *E. coli*, a coluna HiTrap HP 1mL (GE Healthcare) e o sistema de purificação ÄKTA (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com 5 CV (volumes de coluna) do tampão de corrida (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol), a proteína foi eluída com 10 CV de tampão de eluição (20mM Tris-HCl pH 8, 300mM NaCl, 500mM Imidazol) e foram coletadas frações de 1 mL do eluato. As diversas frações coletadas foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 13%.

3.15.2 Purificação por exclusão de tamanho

As frações da cromatografia de afinidade a níquel foram selecionadas, reunidas e concentradas (concentrador Amicon 3000 MWCO, 4000 x g a 4°C) para um volume de 1 mL e centrifugadas a 20000 x g por 10 minutos a 4°C, antes da aplicação na coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). A eluição é isocrática e ocorre em 1 volume de coluna (aproximadamente 24 mL). Tampão utilizado: 20 mM de Tris-HCl pH 8 e 150 mM de NaCl.

3.16 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As amostras de proteínas foram misturadas ao tampão de amostra para proteína 4x e aquecidas a 95° C por 5 minutos. Como referência, é utilizado um marcador de massa molecular de proteínas. O gel de poliacrilamida 13% foi disposto em uma cuba contendo tampão de eletroforese. Para a separação das bandas, foi aplicada uma voltagem de 180 V por 60 minutos. Após a eletroforese o gel foi corado com *Comassie blue* para visualização das bandas.

3.17 WESTERN BLOTTING

Primeiramente, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (12 V por 45 minutos). Em seguida, a membrana foi incubada com uma mistura de leite e PBS (5% em g/mL de leite em pó em solução de PBS 1x) por 16 horas para o bloqueio. No dia seguinte, foram realizadas 3 etapas de lavagem da membrana com PBS 1x por 5 minutos, e logo após ela foi incubada com uma solução contendo o anticorpo primário por pelo menos 1 hora. A membrana então foi lavada mais 3 vezes com PBS 1x e incubada com o anticorpo secundário ligado à enzima fosfatase alcalina. Para revelação, foram adicionados os substratos BCIP (5-bromo- 4-cloro- 3-indolil- fosfato) e NBT (nitroazul de tetrazólio).

3.18 ANTICORPO 9E5

O 9E5 é um anticorpo monoclonal murino anti-epiregulina humana, obtido através da técnica de hibridoma. De acordo com Iijima e colaboradores (2017), o 9E5 reconhece especificamente apenas o domínio EGF da epiregulina humana, não reconhecendo o domínio dos demais ligantes da família do EGF.

A estrutura cristalográfica do fragmento Fab, obtida através da digestão da IgG com papaína, do anticorpo 9E5 foi elucidada por Kado e colaboradores em 2015 e a sequência de aminoácidos das cadeias leves e pesadas disponibilizadas no Banco de Dados de Proteína (PDB, do inglês *Protein Data Bank*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR pETGOF

Com o intuito de otimizar a seleção de clones positivos em fusão a SGFP2 e identificar as colônias expressando maiores quantidades de proteína solúvel foi construído o vetor pETGOF, onde o gene da SGFP2 foi clonado no vetor pET28a-TEV entre os sítios de *HindIII* e *XhoI*, porém fora de fase com a pauta de leitura, dada pelo ATG do sítio de *NcoI* em relação à sequência codificadora da SGFP2. Essa estratégia visa a seleção de clones fluorescentes pois somente após a inserção de um fragmento no vetor com a sequência em fase de leitura com o ATG do sítio de *NcoI* e também com a sequência da SGFP2 é que esta ficará fluorescente (pois a pauta de leitura será restaurada). Dessa maneira, somente os clones positivos irão emitir fluorescência, simplificando assim o processo de seleção.

Primeiramente o gene da SGFP2 foi amplificado tendo como molde o DNA da construção Proteína L-SGFP2 (clone denominado também de 13-7). Os iniciadores utilizados continham os sítios de restrição de *HindIII* e *XhoI*. O amplicom resultante foi digerido e clonado no vetor pET28a-TEV (figura 09).

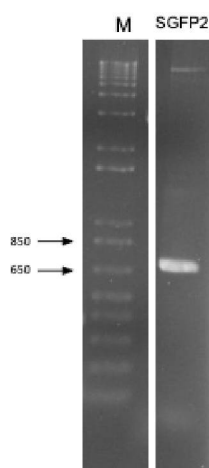


Figura 09. Análise eletroforética do produto de PCR da amplificação do gene da SGFP2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do amplicom da SGFP2 a partir do DNA da construção Proteína L-SGFP2. A banda está de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 780 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M.

Em seguida, foram analisados oito clones provenientes da placa de ligação através da digestão com as enzimas *HindIII* e *XhoI*. Conforme apresentado na figura 10, todos os clones eram positivos, liberando o fragmento da SGFP2 de aproximadamente 780 pb.

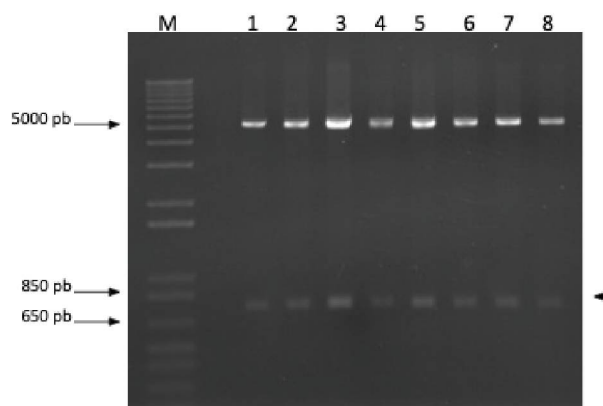


Figura 10. Análise eletroforética do gene da SGFP2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo de oito clones digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* para confirmação da clonagem da SGFP2 no vetor pET28a-TEV. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a SGFP2, com o tamanho esperado de aproximadamente 780 pares de base (pb). As setas maiores indicam as bandas do marcador de DNA (M).

Geralmente a superexpressão de proteínas recombinantes, em especial de anticorpos, leva à produção de proteínas não enoveladas corretamente e conseqüentemente de agregados insolúveis não funcionais. Apesar de existirem diversas estratégias para obtenção de proteínas mais solúveis, como protocolos de renaturação e a utilização de *tags*, cada proteína possui particularidades e nem sempre esses métodos serão suficientes e bem sucedidos. A evolução molecular dessas sequências se torna uma alternativa interessante nesses casos (WALDO, 1999).

Existem diferentes métodos para maturação anticorpos *in vitro* como por exemplo o *phage display*, *yeast display* e *bacteria display*. Entretanto, esses métodos são laboriosos e demorados pois dependem de diversas rodadas de seleção para encontrar os clones com maior afinidade pelo seu alvo. Nesse contexto a utilização de um sistema de *screening* direto se apresenta como uma estratégia promissora (ROSOWSKI, 2018).

A evolução molecular de anticorpos *in vitro* se inicia com a geração de uma biblioteca de sequências variáveis. Isso é feito geralmente utilizando protocolos de PCR mutagênico para gerar mutações aleatórias na sequência original. Uma vez gerada a biblioteca ela deve ser inserida em um organismo para expressão dessas proteínas e posterior seleção dos clones de interesse. Tendo como base os diferentes sistemas disponíveis para esta finalidade, a *E. coli* é o organismo que apresenta maior facilidade de manipulação e manutenção (REDDLE, 2007; ROSOWSKI, 2018).

Além da utilização de um modelo menos complexo (quando comparado as leveduras) a utilização de um gene repórter como a SGFP2 possibilita a seleção direta dos clones que expressam as maiores quantidades de proteínas, sem a necessidade da realização de diferentes rodadas de seleção. Isso é possível através das diferenças na intensidade da fluorescência da SGFP2, onde o sinal de fluorescência será diretamente proporcional a quantidade de proteína solúvel (WALDO, 1999).

Um exemplo da utilização desse princípio foi descrito no trabalho de BERG *et al.*, 2006 onde a evolução molecular da sequência da protease TEV foi realizada e o *screening* para encontrar um clone expressando maiores níveis de proteína solúvel foi feito utilizando a fusão com a GFP. Nesse contexto, o pETGOF já está sendo utilizado em outros projetos do laboratório para maturação de fragmentos de anticorpos em *E. coli*.

4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR PARA EXPRESSÃO DA T7 RNA POLIMERASE

Para a expressão da T7 RNA polimerase na cepa bacteriana TOP10 primeiramente foi construído o vetor contendo o gene da enzima. Foi utilizado o vetor pTrc-His TOPO-NUP1, o qual possui o promotor *trc* que é induzível por IPTG. O gene da T7 (aproximadamente 3000 pares de base) foi retirado do vetor pBEX-T7RNAPol utilizando as enzimas *SpeI* e *HindIII*, conforme pode ser observado na figura 11 e clonado no vetor pTrc-His TOPO-NUP1 entre os sítios de *NheI* e *HindIII*. Os sítios de *SpeI* e *NheI* são compatíveis para ligação.

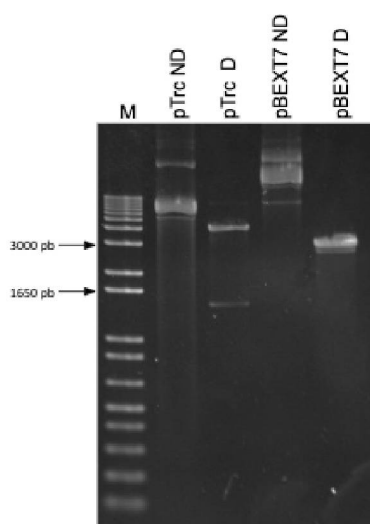


Figura 11. Análise eletroforética do perfil de restrição dos vetores pTrc-His NUP1 e pBEXT7RNAPol. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo das amostras pTrc-His TOPO-NUP1 não digerido (ND) e pTrc-His TOPO-NUP1 digerido com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII* (ND), pBEXT7RNAPol não digerido (ND) e pBEXT7RNAPol digerido (D) com *SpeI* e *HindIII*. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a T7 RNA polimerase, com o tamanho esperado de aproximadamente 3000 pares de base (pb). As setas indicam as bandas do marcador de DNA (M).

Após extração das bandas de interesse do gel e purificação do DNA, foi realizada a ligação do inserto da T7 RNA polimerase no vetor pTrc-His TOPO. Em seguida, foi realizado o *screening* das colônias para identificar os clones que continham o vetor de interesse pTrc-T7. Foi realizada uma primeira etapa de identificação através de uma reação de PCR de colônia. Foram testadas dezesseis colônias, sendo que destas dez apresentaram o amplicon no tamanho esperado de aproximadamente 1300 pares de base, conforme figura 12.

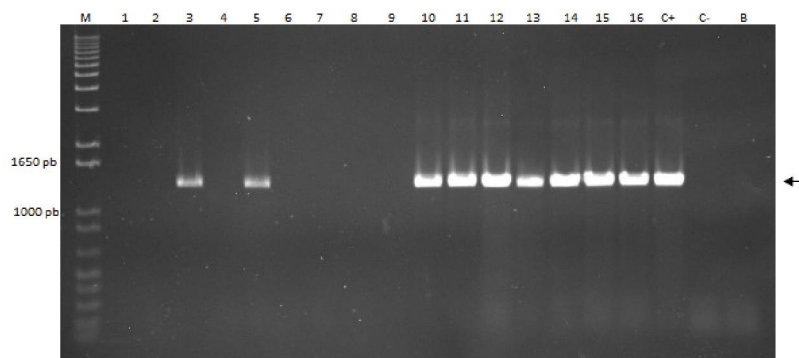


Figura 12. Confirmação por PCR da Clonagem do Gene da T7 Rna Polimerase no Vetor pTrc-HIS TOPO. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos amplicons da T7 RNA polimerase. As bandas estão de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 1300 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M, controle positivo (C+) pBEXT7RNAPol, controle negativo (C-) pTrc-His TOPO-NUP1 e branco (B) reação sem DNA.

Em seguida, uma segunda etapa de verificação foi realizada onde duas colônias foram selecionadas (colônias 14 e 15). As colônias foram cultivadas em meio LB por 16 horas e após esse período o DNA plasmideal foi extraído e submetido a uma digestão diagnóstica com as enzimas *NdeI* e *HindIII*. Os clones positivos, ou seja, aqueles que contém o inserto correspondente ao gene da T7, liberam fragmentos de aproximadamente 3000 pares de base conforme demonstrado na figura 13.

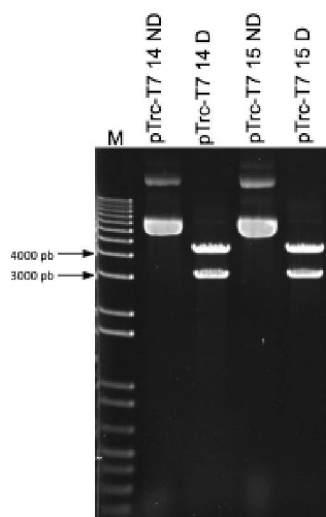


Figura 13. Análise eletroforética do perfil de restrição do vetor pTrc-T7. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos pTrc-T7 não digerido (ND) e pTrc-T7 digerido (D) com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* das colônias 14 e 15. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente T7 RNA polimerase, com o tamanho esperado de aproximadamente 3000 pares de base (pb), e um fragmento de DNA correspondente ao vetor pTrc-His TOPO de aproximadamente 4000 pb. As setas indicam as bandas do marcador de DNA (M).

4.3 EXPRESSÃO DA T7 RNA POLIMERASE NA CEPA DE *E. coli* TOP10

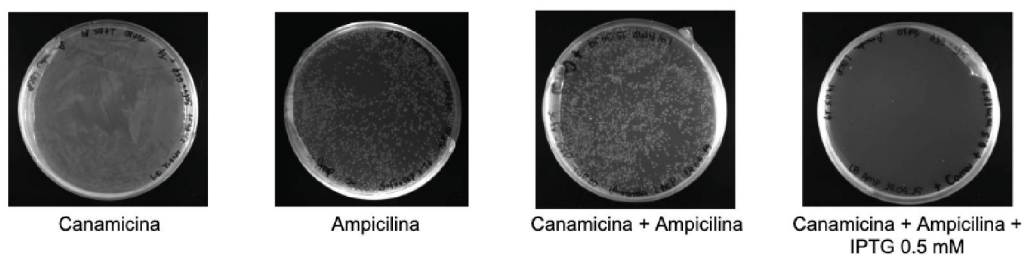
Para testar a expressão da T7 na cepa TOP10, primeiramente foram preparadas células TOP10 quimiocompetentes contendo a construção proteína L-SGFP2 e células quimiocompetentes contendo a construção scFv anti-EPR - SGFP2 (ambas contendo gene de resistência a canamicina e sob o domínio do promotor da T7). Em seguida, o DNA plasmideal pTrc-T7 foi transformado nas células TOP10 + proteína L-SGFP2 e TOP10 + scFv-SGFP2.

Para ambas as construções, após a transformação, as células foram plaqueadas em 4 placas diferentes:

- 1) Placa contendo canamicina para demonstrar que as construções com a SGFP2 estavam presentes nas células;
- 2) Placa contendo ampicilina para confirmar que as células haviam sido transformadas com o vetor pTrc-T7;
- 3) Placa contendo ampicilina + canamicina para demonstrar que tanto o vetor da T7 quanto o vetor com a SGFP2 estavam presentes nas células;
- 4) Placa contendo ampicilina + canamicina + 0.5 mM de IPTG para analisar a existência de colônias fluorescentes, indicativo de que o sistema da T7 em TOP10 estaria funcionando.

Conforme demonstra a figura 14, cresceram colônias tanto nas placas contendo ampicilina quanto nas placas contendo canamicina indicando que ambos os vetores estavam presentes nas células. O surpreendente foi que não houve crescimento nas placas contendo IPTG.

Construção pET-TEV scFv-SGFP2



Construção proteína L-SGFP2

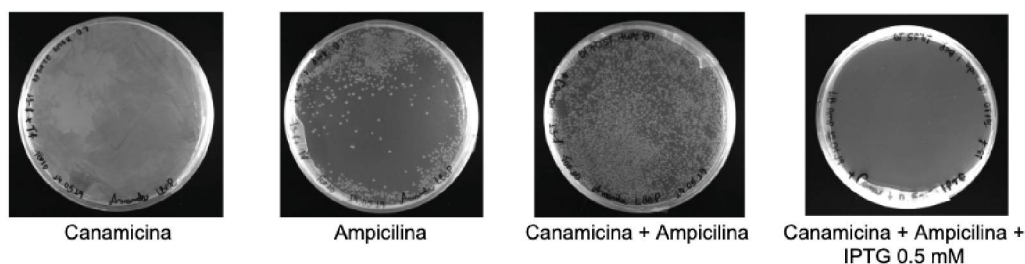


Figura 14. Placas da transformação da cepa TOP10 com o vetor da T7 RNA Polimerase e os vetores scFv anti-EPR-SGFP2 e Proteína L-SGFP2. Placas de LB-ágar onde foram plaqueadas as células de *E. coli* cepa TOP10 transformadas com o vetor pTrc-T7 + scFv anti-EPR-SGFP2 e pTrc-T7 + proteína L-SGFP2. Pode-se observar que as células continham o vetor da T7, o qual confere resistência a ampicilina, e o vetor da construção scFv-SGFP2 ou da construção proteína L-SGFP2, o qual confere resistência a canamicina. Com o intuito de induzir a expressão da T7 e conseqüentemente do gene scFv-SGFP2 ou proteína L-SGFP2, que está sob comando do promotor T7, as células também foram plaqueadas em meio sólido contendo 0.5 mM de IPTG, porém, não houve crescimento de colônias nessa condição.

Para investigar o que poderia estar ocorrendo, foram realizados os seguintes testes de expressão: células TOP10 contendo somente o vetor pTrc-T7, células TOP10 contendo a construção pTrc-His TOPO-NUP1 como controle, as construções com SGFP2 + T7 em TOP10 e as mesmas construções sem a T7 na cepa BL21Star (DE3). Conforme mostrado na figura 15, existe a presença de uma banda no tamanho esperado de aproximadamente 100 kDa indicando que a T7 estava sendo expressa nas células. Entretanto, não foram identificadas bandas referentes às construções com SGFP2 nas células TOP10+T7, somente nas células BL21Star (DE3), indicando que o sistema de expressão em TOP10 não estava funcionando.

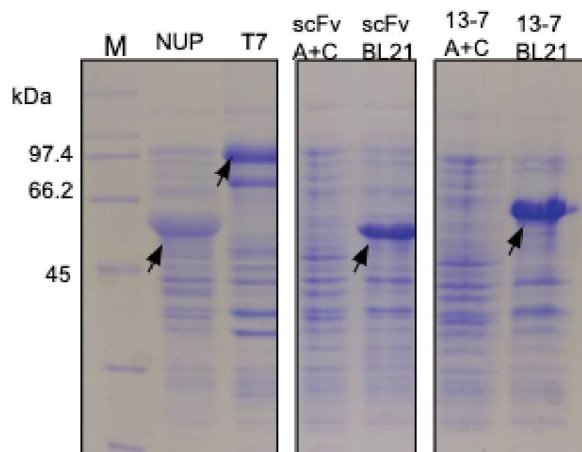


Figura 15. Teste de expressão na cepa de *E. coli* TOP10. Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie* Blue, representando a expressão de proteínas na cepa de *E. coli* TOP10 e BL21 Star (DE3). Marcador de peso molecular (M), expressão da proteína NUP1 em TOP10 (NUP), expressão da T7 RNA polimerase em TOP10 (T7), expressão do scFv anti-EPR-SGFP2+T7 em TOP10 (scFv A+C), expressão do scFv anti-EPR-SGFP2 em BL21 Star (DE3) (scFv BL21), expressão da proteína L-SGFP2+T7 em TOP10 (13-7 A+C), expressão da proteína L-SGFP2 em BL21 Star (DE3) (13-7 BL21). As setas indicam as bandas correspondentes ao tamanho esperado para cada proteína. Foi possível identificar a expressão em TOP10 das proteínas NUP1 (controle) e T7, e em BL21 Star (DE3) do scFv e da proteína L porém, não há banda de expressão visível para estas duas últimas proteínas na cepa TOP10+T7.

Para confirmar a expressão da T7 RNA polimerase também foi realizado um *Western Blotting* utilizando um anticorpo primário contra histidinas, tendo em vista que a T7 RNA polimerase possui uma cauda hexa-histidina na sua região N-terminal. Pode-se observar na figura 16 a presença de bandas correspondentes a T7 RNA polimerase nas células T7+TOP10, resultado que corrobora com o encontrado no gel de poliacrilamida, e também bandas na mesma altura para as construções SGFP2+T7+TOP10, sugerindo que realmente estava ocorrendo a expressão da T7 RNA polimerase mas que a mesma não estava promovendo a transcrição dos genes sob o controle do seu promotor (construções SGFP2).

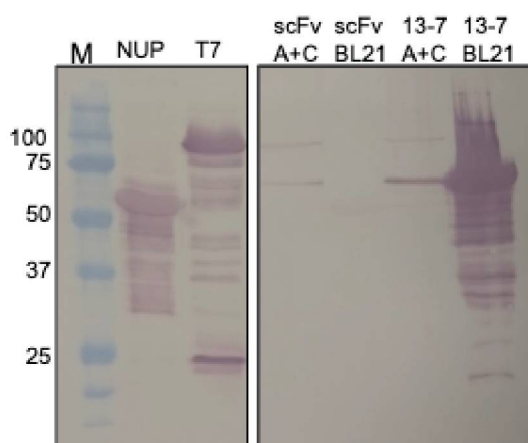


Figura 16. *Western Blotting* anti-His para identificar a expressão da T7 RNA Polimerase. *Western Blotting* utilizando um anticorpo primário anti-histidinas revelado com fosfatase alcalina. Marcador de peso molecular (M), expressão da proteína NUP1 em TOP10 (NUP), expressão da T7 RNA polimerase em TOP10 (T7), expressão do scFv anti-EPR-SGFP2+T7 em TOP10 (scFv A+C), expressão do scFv anti-EPR-SGFP2 em BL21 Star (DE3) (scFv BL21), expressão da proteína L-SGFP2+T7 em TOP10 (13-7 A+C), expressão da proteína L-SGFP2 em BL21 Star (DE3) (13-7 BL21). Foi possível identificar a expressão em TOP10 das proteínas NUP1 (controle) e da T7 em TOP10 e em TOP10 + scFv+T7 e TOP10+proteína-L+T7.

Observou-se durante os testes de expressão que o crescimento dos inóculos (T7+TOP10 ou SGFP2+T7) demorou cerca de 4 horas até a cultura atingir a densidade óptica (D.O.) a 600 nm de 0.4. Além disso, ao final do tempo de 4 horas de expressão a cultura não havia crescido muito, e o pellet celular formado após a centrifugação da mesma era significativamente pequeno para aquele tempo de crescimento. Através desses resultados somado ao não crescimento de colônias nas placas contendo IPTG (indutor da expressão do gene da T7 RNA polimerase), nossa hipótese é que a superexpressão da T7 RNA polimerase poderia ser tóxica para as células TOP10 (SUTER-CRAZZOLARA & UNSICKER, 1995).

Apesar da tentativa do sistema genético utilizando a T7 RNA polimerase na cepa TOP10 (cepa desenvolvida para clonagem) não ter funcionado, conseguimos realizar a transformação de reações de ligação diretamente na cepa BL21Star (DE3) (cepa desenvolvida para expressão). Dessa maneira, utilizaremos essa estratégia para seleção dos clones fluorescentes na etapa de evolução molecular dos scFvs, utilizando em conjunto o vetor pETGOF (scFvs em fusão com a SGFP2).

4.4 CONSTRUÇÃO DO scFv

As regiões variáveis da cadeia leve e pesada do Fab anti-EPR foram amplificadas por PCR (figura 17), a partir do DNA dos genes sintéticos do Fab produzidos pela empresa *GeneCust*, para serem clonadas nos vetores pET28a-TEV, pET28a-TEV-SGFP2 e pET32a. Os *primers* utilizados contêm a sequência do *linker* de glicinas e serinas, o qual é o responsável por conectar as duas regiões variáveis do scFv.

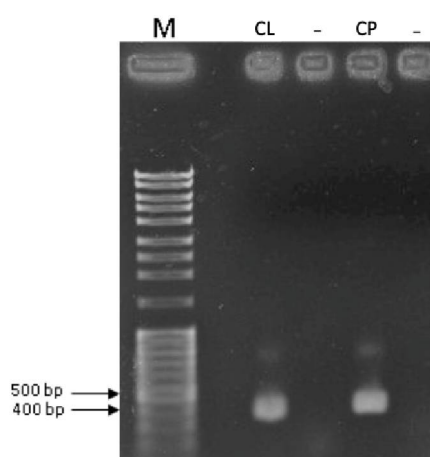


Figura 17. Análise Eletroforética dos Produtos de PCR da Amplificação das Regiões Variáveis dos Genes da Cadeia Leve e Pesada do Fab Anti-EPR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos amplicons das regiões variáveis dos genes da cadeia leve (CL) e pesada (CP) do fragmento de anticorpo do tipo Fab anti-EPR. As bandas estão de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 400 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M e o controle negativo (-) representa a reação sem DNA.

Após a confirmação através de gel de eletroforese de DNA, o amplicon da cadeia pesada foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI* e o da cadeia leve com *EcoRI* e *XhoI*. Os vetores foram primeiramente digeridos com *NcoI* e *EcoRI* para ligação da cadeia pesada. Em seguida foi realizada a ligação destes fragmentos, transformação na cepa de *E. coli* TOP10 e o *screening* de clones positivos (figura 18).

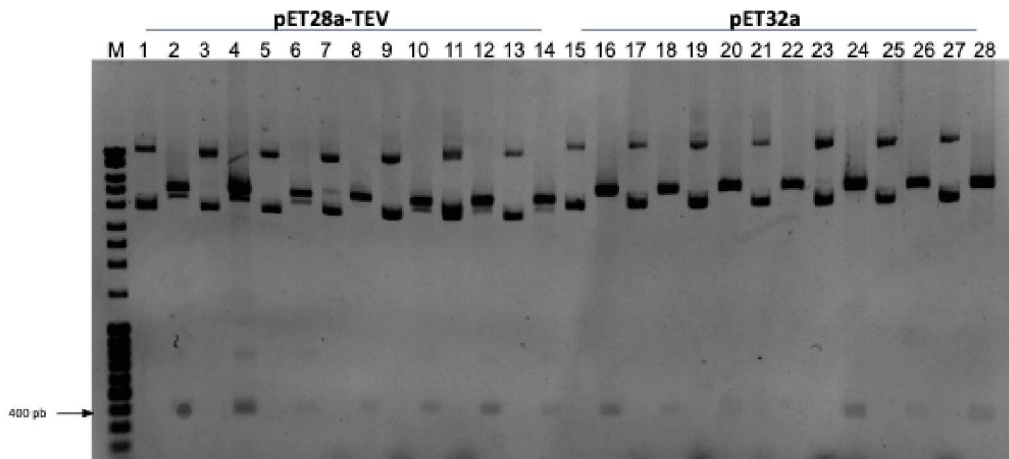


Figura 18. Análise eletroforética do Gene da Cadeia Pesada do scFv. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos pET28a-TEV não digerido (1,3,5,7,9,11,13) e digerido (2,4,6,8,10,12,14) e pET32a não digerido (15,17,19,21,23,25,27) e digerido (16,18,20,22,24,26,28) com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI* de 7 colônias proveniente das placas de ligação. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a porção variável da cadeia pesada do scFv anti-EPR, com o tamanho esperado de aproximadamente 400 pares de base (pb). A seta indica a banda do marcador de DNA (M).

Após a confirmação de clones positivos para ambas as construções, foi selecionada uma colônia de cada para prosseguir com a clonagem da porção variável da cadeia leve. O DNA plasmideal foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* e foi realizada a ligação com o amplicon da cadeia leve. Em seguida, foi realizado o screening de colônias para identificação dos clones positivos (figura 19). Foram identificados clones positivos para ambas as construções.

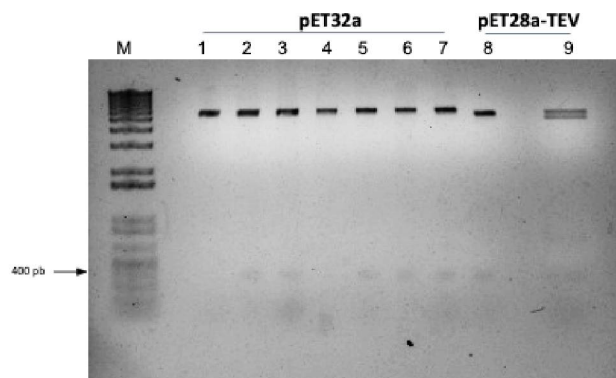


Figura 19. Análise Eletroforética do Gene da Cadeia Leve do scFv. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos pET32a (1 a 7) e pET28a-TEV (8 e 9) digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a porção variável da cadeia leve do scFv anti-EPR, com o tamanho esperado de aproximadamente 400 pares de base (pb). A seta indica a banda do marcador de DNA (M).

Além da construção scFv-TEV, também foi construída a scFv-TEV-SGFP2, onde a SGFP2 foi fusionada na região C-terminal do fragmento de anticorpo. Primeiramente a SGFP2 foi amplificada por PCR utilizando como molde o DNA plasmideal da construção proteína L-SGFP2 (figura 20). Os iniciadores utilizados continham os sítios de restrição *XhoI* e *Sall* e o amplicon foi clonado no plasmídeo scFv-TEV digerido com *XhoI*, tendo em vista que *XhoI* e *Sall* são compatíveis para ligação.

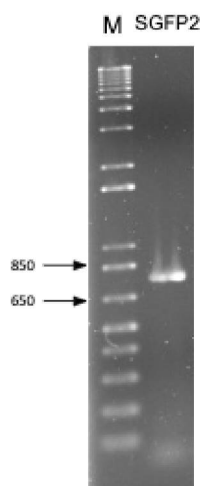


Figura 20. Análise eletroforética do produto de PCR da amplificação do gene da SGFP2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do amplicon da SGFP2 a partir do DNA do plasmídeo proteína L-SGFP2. A banda está de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 780 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M.

Após a ligação dos fragmentos, foi realizado o *screening* de clones positivos e selecionada uma colônia para prosseguir com os testes de expressão. O DNA plasmideal do clone escolhido foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* para confirmar a liberação do fragmento da construção scFv-SGFP2 (figura 21).

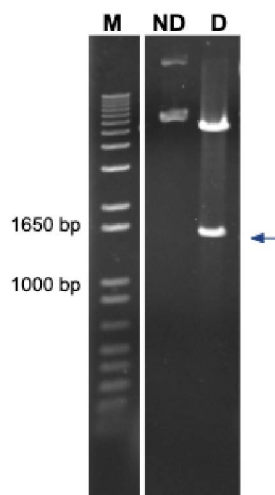


Figura 21. Análise eletroforética da construção scFv-GFP. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do plasmídeo scFv-GFP não digerido (ND) e digerido (D) com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente ao gene do scFv-GFP anti-EPR, com o tamanho esperado de aproximadamente 1490 pares de base (pb). A seta indica a banda do marcador de DNA (M).

4.4.1 Testes de indução da expressão do scFv

Com o intuito de determinar as melhores condições para expressão das construções Trx-scFv, scFv-GFP e scFv-TEV foram realizados ensaios de indução da expressão utilizando três temperaturas distintas: 16 °C, 25 °C e 37 °C. Uma colônia da placa, proveniente da transformação em BL21Star (DE3), foi inoculada em meio LB e submetida ao protocolo de indução da expressão. Os testes iniciais de expressão foram realizados em um volume de cultura de 10 mL. Para a lise das células foi utilizada lisozima (para uma concentração final de 0,15 mg/mL) e posteriormente 06 ciclos de sonicação de 30 segundos. Após o ensaio, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 13% para avaliar os resultados obtidos nos diferentes tempos e temperaturas de indução. As frações não-induzidas com IPTG foram utilizadas como controles negativos destes experimentos. A solubilidade da proteína também foi avaliada, através da separação das frações solúveis e insolúveis provenientes da lise das células bacterianas.

Analisando-se os géis (figura 22) é possível observar que houve a expressão das três construções em todas as temperaturas de indução, porém a proteína encontra-se em maior quantidade nas frações insolúveis. Pode-se observar também que o nível de expressão nas frações solúveis foi maior a 37 °C, o que é consistente com outros relatos na literatura, os quais indicam que a expressão a 37 °C leva a uma

maior produção de proteínas (JALIANI *et al.*, 2014). Portanto, esta foi a temperatura determinada como a melhor condição para a expressão, e posterior purificação, do fragmento de anticorpo.

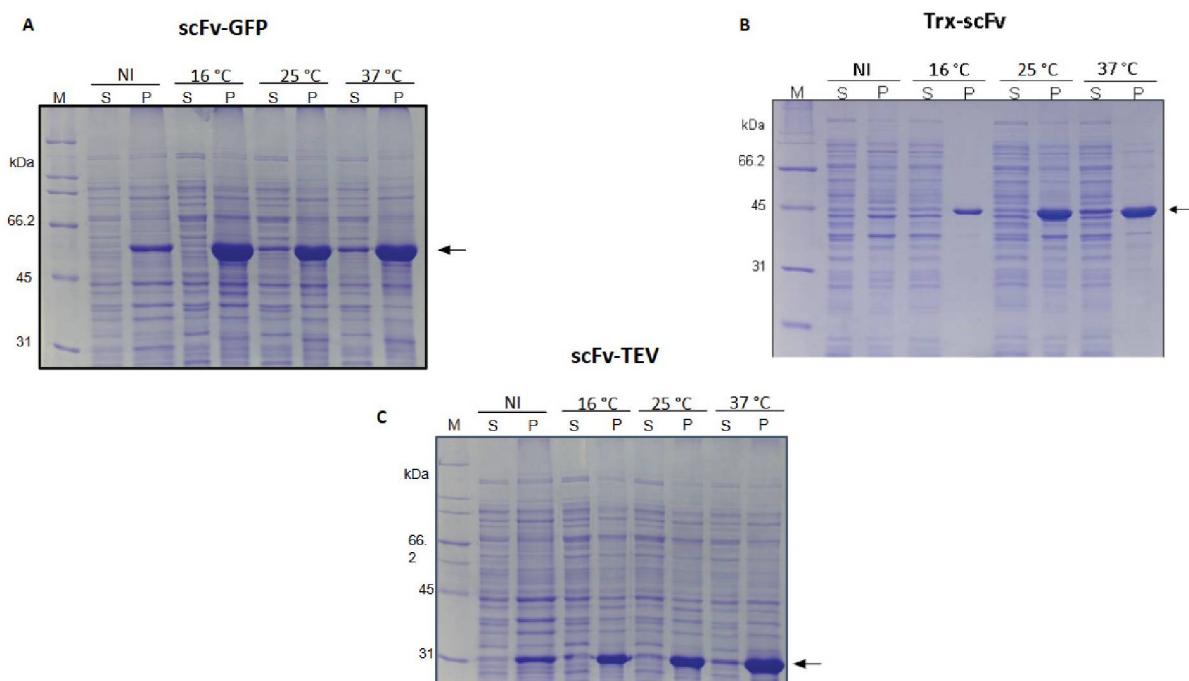


Figura 22. Efeito da temperatura e do tempo de indução na taxa de expressão das construções Trx-scFv, scFv-GFP e scFv na cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3). Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie Blue*, representando a melhor condição para a superexpressão do produto dos plasmídeos a) pET28a-TEV-scFv-SGFP2 b) pET32a-Trx-scFv e c) pET28a-TEV-scFv. S: Frações solúveis das amostras não-induzida (NI) e induzidas com 0.5 mM de IPTG. P: Frações insolúveis das amostras não-induzida e induzidas com 0.5 mM de IPTG. As bandas correspondentes a scFv-GFP, Trx-scFv e scFv possuem um tamanho de aproximadamente 55, 44 e 27 kDa respectivamente. O marcador de massa molecular está representado pela letra M.

Tendo em vista que os anticorpos serão utilizados posteriormente em ensaios de interação, onde é necessário a presença de um marcador fluorescente, foi selecionada a construção contendo a SGFP2 para expressão e purificação em maior volume (500 mL) e a lise passou a ser feita com lisozima seguida de lise por pressão no microfluidificador.

Foram realizadas duas tentativas de purificação da fração solúvel utilizando a cromatografia de afinidade a níquel, porém sem sucesso. Depois de realizar uma eletroforese em gel de poliacrilamida das frações da cromatografia, percebeu-se que as proteínas de interesse não estavam presentes na fração solúvel.

Devido a isso, decidiu-se avaliar se a alteração no método de lise poderia ser responsável por essa diferença na quantidade de proteína solúvel ao final do processo. A sonicação tem uma grande influência na solubilidade e estado de agregação das proteínas recombinantes, diminuindo a presença de grandes agregados e também aumentando a presença da proteína na fração solúvel (ZHU *et al.*, 2018).

Realizou-se então um teste, utilizando as construções scFv-GFP e scFv-TEV, para determinar se uma etapa de sonicação pós-lise poderia resgatar uma maior parcela de proteína da fração insolúvel. A construção scFv-TEV foi incluída como controle para avaliar se a adição de uma tag na construção teria alguma influência sobre este fenômeno.

O teste consistiu de uma lise por lisozima e em seguida pelo microfluidificador, a cultura foi então centrifugada e o pellet resultante ressuspendido em tampão A da cromatografia de afinidade. Em seguida, a suspensão foi sonicada e centrifugada novamente para separar a fração solúvel da insolúvel.

Por meio da figura 23, correspondente aos géis de poliacrilamida deste experimento, foi possível observar que após a lise no microfluidificador as proteínas estavam presentes na fração insolúvel e que a sonicação removeu os scFvs dos corpos de inclusão, solubilizando-os. A adição de uma tag não mostrou ter influência sobre a solubilização dos corpos de inclusão já que ambas as construções apresentaram o mesmo resultado. Isso explica o porquê não havia proteína solúvel nas tentativas de purificação, pois as células estavam passando somente pela lise por pressão diferentemente do teste de expressão inicial em 10 mL, onde foi utilizado o sonicador.

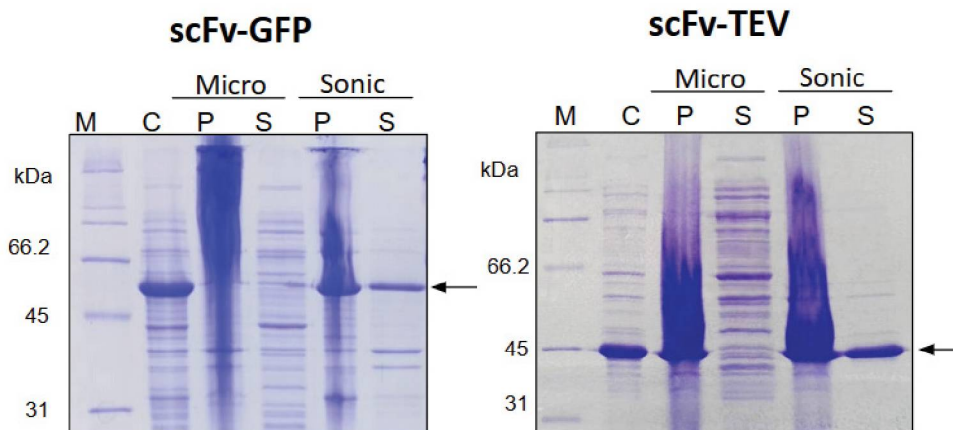


Figura 23. Efeito da sonicação na solubilização da construção scFv-GFP e scFv-TEV. Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie Blue*, representando o efeito da sonicação na solubilização da construção scFv-TEV-SGFP2 e scFv-TEV dos corpos de inclusão. A banda correspondente ao scFv-TEV-SGFP2 possui um tamanho de aproximadamente 60 kDa e a da scFv-TEV aproximadamente 45 kDa. O marcador de massa molecular está representado pela letra M. C=cultura, Micro=lise pelo microfluidificador onde P=pellet após a lise e S=fração solúvel após a lise. Sonic=lise por sonicação onde P=pellet após sonicação e S=fração solúvel após a sonicação. Pode-se observar que após a lise pelo microfluidificador, o scFv-TEV-SGFP2 e o scFv-TEV encontram-se na fração insolúvel e que após a sonicação voltam a estar presentes na fração solúvel.

Com este novo protocolo de purificação estabelecido, realizou-se uma nova tentativa de purificação da construção scFv-GFP utilizando a cromatografia de afinidade a níquel. Contudo, apesar do scFv ser encontrado relativamente puro nas frações solúveis após a sonicação, as construções se mostraram instáveis não se ligando assim a coluna cromatográfica, como demonstra a figura 24.

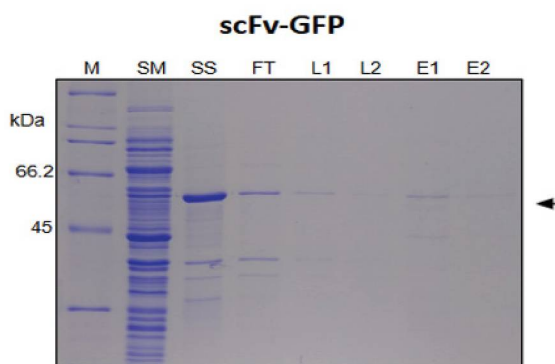


Figura 24. Purificação da construção scFv-SGFP2 através de cromatografia de afinidade a níquel. Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel e analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. Solúvel após lise no microfluidificador (SM), solúvel após lise no microfluidificador e sonicação (SS), *flow-through* (FT), lavagem 1 (L1) e 2 (L2), frações de eluição (E1 e E2). A banda de aproximadamente 54 kDa, referente ao scFv-SGFP2, está presente em maior quantidade na fração solúvel após a sonicação. Entretanto percebe-se a presença da proteína de interesse em todas as frações da cromatografia, especialmente uma quantidade muito reduzida capaz de interagir com a coluna como observado nas frações de eluição. O marcador de massa molecular está representado por M.

Tentativas de realizar uma cromatografia de exclusão por tamanho com essas amostras falharam devido a precipitação das proteínas durante a sua concentração e troca de tampão, etapas necessárias para realização deste tipo de purificação.

O que ocorre, provavelmente, é que a sonicação é capaz de solubilizar agregados não-funcionais da proteína de interesse. Além disso, a energia produzida pelo processo pode fragmentar grandes agregados gerando agregados menores hidrossolúveis que acabam não precipitando com a centrifugação da amostra (KWON et al., 2019), dando a falsa impressão da presença de proteína funcional na fração solúvel.

Devido a isso foi necessário retornar aos testes iniciais de expressão para tentar identificar condições que favorecessem a produção de scFvs solúveis em *E. coli*. Foi testada a cepa deficiente na proteína Δ SlyD, a qual é conhecida por interagir com a coluna de níquel sendo um dos principais contaminantes encontrados em purificações de afinidade a este metal, e que carrega o plasmídeo pRARE2 o qual codifica RNAs transportadores para códons raros, tendo em vista que a sequência do scFv anti-EPR não foi otimizada para expressão em *E. coli*.

Os melhores resultados foram obtidos com a cepa Δ SlyD-pRARE2 nas seguintes condições: indução da expressão com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 horas. A redução da temperatura de indução desfavorece as interações hidrofóbicas responsáveis pelos processos de agregação e também diminui a expressão de algumas proteases, aumentando a estabilidade das proteínas superexpressas (CHESHYRE & HIPKISS, 1989; SØRENSEN & MORTENSEN, 2005).

A figura 25 demonstra o resultado de uma cromatografia de afinidade a níquel realizada a partir de uma cultura produzida conforme os parâmetros mencionados. Nela pode-se observar a banda referente ao scFv-SGFP2 na altura esperada de aproximadamente 54 kDa. Essa cromatografia é uma primeira etapa no processo de purificação que promove o enriquecimento da proteína de interesse e por isso ainda podem ser observadas bandas inespecíficas na amostra.

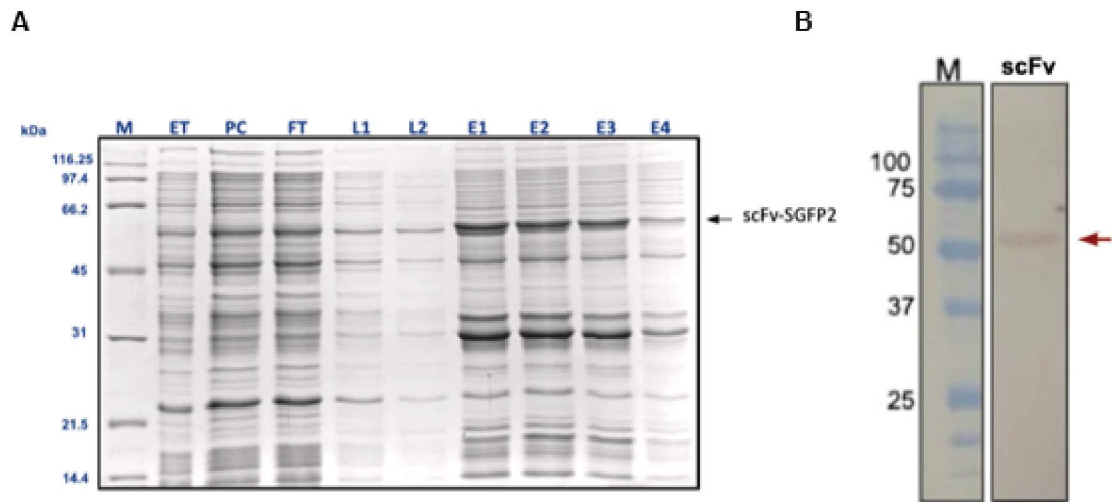


Figura 25. Purificação da construção scFv-SGFP2 através de cromatografia de afinidade a níquel. A) Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel e analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. Extrato Total (ET), Pré-coluna (PC), *flow-through* (FT), lavagem 1 (L1) e 2 (L2), frações de eluição (E1-E4). A banda de aproximadamente 54 kDa, referente ao scFv-SGFP2, está presente em todos os eluatos. B) Western blotting utilizando anticorpo anti-hexahistidinas confirmando a banda referente ao scFv-SGFP2. O marcador de massa molecular está representado por M.

4.5 SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO Fab EM VETOR DE *E. coli*

A fim de comparar tanto a expressão em *E. coli* quanto a seletividade e afinidade diante os diferentes membros da família do EGF, o Fab anti-EPR também foi produzido. Primeiramente as cadeias leve e pesada do Fab foram amplificadas (figura 26), a partir do DNA dos genes sintéticos produzidos pela empresa *GeneCust*.

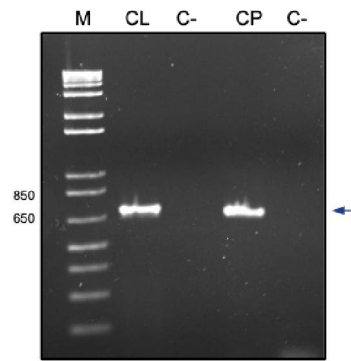


Figura 26. Análise eletroforética dos produtos de PCR da amplificação dos genes da cadeia leve e Pesada do Fab Anti-EPR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos amplicons dos genes da cadeia leve (CL) e pesada (CP) do fragmento de anticorpo do tipo Fab anti-EPR. As bandas estão de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 700 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M e o controle negativo (C-) representa a reação sem DNA.

Em seguida a cadeia leve foi clonada no vetor para expressão em *E. coli* pETDuet-1 e a cadeia pesada no vetor pET28a-TEV-SGFP2 em fusão a SGFP2 na sua região C terminal. Após a confirmação através de gel de eletroforese de DNA, o amplicon da cadeia pesada foi digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* e o da cadeia leve com *BamHI* e *HindIII*. Os vetores foram digeridos com as respectivas enzimas e foi realizada a ligação destes fragmentos e o *screening* de clones positivos (figura 27).

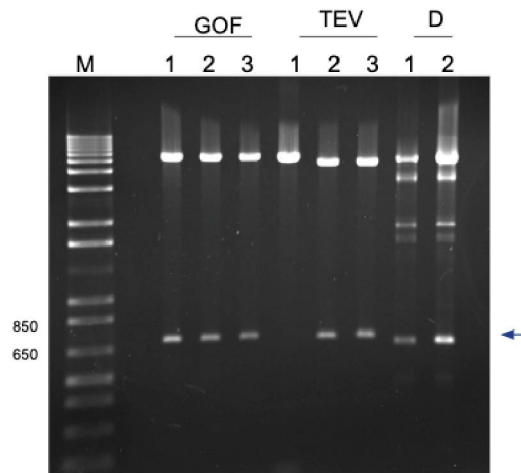


Figura 27. Análise eletroforética do gene da cadeia pesada e leve do Fab anti-EPR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos plasmídeos pET28a-TEV-SGFP2 (pETGOF), pET28a-TEV (TEV) e pETDuet-1 (D) digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII* e *BamHI* e *HindIII* respectivamente. Foram analisadas 3 colônias para a construção da cadeia pesada e duas para a construção da cadeia leve provenientes das placas de ligação. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente a cadeia pesada e a cadeia leve do Fab anti-EPR, com o tamanho esperado de aproximadamente 700 pares de base (pb). A seta indica a banda do marcador de DNA (M).

Optamos também pela produção do fragmento do tipo Fab tendo em vista que apesar do scFv possuir vantagens como menor tamanho e complexidade para expressão em *E. coli*, o fragmento do tipo Fab é uma molécula mais estável e que possui uma afinidade aumentada pelo seu alvo (SIVELLI *et al.*, 2018).

Assim como para o scFv, a melhor cepa para expressão do Fab foi a Δ SlyD-pRARE2. Também se mantiveram como parâmetros de expressão a indução com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 horas. A figura 28 demonstra o gel de poliacrilamida referente a purificação de afinidade a níquel do Fab onde é possível observar as bandas referentes a cadeia pesada em fusão a SGFP2 (aproximadamente 53 kDa) e a cadeia leve (aproximadamente 25 kDa).

O refinamento da padronização da primeira etapa de purificação foi realizado testando-se diferentes volumes de cultura (0.5, 1 e 2 litros) e pHs dos tampões da cromatografia de afinidade a níquel (pH 7.0, 7.5, 8.0 e 8.5). As melhores condições obtidas foram as seguintes: 2 litros de cultura e pH 8.0. Conforme demonstrado na figura 26, as bandas referentes a cadeia leve e a cadeia pesada do Fab anti-EPR podem ser observadas nas frações de eluição 31 a 37. Essas frações são visualmente fluorescentes, devido a presença da SGFP2.

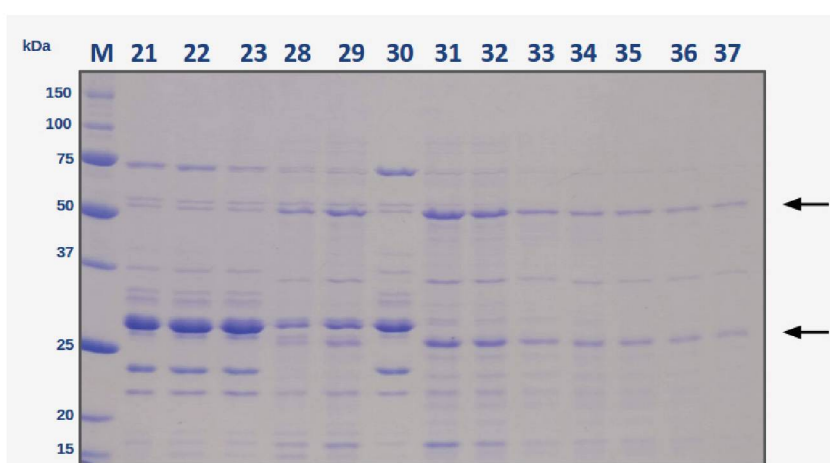


Figura 28. Purificação da construção Fab-SGFP2 através de cromatografia de afinidade a níquel. Amostras obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel e analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. Frações de eluição (21-37). A banda de aproximadamente 53 kDa, referente a cadeia leve e a banda de aproximadamente 24 kDa referente a cadeia leve do Fab-SGFP2, estão presentes nos eluatos 31 a 37. O marcador de massa molecular está representado por M.

Partindo do mesmo volume inicial de cultura de dois litros, as frações obtidas por meio da cromatografia de afinidade a níquel do scFv e do Fab quando comparadas evidenciam que houve um maior rendimento na expressão solúvel do fragmento do tipo Fab, como demonstrado na figura 29.

Conforme relatado por Quintero-Hernandez, 2006, a expressão de fragmentos do tipo Fab em *E. coli* é favorecida na fração solúvel devido a presença das regiões constantes das cadeias leves e pesadas unidas por mais de uma ponte dissulfeto, as quais geram uma estrutura com maior estabilidade. As porções constantes também aumentam a interface de interação entre a cadeia leve e a cadeia pesada e protegem as regiões C-terminais dos domínios variáveis, diminuindo possíveis desnaturações (PLUCKTHUN, 1996).

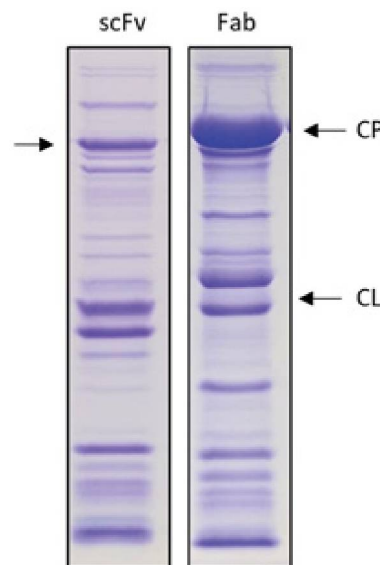


Figura 29. Perfil eletroforético após cromatografia de afinidade a níquel dos fragmentos de anticorpo do tipo scFv-SGFP2 e Fab-SGFP2. SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. Frações de eluição da cromatografia de afinidade a níquel do scFv-SGFP2 (banda de aproximadamente 53 kDa) e do Fab-SGFP2 (cadeia pesada + SGFP2 com aproximadamente 53 kDa e cadeia leve com aproximadamente 24 kDa) demonstrando que o rendimento de proteína expressa na fração solúvel foi maior no fragmento do tipo Fab.

A geração de fragmentos funcionais tem sido um tema de grande interesse na comunidade científica e indústria farmacêutica. Os fragmentos produzidos com sucesso em *E. coli* foram alcançados utilizando principalmente o espaço do periplasma como ambiente para expressão dessas proteínas (VENTURI *et al.*, 2002; KARYOLAIMOS *et al.*, 2019).

Entretanto o periplasma é um compartimento limitante devido ao seu tamanho pequeno e leva normalmente a rendimentos de produção médios ou baixos (0,05-0,5 mg/L de cultura bacteriana). O citoplasma, por sua vez, por ser um compartimento celular de maior volume possibilita um maior rendimento na produção de proteínas. Tem-se produzido diversos tipos de construções de anticorpos no citoplasma bacteriano, desde scFvs e Fabs a até mesmo anticorpos com sua estrutura completa (ROBINSON *et al.*, 2015).

Nossos resultados corroboram com o que foi encontrado em exemplos práticos da literatura, onde o scFv tem um nível de expressão menor que o Fab (SARKER *et al.*, 2019; KRITTANAI, 2020; FARSHDARI *et al.*, 2020). A maioria dos anticorpos citados nesses trabalhos foi expresso como agregados insolúveis e para melhorar a solubilidade foi necessária a adição de *tags* como GST (Glutathione S-Transferase), MBP (do inglês, *Maltose Binding Protein*) e Trx (Tiorredoxina-1).

Também se demonstrou a grande influência que a temperatura de expressão tem no rendimento final dos fragmentos. Maiores temperaturas rendem níveis de expressão mais elevados, podendo chegar até a duas vezes mais (FARSHDARI *et al.*, 2020), entretanto favorecem a formação de agregados insolúveis. O trabalho realizado por Cabilly em 1989 demonstrou que a produção efetiva de Fab solúveis em *E. coli* só foi possível com a diminuição da temperatura de indução (para 30 °C e 21°C) em comparação a temperatura padrão de 37 °C.

A literatura indica que os níveis de expressão de fragmentos de anticorpo funcionalmente ativos em *E. coli* depende, principalmente, da sequência aminoacídica dessas proteínas, o que provoca uma grande diversidade entre anticorpos. Por mais que existam resultados dispostos na literatura de expressão com sucesso de fragmentos solúveis em *E. coli*, geralmente essa expressão é difícil e varia caso a caso (LEVY, 2001).

O Fab foi escolhido como primeiro fragmento a ser analisado nos ensaios de interação e por isso foi realizada mais uma etapa cromatográfica, a cromatografia de exclusão por tamanho, com o objetivo de separar o anticorpo de possíveis agregados existentes na amostra. Como demonstrado na figura 30a, as bandas referentes a cadeia leve e a cadeia pesada do Fab anti-EPR podem ser observadas nas frações de eluição 3 a 6.

As bandas de interesse, referentes a cadeia leve e cadeia pesada do Fab-GFP, já haviam sido confirmadas anteriormente através de um *western blotting* utilizando um anticorpo anti-hexahistidinas, conforme demonstrado na figura 30b.

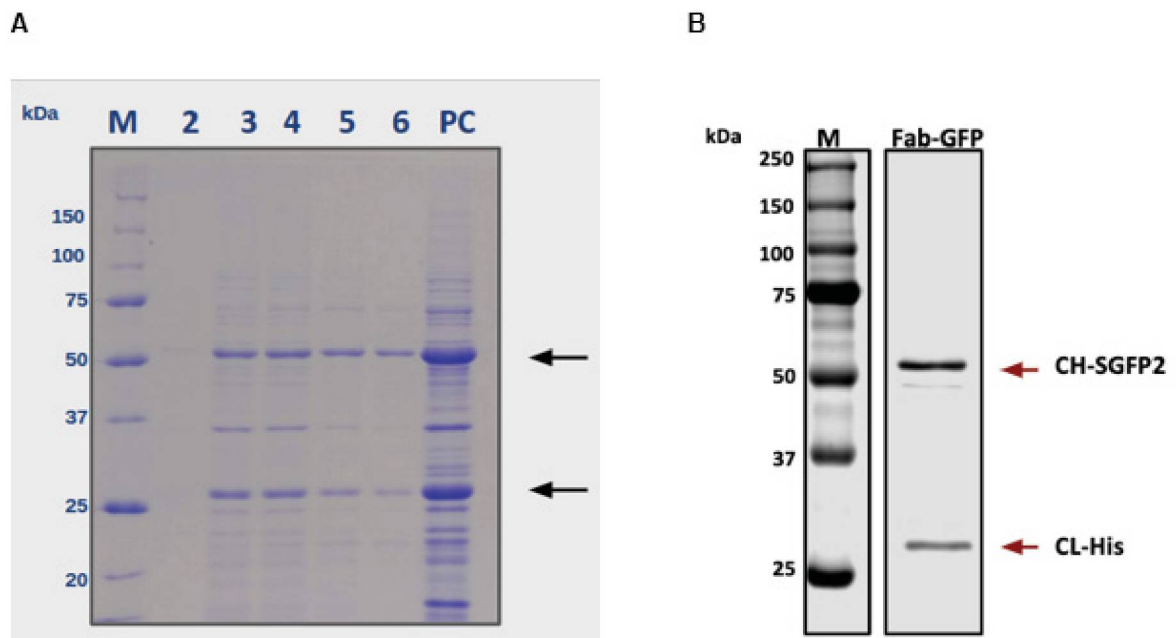


Figura 30. Purificação da Construção Fab-SGFP2 Através de Cromatografia de Exclusão por Tamanho. A) Amostras obtidas durante a cromatografia de exclusão por tamanho e analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. Frações de eluição (2-6), pré-coluna (PC). A banda de aproximadamente 53 kDa, referente a cadeia pesada e a banda de aproximadamente 24 kDa referente a cadeia leve do Fab-SGFP2, estão presentes nos eluatos 3 a 6. B) Western blotting utilizando anticorpo anti-hexahistidinas confirmando as bandas referentes a cadeia pesada (CH-SGFP2) e cadeia leve (CL-His) do Fab-SGFP2. O marcador de massa molecular está representado por M.

Apesar da presença de alguns contaminantes ainda, a termoforese em microescala permite a realização de ensaios de interação sem a necessidade de uma pureza elevada da amostra (KHAVRUTSKII *et al.*, 2013). Inclusive, no trabalho realizado por Wienken *et al.*, 2010 foi utilizado o extrato total de *E. coli* no ensaio de interação e o kD determinado foi consideravelmente menor do que o encontrado para o ensaio utilizando as proteínas purificadas.

Para os ensaios de afinidade e seletividade as quantidades obtidas para ambas as construções (scFv e Fab) seriam suficientes, tendo em vista que a quantidade necessária da molécula que possui a marcação fluorescente é muito baixa (entre 1 e 10 nM) (NANOTEMPER, 2018).

4.6 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS FATORES DA FAMÍLIA DO EGF

4.6.1 Padronização da expressão

Devido a experiência prévia do grupo com a expressão e purificação do fator de crescimento EPR, já se sabia que a expressão a 15 °C por 24 horas era a melhor condição para se trabalhar com essa proteína. Tendo em vista que os fatores pertencem à mesma família e possuem uma alta similaridade estrutural, optou-se por fazer um teste de expressão em pequena escala seguindo essas condições inicialmente. Uma colônia da placa, proveniente da transformação na cepa BL21 Star (DE3), foi inoculada em meio LB (do inglês *Lysogeny Broth*, Bertani 1951) e submetida ao protocolo de indução da expressão. Após o ensaio, realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida 13% para avaliar os resultados obtidos nos diferentes tempos e temperaturas de indução. As frações não-induzidas com IPTG foram utilizadas como controles negativos destes experimentos. A solubilidade da proteína também foi avaliada, através da separação das frações solúveis e insolúveis provenientes da lise das células bacterianas.

Analisando-se os géis (figura 31) é possível observar que houve a expressão das proteínas nesta condição, sendo encontradas nas frações solúveis em quantidade suficiente para prosseguir com a expressão em maior escala e purificação sem a necessidade de otimização.

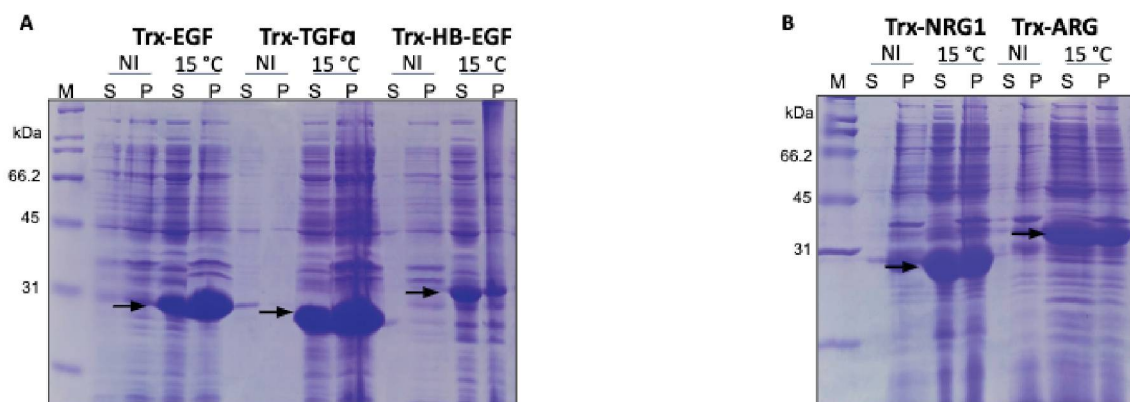


Figura 31. Teste de expressão em pequena escala dos fatores de crescimento em cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3). Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie* Blue, representando a superexpressão dos fatores de crescimento em fusão com a Trx. A) Frações solúveis (S) e insolúveis (P) das amostras não-induzidas (NI) e induzidas (I) com IPTG das proteínas de fusão Trx-EGF, Trx-TGF α e Trx-HB-EGF. B) Frações solúveis (S) e insolúveis (P) das amostras não-induzidas (NI) e induzidas (I) com IPTG das proteínas de fusão Trx-NRG1, Trx-ARG e Trx-BTC.

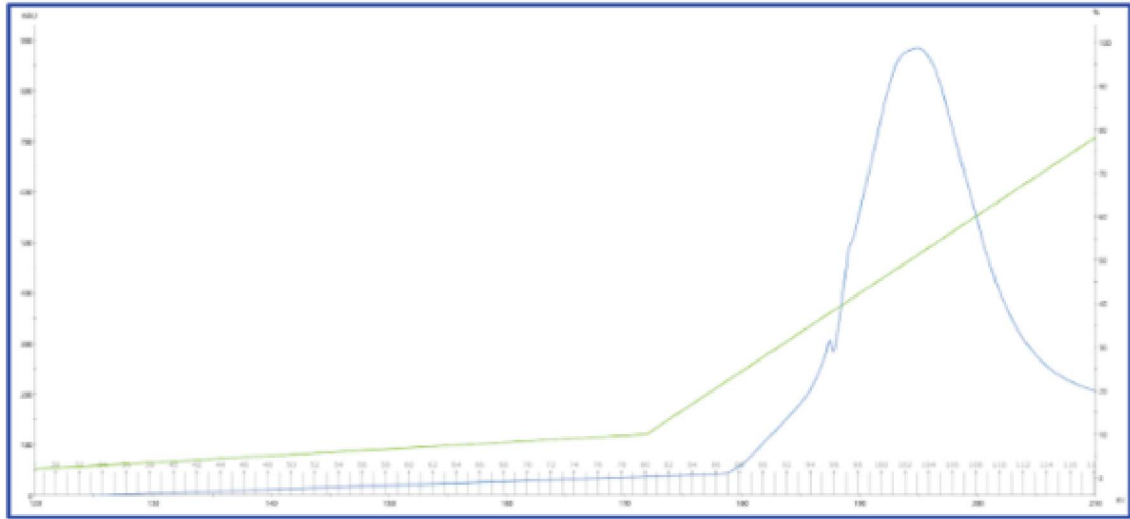
4.6.2 Testes de purificação

Após ser verificada a presença das construções na fração solúvel foi realizada uma expressão em maior escala utilizando 500 mL de cultura. No total são oito construções, sendo os sete fatores da família do EGF e mais um controle negativo para os testes de interação, a NRG1. A expressão e purificação dos fatores foi dividida com o doutorando do laboratório Arthur Ferreira Schweitzer, tendo em vista que os fatores serão também utilizados em outros projetos. Neste projeto foi realizada a purificação das construções Trx-EPR, Trx-NRG-1, Trx-EPGN, Trx-HB-EGF e Trx-ARG através de cromatografia de afinidade a níquel, tendo em vista que o plasmídeo pET32a possui uma cauda de hexahistidina.

4.6.2.1 Purificação EPR e NRG-1

A purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade a níquel conforme descrito no item 3.15.1 da seção de matérias e métodos. Nos cromatogramas obtidos (figuras 31a e 32a), é possível visualizar o pico referente a eluição das proteínas. O método utilizado forneceu bons resultados, uma vez que quantidades significativas das proteínas recombinantes foram detectadas, em géis de SDS-PAGE 13%, nas frações de eluição (figuras 31b e 32b).

A



B

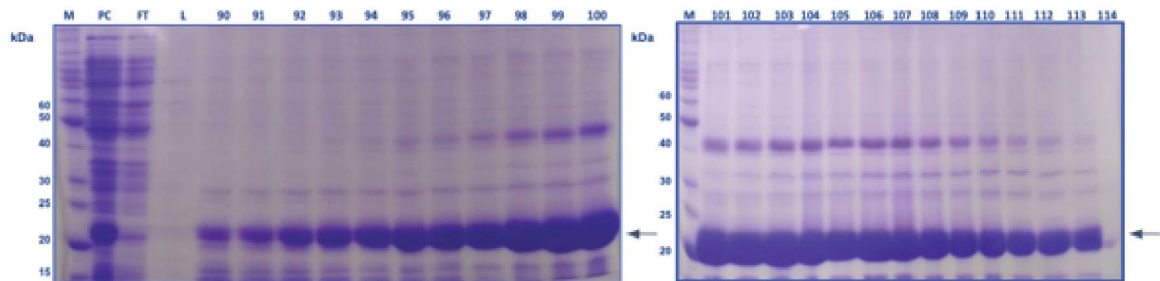
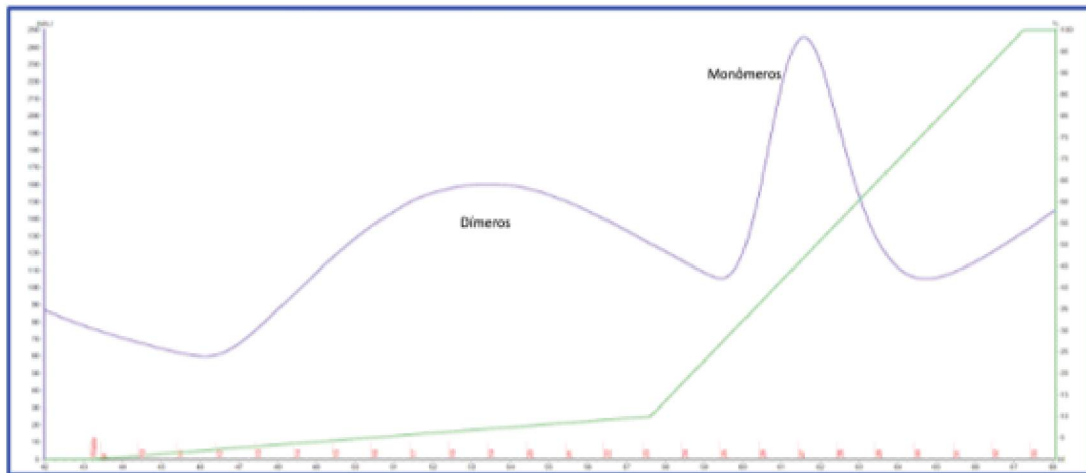


Figura 31. Purificação Da Trx-EPR por Cromatografia de Afinidade a Níquel. A) Cromatograma obtido da purificação por afinidade realizada para purificar a Trx-EPR. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. Na base do pico estão representadas o fracionamento dos eluatos. B) Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie Blue*, representando as frações de eluição (90-114) obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel. A banda de aproximadamente 24 kDa, referente a Trx-EPR, está presente em todos os eluatos.

A



B

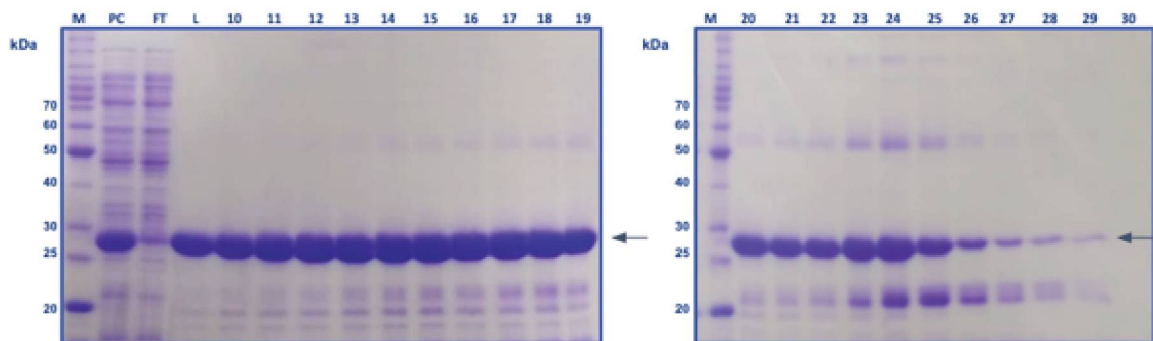


Figura 32. Purificação Da Trx-NRG-1 por Cromatografia de Afinidade a Níquel. A) Cromatograma obtido da purificação por afinidade realizada para purificar a Trx-NRG-1. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. Na base do pico estão representadas o fracionamento dos eluatos. B) Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie Blue*, representando as frações de eluição (10-30) obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel.

A fusão dos fatores de crescimento com a tiorredoxina na região C-terminal mostrou-se uma construção que apresenta um grande rendimento de proteínas solúveis. A utilização do pET32a para a produção dos fatores da família do EGF já foi descrita em outros trabalhos (SATO *et al.*, 2003; KADO *et al.*, 2015) e como a estrutura tridimensional entre os fatores da família é altamente conservada, esperava-se que as outras fusões também fornecessem um rendimento elevado.

Em contraste, o trabalho realizado por Mautino, 2004 onde a expressão da NRG-1 foi realizada sem a tag Trx, levou a um rendimento extremamente baixo de proteínas, aliado a um protocolo de purificação laborioso que envolvia a desnaturação

e renaturação da NRG-1. Nossa construção obteve resultados muito superiores em questão de rendimento final de proteína solúvel e também na facilidade na purificação da NRG-1.

4.6.2.2 Purificação EPGN, HB-EGF e AREG

Os resultados da expressão e purificação dos fatores EPGN, HB-EGF e AREG foram de acordo com os esperados. Nos cromatogramas obtidos (figuras 33a, 34a e 35a), é possível visualizar o pico referente à eluição da proteína. O método utilizado forneceu bons resultados, uma vez que quantidades significativas da proteína recombinante foram detectadas, em géis de SDS-PAGE 13%, nas frações de eluição (figuras 33b, 34b e 35b).

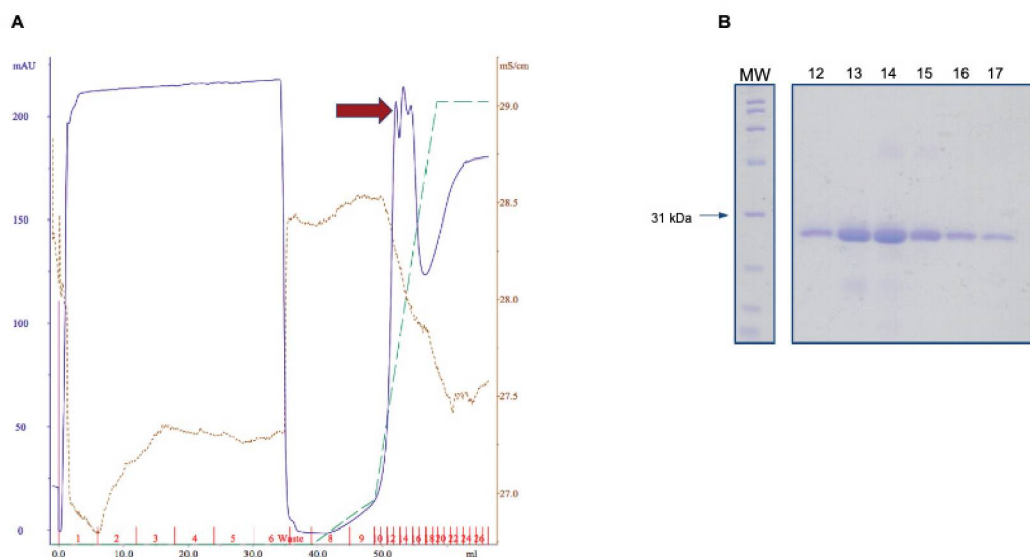


Figura 33. Purificação Da Trx-EPGN por Cromatografia de Afinidade a Níquel. A) Cromatograma obtido da purificação por afinidade realizada para purificar a Trx-EPGN. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. Na base do pico estão representadas em vermelho o fracionamento dos eluatos. B) Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie* Blue, representando as frações de eluição (12-17) obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel. A banda de aproximadamente 24 kDa, referente a Trx-EPGN, está presente em todos os eluatos, porém bandas mais intensas, indicando maiores concentrações da proteína, são observadas nos eluatos 13 e 14. O marcador de massa molecular está representado por MW.

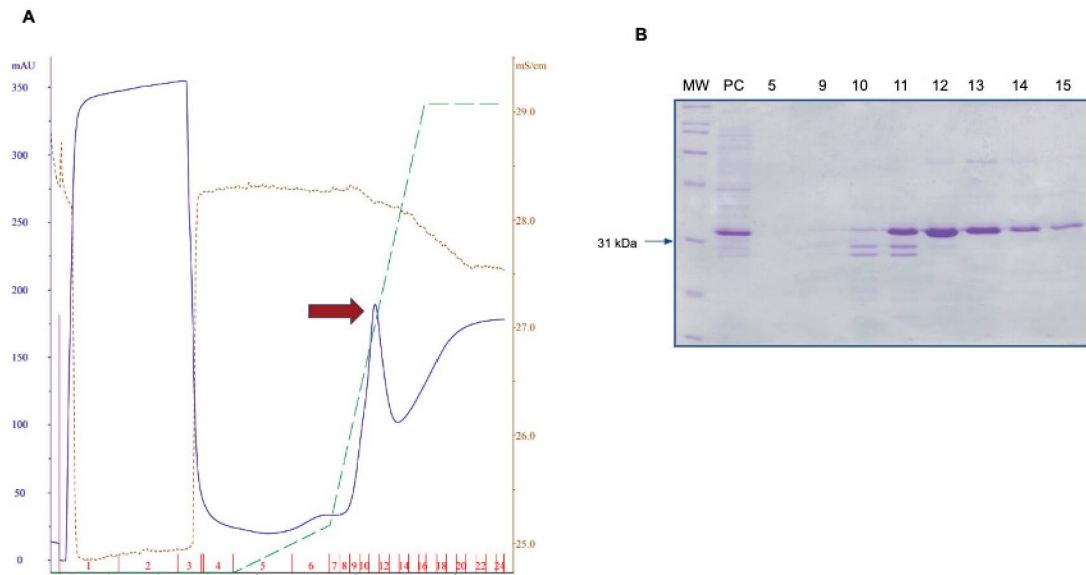


Figura 34. Purificação da Trx-HB-EGF por Cromatografia de Afinidade a Níquel. A) Cromatograma obtido da purificação por afinidade realizada para purificar a Trx-HB-EGF. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. Na base do pico estão representadas em vermelho o fracionamento dos eluatos. B) Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie* Blue, representando as frações de eluição (9-15) obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel. A banda referente a Trx-HB-EGF está presente em todos os eluatos, porém bandas mais intensas, indicando maiores concentrações da proteína, são observadas nos eluatos 11, 12 e 13. O marcador de massa molecular está representado por MW, o pré-coluna por PC e a fração número 5 corresponde a lavagem.

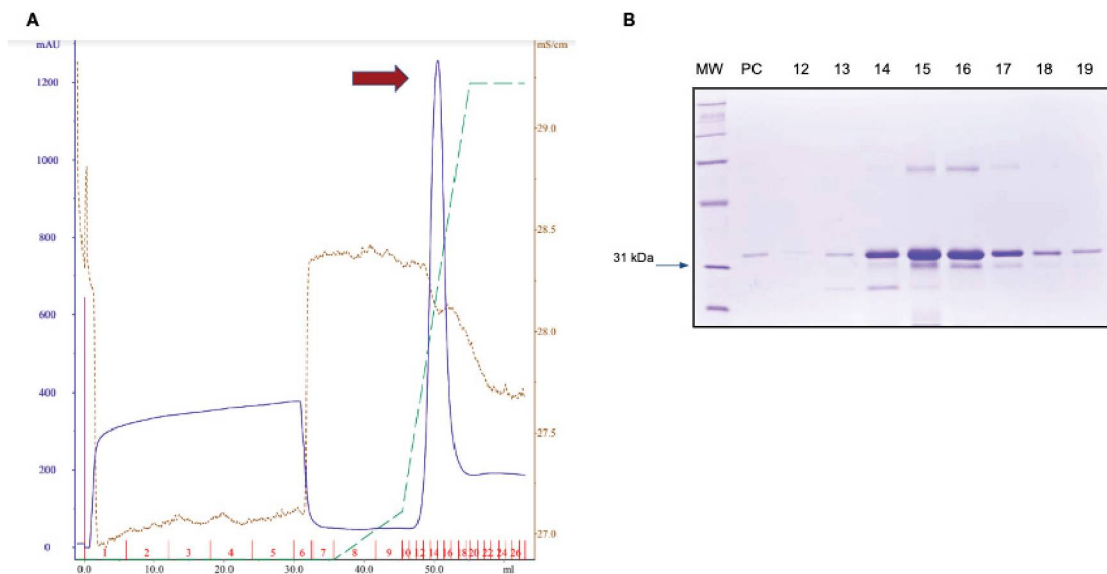


Figura 35. Purificação da Trx-ARG por Cromatografia de Afinidade a Níquel. A) Cromatograma obtido da purificação por afinidade realizada para purificar a Trx-ARG. O pico em azul corresponde à absorbância, na faixa da luz UV, das frações purificadas. Na base do pico estão representadas em vermelho o fracionamento dos eluatos. B) Gel de poliacrilamida 13%, corado com *Coomassie* Blue, representando as frações de eluição (12-19) obtidas durante a cromatografia de afinidade a níquel. A banda referente a Trx-ARG está presente em todos os eluatos, porém bandas mais intensas, indicando maiores concentrações da proteína, são observadas nos eluatos 14, 15 e 16. O marcador de massa molecular está representado por MW e o pré-coluna por PC.

A adição de outras tags, como a tag SUMO (do inglês, *Small Ubiquitin-like Modifier*), também se mostrou eficiente na produção do fator de crescimento HB-EGF solúvel (LU, 2010). Já para o EPGN trabalhos com outras construções reforçam a necessidade de uma fusão para que o rendimento na fração solúvel seja satisfatório, sendo que a construção utilizada no trabalho continha apenas a cauda hexahistidina. Os níveis de expressão e o rendimento pós-purificação foram significativamente baixos e o EPGN teve que ser desnaturado para remoção dos corpos de inclusão (STRACHAN, 2001).

Com relação a AREG, o único trabalho encontrado na literatura sobre a expressão dessa proteína em *E. coli* (THOMPSON *et al.*, 1996) apresenta um protocolo de purificação extremamente laborioso, com desnaturação e renaturação da proteína e diversas etapas cromatográficas. Em contrapartida o protocolo validado nesse projeto possui apenas uma etapa de purificação e os fatores são encontrados diretamente na fração solúvel.

Apesar do uso de certas tags auxiliar na solubilidade proteica, elas podem ser prejudiciais para os experimentos posteriores a purificação, pois podem alterar a conformação nativa da proteína, inibir sua atividade ou até mesmo alterar suas funções biológicas. Experimentos como ensaios de interação ou cristalização para difração de raios-X são alguns dos exemplos nos quais a remoção das tags é necessária (SCHAEFER *et al.*, 2002; ARNAU *et al.*, 2006).

As proteínas de fusão podem ser removidas por métodos químicos ou por clivagem com proteases sítio específicas, um processo menos agressivo. Como os fatores de crescimento iriam ser utilizados nos ensaios de interação com os fragmentos de anticorpo optamos pela remoção da tag Trx dos mesmos a fim de garantir um ensaio mais próximo da realidade biológica (COSTA, 2014).

A remoção da tag de tioredoxina da região N-terminal dessas construções foi realizada com a protease trombina. Após a digestão, a tag e o restante da construção foram separadas através de uma cromatografia de exclusão por tamanho. Padronizamos a remoção da Trx primeiramente da EPR e da NRG-1 (neuregulina-1), tendo em vista que seriam os primeiros fatores a serem utilizados nos testes de interação, conforme demonstra a figura 36. Após cromatografia de exclusão por tamanho detectamos um pico da NRG-1 nas frações 16-19 e um pico da Trx nas frações 22 a 24 (figura 36 a).

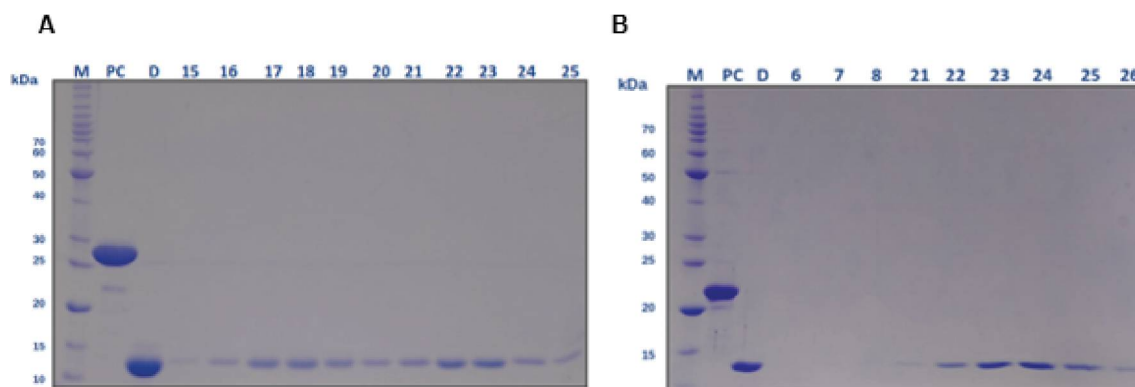


Figura 36. Remoção da *tag* tioredoxina dos fatores de crescimento EPR e NRG-1. Amostras da cromatografia de exclusão por tamanho obtidas após a digestão com a protease trombina e analisadas em gel SDS-PAGE 13% corado com *Coomassie blue*. A: Pré-coluna antes da digestão (PC) e após a digestão com a trombina e frações de eluição da NRG-1 (15-25). A banda de aproximadamente 11 kDa, referente a NRG-1 digerida, está presente nos eluatos (15-25). B: Pré-coluna antes da digestão (PC) e após a digestão com a trombina e frações de eluição da EPR (6-8 e 21 a 26). A banda de aproximadamente 8 kDa, referente a EPR digerida, está presente nos eluatos (21-26). O marcador de massa molecular está representado por M.

Com relação a clivagem da Trx da EPR, pelas massas moleculares de cada uma, acreditávamos que a banda visualizada em gel de SDS-PAGE referente a EPR (aproximadamente 6 kDa) sem a tioredoxina (aproximadamente 10 kDa) seria aquela correspondente ao segundo pico de eluição da cromatografia de exclusão por tamanho (frações 16 a 24 - figura 37a). Entretanto, conforme demonstrado através do *western blotting* utilizando um anticorpo anti-his (figura 37b), a banda principal do segundo pico corresponde a tioredoxina (porção que retém a cauda de histidinas após a clivagem). Por sua vez, o fator de crescimento encontra-se nas frações de agregados (7 a 9), não havendo a separação do mesmo em sua forma monomérica necessária para os ensaios seguintes.

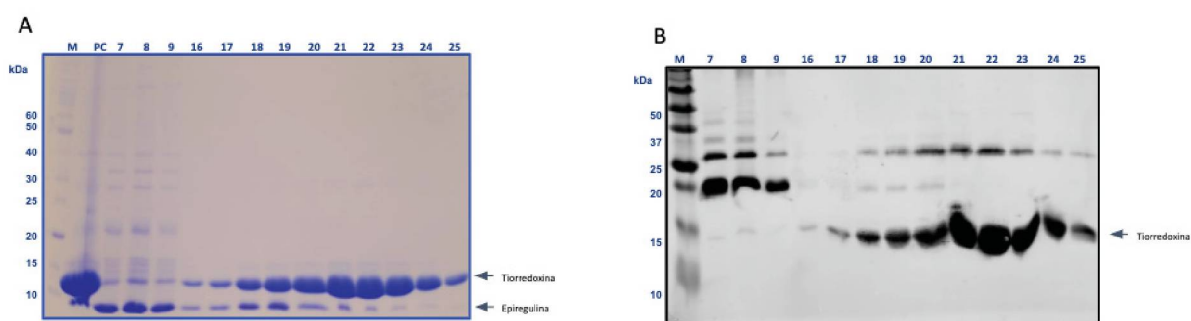


Figura 37. Frações da purificação de exclusão por tamanho após clivagem da tag de tiorredoxina da epiregulina. Amostras obtidas na cromatografia de exclusão por tamanho e analisadas através de SDS-PAGE e Western blotting (figura 29 a e 29 b). Figura 29 a: Gel de poliacrilamida representando as bandas da epiregulina (aproximadamente 8 kDa) e da tiorredoxina eluídas juntas nas frações da purificação. Frações de eluição (7 e 28), pré-coluna (PC). O marcador de massa molecular está representado por M. Figura 29 b: foi utilizada marcação para cauda de histidinas e as bandas marcadas correspondem a construção inteira (amostra não-digerida e com aproximadamente 21 kDa) e a tiorredoxina (porção que permanece com a cauda de histidinas após clivagem e que contém aproximadamente 13 kDa).

Após a constatação de que o perfil eletroforético encontrado indica a presença do fator de crescimento em agregados, foram realizadas outras duas tentativas de purificação utilizando diferentes protocolos, visando assim retirar a epiregulina da fração agregada. No primeiro protocolo desenvolvido, foi realizada uma cromatografia de afinidade a metal (IMAC) seguida de cromatografia por exclusão de tamanho. Realizou-se então a digestão com trombina para separação do fator da tag Trx e uma segunda cromatografia de afinidade a metal.

Essa tentativa não foi suficiente para separar o fator de crescimento em sua conformação nativa da tag em quantidades suficientes para os ensaios de interação, portanto um novo protocolo foi desenhado para tentar mitigar estes problemas.

A nova tentativa constitui-se também de uma IMAC, desta vez seguida diretamente para a digestão, tentando assim evitar a grande perda de material que ocorre entre os dois processos. Após a digestão foi realizada uma segunda cromatografia de afinidade a metal, buscando separar o ligante de interesse, o qual possui his-tag (figura 38).

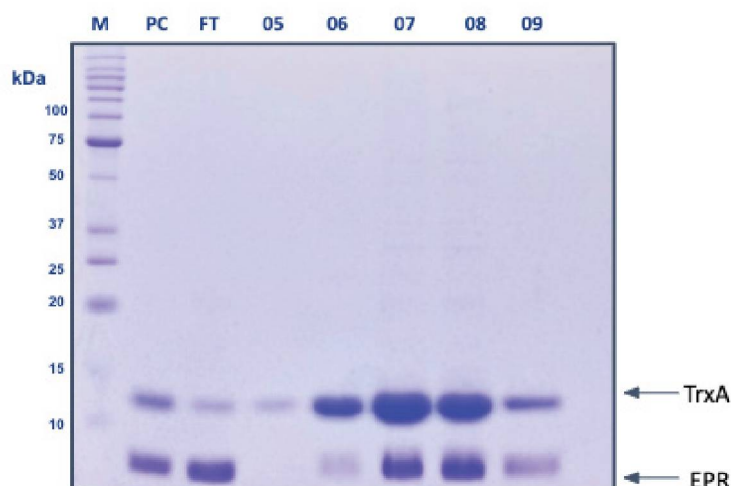


Figura 38. Frações da purificação de afinidade a níquel após clivagem da tag de tiorredoxina da epiregulina. Amostras obtidas na cromatografia de afinidade a níquel e analisadas através de SDS-PAGE. Gel de poliácridamida representando as bandas da epiregulina (aproximadamente 8 kDa) e da tiorredoxina (aproximadamente 13 kDa) eluídas juntas nas frações da etapa final da purificação. Pré-coluna (PC), *flowthrough* (FT) e frações de eluição (05 e 09). O marcador de massa molecular está representado por M.

Após a implementação de ambos os protocolos, observou-se que nenhum dos dois produziu uma melhora satisfatória na pureza e rendimento do ligante. Diante dessas tentativas não sucedidas, acreditávamos que o problema se encontrava em uma etapa anterior, onde o gene da EPR acabou sendo clonado muito próximo ao gene da Trx (figura 42b), resultado assim em um produto instável e de difícil purificação. Então, uma das alternativas para a resolução deste problema foi realizar uma nova clonagem do gene da EPR, desta vez em uma região mais distante a Trx, utilizando os sítios de *NcoI* e *XhoI*, sítios utilizados para a clonagem dos demais fatores.

Primeiramente a sequência de DNA da EPR foi amplificada a partir do DNA do gene sintético. O amplicon resultante possui o tamanho esperado de aproximadamente 148 pares de base como demonstrado através de um gel de agarose (figura 39).

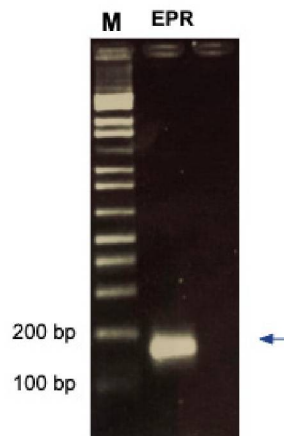


Figura 39. Análise eletroforética do produto de PCR da amplificação do gene da EPR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do amplicon da EPR a partir do DNA do plasmídeo proteína pET32a-Trx-EPR. A banda está de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 148 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M.

Em seguida o amplicon e o vetor PET32a foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI* e foi realizada a ligação desses fragmentos. O *screening* de clones positivos foi realizado inicialmente através de um PCR de colônia (figura 40) e todas as colônias testadas apresentaram amplificação no tamanho esperado para o gene da EPR (aproximadamente 148 pb).

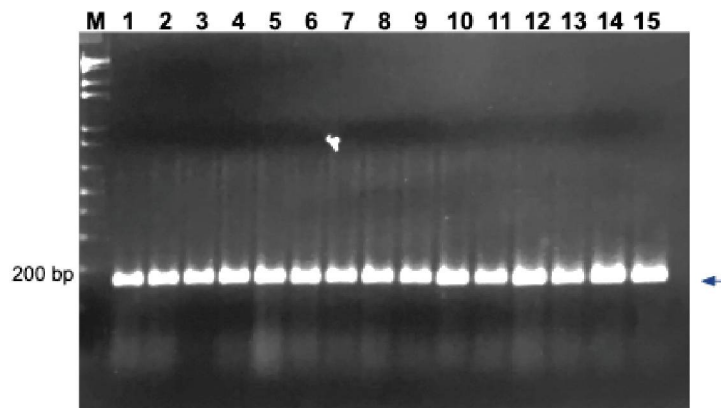


Figura 40. Confirmação por PCR da Clonagem do Gene da EPR no Vetor pET32a. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo dos amplicons da EPR. As bandas estão de acordo com o tamanho esperado de aproximadamente 148 pares de base (pb). O marcador de DNA está representado pela letra M, 1 a 15 clones positivos.

Um clone foi selecionado para os testes de expressão e purificação e foi realizada uma digestão diagnóstica com as enzimas *NcoI* e *XhoI* para confirmar a liberação do inserto referente a EPR.

Conforme demonstrado na figura 41, após a digestão houve a liberação do fragmento no tamanho esperado.

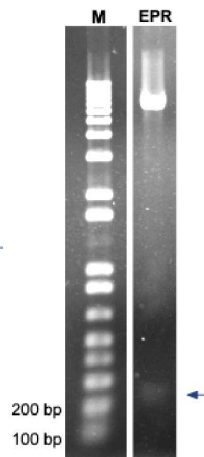


Figura 41. Análise eletroforética da construção Trx-EPR. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo do plasmídeo pET32a-Trx-EPR não digerido (ND) e digerido (D) com as enzimas de restrição *NcoI* e *XhoI*. Foi liberado um fragmento de DNA, correspondente ao gene da EPR com o tamanho esperado de aproximadamente 148 pares de base (pb). A seta indica a banda do marcador de DNA (M).

Entretanto, após realização dos testes de expressão com o novo clone (figura 42c), utilizando o protocolo de purificação por afinidade seguido pela digestão com trombina e finalizado com a separação por exclusão de tamanho, ainda obtivemos o mesmo resultado (conforme demonstrado na figura 43), onde acontece a clivagem com a trombina, porém não é possível separar a Trx da EPR.

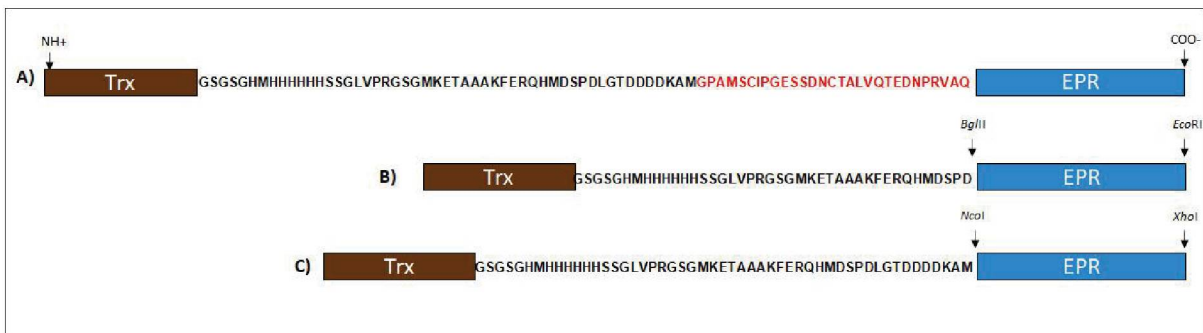


Figura 42. As diferentes construções da Trx-EPR disponíveis. A) Sequência utilizada por Kado *et al.* para a produção do cristal da EPR. B) Construção inicialmente utilizada neste trabalho. C) Construção criada posteriormente para o teste de expressão e purificação.

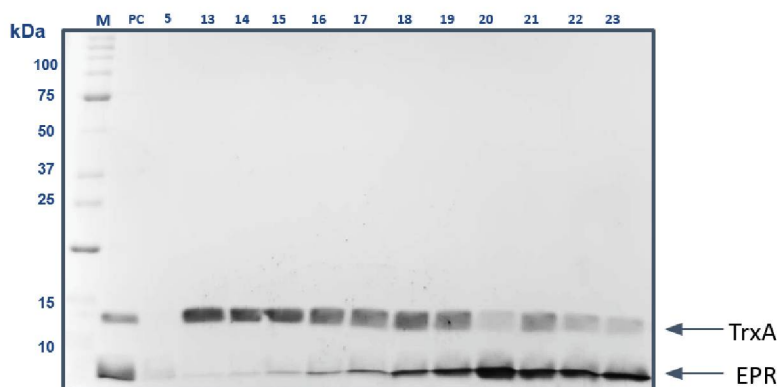


Figura 43. Frações da purificação de exclusão por tamanho após clivagem da tag de tiorredoxina da epiregulina. Amostras obtidas na cromatografia de exclusão por tamanho e analisadas através de SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida representando as bandas da epiregulina (aproximadamente 8 kDa) e da tiorredoxina (aproximadamente 13 kDa) co-eluído nas frações da purificação. Frações de eluição (5, 13-23), pré-coluna (PC). O marcador de massa molecular está representado por M.

Reavaliando a sequência de aminoácidos que foi sintetizada com a sequência da estrutura cristalizada publicada por Kado *et al.*, 2015 constatou-se que existe uma diferença de 29 resíduos a menos na porção n terminal do nosso clone (figura 42a, destacado em vermelho). Esse prolongamento N-terminal pertence a pró-epiregulina e parece ser importante para facilitar a fusão com a Trx, conforme relatado pelos próprios autores.

Em busca de uma estrutura mais próxima da realidade biológica a remoção da Trx da EPR acabou demonstrando que o desenho das construções genéticas tem grande influência no comportamento das proteínas. Apesar de inesperadas, as descobertas encontradas neste trabalho renderam informações relevantes sobre o tipo de construção genética que precisa ser feita para que expressão da EPR em *E. coli* seja eficiente.

Devido a isso não foi possível realizar os ensaios de interação com os fragmentos de anticorpos, já que a EPR era o alvo para a avaliação dessas moléculas. Como perspectiva para realização dos ensaios de interação será construído um novo clone com a sequência idêntica a da EPR cristalizada por Kado e colaboradores (2015).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. Foi realizada a clonagem do gene da T7 RNA polimerase no vetor para expressão em *E. coli* pTrc-His TOPO. Células competentes TOP10 contendo o vetor foram preparadas e, testes realizados sugeriram que a expressão da T7 poderia estar sendo tóxica para as células TOP10;
2. Apesar disso, uma segunda estratégia foi otimizada para seleção de clones positivos para evolução molecular dos fragmentos de anticorpo. Para isso foi construído o vetor pETGOF que pode ser utilizado juntamente com a transformação das reações de ligação diretamente na cepa BL21Star (DE3);
3. As regiões variáveis das cadeias leve e pesada do Fab anti-EPR foram amplificadas e clonadas nos vetores pET28a e pET32a para expressão em *E. coli*, dando origem assim ao fragmento do tipo scFv;
4. As cadeias leve e pesada do Fab anti-EPR foram amplificadas e clonadas nos vetores pET28a e pETDuet-1 respectivamente para expressão em *E. coli*;
5. Foram realizados testes de expressão dos anticorpos recombinantes em pequena escala para determinar a melhor condição para sua expressão. Ficou determinada a condição de 16 °C - 16 horas para realização dos testes em maior escala;
6. Os genes dos fatores de crescimento EPR, NRG-1, AREG, HB-EGF e EPGN foram expressos e purificados com sucesso. A NRG-1 foi separada da Trx por digestão com trombina e se mostrou solúvel e monomérica. A EPR após digestão com trombina se mostrou agregada. Com isso os ensaios para avaliação dos fragmentos de anticorpos ficaram prejudicados;
7. Acreditamos que a agregação da EPR foi devido à construção utilizada nesse projeto não ser a mesma sequência da EPR cristalizada. Por isso a remoção da *tag* de tioredoxina não foi possível;

8. Como perspectivas para esse trabalho estão a construção de um novo clone para produzir uma proteína com sequência idêntica a da EPR que foi cristalizada e realizar os testes de interação com os fragmentos de anticorpo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

ALVARENGA, L. M.; ZAHID, M.; DI TOMMASO, A.; JUSTE, M. O.; AUBREY, N.; BILLIALD, P.; MUZARDET, J. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. **Toxins**, v. 6, n. 8, p. 2541–2567, 2014.

APPERT-COLLIN, A.; HUBERT, P.; CRÉMEL, G.; BENNASROUNE, A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

ARNAU, J.; LAURITZEN, C.; PETERSEN, G. E.; PEDERSEN, J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 1, p. 1–13, 2006.

BATES, A.; POWER, C. A. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 28, 2019.

BETHELL, D. R.; HOWARD, G. C. Basic methods in antibody production and characterization. 1a. ed. Florida: **CRC Press LLC**, 2000.

BETTER, M.; CHANG, C. P.; ROBINSON, R. R.; HORWITZ, A. H. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. **Science**, v. 240, n. 4855, p. 1041, 1988.

BIRD, R. E.; HARDMAN, K. D.; JACOBSON, J. W.; JOHNSON, S.; KAUFMAN, B. M.; LEE, S.; LEE, T.; POPE, S. H.; RIORDAN, G. S.; WHITLOW, M. Single-chain antigen-binding proteins. **Science**. v. 242, p.423-426, 1988.

CABILLY, S. Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in Escherichia coli. **Gene**, v. 85, n. 2, p. 553–557, 1989.

CHESSHIRE J. A., HIPKISS A. R. Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 1989;31(2):158-62.

CHIU, M. L.; GILLILAND, G. L. Engineering antibody therapeutics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 38, p. 163–173, 2016. Elsevier Ltd.

CHIU, M. L.; GOULET, D. R.; TEPLYAKOV, A.; GILLILAND, G. L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, v. 8, n. 4, p. 55, 2019.

DAVANLOO, P.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 81, p. 2035-2039, 1984.

DOS SANTOS, M. L.; QUINTILIO, W.; MANIERI, T. M.; TSURUTA, L. R.; MORO, A. M. Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. Special Issue, p. 1–15, 2018.

FARSHDARI, F.; AHMADZADEH, M.; NEMATOLLAHI, L.; MOHIT, E. The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, p. 2–9, 2020.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D.; XIAO, S.; LEE, G. U.; BILLIALD, P.; MUZARD, J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125-1148, 2013.

FRENZEL, A.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. Expression of recombinant antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUL, p. 1–20, 2013.

GOLDMAN, R. D. Antibodies: indispensable tools for biomedical research. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 593–595, 2000.

GOUTSOULIAK, K., VEERARAGHAVAN, J., SETHUNATH, V., ANGELIS, C., OSBORNE, C. K., RIMAWI, M. F., SCHIFF, R. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. **Nat Rev Clinical Oncology**, v. 17, 233-250, 2020.

GUO, Y.; TIAN, X.; WANG, X.; XIAO, Z. Adverse effects of immunoglobulin therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–13, 2018.

HARRIS, R. C.; CHUNG, E.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 2–13, 2003.

HIFUMI, T.; YAMAMOTO, A.; ATO, M.; et al. Clinical serum therapy: Benefits, cautions, and potential applications. **Keio Journal of Medicine**, v. 66, n. 4, p. 57–64, 2017.

HOLBRO, T.; HYNES, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 195–217, 2004.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotech**, v. 23, n. 9, p. 1126-1134, 2005.

HUDSON, P. J.; SOURIAU, C. Engineered antibodies. **Nature Medicine**, v. 9, n. 1, p. 129–134, 2003.

HYNES, N. E.; MACDONALD, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 177–184, 2009.

IJIMA, M.; ANAI, M.; KODAMA, T.; SHIBASAKI, Y. Epiregulin-blocking antibody inhibits epiregulin-dependent EGFR signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 489, n. 1, p. 83–88, 2017.

JACOBI, N.; SEEBOECK, R.; HOFMANN, E.; EGER, A. ErbB family signalling: a paradigm for oncogene addiction and personalized oncology. **Cancers**, v. 9, n. 4, p. 1–24, 2017.

JALIANI H. Z., FARAJNIA S., SAFDARI Y., MOHAMMADI S. A., BARZEGAR A., JERABEK-WILLEMSSEN, M., WIENKEN, C. J., BRAUN, D., BAASKE, P. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. **Assay Drug Dev Technol.** v. 9(4): 342–353, 2011.

JOÃO, C.; NEGI, V. S.; KAZATCHKINE, M. D.; BAYRY, J.; KAVERI, S. V. Passive Serum Therapy to Immunomodulation by IVIG: A Fascinating Journey of Antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 6, p. 1957–1963, 2018.

KADO, Y., MIZOHATA, E., NAGATOISHI, S., IJIMA, M., SHINODA, K., MIYAFUSA, T., NAKAYAMA, T., YOSHIZUMI, T., SUGIYAMA, A., KAWAMURA, T., LEE, Y. H., MATSUMURA, H., DOI, H., FUJITANI, H., KODAMA, T., SHIBASAKI, Y., TSUMOTO, K., INOUE, T. Epiregulin recognition mechanisms by anti-epiregulin antibody 9E5: structural, functional, and molecular dynamics simulation analyses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2319–2330, 2015.

KANYAVUZ, A.; MAREY-JAROSSAY, A.; LACROIX-DESMAZES, S.; DIMITROV, J. D. Breaking the law: unconventional strategies for antibody diversification. **Nature Reviews Immunology**. v. 19, p. 355–368, 2019.

KARYOLAIMOS, A.; AMPAH-KORSAH, H.; HILLENAAR, T.; et al. Enhancing Recombinant Protein Yields in the E. coli Periplasm by Combining Signal Peptide and Production Rate Screening. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. July, p. 1–11, 2019.

KHAVRUTSKII, L.; YEH, J.; TIMOFEEVA, O.; et al. Protein purification-free method of binding affinity determination by microscale thermophoresis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 78, p. 1–6, 2013.

KREMERS, G., GOEDHART, J., VAN DEN HEUVEL, D. J., GERRITSEN, H. C., GADELLA, T. W. J. Improved green and blue fluorescent protein for expression in bacteria and mammalian cells. **Biochemistry**, n. 46, p. 3775–3783, 2007.

KRITTANAI, S.; PUTALUN, W.; SAKAMOTO, S.; et al. Expression of actively soluble antigen-binding fragment (Fab) antibody and GFP fused Fab in the cytoplasm of the engineered Escherichia coli. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4519–4529, 2020. Springer Netherlands.

KULMALA, A.; HUOVINEN, T.; LAMMINMÄKI, U. Improvement of Fab expression by screening combinatorial synonymous signal sequence libraries. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 157, 2019.

KWON, S. BIN; YU, J. E.; KIM, J.; et al. Quality screening of incorrectly folded soluble aggregates from functional recombinant proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

LaVALLIE, E. R.; DiBLASIO, E. A., KOVACIC, S., GRANT, K. L., SCHENDEL, P. F., McCOY, J. M. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 187-193, 1993.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J.; FERGUSON, K. M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, n. 27918, p. 1–18, 2014.

LEVY, R.; WEISS, R.; CHEN, G.; IVERSON, B. L.; GEORGIU, G. Production of correctly folded fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* *gor* mutants via the coexpression of molecular chaperones. **Protein Expression and Purification**, v. 23, n. 2, p. 338–347, 2001.

LIPMAN, N. S.; JACKSON, L. R.; TRUDEL, L. J.; WEIS-GARCIA, F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–267, 2005.

LIU, M.; WANG, B.; WANG, F.; et al. Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 15, p. 6071–6079, 2019.

LU, W.; CAO, P.; LEI, H.; ZHANG, S. High-level expression and purification of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) with SUMO fusion. **Molecular Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 198–203, 2010.

MAKARAVICIUTE, A.; JACKSON, C. D.; MILLNER, P. A.; RAMANAVICIENE, A. Considerations in producing preferentially reduced half-antibody fragments. **Journal of Immunological Methods**, v. 429, p. 50–56, 2016.

MANOUTCHARIAN, K.; PEREZ-GARMENDIA, R.; GEVORKIAN, G. Recombinant Antibody Fragments for Neurodegenerative Diseases. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 5, p. 779–788, 2016.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v. 82, p. 775–797, 2013.

NANOTEMPER TECHNOLOGIES. Monolith(R) NT.115 User Manual. Munique, Alemanha, 24 p. 2018.

NELSON A. L., REICHERT J. M. Development trends for therapeutic antibody fragments. **Nat Biotechnol**. 27(4):331-337, 2009.

NELSON, A. L. Antibody fragments: Hope and hype. **mAbs**, v. 2, n. 1, p. 77–83, 2010.

NIWA, R.; SATOH, M. The current status and prospects of antibody engineering for therapeutic use: focus on glycoengineering technology. **J Pharm Sci.** 104(3):930-941, 2015.

PLÜCKTHUN, A. KREBBER, C. KREBBER, U. HORN, U. KNÜPFER, R. WENDEROTH, L. NIEBA, K. P. AND D. R. Producing antibodies in *Escherichia coli*: From PCR to fermentation. 1996.

PRENZEL, N.; FISCHER, O. M.; STREIT, S.; HART, S.; ULLRICH, A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. **Endocrine-Related Cancer**, v. 8, n. 1, p. 11–31, 2001.

QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; JUÁREZ-GONZÁLEZ, V. R.; ORTÍZ-LEÓN, M.; et al. The change of the scFv into the Fab format improves the stability and in vivo toxin neutralization capacity of recombinant antibodies. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 6, p. 1307–1315, 2007.

QUIROZ, F. G., SINCLAIR, S. M. Engineered antibody fragments: replicating the immune system and beyond. **Revista Ingenieria Biomedica.** v. 4 pp 74-86, 2010.

RAMSLAND, P. A.; HUTCHINSON, A. T.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies: Discovery, design and deployment. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 1–3, 2015.

RIESE, D. J.; CULLUM, R. L. Epregrin: roles in normal physiology and cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 49–56, 2014.

ROBINSON, M. P.; KE, N.; LOBSTEIN, J.; et al. Efficient expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

ROSKOSKI, R. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: structures and small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, v. 87, p. 42–59, 2014.

ROSKOSKI, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacological Research**, v. 79, p. 34–74, 2014.

ROSOWSKI, S.; BECKER, S.; TOLEIKIS, L.; et al. A novel one-step approach for the construction of yeast surface display Fab antibody libraries. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A Laboratory manual. 3a ed.

SARKER, A.; RATHORE, A. S.; GUPTA, R. D. Evaluation of scFv protein recovery from *E. coli* by in vitro refolding and mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

SCHÄFER, F.; SCHÄFER, A.; STEINERT, K. A highly specific system for efficient enzymatic removal of tags from recombinant proteins. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13, n. 3, p. 158–171, 2002.

SCHMID, A. S.; NERI, D. Advances in antibody engineering for rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 197–207, 2019.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 3, p. 460–466, 2009.

SEIDEL, S. A. I.; DIJKMAN, P. M.; LEA, W. A.; et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. **Methods**, v. 59, n. 3, p. 301–315, 2013.

SINGH, B.; CARPENTER, G.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands: recent advances. **F1000Research**, v. 5, p. 2270, 2016.

SIVELLE, C.; SIEROCKI, R.; FERREIRA-PINTO, K.; et al. Fab is the most efficient format to express functional antibodies by yeast surface display. **mAbs**, v. 10, n. 5, p. 720–729, 2018.

SØRENSEN H. P., MORTENSEN K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microb Cell Fact.** 4(1):1 2005.

STRACHAN, L.; MURISON, J. G.; PRESTIDGE, R. L.; et al. Cloning and Biological Activity of Epigen, a Novel Member of the Epidermal Growth Factor Superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 18265–18271, 2001.

STROHL, W. R., STROHL, L. M. Therapeutic Antibody Engineering. Woodhead Publishing, 696 p. 2012.

STUDIER, F. W.; DUNN, J. J. Organization and expression of bacteriophage T7 DNA. **Cold Spring Hard Symp Quant Biol**, v. 47, p. 999-1007, 1983.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, p. 113-130, 1986.
SUNAGA, N.; KAIRA, K. Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer. **Lung Cancer** (Auckl). vol. 6, p. 91-98, 2015.

SUTER-CRAZZOLARA C., UNSICKER, K. Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. **Biotechniques**. v. 2, pp 202-204, 1995.

TABOR, S. Expression using the T7 RNA polymerase / promoter system. **Current Protocols in Molecular Biology**, p. 16.2.1-16.2.11, 1990.

TALEBI S. Optimized condition for enhanced soluble-expression of recombinant mutant *anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase. **Adv Pharm Bull.** 2014;4(3):261.

VENTURI, M.; SEIFERT, C.; HUNTE, C. High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 1, p. 1–8, 2002.

WALDO, G. S.; STANDISH, B. M.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 691–695, 1999.

WIENKEN, C. J.; BAASKE, P.; ROTHBAUER, U.; BRAUN, D.; DUHR, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. **Nature Communications**, v. 1, n. 7, 2010.

WILSON, K. J.; GILMORE, J. L.; FOLEY, J.; LEMMON, M. A.; RIESE, D. J. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 1–8, 2009.

YANG, J.; LI, S.; WANG, B.; WU, Y.; CHEN, Z.; LV, M.; LIN, Y.; YANG, J. Potential biomarkers for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11645–11655, 2016.

ZENG, F.; HARRIS, R. C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 2–11, 2014.

ZHU, Z.; ZHU, W.; YI, J.; et al. Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. **Food Research International**, v. 106, n. January, p. 853–861, 2018.