

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAFAEL CERIONI TOGNATO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO INIBITÓRIA DE FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS DO TIPO SCFV CONTRA A CALICREÍNA 7**

SANTO ANDRÉ
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
RAFAEL CERIONI TOGNATO

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO INIBITÓRIA DE FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS DO TIPO SCFV CONTRA A CALICREÍNA 7**

Trabalho apresentado à banca examinadora da
Universidade Federal do ABC como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Puzer

SANTO ANDRÉ

2021

Dedico esse trabalho a todos aqueles que defendem o progresso e expansão da ciência e educação pública de excelência no Brasil e no mundo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Luciano Puzer por não apenas aceitar a orientação desse trabalho de conclusão de curso, mas por ter sido meu mentor e orientador de Iniciação Científica durante quatro anos de minha graduação, auxiliando-me em meus projetos e promovendo em mim uma visão ética e moral no desenvolvimento científico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desse projeto com bolsa de Iniciação Científica pelo processo 2019/11045-1, sem o qual esse projeto jamais seria realizado.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa, Ana, Aquiles, Marcelo e Iasmin, que não apenas cooperaram para meu desenvolvimento acadêmico e científico, mas também para meu engrandecimento como ser humano com suas louváveis amizades.

A todos meus outros melhores amigos que conheci durante meu período de graduação na Universidade Federal do ABC, Bruna, Diogo, Gabriele, Giovana, Marcela e Thais, pelo eterno companheirismo, compaixão e compartilhamento de inúmeras experiências nesses nossos anos de juventude.

À minha irmã gêmea, Marília, pela constante companhia na vida em todos bons e maus momentos.

Aos meus pais, que sempre batalharam para que eu tivesse uma educação e aprendizagem extraordinária.

Ao Leandro, meu irmão dessa e de outras vidas.

Ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC pela excelência no ensino e apoio ao desenvolvimento de todos os discentes.

À banca examinadora, por aceitar o convite de participar da avaliação de meu trabalho nesse momento final da minha jornada de graduando.

*“Uma mente disciplinada leva à felicidade e uma
mente indisciplinada leva ao sofrimento”.*

(Dalai Lama)

RESUMO

As calicreínas teciduais humanas (KLKs) formam uma família de 15 serino proteases encontradas na forma proteica e a nível de mRNA em diversos tecidos do corpo humano, atuando em inúmeras rotas essenciais para a homeostase do mesmo. Dentre elas, a calicreína tecidual humana 7 (KLK7) exerce um papel essencial na descamação da epiderme, precisamente pela clivagem de corneodesmossomas no estrato córneo. A atividade desregulada da KLK7 vem exaustivamente sendo associado com patologias dermatológicas, como dermatite atópica, psoríase e Síndrome de Netherton, tornando a enzima um alvo terapêutico de grande interesse. Anticorpos recombinantes são a classe de medicamentos que mais se expande e gera lucros mundialmente, podendo ser selecionados via tecnologia do *phage display*. Tais proteínas podem ser expressas e caracterizadas apenas como moléculas formadas pela fusão dos domínios variáveis de um anticorpo, formando os fragmentos scFv. Diferentemente dos demais tipos, moléculas scFv não necessitam de modificações pós-traducionais, podendo ser estudadas em sistemas de expressão procarionte. Contudo, a rasa eficácia da expressão está diretamente relacionada com a presença de códons que são raros em genomas de bactérias, assim como a dificuldade de formação de pontes dissulfeto no ambiente redutor do citoplasma bacteriano. Este trabalho teve como objetivo a comparação e clonagem de três sequências scFv anti-KLK7 (LUP37A10, LUP37C11, LUP37D11), previamente selecionadas por *phage display*, no vetor pET-28 a (+) para estudo de expressão em diferentes linhagens de *E. coli* (Rosetta™ (DE3) e Origami 2) e caracterização inibitória contra KLK7. No estudo das sequências, observou-se que nos três anticorpos mais de 50% dos resíduos de arginina provinham de códons raros, assim como fora constatada a presença de códons raros correspondentes a leucina e prolina em diferentes proporções nas sequências. O melhor método de expressão obtido foi na linhagem Rosetta™ (DE3), que é suplementada com tRNAs para códons raros, com indução por 50 µM de IPTG. Apesar disso, análises de *western blotting* revelaram que grande parte dos scFv ficaram contidos em corpos de inclusão, necessitando passarem por extração via ureia e renaturação in vitro. Dos três anticorpos, apenas LUP37A10 foi completamente purificado via cromatografia de afinidade. O anticorpo inibiu 53% da atividade da KLK7 quando utilizado em uma concentração de 300 nM; maiores concentrações acarretaram na precipitação da proteína.

Palavras-chave: anticorpo, calicreína, *phage display*, scFv

ABSTRACT

Human tissue kallikreins (KLKs) form a family of 15 serine proteases found in protein form and at mRNA level in different tissues of the human body, acting in numerous essential routes for its homeostasis. Among them, human tissue kallikrein 7 (KLK7) plays an essential role in the desquamation of the epidermis, precisely through the cleavage of corneodesmosomes in the stratum corneum. The unregulated activity of KLK7 has been extensively associated with dermatological pathologies, such as atopic dermatitis, psoriasis and Netherton Syndrome, making the enzyme a therapeutic target of great interest. Recombinant antibodies are the class of drugs that is expanding the most and generating profits worldwide, and can be selected via *phage display* technology. Such proteins can be expressed and characterized only as molecules formed by the fusion of the variable domains of an antibody, forming scFv fragments. Unlike other types, scFv molecules lack post-translational modifications and can be studied in prokaryote expression systems. However, the low efficiency of expression is directly related to the presence of codons that are rare in bacterial genomes, as well as the difficulty in forming disulfide bonds in the reducing environment of the bacterial cytoplasm. This work aimed to compare and clone three anti-KLK7 scFv sequences (LUP37A10, LUP37C11, LUP37D11), previously selected by *phage display*, in the pET-28 a (+) vector to study their expression in different *E. coli* strains (RosettaTM (DE3) and Origami 2) and inhibitory characterization against KLK7. In the study of the sequences, it was observed that in the three antibodies more than 50% of the arginine residues came from rare codons, as well as the presence of rare codons corresponding to leucine and proline in different proportions in the sequences. The best expression method obtained was in the RosettaTM (DE3) strain, which is supplemented with tRNAs for rare codons, with induction by 50 μ M of IPTG. Despite this, western blotting analyzes revealed that most of the scFv were contained in inclusion bodies, needing to undergo extraction via urea and *in vitro* refolding. Of the three antibodies, only LUP37A10 was completely purified via affinity chromatography. The antibody inhibited 53% of KLK7 activity when used at a concentration of 300 nM; higher concentrations resulted in protein precipitation.

Keywords: antibody, kallikrein, *phage display*, scFv

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Os resíduos Ser 195, His 57 e Asp 102 formam a tríade catalítica das serino proteases. Ocorrem ligações de hidrogênios entre esses resíduos de aminoácidos, e o ataque nucleofílico é executado pelo resíduo Ser 195. Retirado de EREZ, FAZZ, BIBI, 2009..... 20
- Figura 2.** Processo de hidrólise exercido por uma serino protease. Na fase de acilação, é formado um complexo tetraédrico resultante do ataque nucleofílico do resíduo de serina em um grupo carbonila do substrato (1). O próton removido de Ser 195 é doado para His 57, que forma um íon imidazólico. Um intermediário acil-enzima é formado com a doação de um próton de His 57 (2). O grupo R'NH₂ é substituído por uma molécula de água (3) que, com o auxílio de His 57, promove um ataque nucleofílico à carbonila ligada a Ser 195, promovendo a saída do grupo carboxilato (4). Retirado de VOET et al, 2008. 21
- Figura 3.** Distribuição de calicreínas teciduais humanas em diferentes tecidos biológicos, a nível de mRNA e/ou proteína..... 22
- Figura 4.** Ação de calicreínas teciduais humanas no estrato córneo (epiderme). Na imagem, é possível visualizar uma pré-KLK pela presença do peptídeo sinal, KLK ativa na região de descamação atuando na clivagem de corneodermossomas e KLK sendo inibida pelo inibidor endógeno LEKTI. 25
- Figura 5.** Estrutura básica de uma imunoglobulina (Ig). Cada monômero é formado de dois pares de cadeias pesadas (C), diferenciadas por três domínios conservados (CH₁₋₃) e um variável (VH) e dois pares de cadeias leves (L), formadas de um domínio conservado (CL) e um variável (VL). A região Fc é formada exclusivamente de cadeias pesadas conservadas, enquanto que é na região Fab onde ocorre ligação ao antígeno. 28
- Figura 6.** Anticorpos IgG, IgD e IgE são encontrados como monômeros, enquanto IgA são encontrados na forma de dímeros e IgM de pentâmeros (em mamíferos). 29
- Figura 7.** Esquema da técnica de hibridoma. O camundongo é imunizado com o antígeno e suas células B são isoladas para serem fusionadas com células de mieloma (1-3). As células híbridas são selecionadas em meio HAT e o clone positivo é isolado e expandido para produção de anticorpos monoclonais. 30
- Figura 8.** Esquema da técnica de phage display. Fagos contendo fragmentos scFv na superfície do capsídeo são apresentados ao antígeno em placa de aderência (1,2). Os fagos que não se ligam são descartados por lavagem (3), enquanto os ligantes são posteriormente removidos por tripsinização (4) para infecção de linhagem de E. coli e produção de novos scFvs ainda mais

específicos (5, 6). O ciclo é repetido 5 ou 6 vezes, e os fagos selecionados finais são utilizados para produção dos fragmentos scFv e identificação via ELISA (7, 8).	32
Figura 9. O scFv pode ser também utilizado para formação de demais tipos de anticorpos, como Fab, scFv-Fc e di-scFv.	32
Figura 10. Vektor pHAL30, com apontamento para as regiões de clonagem dos domínios variáveis leve e pesado (Cloning VL e Cloning VH), sob modulação do operon lac.	38
Figura 11. Vektor pET-28 a (+).....	39
Figura 12. 1 kb DNA Ladder (N3232L, NEB, Estados Unidos).....	43
Figura 13. 100bp Ladder Plus, Ready-To-Use (M1071, Sinapse Biotecnologia, Brasil).	44
Figura 14. Pierce™ Unstained Protein MW Marker (26610, Thermo Fisher, Estados Unidos).	47
Figura 15. Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (26623, Thermo Fisher, Estados Unidos).	48
Figura 16. Gel de agarose 1% do vetor pET-28 a (+) digerido com enzimas Not I HF e Nco I HF.	55
Figura 17. Digestões dos clones LUP37C11 e LUP37D11 clonados no vetor pHAL 30. Os fragmentos digeridos (aproximadamente 800 bp) estão destacados pelo retângulo vermelho.	55
Figura 18. Digestão do clone LUP37A10 clonado no vetor pHAL 30. O fragmento digerido (aproximadamente 800 bp) está destacado pelo retângulo vermelho.....	56
Figura 19. PCR de colônia de células Origami 2 transformadas com LUP37C11 clonado no vetor pET-28 a (+).	56
Figura 20. PCR de colônia de células Rosetta (DE3) transformadas com LUP37C11 clonado no vetor pET-28 a (+).	57
Figura 21. Gel SDS-PAGE 10% de LUP37C11 expressado em Origami 2 (10 mL) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100, 250 e 500 µM).....	58
Figura 22. Gel SDS-PAGE 10% de LUP37C11 expressado em Rosetta™ (DE3) (10 mL) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100, 250 e 500 µM).....	58
Figura 23. Western Blotting das expressões em 10 mL de LUP37C11 em Origami 2 em diferentes concentrações de IPTG (50, 100 e 250 µM).....	59
Figura 24. Western Blotting das expressões em 10 mL de LUP37C11 em Rosetta™(DE3) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100 e 250 µM).....	59
Figura 25. PCR de colônias Rosetta™(DE3) transformadas com LUP37A10 e D11.	60
Figura 26. Cromatograma de LUP37C11.....	61
Figura 27. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37C11.....	62

Figura 28. Western Blotting do pico T7 e pellet (corpos de inclusão).....	62
Figura 29. Cromatograma de LUP37C11 extraído com ureia 8 M.	64
Figura 30. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37C11 extraído com ureia 8 M.....	64
Figura 31. Cromatograma de LUP37A10 extraído com ureia 8 M.	65
Figura 32. Cromatograma de LUP37D11 extraído com ureia 8 M.	66
Figura 33. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37A10 extraído com ureia 8 M.....	67
Figura 34. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37D11 extraído com ureia 8 M.....	67
Figura 35. Gel SDS-PAGE 10% das amostras contendo os três scFv concentrados.	68
Figura 36. Western blotting das amostras dos três scFv concentradas.....	69
Figura 37. Gráfico de IC ₅₀ de LUP37A10 contra KLK7 recombinante.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa, ponto isoelétrico e coeficiente de extinção molar dos scFv obtidos no ProtParam ExPASy.	50
Tabela 2. Quantidade percentual de resíduos de aminoácidos em cada clone scFv.....	51
Tabela 3. Grau de identidade entre os anticorpos scFv.	53
Tabela 4. Grau de similaridade entre os anticorpos scFv.	53
Tabela 5. Quantidade percentual de códons raros entre os anticorpos scFv.	53
Tabela 6. Atividade residual de KLK7 recombinante (%) por LUP37A10.	71

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E UNIDADES

µg: micrograma

µL: microlitro

µM: micromolar

Abz: ácido ortoaminobenzóico

ArnA: Proteína bifuncional de resistência à polimixina

EDDnp: etilenodiaminotetracético

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

FPLC: cromatografia líquida de proteína rápida (do inglês *fast protein liquid chromatography*)

OD: densidade óptica

OD₆₀₀: densidade óptica medida com comprimento de onda de 600 nm

g: grama

Ig: imunoglobulina

kb: kilobase

kDa: quilodalton

KLK: calicreína tecidual humana

bp: pares de base

L: litro

LEKTI: inibidor linfoepitelial do tipo Kazal

M: molar

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

nm: nanômetro

nM: nanomolar

°C: graus Celsius

pb: pares de base

PBS: tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffered-saline*)

pH: potencial hidrogeniônico

pI: ponto isoelétrico

PSA: antígeno prostático específico (do inglês *prostate specific antigen*)

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio

Tris: trisaminometano

UV: ultravioleta

SlyD: Isomerase de peptidil-prolil cis-trans do tipo FKBP

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Nome	Abreviaturas	
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tirosina	Tyr	Y
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. PROTEASES	18
1.2. SERINO PROTEASES	19
1.3. CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS.....	22
1.4. ATIVIDADES DAS CALICREÍNAS TECIDUAIS HUMANAS NO ESTRATO CÓRNEO	24
1.5. ANTICORPOS	27
1.6. ENGENHARIA DE ANTICORPOS E <i>PHAGE DISPLAY</i>	29
1.7. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E ATIVIDADES INIBITÓRIAS DE ANTICORPOS RECOMBINANTES ..	33
1.8. EXPRESSÃO DE ANTICORPOS DO TIPO SCFV EM LINHAGENS DE <i>E. COLI</i>	35
2. OBJETIVOS.....	40
3. JUSTIFICATIVA.....	41
4. METODOLOGIA	42
4.1. ESTUDO DAS SEQUÊNCIAS SCFV NO BLAST E EXPASY	42
4.2. CLONAGEM DOS GENES SCFV NO VETOR PET28 A(+)	42
4.3. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES	44
4.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	45
4.5. EXPRESSÕES EM 10 E 100 ML	45
4.6. LISE E CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES	46
4.7. WESTERN BLOTTING	48
4.8. RENATURAÇÃO IN VITRO	49
4.9. ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1. ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEQUÊNCIAS DE ANTICORPOS	50
5.2. CLONAGEM DOS GENES SCFV NO VETOR PET-28 A (+)	54
5.3. EXPRESSÃO DE LUP37C11 EM CULTURAS DE 10 ML.....	57
5.4. EXPRESSÃO DOS SCFVS EM CULTURAS DE 100 ML.....	61
5.5. TESTE DE IC ₅₀	70
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteases

Proteases são enzimas cujas atividades catalíticas residem na quebra de ligações peptídicas de outras proteínas (TURK, Boris, 2006), representando cerca de 2% a 4% de todo proteoma conhecido até o momento (PATEL, 2017).

As proteases se adaptaram durante a história da evolução da vida para atuarem em condições diversas de variação de pH, temperatura etc., culminando no aparecimento de diferentes mecanismos de catálise para hidrólise de seus respectivos substratos; e, portanto, tais mecanismos são fatores de classificação dessas moléculas em serino, cisteína e treonino proteases (hidrólise nucleofílica no sentido amino-terminal) ou aspartil, metalo e glutamil proteases (DEL ROSSO, 2013).

Ainda mais, a classificação dessas moléculas pode ser decorrente da posição da ligação peptídica que é clivada no substrato, sendo as exopeptidases atuantes na remoção de aminoácidos sequenciais a partir do N-terminal ou C-terminal (aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente) e endopeptidases (hidrólise de ligações peptídicas que estão no interior da sequência proteica) (TURK, Boris, 2006).

De papel essencial para homeostase dos organismos, as proteases atuam em diversas atividades celulares, participando, por exemplo, dos processos de ativação de fatores das respostas imunes inata e adaptativa (HAILFINGER; REBEAUD; THOME, 2009) divisão celular (DI BACCO *et al.*, 2006), necrose (SENDER *et al.*, 2013) e apoptose (RIEDL *et al.*, 2005), também estando presentes em mecanismos de proliferação de vírus e bactérias (MARSHALL, 2017).

Contudo, atividades alteradas de diversas proteases estão associadas com patologias cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias e até mesmo diversos tipos de câncer (TURK, 2006), tornando-as biomoléculas de especial atenção para a indústria farmacêutica e pesquisa medicinal (PUENTE *et al.*, 2005).

1.2. Serino Proteases

Dentre os diversos tipos de proteases supracitados, as serino protease são as mais abundantes e funcionalmente diversas. Uma vez que a abundância está intrinsicamente associada ao sucesso evolutivo, os mecanismos moleculares de catálise dessas proteases têm recebido demasiada atenção na sociedade científica (DI CERA, 2009).

O nome “serino” é decorrente da presença de uma serina essencial no processo de catálise. A serina é um aminoácido polar decodificado por seis códons (UCU, UCC, UCA, UCG, AGU e AGC), sendo o maior número de códons para um aminoácido (PATEL, 2017). Além de ser sintetizada pelo organismo, a serina pode ser obtida através da hidroximetilação da glicina (TAMMEN; FRISO; CHOI, 2013).

O MEROPS é um banco de dados que classifica e divide as proteases em clãs, por similaridade do mecanismo de catálise, e famílias, por ancestralidade em comum (RWALINGS, 2008). Nele, as serino proteases estão distribuídas em 13 clãs e 40 famílias, sendo o clã PA, caracterizado pela alta expressão em organismos eucariontes, aquele que detém o maior número de serino proteases. Não obstante, o PA é um dos clãs de proteases mais bem estudados pela ciência (DI CERA, 2009). A família S1 do clã PA é a mais abundante dentre as famílias de serino proteases (POLGÁR, 2005).

Tais proteases são caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica formada por resíduos de ácido aspártico, histidina e serina (POLGÁR, 2005). Essa formação existe em pelo menos quatro contextos estruturais diferentes, o que indica que esse mecanismo de catálise surgiu independentemente na história evolutiva em quatro ocasiões distintas (HEDSTROM, 2002).

Os resíduos Ser 195, His 57 e Asp 102 da tríade catalítica formam ligações de hidrogênio essenciais para o funcionamento da catálise (Figura 1). A histidina, com auxílio do ácido aspártico, remove o próton da hidroxila da serina (EREZ, 2016). Essa remoção torna a serina ativa para o ataque nucleofílico, que é essencial para a clivagem do substrato (TANG, 2016).

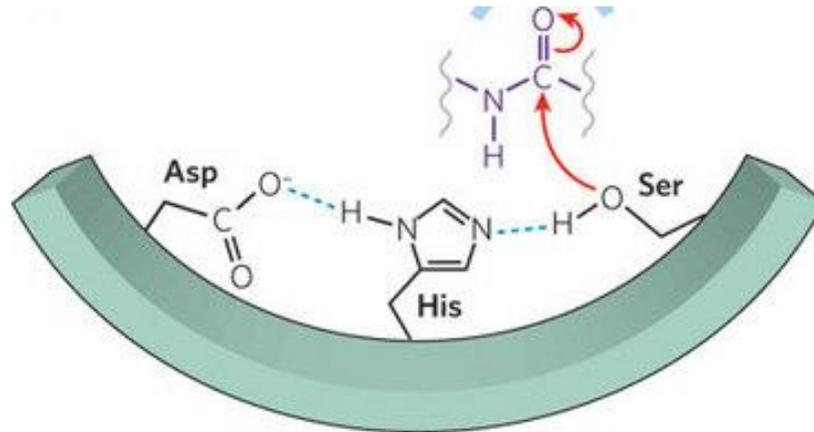


Figura 1. Os resíduos Ser 195, His 57 e Asp 102 formam a tríade catalítica das serino proteases. Ocorrem ligações de hidrogênio entre esses resíduos de aminoácidos, e o ataque nucleofílico é executado pelo resíduo Ser 195. Retirado de EREZ, FAZZ, BIBI, 2009

O processo de hidrólise é dividido nas etapas de acilação e desacilação. A etapa de acilação é demarcada pela formação do complexo enzima-substrato, onde o resíduo Ser 195 exerce um ataque nucleofílico no grupo carbonila do peptídeo, formando um intermediário tetraédrico. O próton removido da hidroxila do resíduo da Ser 195 para o ataque é recebido pelo anel imidazólico do resíduo His 57, formando um íon imidazólico. Esse processo é auxiliado pelo resíduo Asp 102. (Figura 2) (VOET, 2008).

O intermediário tetraédrico é decomposto para um intermediário acil-enzima devido à doação de um próton de N3 do resíduo His 57. O grupo de saída $\text{R}'\text{NH}_2$ é liberado da enzima e substituído por uma molécula de água do solvente (Figura 2). Com isso, na desacilação, a molécula de água, com auxílio do resíduo de histidina, promove um ataque nucleofílico à carbonila que está ligada a Ser 195. Assim, o produto carboxilato é liberado (Figura 2) (VOET; VOET, 2014).

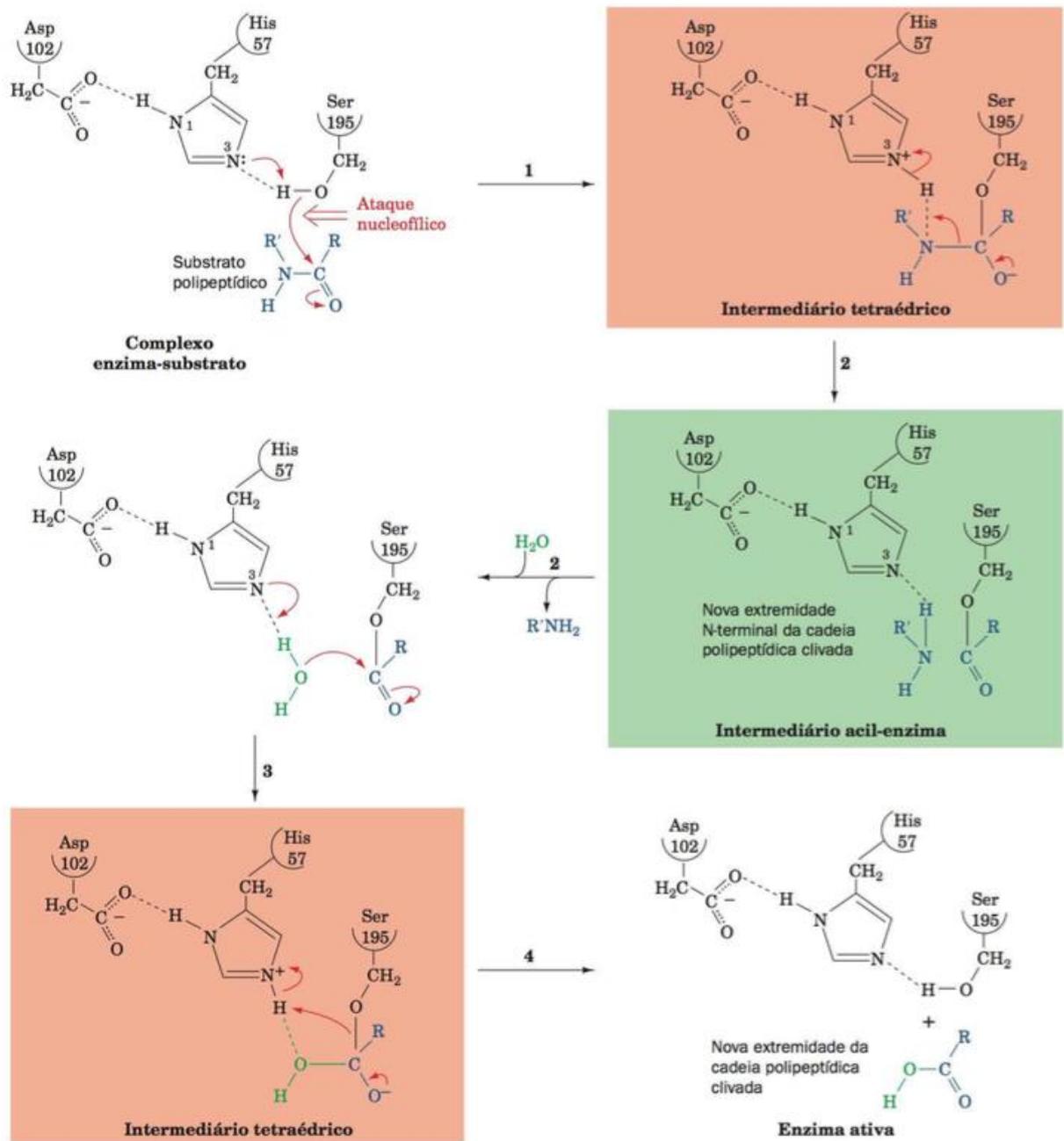


Figura 2. Processo de hidrólise exercido por uma serino protease. Na fase de acilação, é formado um complexo tetraédrico resultante do ataque nucleofílico do resíduo de serina em um grupo carbonila do substrato (1). O próton removido de Ser 195 é doado para His 57, que forma um íon imidazólico. Um intermediário acil-enzima é formado com a doação de um próton de His 57 (2). O grupo $R'NH_2$ é substituído por uma molécula de água (3) que, com o auxílio de His 57, promove um ataque nucleofílico à carbonila ligada a Ser 195, promovendo a saída do grupo carboxilato (4). Retirado de VOET; VOET, 2014.

1.3. Calicreínas teciduais humanas

As calicreínas teciduais humanas (KLKs, de *human tissue kallikreins*) formam um grupo de 15 serino proteases (KLK1-KLK15), endopeptidases, podendo ser encontradas na forma proteica ou a nível de mRNA em diversos tecidos do organismo (DIAMANDIS *et al.*, 2000; TURK, B., 2006) (Figura 3). Tais proteínas são respectivamente expressas por 15 genes agrupados no braço longo do cromossomo 19, precisamente na região q13.3-4. O *locus* da família se estende por cerca de 265 kbp, possuindo, além dos 15 genes das KLKs, ao menos um pseudogene (LUNDWALL; BRATTSAND, 2008).

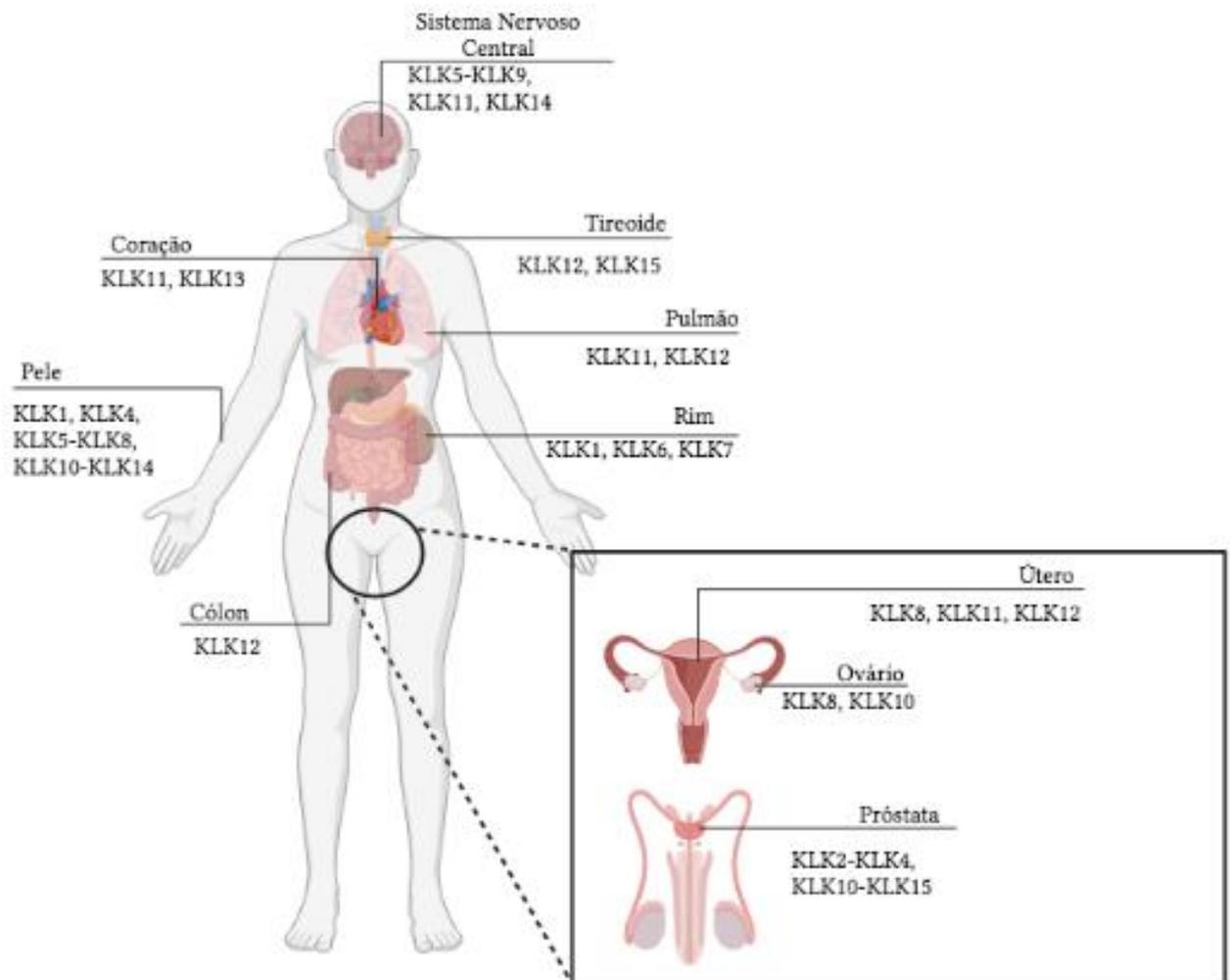


Figura 3. Distribuição de calicreínas teciduais humanas em diferentes tecidos biológicos, a nível de mRNA e/ou proteína.

Os produtos das traduções desses genes são expressos com um peptídeo sinal de 16 a 34 aminoácidos na região amino terminal que age como sinalizador para transporte ao retículo endoplasmático para secreção (LUNDWALL; BRATTSAND, 2008). Essa sequência peptídica é então clivada para produzir as formas zimogênicas dessas enzimas, que carregam um pro-peptídeo N-terminal mais curto. Previamente à secreção, esse pró-peptídeo é clivado (OBIEZU; DIAMANDIS, 2005). A clivagem do pró-peptídeo do zimogênio permite a ativação da KLK, e esse fenômeno pode ocorrer pela ação de outras enzimas, incluindo outras KLKs, ou da própria KLK em questão (FISCHER; MEYER-HOFFERT, 2013).

Apesar de possuírem uma homologia de aproximadamente 40% em suas sequências (LUNDWALL; BRATTSAND, 2008), as KLKs demonstram atuar em processos biológicos diversificados, mas seus papéis fisiológicos ainda não foram completamente elucidados. Todavia, desregulações na atividade dessas enzimas têm sido associadas com doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, dermatológicas e certos tipos de cânceres, tornando-as alvos terapêuticos de pesquisas (LOESSNER *et al.*, 2018).

A calicreína tecidual humana 1 (KLK1), primeira KLK descoberta, possui suas funções melhor descritas, das quais se destaca sua ação na clivagem de cininogênio e liberação de lisil-bradicinina no sistema calicreína-cinina, de âmbito essencial para processos cardiovasculares (MOREAU *et al.*, 2005).

As calicreínas teciduais humanas 2 e 3 (KLK2, KLK3) estão associadas com a mobilidade espermática, sendo o processo de clivagem das semenogelinas do sêmen por essas KLKs extensivamente estudado (VEVERIS-LOWE *et al.*, 2007; (GUPTA *et al.*, 2017). Não obstante, a KLK3, também nomeada de antígeno prostático específico (PSA, de *prostate-specific antigen*) é um dos biomarcadores de câncer de próstata mais conhecidos (SAINI, 2016; LIN *et al.*, 2021).

A potencial atividade da KLK6 no sistema nervoso central vem sendo demonstrada por resultados experimentais (YOUSEF; KISHI; DIAMANDIS, 2003), como a desmielinização precoce no sistema nervoso central em modelo viral de esclerose múltipla por ação da KLK6 (SCARISBRICK *et al.*, 2010) e o nível elevado da enzima no líquido cefalorraquidiano de pacientes diagnosticados com esclerose múltipla avançada (HEBB *et al.*, 2010).

As KLK5 e KLK7 têm sido apontadas como essenciais para a manutenção da pele, precisamente no que diz respeito ao processo regulado de descamação da mesma

no estrato córneo (EKHOLM; BRATTSAND; EGELRUD, 2000). Uma maior descrição de suas atividades no estrato córneo e consequências fisiológicas quanto às suas desregulações, precisamente no âmbito da KLK7, será realizada na próxima seção desse trabalho.

Diferentes tipos de inibidores endógenos das KLKs já foram descritos na literatura, dentre eles inibidores do grupo serpina, do tipo Kazal e Kunitz (MASURIER *et al.*, 2018), sendo também inibidas pelo íon Zn^{2+} (DEBELA *et al.*, 2016). Inibidores sintéticos contra as KLKs também já foram descritos, dentre eles inibidores covalentes e não-covalentes (MASURIER *et al.*, 2018). O uso de anticorpos recombinantes contra alguns tipos de KLK também foi descrito e será abordado em seções seguintes.

Ainda mais, calicreínas teciduais humanas recombinantes são rotineiramente produzidas em nosso laboratório por metodologia já bem estabelecida através do uso de baculovírus contendo genes dessas KLKs e células de inseto da linhagem SF9, sendo um sistema de expressão mundialmente reconhecido (GALLENO; SICK, 1999).

1.4. Atividades das calicreínas teciduais humanas no estrato córneo

Ao menos onze calicreínas teciduais humanas (KLK1, KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13 e KLK14) já foram identificadas por ensaio de ELISA e de PCR em tempo real no estrato córneo e estrato superior granuloso da epiderme humana (KOMATSU *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2017). Sendo expressas como zimogênios no estrato granuloso, essas proteínas são transportadas por grânulos lamelares em queratinócitos e são secretadas no espaço intercelular do estrato córneo (KISHIBE, 2019).

A ativação da cascata de calicreínas é iniciada pela KLK5, que é capaz de se autoativar e ativar, além das demais calicreínas supracitadas, metaloproteases presentes nessa camada da pele (KISHIBE, 2019). A KLK14, após ser ativada, pode aumentar a ativação da KLK5 via *feedback* positivo (EISSA; DIAMANDIS, 2008).

A principal função dessas proteases no estrato córneo refere-se à descamação, sendo as atividades das KLK5 e KLK7 melhor descritas, precisamente quanto à clivagem de corneodesmosomas (Figura 4). A KLK5 é capaz de clivar *in vitro* os três componentes proteicos dessas estruturas (desmogleina 1, desmocolina 1 e corneodesmosina), enquanto a KLK7 é capaz de clivar apenas a desmocolina 1 e a corneodesmosina (CAUBET *et al.*, 2004) (Figura 4). Ainda mais, as KLKs também

atuam no controle da microbiota epidermal, incluindo a ativação de peptídeos antimicrobianos e regulação de enzimas processadoras de lipídios (KISHIBE, 2019).

O LEKTI, decodificado pelo gene SPINK5, é um dos inibidores endógenos epidermais de KLKs mais importantes, sendo capaz de inibir as KLK5, KLK6, KLK7, KLK13 e KLK14 (HOVNANIAN, 2013). Não obstante, a atividade dessas proteases na pele também é modulada pela alteração de pH e concentração do íon Zn^{2+} . O pH do estrato córneo diminui juntamente com a concentração do íon de acordo com a ascendência das células na camada, promovendo um aumento da atividade catalítica das calicreínas e descamação das camadas celulares superiores (LUNDWALL; BRATTSAND, 2008).

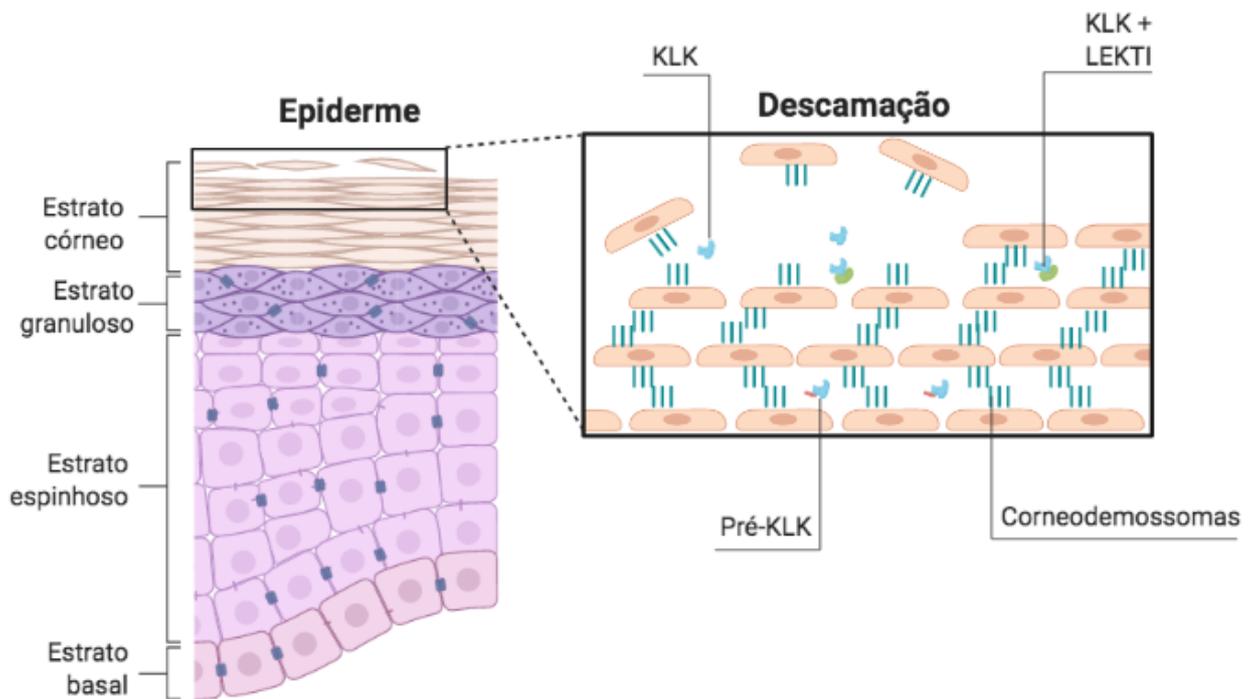


Figura 4. Ação de calicreínas teciduais humanas no estrato córneo (epiderme). Na imagem, é possível visualizar uma pré-KLK pela presença do peptídeo sinal, KLK ativa na região de descamação atuando na clivagem de corneodossomas e KLK sendo inibida pelo inibidor endógeno LEKTI.

A atividade aumentada da KLK7 vem sendo associada a patologias dermatológicas, dentre elas a Síndrome de Netherton, psoríase e dermatite atópica (KISHIBE, 2019).

A síndrome de Netherton é uma doença recessiva autossomal inflamatória de pele (FURIO; HOVNANIAN, 2014) caracterizada pelo processo de descamação grave

da pele, disfunções da barreira cutânea e aparecimento de diversos sintomas alérgicos. Sua causa é dada pela mutação do gene *SPINK5*, responsável pelo inibidor de serino proteases *LEKTI*, de forma que há perda de função deste. A atividade desregulada das *KLK5* e *KLK7* prejudica o processamento lipídico no estrato córneo e aumenta a descamação, permitindo a entrada de microrganismos patogênicos que culmina no aumento da ativação da reposta imune e inflamatória (BONNART *et al.*, 2010).

A dermatite atópica é também uma doença inflamatória da pele, de caráter crônico. A *KLK7* é indicada como umas das possíveis proteases cruciais para a patogênese da dermatite atópica, uma vez que está em níveis aumentados nas células das lesões hiperqueratinosas do estrato córneo (KOMATSU *et al.*, 2007). O aparecimento de tais lesões é indicador de processo desregular de descamação (ISHIDA-YAMOTO; IGAWA, 2015). Todavia, estudos indicam que apesar da expressão elevada da *KLK7*, sua secreção não é aumentada e, portanto, ela não está superativa na matriz extracelular do estrato córneo (IGAWA *et al.*, 2017).

Por fim, a psoríase, também de caráter inflamatório, é caracterizada pela formação de placas e lesões escamosas, juntamente com ressecamento e espessamento da pele. As *KLK6* e *KLK8* encontram-se com atividade aumentada nas lesões dessa doença (EISSA *et al.*, 2013). Um estudo em camundongos aponta que a *KLK8* é primordial para o processo de acantose (espessamento da epiderme) e inflamação juntamente com as *KLK6* e *KLK7* (KISHIBE *et al.*, 2007).

Uma vez que a *KLK7* é atuante em algum grau em tais patologias dermatológicas, é de suma importância que se estudem inibidores exógenos dessa calicreína, a fim de se obter possíveis tratamentos para as mesmas, ou uma melhor compreensão dos mecanismos de atuação da protease nas enfermidades. Dentre esses inibidores, uma possibilidade reside dentro da classe de anticorpos recombinantes.

1.5. Anticorpos

Anticorpos, também denominados imunoglobulinas (Ig), são proteínas que constituem parte do repertório de resposta imune de diversos organismos, sendo utilizados para identificação, marcação e neutralização de organismos exógenos ao sistema, como vírus e bactérias.

São primeiramente expressos como receptores de células B, sendo secretados de forma solúvel quando essas células são ativadas (MURPHY *et al.*, 2010). Cada anticorpo é capaz de identificar e se ligar a moléculas específicas denominadas antígenos pelo reconhecimento de pequenas sequências e elementos estruturais denominados epítomos dessas moléculas, neutralizando a atividade do antígeno ou marcando o organismo para fagocitose ou outros processos biológicos (GROFF; BROWN; CLIPPINGER, 2015).

São proteínas pesadas, de cerca de 150 kDa, possuindo um formato monomérico de “Y” ou uma combinação desse formato em dímeros ou tetrâmeros (RETH, 2013). Cada monômero é formado de dois pares de cadeias idênticas, sendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, totalizando quatro cadeias polipeptídicas. Tanto as cadeias leves como pesadas são formadas por diferentes domínios, sendo esses denominados em domínios variáveis (VH, para o domínio variável das cadeias pesadas, e VL, para o domínio variável das cadeias leves) e domínios constantes (CH, para os domínios constantes das cadeias pesadas, e CL, para o domínio constante das cadeias leves) (Figura 5).

Ainda mais, a estrutura do anticorpo pode ser dividida em duas regiões principais. A região onde se encontram os domínios variáveis juntamente com uma porção de domínios conservados é denominada Fab (do inglês *fragment antigen binding*), e é onde ocorre a ligação entre antígeno e anticorpo. Precisamente, essa ligação ocorre dentro dos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas da Fab, que podem ser chamados também de fragmentos Fv (do inglês *variable fragment*) (Figura 5).

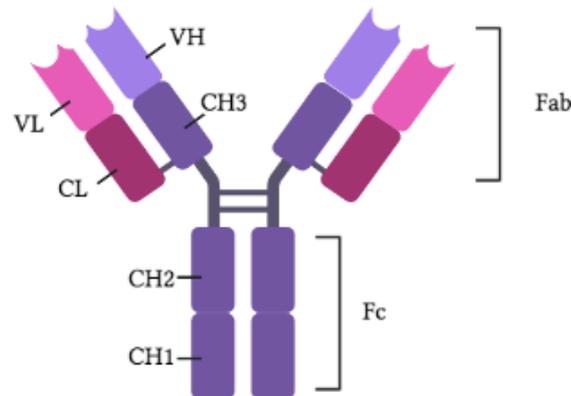


Figura 5. Estrutura básica de uma imunoglobulina (Ig). Cada monômero é formado de dois pares de cadeias pesadas (C), diferenciadas por três domínios conservados (CH₁₋₃) e um variável (VH) e dois pares de cadeias leves (L), formadas de um domínio conservado (CL) e um variável (VL). A região Fc é formada exclusivamente de cadeias pesadas conservadas, enquanto que é na região Fab onde ocorre ligação ao antígeno.

Além disso, cada domínio variável contém três regiões hipervariáveis formando alças na superfície estrutural do anticorpo que facilitam a ligação ao antígeno. Essas alças são chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR) e são elas que conferem aos anticorpos a grande diversidade na sequência de aminoácidos (KIERNY *et al.*, 2012).

A região constante Fc (do inglês, *fragment crystallizable*), que compõe o restante da proteína, formada exclusivamente por domínios conservados das cadeias pesadas, está associada a funções efetoras da molécula, agindo pelo sistema complemento ou pela ligação com receptores celulares (Figura 5). A variação das cadeias pesadas segrega os anticorpos em cinco classes: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, baseadas em suas respectivas regiões constantes classificadas como α , δ , ϵ , μ e γ (MURPHY *et al.*, 2010) (Figura 6). As IgG podem ser divididas em subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 pela presença de diferentes cadeias pesadas com grau de similaridade γ_1 , γ_2 , γ_3 e γ_4 , respectivamente (VIDARSSON, DEKKERS, *et al.* 2014).

Enquanto grande parte das imunoglobulinas atuam como monômeros, as IgA são encontradas como dímeros, enquanto as IgM são encontradas como tetrâmeros em alguns peixes e pentâmeros em mamíferos (MASHOOF; CRISCITIELLO, 2016) (Figura 6).

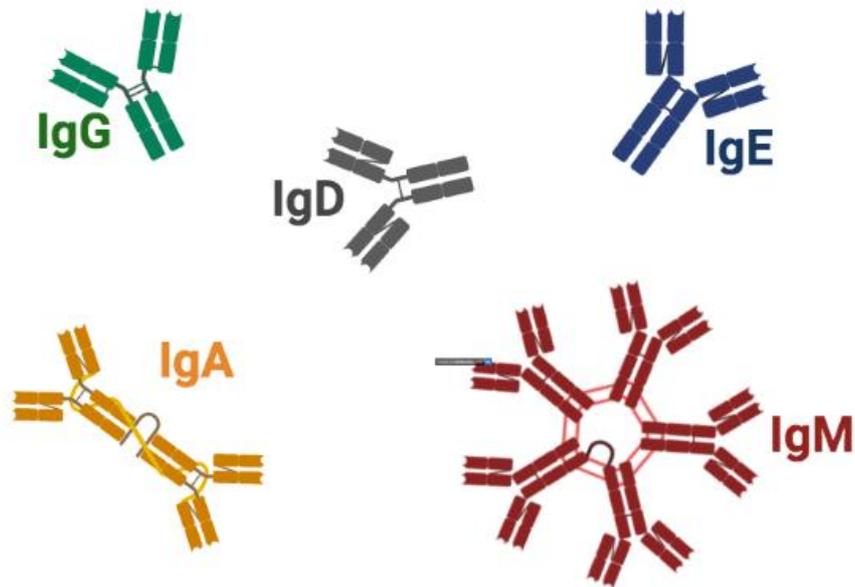


Figura 6. Anticorpos IgG, IgD e IgE são encontrados como monômeros, enquanto IgA são encontrados na forma de dímeros e IgM de pentâmeros (em mamíferos).

1.6. Engenharia de anticorpos e *phage display*

Devido à alta afinidade dos anticorpos para seus antígenos, somado à alta produção dessas moléculas em organismos e seu tempo de meia-vida prolongados, os anticorpos tem sido considerados nas últimas décadas como moléculas de forte potencial para a geração de “biofármacos”, levando ao desenvolvimento de múltiplas técnicas de produção de imunoglobulinas.

A tecnologia do hibridoma, apresentada por Milstein e Köhler em 1975, permitiu a produção de anticorpos monoclonais (mAbs, de *monoclonal antibodies*) em maior escala, culminando na seleção de anticorpos específicos para inúmeros antígenos. Tratando-se de um hibridoma de camundongos, a técnica baseia-se pela injeção de um antígeno específico no animal, partindo para a coleta de células produtoras de anticorpos no baço e fusão dessas com células de mieloma. A célula híbrida é então isolada e expandida, de forma que as células-filhas continuam a secretar o anticorpo específico, sendo que elas sintetizam um único anticorpo específico contra o antígeno selecionado,

tratando-se, portanto, de um anticorpo monoclonal (Figura 7) (SILVA; CORTE-REAL; GOLÇALVES, 2008).

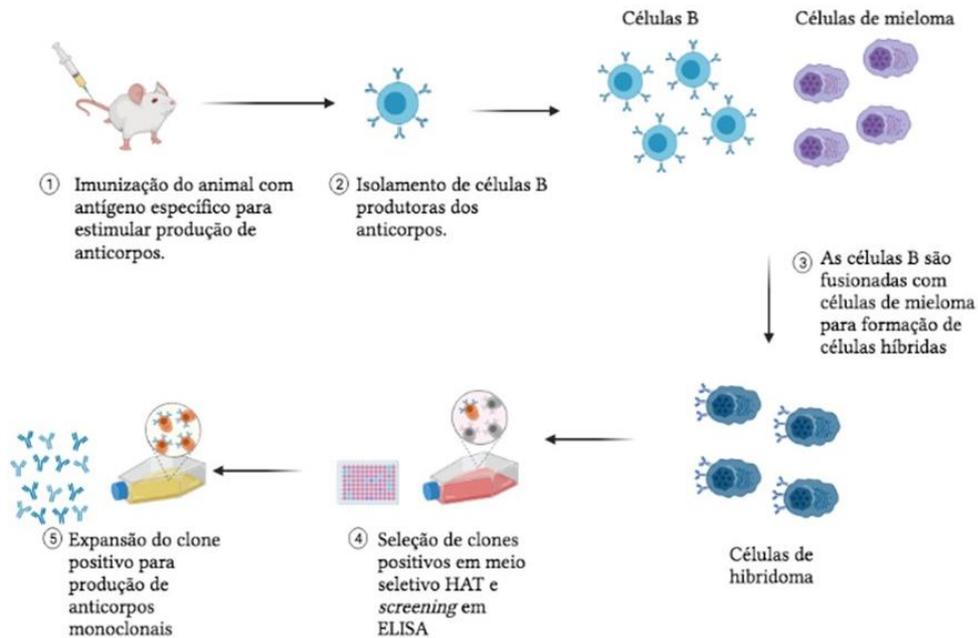


Figura 7. Esquema da técnica de hibridoma. O camundongo é imunizado com o antígeno e suas células B são isoladas para serem fusionadas com células de mieloma (1-3). As células híbridas são selecionadas em meio HAT e o clone positivo é isolado e expandido para produção de anticorpos monoclonais (4-5).

Os primeiros anticorpos monoclonais derivados de hibridoma, como o Muromonab-CD, apesar de serem efetivos no tratamento de doenças, culminaram em diversos efeitos colaterais decorrentes da resposta imune contra a introdução dos anticorpos murinos (SMITH, 1996). Além disso, os anticorpos murinos demonstraram possuir uma meia-vida curta, revelando limitações quanto a penetração em sítios de tumores (STERN; HERMANN, 2005).

Dessa forma, deu-se início ao processo de humanização dos anticorpos derivados de hibridoma, a fim de reduzir a imunogenicidade dessas moléculas, através da produção de anticorpos quiméricos por alterações de sequências específicas de origem murina (STERN; HERMANN, 2005).

A partir da década de 90, camundongos transgênicos contendo o repertório genético de imunoglobulinas humanas passaram a ser utilizados na tecnologia de hibridoma, selecionando anticorpos com menor imunogenicidade para o tratamento de diversas patologias, incluindo inúmeros tipos de câncer.

Atualmente, a tecnologia de *phage display*, diferentemente do hibridoma, permite a seleção de anticorpos *in vitro*. Baseada no revolucionário trabalho de George

Smith (SMITH, 1985), onde genes de oligopeptídeos foram fusionados ao gene da proteína III e posteriormente apresentados à superfície do bacteriófago filamentoso M13, permitindo a seleção *in vitro* das diferentes moléculas apresentadas na superfície do vírus (PARMLEY & SMITH, 1988), a tecnologia de *phage display* é baseada na expressão de fragmentos de anticorpos, usualmente a região Fab ou apenas a fusão dos domínios variáveis (scFv, de *single chain variable fragment*) na superfície de bacteriófagos, permitindo a seleção de anticorpos que se ligam à molécula-alvo.

O uso do *phage display* exige a construção de bibliotecas de anticorpos, por onde o cDNA é obtido para ser incorporado no gene viral dos fagos. Bibliotecas do tipo *naïve* são construídas a partir da doação de células B de indivíduos não imunizados, como a biblioteca HAL4/7 de genes scFv construídas por Hust *et al.* em 2011.

O antígeno utilizado na seleção dos anticorpos é incubado com a biblioteca de fragmentos tipo scFv, que é apresentada na superfície dos fagos. Os anticorpos que se ligarem fracamente, ou que não se ligarem ao antígeno, são removidos por sucessivas lavagens com tampão apropriado. Os anticorpos que ligarem-se ao antígeno são eluídos do sistema por tripsinização, e utilizados em nova infecção da linhagem de *E. coli* (KUGLER *et al.*, 2015). Usualmente o procedimento é repetido entre duas a seis vezes para enriquecer a amostra com os anticorpos mais específicos para o antígeno em questão. Esses anticorpos específicos são produzidos separadamente e testados contra o antígeno utilizando o ensaio de ELISA clássico (HUST *et al.*, 2014), e posteriormente podem ser inseridos na estrutura original do anticorpo, ou utilizados na geração de anticorpos de diferentes formatos como Fab ou scFv-Fc (Figuras 8-9).

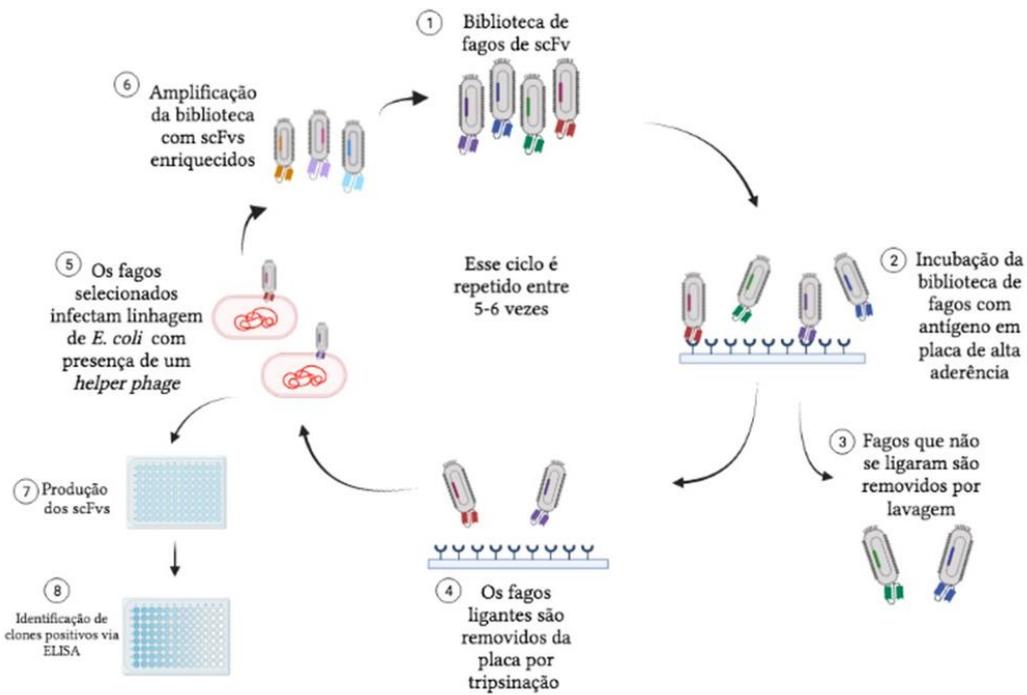


Figura 8. Esquema da técnica de *phage display*. Fagos contendo fragmentos scFv na superfície do capsídeo são apresentados ao antígeno em placa de aderência (1,2). Os fagos que não se ligam são descartados por lavagem (3), enquanto os ligantes são posteriormente removidos por tripsinização (4) para infecção de linhagem de *E. coli* e produção de novos scFvs ainda mais específicos (5, 6). O ciclo é repetido 5 ou 6 vezes, e os fagos selecionados finais são utilizados para produção dos fragmentos scFv e identificação via ELISA (7, 8).

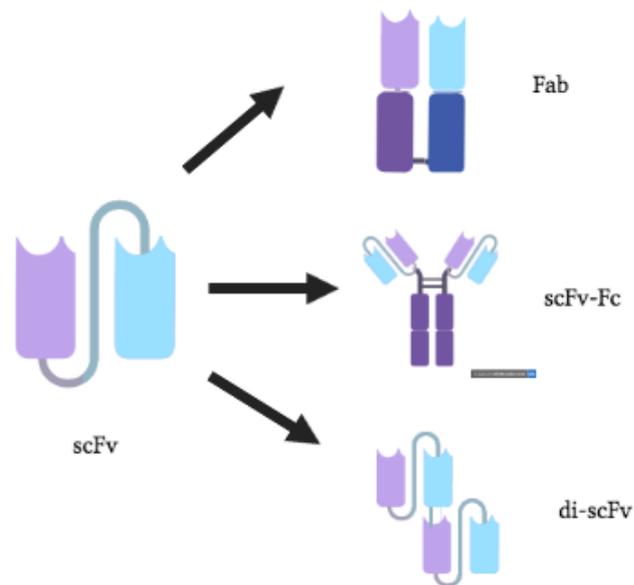


Figura 9. O scFv pode ser também utilizado para formação de demais tipos de fragmentos anticorpos, como Fab, scFv-Fc e di-scFv.

A grande vantagem do *phage display* reside no uso das bibliotecas de anticorpos, que podem possuir mais de 10^{10} genes, permitindo a utilização e busca de inúmeros clones de anticorpos de um modo extremamente rápido e simultâneo diferentemente da tecnologia de hibridoma, que usualmente demora de 3 a 4 meses para obtenção de um único clone. Todavia, a construção de uma biblioteca grande o suficiente ($>10^9$) é um processo extremamente custoso, e a afinidade dos anticorpos obtidos pode ser menor do que os mAbs derivados das células híbridas.

Anticorpos recombinantes contra as calicreínas teciduais humanas são os principais objetos do grupo de pesquisa, que recentemente selecionou anticorpos contra a KLK7 via *phage display*, denominados LU37A10, LUP37C11 e LUP37D11, e os expressou no formato scFv-Fc em células eucariontes HEK 293, estudando suas atividades inibitórias (IC_{50}) e suas introduções dentro de um sistema de *drug delivery* de hidrogéis para o âmbito da Síndrome de Netherton (LAUREANO *et al.*, 2020).

Diferentemente de anticorpos scFv-Fc, os fragmentos de anticorpos do tipo scFv, também chamados de anticorpos scFv, são formados pelos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas (VL e VH, respectivamente) fusionados por uma cadeia polipeptídica denominada *linker*, que estabiliza a proteína (SHEN *et al.*, 2008). Constituem a menor classe de anticorpos recombinantes, pesando usualmente de 27 a 29 kDa, e são caracterizados também pela presença de duas pontes dissulfeto presentes em cada domínio variável (SEO *et al.*, 2009). Não obstante, anticorpos do tipo scFv podem ser produzidos em *E. coli* via tecnologia do DNA recombinante, apesar de frequentemente serem expressos e agregados em corpos de inclusão, ocorrendo perda da atividade proteica, como será abordado na Seção 1.8. A expressão de anticorpos scFv funcionais LUP37A10, LUP37C11 e LUP37D11 contra a KLK7 em *E. coli* é o objetivo primordial desse trabalho, e será detalhada adiante.

1.7. Análise das sequências e atividades inibitórias de anticorpos recombinantes

Anticorpos provenientes de uma mesma biblioteca contra um antígeno em comum podem ser estudados através de duas formas: pela comparação das sequências e análise da atividade inibitória contra o antígeno. A primeira etapa é essencial para a compreensão da similaridade entre as sequências das moléculas selecionadas, além da

visualização da presença percentual de aminoácidos primordiais para o *folding* correto das proteínas – como os resíduos de cisteína para as pontes dissulfeto.

Dois softwares online são capazes de realizar tais estudos: o BLAST (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) e o ProtParam ExPASy. O BLAST trata-se de uma plataforma de domínio público, idealizada pelo *National Institutes of Health* (Estados Unidos) e caracterizada por um algoritmo capaz de buscar e/ou comparar sequências biológicas (genômicas ou peptídicas), fornecendo o grau de identidade entre duas ou mais sequências (igualdade dentro delas) (BORATYN *et al.*, 2013). O grau de identidade denota a quantidade percentual de aminoácidos exatamente iguais dentro das sequências. Ele é calculado pela razão da quantidade de resíduos de aminoácidos iguais pela quantidade de aminoácidos da menor proteína envolvida na análise. Se possuímos, por exemplo, uma sequência A de 320 aminoácidos e uma sequência B de 450 aminoácidos que compartilham 100 resíduos *idênticos* nas mesmas posições, o grau de identidade será dado por:

$$\text{Identidade} = \frac{100}{320} \times 100 = 31,25\%$$

O grau de similaridade, contudo, leva em conta aminoácidos diferentes que possuem características bioquímicas semelhantes, sendo demarcados por um símbolo de “+” na comparação das sequências dentro do BLAST. Se, no mesmo exemplo acima, as sequências A e B compartilharem 23 aminoácidos *semelhantes* nas mesmas posições, o grau de similaridade será dado por:

$$\text{Similaridade} = \frac{123}{320} \times 100 = 38,43\%$$

O ExPASy (do inglês *Expert Protein Analysis System*) é um portal de bioinformática mantido pelo Instituto Suíço de Bioinformática, por onde é possível, ao submeter uma sequência peptídica, ver a quantidade percentual de cada resíduo de aminoácido na sequência, além de obter informações acerca do ponto isoelétrico teórico da proteína e coeficientes de estabilidade e de extinção molar (ARTIMO *et al.*, 2012).

As informações obtidas de semelhança de sequências, percentuais de resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico podem cooperar para a escolha do sistema, tempo e

eficácia da expressão de proteínas recombinantes, além de ser essencial para certos tipos de cromatografia, como a de troca iônica.

Uma vez expressos e purificados, a atividade inibitória de anticorpos pode ser estudada pela obtenção do IC₅₀. O valor de IC₅₀ é definido pela concentração de inibidor capaz de reduzir pela metade a atividade do antígeno. Para avaliar a capacidade inibitória de anticorpos recombinantes, é necessário estudar previamente a atividade enzimática do antígeno (SEBAUGH, 2011).

A atividade enzimática mede a taxa da reação catalisada pela enzima em condições específicas de pH e temperatura. A medição ocorre pela clivagem de um substrato, durante um período de tempo, que ao ser clivado emite fluorescência medida em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). Durante o tempo estimado do ensaio, a fluorescência aumenta de acordo com a atividade enzimática, de modo que os pontos de UAF são utilizados para formar uma reta média. O coeficiente angular da reta do ensaio (UAF por segundos) denota a atividade da enzima, sendo convertido em atividade residual (coeficiente da reta = 100% de atividade enzimática). A adição de um inibidor funcional equivale à diminuição do coeficiente angular da reta que, por conseguinte, acarreta a diminuição da atividade catalítica residual.

Para a obtenção do IC₅₀, o inibidor é adicionado em diferentes concentrações, usualmente de 5 a 10 valores, de modo que se obtenham concentrações de baixa inibição (< 50% de atividade residual) e alta inibição (> 50% de atividade residual). Os dados então são plotados em um gráfico de atividade residual para obtenção do valor de IC₅₀ (SEBAUGH, 2011).

1.8. Expressão de anticorpos do tipo scFv em linhagens de *E. coli*

A tecnologia do DNA recombinante teve seus primórdios no início da década de 70, quando Paul Berg e colaboradores realizaram o primeiro experimento bem sucedido dentro do tema ao recombinar uma fita de DNA do fago delta com o operon da galactose de *E. coli*, inserindo o produto recombinante em vírus SV40 (JACKSON, D.; ROBERT H.; BERG P., 1972).

Ainda na mesma década, o laboratório de Herbert Boyer isolou e estudou a enzima de restrição EcoRI, capaz de clivar DNA em sequências GAATTC. Concomitantemente, Cohen e colaboradores estudavam a inserção e propagação de

plasmídeos exógenos em linhagens de *E. coli*. Em uma colaboração louvável, Boyer e Cohen se uniram para digerir um plasmídeo de *Staphylococcus* e inserir fragmentos desse DNA em plasmídeos de *E. coli*, inserindo o DNA recombinante nas bactérias, que passaram a propagá-lo pelas gerações (CHANG; COHEN, 1974).

A partir desses estudos, o isolamento de genes e clonagem destes em vetores para geração de DNA recombinante tornou-se uma prática extremamente comum em laboratórios de pesquisa e para fins medicinais. Diversas proteínas e peptídeos recombinantes produzidos em diversas linhagens celulares são utilizados para fins terapêuticos, como o hormônio do crescimento, insulina, hormônio folículo estimulante (FSH) e o fator VIII de coagulação (MAKSUM *et al.*, 2020).

A *Escheria coli* é uma bactéria gram-negativa da família *Enterobacteria* que possui diversas linhagens, a minoria de caráter patogênico. Devido a seu rápido crescimento, genoma bem caracterizado e capacidade de crescimento tanto em condições aeróbicas e anaeróbicas, inúmeras linhagens dessa espécie têm sido utilizadas para a expressão de certas proteínas recombinantes, como hepcidina, queratinase e o fator de crescimento epidérmico humano (MAKSUM *et al.*, 2020).

As etapas de produção de uma molécula recombinante em *E. coli* para fins terapêuticos muitas vezes envolve múltiplas etapas de purificação ou clonagem do gene de interesse em vetores intermediários com sequências de peptídeos sinais para transporte da proteína para o periplasma ou meio extracelular, a fim de separar o produto recombinante de possíveis toxinas – principalmente se ele é agregado em corpos de inclusão. É importante denotar que proteínas que exigem certas modificações pós-traducionais, como glicosilação ou alquilação, não são recomendadas para esse sistema de expressão (MAKSUM *et al.*, 2020).

Estudos da expressão de anticorpos do tipo scFv em linhagens de *E. coli* têm sido apresentados continuamente nas últimas décadas, essencialmente por esses fragmentos não necessitarem de modificações pós-traducionais. Uma vez que é no fragmento scFv que reside a capacidade inibitória do anticorpo, a expressão desse tipo de molécula em bactéria traz consigo inúmeras vantagens, principalmente associadas à rápida produção e ao custo menor se comparada ao uso de linhagens de células eucariontes (AHMAD *et al.*, 2012).

Todavia, o sucesso da expressão e caracterização desse tipo de anticorpo em *E. coli* é frequentemente impedido pela agregação dessas moléculas em corpos de inclusão, ou pelo dobramento incorreto da proteína devido à redução de resíduos de cisteína pelas

vias da tiorredoxina redutase (trxB) e da glutarredoxina (gor), impedindo a formação de pontes dissulfeto (FAULKNER *et al.*, 2008).

Não obstante, os scFv, por serem sequências essencialmente de eucariontes, podem possuir códons que são raros no genoma bacteriano, como certos códons que correspondem à arginina (AGG, AGA, CGA), leucina (CUA), isoleucina (AUA) e prolina (CCC) (CHEN; TEXADA, 2006). Proteínas que contêm esses códons usualmente culminam em uma produção ínfima ou notoriamente reduzida no sistema bacteriano, devido primordialmente à falta de tRNAs correspondentes aos códons (WANG, Y. *et al.*, 2016).

Além disso, diferenças na temperatura durante o período de expressão estão associadas à quantidade de proteína produzida e a sua porcentagem solúvel; o aumento de temperatura leva frequentemente ao aumento de proteína produzida e do percentual insolúvel (corpos de inclusão) da mesma (SAN-MIGUEL; PÉREZ-BERMÚDEZ; GAVIDIA, 2013), enquanto a alteração da concentração do indutor de expressão (como isopropil β -d-1-tiogalactopiranosídeo, IPTG, que age sob o lac óperon de vetores) também afeta a quantidade de proteína recombinante produzida (TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006).

Sendo assim, diversas estratégias vêm sendo trabalhadas por laboratórios de pesquisa, como a expressão em temperaturas baixas (4° ou 18° C); fusão do gene de estudo com uma chaperona no vetor; solubilização de corpos de inclusão com agentes desnaturantes, como ureia, seguida de renaturação *in vitro*; utilização de linhagens diferenciadas de *E. coli*, destacando-se as linhagens Origami™ 2, que possui mutações na gor e trxB, ou Rosetta™ (DE3), que possui suplementação de tRNAs de códons raros. O uso de todas essas estratégias já culminou na expressão e caracterização de scFvs, como anti-IgE humano, anti-HER2 e anti-ácido domóico (HU *et al.*, 2007; WANG, M. R. *et al.*, 2011; FARSHDARI *et al.*, 2020).

Os anticorpos LUP37A10, LUP37C11 e LUP37D11 foram selecionados via *phage display* com seus fragmentos scFv clonados no vetor pHAL 30 dentro da região delimitada pelos sítios de restrição das enzimas Nco I e Not I (Figura 10). Uma vez que tal vetor não é usualmente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes, optou-se, nesse trabalho, pela clonagem dos insertos no vetor pET28 a (+), já utilizado rotineiramente em trabalhos do grupo de pesquisa (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

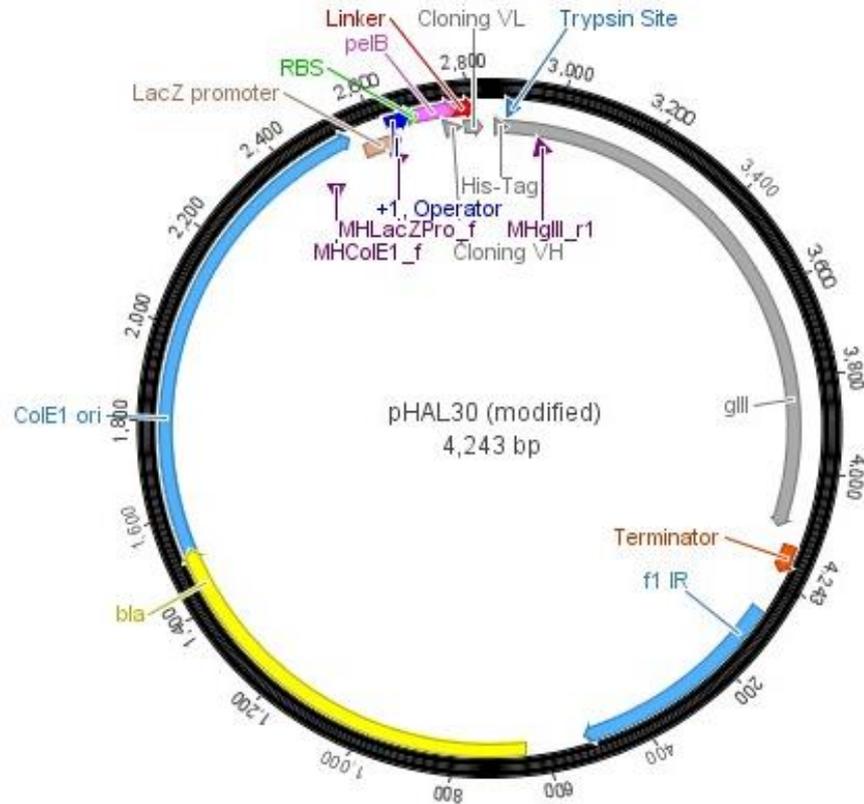


Figura 10. Vetor pHAL30, com apontamento para as regiões de clonagem dos domínios variáveis leve e pesado (Cloning VL e Cloning VH), sob modulação do operon lac.

O pET 28 a (+) é um vetor com resistência a canamicina, de expressão de proteína recombinante modulada pelo *operon lac*. O IPTG, de modo similar a alolactose, liga-se ao repressor lac e o libera do sítio do operador lac, permitindo a expressão da proteína recombinante. O vetor pET-28 a (+) é uma excelente escolha para produção de proteína recombinante para ser purificada por cromatografia de afinidade, uma vez que a proteína nele é produzida de modo fusionado a uma sequência sêxtupla de histidina (His-Tag) C-terminal que possui forte afinidade pelo níquel carregado em colunas desse tipo de purificação (Figura 11).

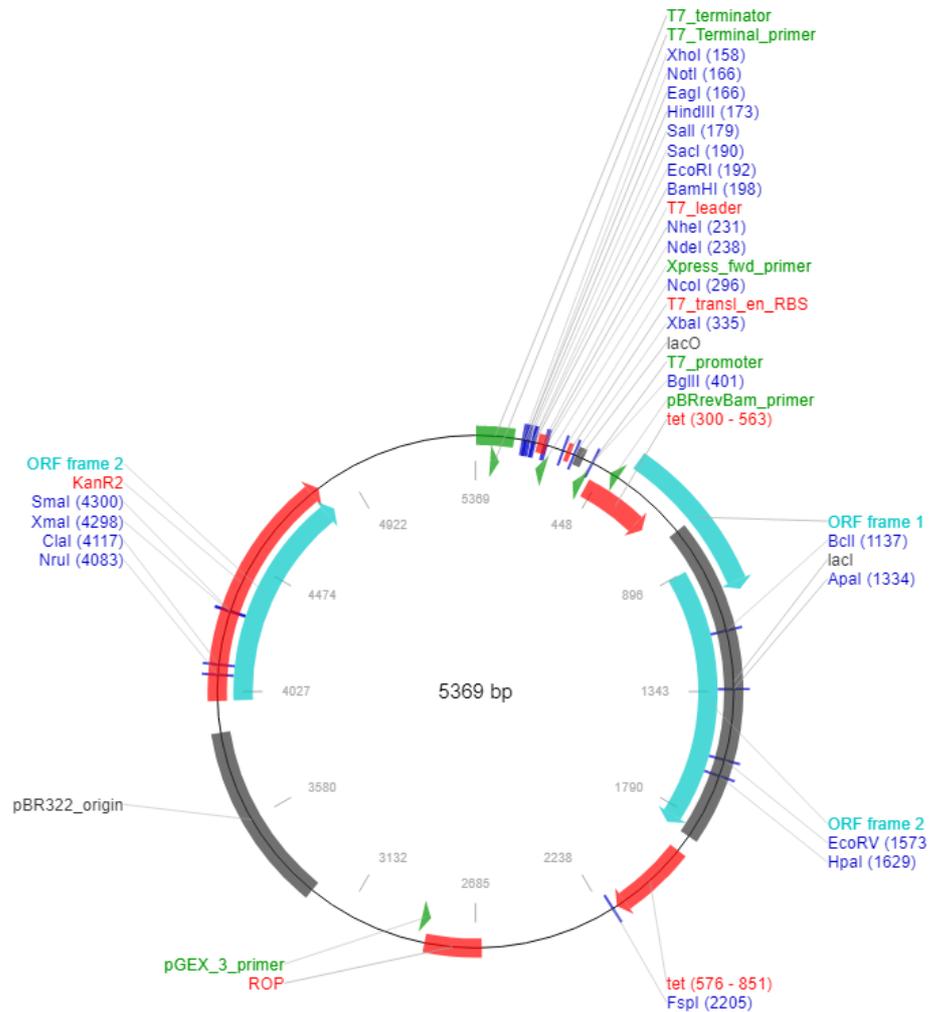


Figura 11. Vetor pET-28 a (+). Retirado de: Addgene, Estados Unidos.

A técnica de renaturação *in vitro* foi escolhida para utilização dentro da possibilidade de retenção das proteínas em corpos de inclusão, uma vez que é também uma técnica dominada pelo grupo, que recentemente produziu o fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C) em *E. coli* via renaturação *in vitro* (dados não publicados).

2. OBJETIVOS

O objetivo primordial desse trabalho é expressar em *E. coli* e caracterizar a atividade inibitória dos anticorpos scFv LUP37A10, LUP37C11 e LUP37D11 contra a calicreína tecidual humana 7. Para isso, os seguintes objetivos secundários foram estabelecidos:

- Análise das sequências dos scFv em BLAST e ProtParam ExPASy;
- Digestão das sequências clonadas no vetor pHAL30 e clonagem das mesmas no vetor pET28 a(+);
- Transformação dos clones em células de *E. coli* das linhagens Origami 2 e Rosetta™(DE3);
- Expressão em 10 mL de meio LB de um dos anticorpos em diferentes concentrações de IPTG nas linhagens estabelecidas, a fim de encontrar a melhor concentração de indutor e linhagem de célula via análise de *western blotting*;
- Expressão em 100 mL de meio LB dos três scFv na linhagem escolhida;
- Extração dos anticorpos retidos em corpos de inclusão via solubilização por ureia;
- Purificação dos anticorpos recombinantes via cromatografia de afinidade;
- Renaturação das proteínas recombinantes purificadas por diálise;
- Testes enzimáticos contra a KLK7 para determinação do IC₅₀;

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos anticorpos tem se tornado um mecanismo essencial para o progresso e expansão da pesquisa e indústria farmacêutica. Em 2018, o mercado global de terapias com anticorpos chegou ao valor de US\$115,2 bilhões, com expectativa de ultrapassar o meio trilhão de dólares em 2025. De acordo com o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*, agência regulatória dos Estados Unidos), 61 anticorpos selecionados e caracterizados já são utilizados no tratamento de doenças, sendo 18 aprovados apenas no ano de 2018 (LU *et al.*, 2020).

Nesse cenário de rápida expansão, os anticorpos do tipo scFv chamam a atenção pela possibilidade de expressão em sistemas mais baratos que, se corretamente caracterizados, possuem o potencial de resultar em uma larga expressão dessas moléculas de um modo muito mais rentável. Além do próprio caráter terapêutico devido a sua atividade inibitória, essas moléculas têm sido estudadas como potenciais carreadores de fármacos (KATO *et al.*, 2015), também sendo aplicadas em mecanismos de diagnóstico de diversos cânceres, como o de próstata (HAN *et al.*, 2016), e de doenças parasitárias, como a neurocisticercose (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Entretanto, como fora explicitado anteriormente, inúmeras dificuldades na obtenção de clones scFv funcionais acabam gerando empecilhos para o sucesso desse ramo farmacológico, denotando a necessidade de um esforço global para a expansão do conhecimento nessa área.

É claro o papel da KLK7 em diversas patologias dermatológicas, como a Síndrome de Netherton, devida a sua atividade desregulada no estrato córneo com outras KLKs. Uma vez que nosso grupo de pesquisa caracterizou anticorpos contra a KLK7 no formato scFv-Fc, estudando-os em um sistema de *drug delivery*, a caracterização dos anticorpos scFv em mesmas condições é uma etapa essencial para o progresso de nossas pesquisas, uma vez que não existe bibliografia disponível desse tipo de anticorpo contra a KLK7. Caracterizá-los é um passo primordial para o estudo dessas moléculas, uma vez que essa etapa permite o futuro estudo dessas proteínas também em sistemas de *drug delivery*, denotando o potencial terapêutico desses clones nesse formato.

Dessa forma, como será detalhado adiante, a expressão e caracterização de três clones scFv LUP37A10, LUP37C11 e LUP37D11 em *E. coli* é a meta principal desse trabalho.

4. METODOLOGIA

4.1. Estudo das sequências scFv no BLAST e ExPASy

A ferramenta utilizada do BLAST foi o pblast, disponível em <https://tinyurl.com/6bxfet8x>. As sequências dos anticorpos foram submetidas em formato FASTA e o grau de identidade foi obtido após o processamento das sequências no sistema. A matriz utilizada para comparação foi BLOSUM62. O custo de *gaps* foi 11 para existência e 1 para extensão. O alinhamento das sequências pela ferramenta foi utilizado para contagem de aminoácidos similares e conseguinte cálculo do grau de similaridade.

Também em formato FASTA, as sequências foram aplicadas individualmente na ferramenta ProtParam do ExPASy (<https://tinyurl.com/4k2ynx4a>). Nele, foram extraídas as quantidades percentuais de cada resíduo de aminoácido, assim como massa (em kDa), ponto isoelétrico teórico e coeficiente de extinção molar. O coeficiente de extinção molar foi utilizado para medição da concentração de amostras purificadas no aparelho Biodrop μ LITE (Biochrom, Reino Unido).

4.2. Clonagem dos genes scFv no vetor pET28 a(+)

A extração de DNA dos scFv clonados ao vetor pHAL 30 ocorreu a partir de inóculo de colônias *E. coli* Mach T1 previamente transformadas e estocadas em glicerol 40% a -80°C . Colônias contendo o plasmídeo de cada scFv foram inoculadas em 2 mL de meio líquido 2-YT (1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5% NaCl) suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Após 20 horas de crescimento a 37°C a 200 RPM, os inóculos foram centrifugados a 4000 RCF por 20 minutos a 4°C . Posteriormente, os pellets formados foram ressuspensos com 200 μL de Solução P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, pH = 8,0) e incubados por 10 minutos em gelo, sendo acrescidos de 300 μL de Solução P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS), incubados novamente por 10 minutos em gelo e acrescidos de 300 μL de Solução P3 (3 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ pH = 5,5), então centrifugados por uma hora a 12500 RPM em temperatura ambiente.

Os sobrenadantes foram separados e acrescidos a 600 μL de clorofórmio, incubados sob agitação por 5 minutos e centrifugados a 12500 RPM por 15 minutos. Os sobrenadantes foram novamente separados e acrescidos de 800 μL de isopropanol, sendo centrifugados a 12500 RPM a 4°C por uma hora. O isopropanol foi retirado e 1

mL de etanol 70% gelado foi adicionado aos pellets, deixados sob centrifugação 12500 RPM a 4°C por meia hora. Após isso, o etanol foi removido e os pellets incubados a temperatura ambiente para secarem totalmente, sendo ressuspensos em 30 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1mM, pH = 8,0) após secagem.

Os anticorpos scFv clonados no vetor pHAL 30 foram digeridos juntamente com o vetor pET28 a(+) fechado. A digestão consistiu do uso de 1 µg de DNA, 20 U de NcoI-HF, 20 U de NotI-HF e 5 µL de 1X Cutsmart. Cada reação foi completada até 50 µL com H₂O e aquecida por três horas a 37°C. A inativação das enzimas de restrição foi estabelecida a 60°C. A análise das digestões ocorreu por eletroforese de gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. As purificações dos produtos digeridos seguiram os parâmetros e instrumentos estabelecidos no *PureLink™ Quick Gel Extraction Kit* (K210012, Thermo Fisher, Estados Unidos). Os marcadores de peso moleculares utilizados em géis de agarose nesse trabalho foram *1 kb DNA Ladder* (N3232L, NEB, Estados Unidos) (Figura 12) ou *100bp Ladder Plus, Ready-To-Use* (M1071, Sinapse Biotecnologia, Brasil) (Figura 13), dependendo da disponibilidade no laboratório. A ligação dos insertos com o vetor ocorreu pelo uso de T4 DNA Ligase (EL0011, Thermo Fisher, Estados Unidos), seguindo instruções do fornecedor.

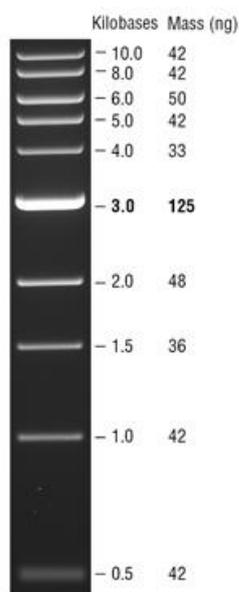


Figura 12. 1 kb DNA Ladder (N3232L, NEB, Estados Unidos).

100bp ladder plus M1071/M1072

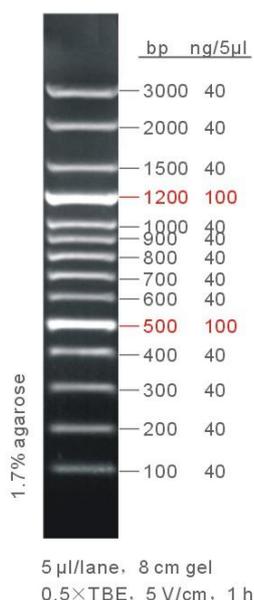


Figura 13. 100bp Ladder Plus, Ready-To-Use (M1071, Sinapse Biotecnologia, Brasil).

Foi usada uma razão molar vetor:inserir de 1:4 e os produtos ligados foram transformados em linhagem *E. coli* Mach T1 para estoque com glicerol 40% a -80°C . As colônias Mach T1 transformadas passaram por análise via PCR antes de serem isoladas para estoque, também sendo utilizadas para extração dos vetores pET28 a(+) contendo os genes dos scFv pelo mesmo protocolo apresentado, para transformação nas demais linhagens de bactérias utilizadas.

4.3. Transformação de células competentes

Para cada scFv, 10 ng do gene inserido no pET28 a (+) foram utilizados para 20 µL de células competentes. Para a transformação das células, elas foram incubadas com a quantidade de DNA por 30 minutos em gelo, aquecidas por 90 segundos a 42°C e incubadas novamente em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram completadas para 100 µL com meio 2-YT, cultivadas por 90 minutos a 37°C com agitação de 200 RPM, para então serem passadas para meio sólido em placa de petri. As transformações em todas as linhagens tiveram o meio sólido suplementado com 50 µg/mL de canamicina. Para as transformações na linhagem Origami 2, o meio sólido também foi suplementado com uma concentração final de 12,5 µg/mL de tetraciclina, enquanto que para as

transformações na linhagem RosettaTM(DE3), o meio foi suplementado com uma concentração final de 34 µg/mL de cloranfenicol. As transformações foram mantidas a 37°C em estufa durante 20 horas para observação do crescimento de colônias.

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Colônias das transformações foram selecionadas para reação de PCR a fim de se constatar a presença dos insertos para utilização das células para expressão. Uma região de cada colônia foi pega encostando-se ponteira de 10 µL na colônia e ressuspendida em 10 µL de *UltraPureTM DEPC-Treated Water* (750023, Thermo Fisher, Estados Unidos), sendo aquecida a 98° C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12500 RPM por 10 minutos e utilizou-se 1,5 µL de cada sobrenadante para a reação de PCR. A realização da reação de PCR baseou-se na utilização de dNTP (0,2 mM), Primer Forward (0,1 mM), Primer Reverse (0,1 mM), 0,25 µL de Taq Polimerase (5 U/µL), 2,5 µL de *10X PCR Buffer (Mg²⁺ Plus* (P1101, Sinapse Inc., Brasil) por amostra, completando para 25 µL finais com *UltraPureTM DEPC-Treated Water* para cada amostra. O controle positivo tratou-se de colônias contendo o vetor pET-28 a (+) sem inserto. As amostras de PCR foram aplicadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

4.5. Expressões em 10 e 100 mL

O clone LUP37C11 foi escolhido para expressão em 10 mL nas duas linhagens de *E. coli* selecionadas, a fim de que apenas uma linhagem de bactéria fosse escolhida para a expressão de todos os clones em cultura de 100 mL. Foram utilizadas diferentes concentrações (µM) de IPTG para indução da expressão: 50, 100, 250, 500. Células transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB (L3022, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) suplementadas pelos respectivos antibióticos de cada linhagem (Seção 4.3) e cultivadas a 37°C por 200 RPM por 20 horas. Posteriormente, 100 µL do meio de cultura fora passada para 10 mL de meio LB fresco suplementado com antibiótico, sendo cultivadas em tubo cônico a 37°C por 200 RPM.

O crescimento da cultura foi medido em intervalos de uma hora pela medida de densidade óptica (OD) a 600 nm. Quando a OD₆₀₀ = 0,5, o meio de cultura foi acrescido da respectiva concentração de IPTG, sendo a cultura cultivada a partir desse momento

a 30°C e 200 RPM por 20 horas. Após duas, quatro e vinte horas de expressão, 1 mL foi removido de cada amostra e centrifugado por 20 minutos a 12500 RPM e 4°C, sendo os sobrenadantes descartados e os pellets congelados para análise de western blotting a fim de constatar a presença da proteína recombinante.

Para a expressão em 100 mL de todos os scFv na linhagem que obteve os melhores resultados na expressão a 10 mL, células transformadas foram novamente inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado de antibiótico por 20 horas a 37°C e 200 RPM. Após o período, 1 mL do meio de cultura foi passada para 100 mL de meio LB fresco e, de modo semelhante, a melhor concentração de IPTG obtida previamente foi utilizada quando $OD_{600} = 0,5$. Após 20 horas, a cultura fora centrifugada por 20 minutos a 12500 RPM e 4°C para ser lisada e purificada.

4.6. Lise e cromatografia de afinidade dos anticorpos recombinantes

O pellet do LUP37C11 proveniente da primeira expressão em 100 mL foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise (Na_2HPO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH = 8,0) suplementado com coquetel de inibidores de protease para ser sonicado. A sonicação ocorreu por 15 minutos, intercalada por pulsos de 9,9 segundos. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12500 RPM por 20 minutos a 4°C, com o sobrenadante coletado e filtrado para aplicação no FPLC Äkta Start (GE Healthcare Bio-science, Estados Unidos) a fim de realizar a cromatografia e purificação do anticorpo. Os pellets contendo corpos de inclusão foram congelados a -20°C.

A coluna cromatográfica utilizada foi a HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Bio-science, Estados Unidos) carregada com sulfato de níquel 0,1 M. A coluna foi lavada com 20 mL de tampão de lavagem (Tris 500 mM, NaCl 500 mM), seguida de um aumento gradual de 5, 10, 20, 40 e 100% de tampão de eluição (Tris 500mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM), consistindo em 20 mL de eluição divididos em alíquotas de 1 mL. As amostras provenientes de picos de purificação foram congeladas a -20°C para posteriormente serem avaliadas junto com corpos de inclusão em gel SDS-PAGE 10%. O marcador de peso molecular utilizado para esses géis foi o *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (26610, Thermo Fisher, Estados Unidos) (Figura 14).

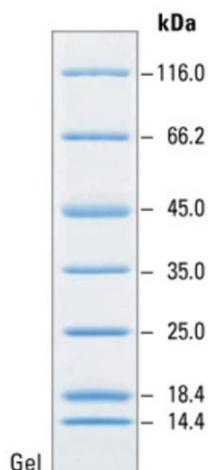


Figura 14. *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* (26610, Thermo Fisher, Estados Unidos).

Uma vez constatada a presença da proteína em corpos de inclusão, um protocolo de extração via agente desnaturante foi adotado para todos os anticorpos. Nele, os pellets das expressões em 100 mL foram ressuspensos em tampão de lise desnaturante (Imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tris 50 mM, Ureia 8 M) e incubados em gelo por uma hora, sendo sonicadas nos mesmos parâmetros previamente apresentados. Após centrifugação e filtração, a cromatografia, em coluna de mesmo tipo, ocorreu nos mesmos moldes de aumento gradual de tampão, sendo as composições do tampão de lavagem (Imidazol 60mM, NaCl 500mM, Tris 50mM e Ureia 4M) e de eluição (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Imidazol 500 mM) modificadas. As amostras provenientes de picos de purificação também foram congeladas a -20°C para posteriormente serem avaliadas junto com corpos de inclusão em gel SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com Comassie Blue por 30 minutos e deixados sob agitação com descorante por 20 horas. Amostras contendo a banda dos scFvs foram aplicadas em ensaio de *western blotting*.

4.7. Western Blotting

Os ensaios de *western blotting* ocorreram com membrana de PVDF previamente ativada com metanol. A transferência em membrana PVDF de blotting semi-seco ocorreu a 18 V por 60 minutos pela utilização do *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-rad, Estados Unidos) e tampão de transferência (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20%, SDS 0,04%, pH = 9,2). A checagem da transferência foi realizada pela passagem do marcador pré corado *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (26623, Thermo Fisher, Estados Unidos) (Figura 15) do gel para a membrana. Após esta etapa, a membrana foi lavada com tampão TBS 1X (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH= 7,5) e incubada com tampão de bloqueio (TBS 1X, 5% de leite em pó) por 60 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal anti-poli-histidina (anti-His-Tag) produzido em camundongo (H102, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) diluído na proporção de 1:1000 no tampão de bloqueio a 4°C sob agitação por 20 horas. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS 1X e incubada a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-*mouse* IgG, IgM (H+L) produzido em cabrito (A10677, Sigma Aldrich, Estados Unidos) diluído na proporção 1:500 no tampão de bloqueio por 60 minutos. Após uma lavagem final com TBS 1X, a membrana foi revelada com tampão de revelação (1 M Tris, 100 µM luminol, 100 µM ácido p-cumárico, 0,6% H₂O₂) em transluminador.

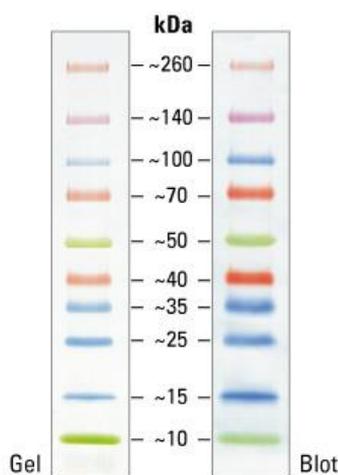


Figura 15. *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (26623, Thermo Fisher, Estados Unidos).

4.8. Renaturação in vitro

Os anticorpos purificados e identificados via *western blotting* passaram por um processo de renaturação in vitro devido à extração com ureia. Para isso, as amostras de cada scFv foram aplicadas separadamente em membrana de diálise *SnakeSkin™ Dialysis Tubing*, 10K MWCO (68100, Thermo Fisher, Estados Unidos). As membranas preenchidas foram imersas em 1 L de tampão de diálise (Tris 20 mM, pH = 8,0) e incubadas sob agitação a 4°C. Após quatro horas, o tampão de diálise foi descartado e substituído por tampão fresco, e as amostras foram mantidas na membrana sob agitação por mais 20 horas. Com o término do período, as proteínas foram removidas das membranas e estocadas a -20°C.

4.9. Análise da atividade enzimática

A atividade da KLK7 sem e com a presença de anticorpos recombinantes foi monitorada por ensaio de fluorescência pela hidrólise do substrato fluorogênico P1Y (Abz-KLYSSKQ-EDDnp) em concentração final de 20 μ M em placa de 96 poços no espectrofluorímetro *Sinergy™ H1* (BioTek, Estados Unidos) com comprimentos de onda ajustados para $\lambda_{em} = 380$ nm e $\lambda_{ex} = 460$ nm. O tampão de ensaio utilizado foi Tris 50 mM, pH = 7,5. Para a atividade sem presença de anticorpo, quanto para a presença de diferentes concentrações desses, foram realizadas triplicatas das leituras durante dez minutos. As triplicatas foram utilizadas para obtenção de uma média e de um desvio padrão interpretado como o erro das medições. Dentro dos dez minutos de leitura, a placa foi aquecida previamente a 37°C, com leituras a cada 30 segundos separadas por intervalos de agitação das amostras nos poços. Para a obtenção do IC₅₀, os dados obtidos foram submetidos para análise no programa *GraphPad Prism 8*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise comparativa das sequências de anticorpos

As sequências dos clones LUP37A10, LUP37C11 e LUP37D11 encontram-se patenteadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) e, portanto, não serão completamente apresentadas nesse trabalho por questões jurídicas. Todavia, certos aspectos quanto à similaridade dos anticorpos, ponto isoelétrico, e presença de códons raros serão apresentados a seguir. As três sequências foram submetidas inicialmente no ProtParam ExPASy. Na Tabela 1, é possível observar os parâmetros de massa (kDa), ponto isoelétrico e coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), enquanto na Tabela 2 encontra-se explicitada a quantidade percentual de cada resíduo de aminoácidos nos três clones.

Tabela 1. Massa, ponto isoelétrico e coeficiente de extinção molar dos scFv obtidos no ProtParam ExPASy.

Parâmetros	Anticorpos scFv		
	LUP37A10	LUP37C11	LUP37D11
Massa (kDa)	28,7	28,7	28,7
Ponto isoelétrico	4,75	4,85	4,85
Coeficiente de Extinção Molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	55600	46090	46090

Tabela 2. Quantidade percentual de resíduos de aminoácidos em cada clone scFv.

Resíduos de aminoácidos	Anticorpos scFv		
	LUP37A10	LUP37C11	LUP37D11
Ala	7.8%	8.2%	8.2%
Arg	3.0%	3.4%	3.4%
Asn	0.7%	2.2%	1.5%
Asp	4.4%	4.9%	5.2%
Cys	1.5%	1.5%	1.5%
Gln	5.2%	6.0%	6.0%
Glu	5.6%	5.6%	5.6%
Gly	10.7%	10.5%	10.4%
His	0.7%	0.7%	1.1%
Ile	1.5%	1.9%	1.9%
Leu	6.7%	5.6%	5.6%
Lys	3.7%	4.1%	4.1%
Met	1.9%	1.9%	1.9%
Phe	2.6%	2.6%	2.6%
Pro	5.2%	4.5%	4.9%
Ser	14.4%	12.4%	12.3%
Thr	8.9%	8.2%	8.2%
Trp	2.2%	1.5%	1.5%
Tyr	5.6%	6.0%	6.0%
Val	7.8%	8.2%	8.2%

Pelas características descritas, observou-se que os clones LUP37C11 e LUP37D11 possuem uma maior semelhança quando comparados ao LUP37A10; ambos possuem o mesmo ponto isoelétrico e coeficiente de extinção molar, compartilhando quantidades percentuais equânimes dos resíduos de aminoácidos de alanina (8,2%), arginina (3,4%), glutamina (6%), isoleucina (1,9%), leucina (5,6%), lisina (4,1%), treonina (8,2%), triptofano (1,5%), tirosina (6%) e valina (8,2%), enquanto compartilham com LUP37A10 as mesmas quantidades percentuais apenas para os resíduos de cisteína (1,5%), glutamato (5,6%), metionina (1,9%) e fenilalanina (2,6%).

As diferenças de sequência entre LUP37C11 e LUP37D11 resumem-se ao percentual de resíduos de asparagina (2,2% e 1,5%, respectivamente), aspartato (4,9% e 5,2%), histidina (0,7% e 1,1%), prolina (4,5% e 4,9%) e serina (12,4% e 12,3%). Desses últimos resíduos, o clone LUP37C11 compartilhou a mesma quantidade de histidina com LUP37A10.

A conservação dos resíduos de cisteína nos três clones indica a importância da formação de pontes dissulfeto em cada domínio (VH e VL), tornando-se um provável ponto essencial para o dobramento correto dessas proteínas, uma vez que a quebra dessas ligações já demonstrou ser fator para proteólise, perda de afinidade ou agregação de anticorpos scFv (SEO *et al.*, 2009).

Desse modo, como fora abordado na Seção 1.8, linhagens de *E. coli* como a Origami 2 impedem a redução de resíduos de cisteína, permitindo a formação das pontes dissulfeto. Assim, tal linhagem foi escolhida para ser testada na expressão dos clones scFv.

As sequências também foram submetidas na ferramenta pblast do BLAST a fim de aferir o grau de identidade e similaridade entre as sequências. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. É interessante denotar que apesar de divergirem em relação a certas quantidades de resíduos de aminoácidos, os clones LUP37C11 e D11 são quase 100% similares – isto é, quando ocorre mudança de um aminoácido em uma dada posição em uma das duas sequências, a mudança quase sempre se dá para outro aminoácido de propriedades bioquímicas semelhantes. Na realidade, a única alteração assimilada foi decorrente da adição de um resíduo de histidina na posição 237 do clone LUP37D11. Por outro lado, a identidade e similaridade de ambos os clones não chegou a 90% quando comparados com a sequência do LUP37A10.

Resíduos de arginina, leucina, isoleucina e prolina foram estudados para buscar a presença de códons raros nas sequências dos anticorpos. Para isso, as sequências nucleotídicas foram avaliadas a fim de visualizar os códons correspondentes a esses resíduos na leitura de *frame* correta. A quantidade total de cada um desses resíduos nos anticorpos foi considerada como 100%, visando ao cálculo da quantidade relativa de códons raros correspondentes a esses aminoácidos presente nos clones. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 3. Grau de identidade entre os anticorpos scFv.

Anticorpos scFv	Grau de Identidade		
	LUP37A10	LUP37C11	LUP37D11
LUP371A10	-	81,48%	81,55%
LUP37C11	81,48%	-	98,51%
LUP37D11	81,55%	98,51%	-

Tabela 4. Grau de similaridade entre os anticorpos scFv.

Anticorpos scFv	Grau de Similaridade		
	LUP37A10	LUP37C11	LUP37D11
LUP371A10	-	87,4%	87,82%
LUP37C11	87,4%	-	99,3%
LUP37D11	87,82%	99,3%	-

Tabela 5. Quantidade percentual de códons raros entre os anticorpos scFv.

Códons Raros	Quantidade percentual de códons raros nos clones scFv		
	LUP37A10	LUP37C11	LUP37D11
Arginina (AGG, AGA, CGA)	50%	55,5%	55,5%
Leucina (CUA)	0%	6,6%	6,6%
Isoleucina (AUA)	0%	0%	0%
Prolina (CCC)	14,28%	25%	23,8%

Nenhum dos anticorpos apresentou códon raro para isoleucina. Por outro lado, mais de 50% das argininas dos scFv selecionados correspondem a algum dos códons

raros (AGG, AGA, CGA), enquanto fora constatada a presença de códons raros para a leucina nos clones LUP37C11 e D11. O códon CCC de prolina também foi encontrado em todas as sequências, mas em quantidades percentuais diferentes. Como descrito na seção 1.8, a presença de tais códons pode promover uma diminuição severa na produção da proteína recombinante, de modo que seja extremamente dificultoso de obter a mesma purificada.

Dentre as possíveis estratégias estabelecidas para ultrapassar esse desafio, encontram-se o processo de otimização de códons e a utilização de linhagens específicas de *E. coli*. A primeira se trata da síntese da sequência nucleotídica com modificação desses códons para códons equivalentes (isto é, que correspondem ao mesmo aminoácido no processo de tradução) que não são raros no genoma bacteriano. Já a segunda consiste na utilização de linhagens de *E. coli* com suplementação de tRNAs, como a Rosetta™ (DE3) (Seção 1.8).

Apesar da otimização de códons possuir a vantagem de não depender de uma linhagem de *E. coli* específica para expressão após a modificação da sequência, o uso da Rosetta™ (DE3) foi optado para essa pesquisa por ser uma linhagem já disponível em nosso laboratório, visando à uma comparação da eficácia da expressão com a linhagem Origami 2.

Para isso, um único clone foi selecionado para testes de expressão em 10 mL de meio de cultura, tratando-se do LUP37C11, por justamente possuir mais códons raros, levando a uma comparação mais efetiva dentre as expressões nas duas linhagens.

5.2. Clonagem dos genes scFv no vetor pET-28 a (+)

Como abordado na Seção 1.8, os genes scFv encontravam-se clonados no vetor pHAL30, necessitando, portanto, serem digeridos para então serem clonados no vetor pET-28 a (+). O vetor também necessitou passar pelo processo de digestão, a fim de ser aberto para posterior ligação dos insertos digeridos. O gel de agarose da digestão do vetor pET-28 a (+) pode ser observado na Figura 16. Como controle negativo, foi utilizado o vetor fechado não-digerido (aproximadamente 4000 bp).

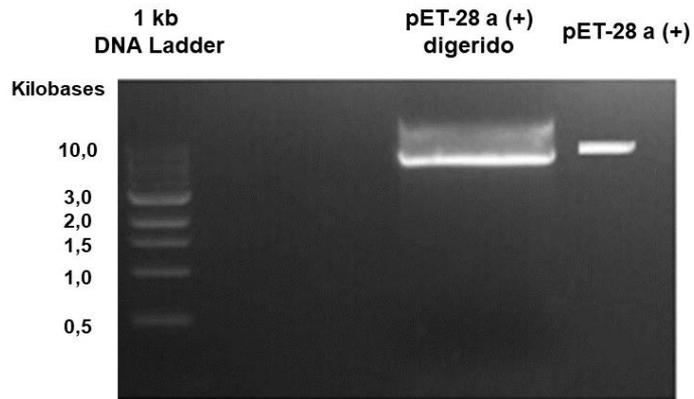


Figura 16. Gel de agarose 1% do vetor pET-28 a (+) digerido com enzimas Not I HF e Nco I HF.

As digestões dos insertos (aproximadamente 800 bp) no vetor pHAL30 podem ser observadas nas Figuras 17 e 18. Como descrito na Seção 4.1, os produtos das digestões foram extraídos e ligados no pET-28 a (+) aberto, passando por um processamento de estocagem antes de serem utilizados para transformação de células competentes Origami 2 e RosettaTM(DE3). Como abordado na seção anterior, o clone LUP37C11 foi selecionado para as primeiras transformações nessas linhagens. O resultado dos PCR de colônia de ambas as linhagens transformadas com esse clone pode ser visualizado nas Figuras 19 e 20. Para os PCR de colônia, células transformadas das respectivas linhagens com o vetor pET-28 a (+) fechado sem inserto foram utilizadas como controle positivo, enquanto o controle negativo foi constituído sem a adição de nenhuma colônia. Sete colônias positivas de RosettaTM (DE3) contendo plasmídeo com LUP37C11 foram constatadas, enquanto cinco colônias da linhagem Origami 2 foram selecionadas (Figuras 19 e 20).

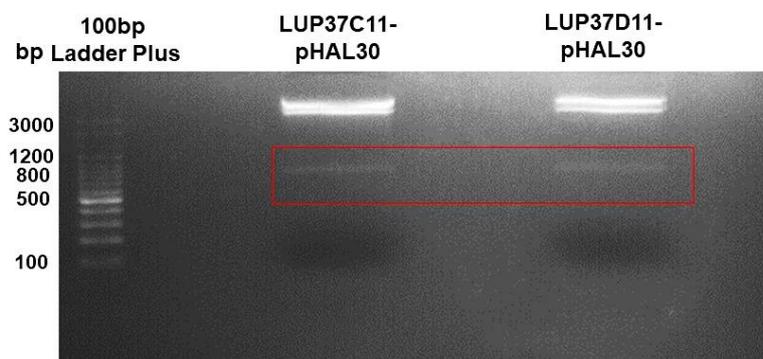


Figura 17. Digestões dos clones LUP37C11 e LUP37D11 clonados no vetor pHAL 30. Os fragmentos digeridos (aproximadamente 800 bp) estão destacados pelo retângulo vermelho.

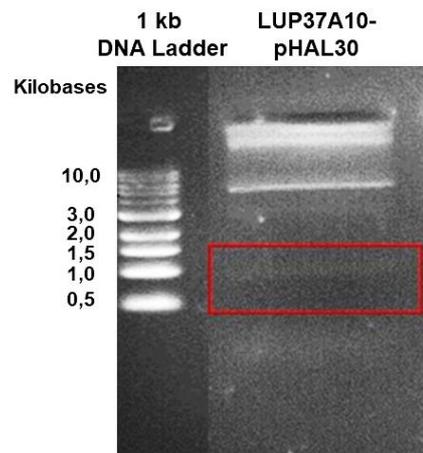


Figura 18. Digestão do clone LUP37A10 clonado no vetor pHAL 30. O fragmento digerido (aproximadamente 800 bp) está destacado pelo retângulo vermelho.

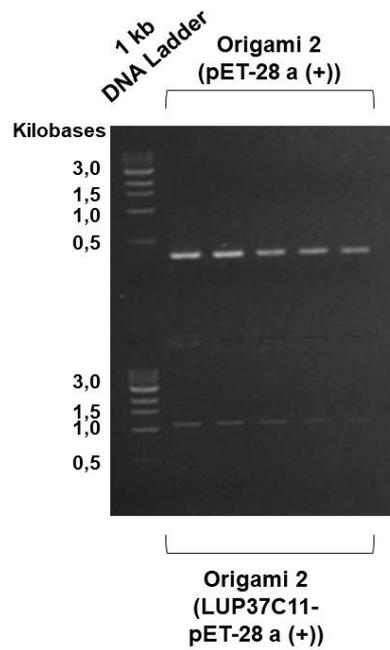


Figura 19. PCR de colônia de células Origami 2 transformadas com LUP37C11 clonado no vetor pET-28 a (+).

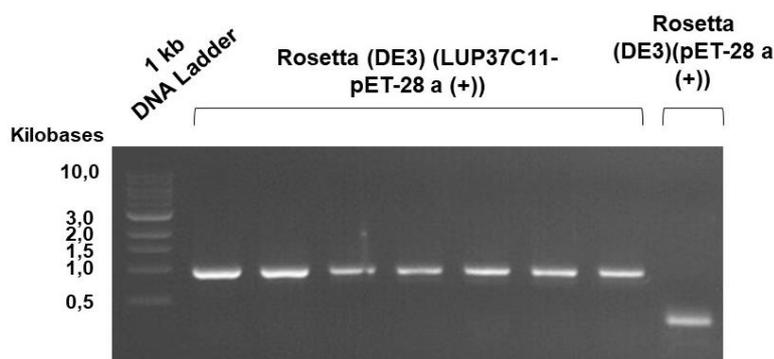


Figura 20. PCR de colônia de células Rosetta (DE3) transformadas com LUP37C11 clonado no vetor pET-28 a (+).

Uma vez constatada as clonagens corretas do clone LUP37C11, uma colônia positiva de cada linhagem foi isolada em 5 mL de meio LB acrescido dos respectivos antibióticos (Seção 4.3) e mantida sob agitação a 37°C por 20 horas, para então serem utilizadas nos ensaios de expressão em culturas de 10 mL.

5.3. Expressão de LUP37C11 em culturas de 10 mL

Em cada cultura de 10 mL foram adicionados 100 µL da cultura de 5 mL do dia anterior. As novas culturas foram mantidas a 37°C sob agitação, e seus crescimentos foram analisados via OD₆₀₀. A densidade óptica tem se mostrado uma excelente ferramenta de análise de crescimento em cultura bacteriana, sendo os valores de OD₆₀₀ = 0,5 a 0,6 correspondentes à fase exponencial do crescimento de população de tais microrganismos. É na fase exponencial onde se encontram as melhores condições para indução de expressão de proteínas recombinantes (WIDDEL, 2010).

Géis SDS-PAGE 10% de expressões do LUP37C11 em ambas as linhagens podem ser visualizados nas Figuras 21 e 22. Culturas com concentrações de 50, 100, 250, 500 µM de IPTG foram avaliadas nos intervalos de duas, quatro e vinte horas, sendo adicionados nos géis 10 µL de uma diluição 1:10 dos pellets das expressões em água ultrapura. Como demonstra a Figura 21, não ocorreu a intensificação de nenhuma banda próxima ao tamanho desejado de 28 kDa na Origami 2. Uma intensificação acentuada de bandas de 25 a 35 kDa ocorreram nas amostras provenientes da linhagem de Rosetta™ (DE3) (Figura 22) quando comparada com células transformadas apenas com a anterior.

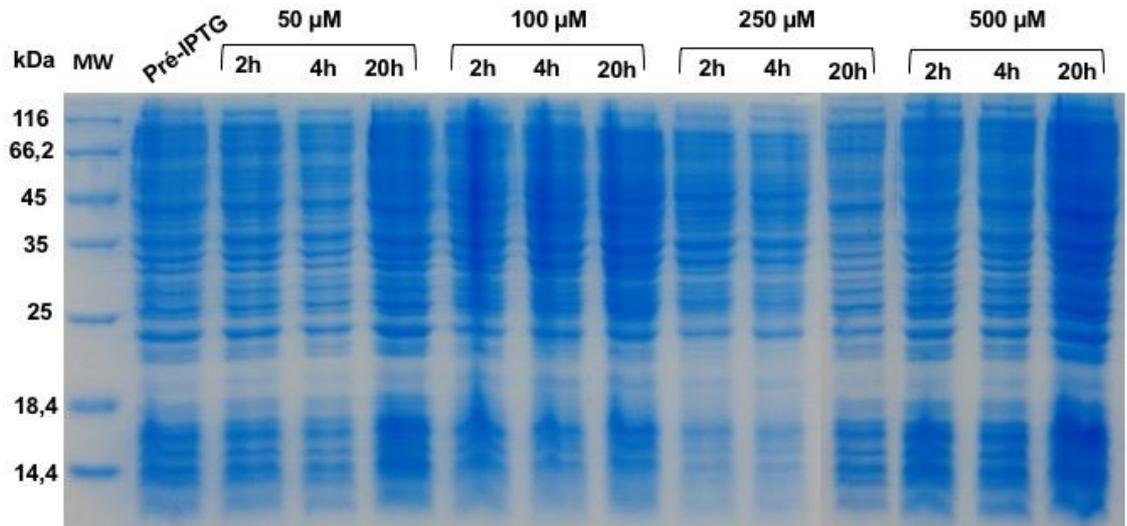


Figura 21. Gel SDS-PAGE 10% de LUP37C11 expressado em Origami 2 (10 mL) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100, 250 e 500 µM).

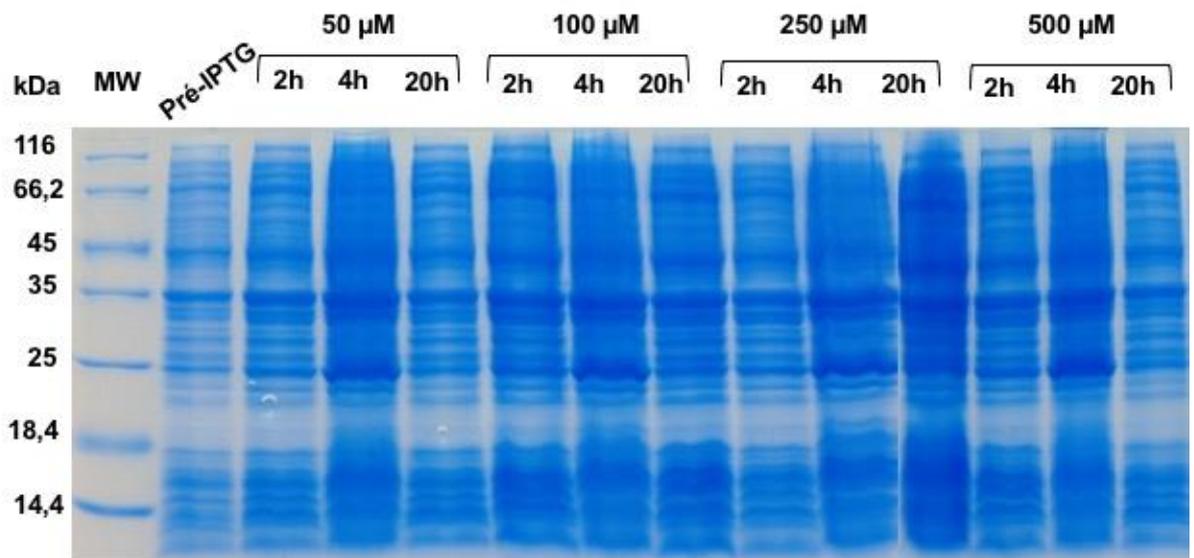


Figura 22. Gel SDS-PAGE 10% de LUP37C11 expressado em Rosetta™ (DE3) (10 mL) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100, 250 e 500 µM).

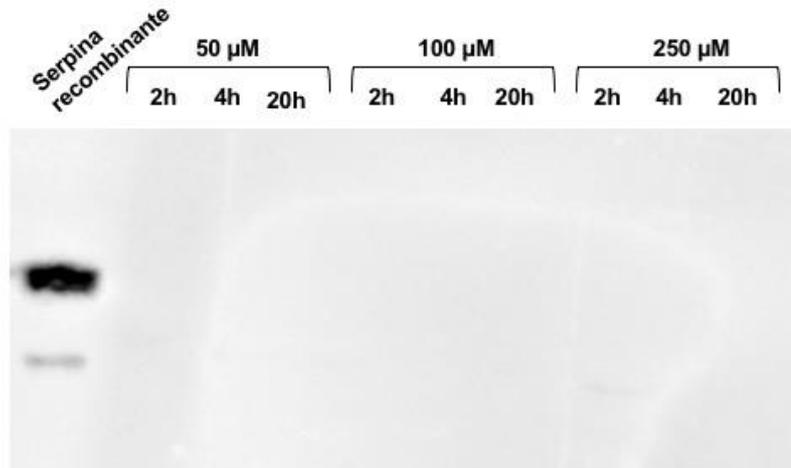


Figura 23. *Western Blotting* das expressões em 10 mL de LUP37C11 em Origami 2 em diferentes concentrações de IPTG (50, 100 e 250 μM).

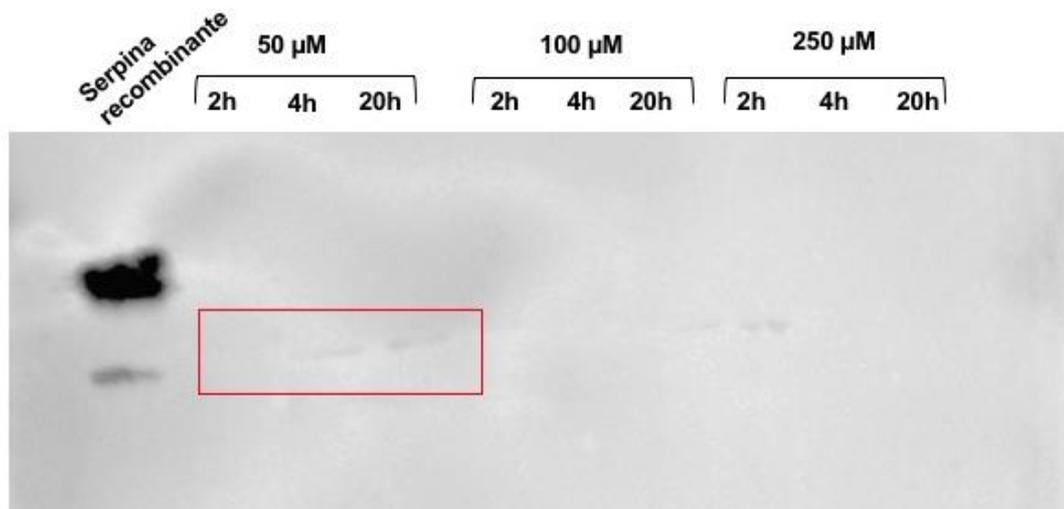


Figura 24. *Western Blotting* das expressões em 10 mL de LUP37C11 em Rosetta™(DE3) em diferentes concentrações de IPTG (50, 100 e 250 μM).

Ainda assim, o método de coragem não se demonstrou efetivo para observação de uma banda acentuada de proteína recombinante, dada a abundância de proteínas dentro do intervalo de 25 a 35 kDa, fenômeno que dificultou a busca para uma banda específica. Desse modo, as mesmas amostras foram analisadas via *western blotting*. Inicialmente, foram aplicadas apenas as amostras de 50, 100 e 250 μM de IPTG. Como controle positivo, foi utilizada uma serpina recombinante, produzida pelo grupo de pesquisa, que também contém His-Tag. Os resultados podem ser observados nas Figuras 23 e 24.

Apenas expressões derivadas da linhagem Rosetta™(DE3) demonstraram aparecimento da banda scFv, precisamente na concentração de 50 µM de IPTG. A pouca intensidade da banda foi associada ao fato de a amostra ser derivada de uma diluição de uma alíquota de 1 mL da cultura de 10 mL, acarretando em uma quantidade ínfima recombinante disponível.

É interessante notar que o aumento da concentração de IPTG não acarretou no aumento da expressão do anticorpo LUP37C11 – cujos valores para além de 50 µM de indutor não culminaram em bandas detectáveis no ensaio. A nossa hipótese é de que as outras concentrações também produziram o clone, mas em menor quantidade, de modo que a diluição da amostra da cultura impediu a captação no ensaio, uma vez que achados bibliográficos recentes também demonstraram que concentrações menores de IPTG resultaram em melhores expressões de anticorpos scFv em *E. coli* (FARSHDARI *et al.*, 2020).

Além disso, o fato de não ocorrer expressão detectável da proteína recombinante na linhagem Origami 2 demonstrou que a rasa constituição de cisteína do clone não foi efetivamente uma problemática para a expressão do mesmo, mas a presença de códons raros afetou efetivamente o sucesso da produção do scFv, dada a detecção apenas nas células Rosetta™(DE3). Assim, as células com o clone LU37C11 dessa última linhagem foram utilizadas para expressão em 100 mL e, não obstante, os anticorpos LUP37A10 e LUP37D11 clonados no pET-28 a (+) foram transformados em células da linhagem, cujo resultado pode ser observado pelo PCR de colônias da Figura 25. Foi optado, por uma questão de prazo, seguir adiante com expressão em 100 mL com 50 µM de IPTG, a fim de se observar bandas mais notórias em gel e em *blotting*.

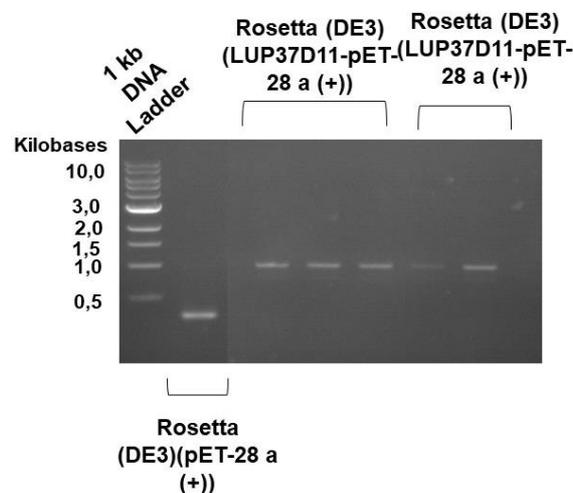


Figura 25. PCR de colônias Rosetta™(DE3) transformadas com LUP37A10 e D11.

5.4. Expressão dos scFvs em culturas de 100 mL

O LUP37C11 foi o primeiro dos três scFvs selecionados para a expressão em 100 mL em Rosetta™(DE3). O cromatograma da purificação de afinidade pode ser observado na Figura 26, com um pico de 40 mAU em apenas 25 mM de imidazol (5% de tampão de eluição). Picos menores de UV foram observados durante todas as etapas de eluição da amostra, como demonstra a mesma figura. Uma vez que esses ruídos poderiam indicar também a possível presença do anticorpo, amostras de cada porcentagem de eluição foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% (Figura 27). As amostras T7 e T8 referem-se ao pico de eluição em 25 mM de Imidazol; T12 e T13 de 50 mM, e T19 de 100 mM. Juntamente a elas, foram aplicadas ao gel o pellet restante após lise celular (corpos de inclusão) diluído quinze vezes e amostra decorrente das proteínas que não se ligaram na coluna e foram descartadas da mesma na etapa de lavagem (*flow-through*).

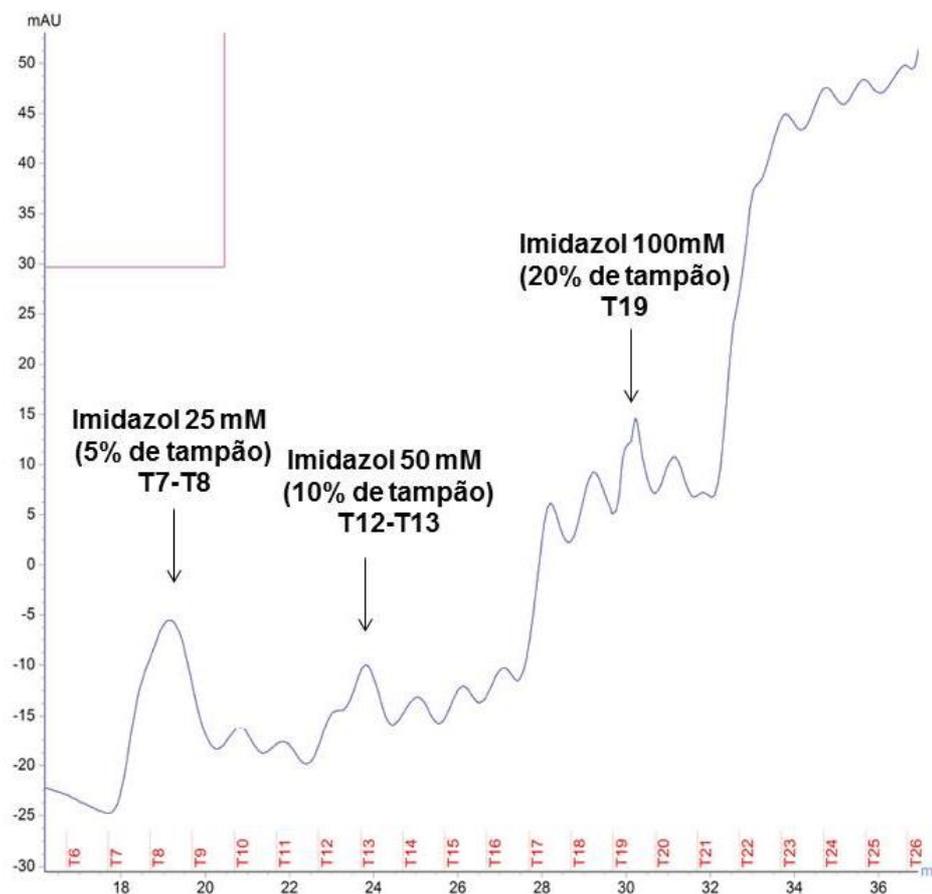


Figura 26. Cromatograma de LUP37C11.

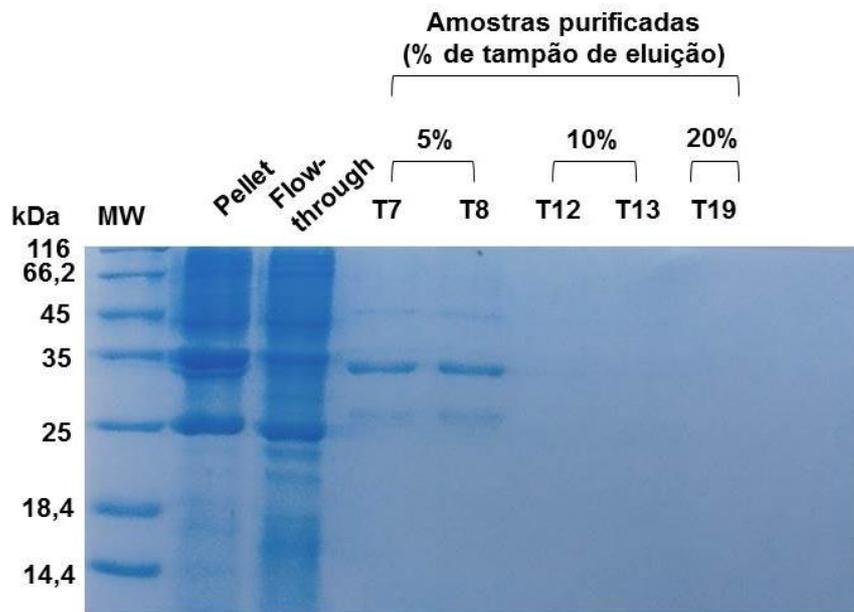


Figura 27. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37C11.

Como é possível observar, bandas visíveis só foram obtidas em T7 e T8, com as bandas principais próximas ao marcador de 35 kDa. Ainda mais, uma banda forte do mesmo tamanho fora observada na amostra de corpos de inclusão, logo abaixo de outra banda demasiadamente expressa (Figura 27). Suspeitou-se que essa banda, juntamente com as observadas em T7 e T8 de mesmo tamanho tratavam-se do scFv LUP37C11 e, para isso, as amostras foram submetidas a procedimento de *western blotting* (Figura 28).

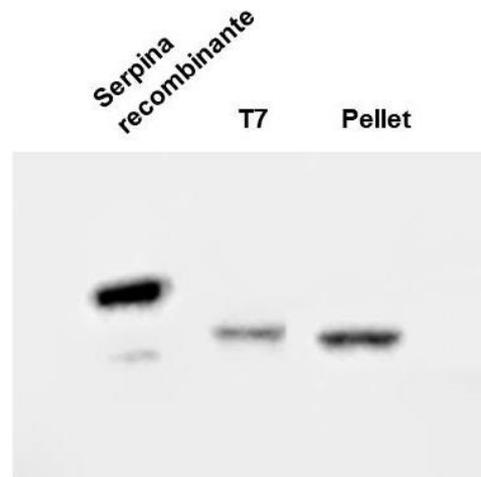


Figura 28. Western Blotting do pico T7 e pellet (corpos de inclusão).

Através do *western blotting*, foi possível identificar a presença do anticorpo scFv tanto em T7-T8 quanto no pellet (corpos de inclusão). Uma vez que o pellet foi diluído 15 vezes para o experimento, e aplicado apenas 10 μ L dessa diluição, chegou-se à conclusão de que grande parte da proteína recombinante fora mantida de modo insolúvel em corpos de inclusão, de modo a necessitar de lise celular via agente desnaturante.

A expressão foi refeita com a presença de ureia, e o cromatograma pode ser observado na Figura 29. Verificaram-se três picos em concentrações diferentes de tampão de eluição, um pico de aproximadamente 35 mAU em 5% de tampão (amostras T7-T8), outro de 60 mAU em 10% de tampão (T11-T12), e o último de 50 mAU em 20% de tampão (T16-T17). Uma das hipóteses para a diferença entre as cromatografias da expressão com e sem ureia reside no fato da interação da His-tag com a coluna cromatográfica divergir quando a proteína está em sua conformação correta e quando está desnaturada. A estabilidade da proteína é uma característica fundamental para a retenção dela na cromatografia de afinidade (IVANOVA *et al.*, 2016), e a desnaturação por ureia já demonstrou alterar a retenção de moléculas em outros métodos cromatográficos, como de troca iônica (KHADEMI; MOSTAFAIE, 2010) e de interação hidrofóbica (FENG; JIANG; GENG, 1995).

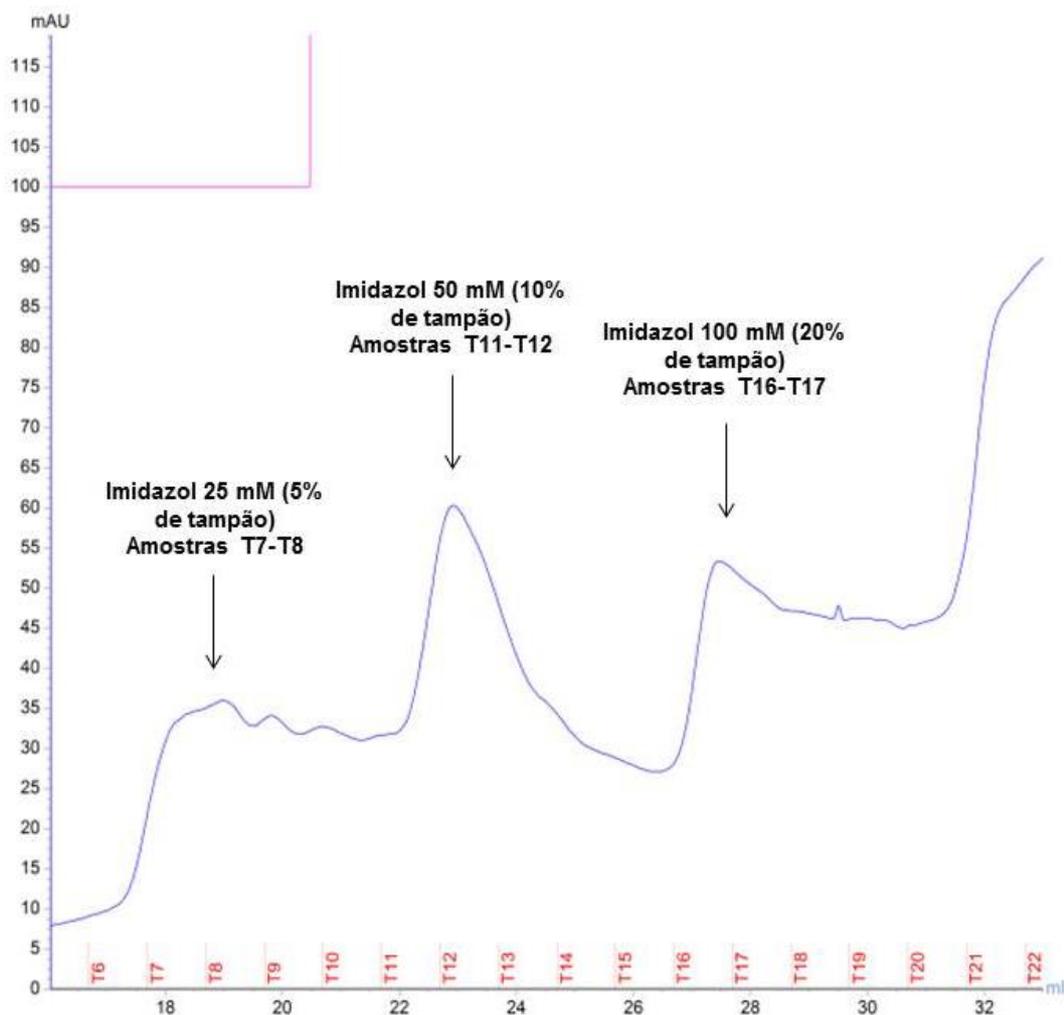


Figura 29. Cromatograma de LUP37C11 extraído com ureia 8 M.

As amostras dos picos de purificação foram aplicadas em um gel SDS-PAGE 10% (Figura 30). As amostras de 20% de tampão de eluição culminaram em bandas poucos visíveis no gel. Todavia, o anticorpo scFv foi observado nas eluições tanto de 5% quanto de 10%, com tais amostras apresentando também uma banda de contaminação próxima ao marcador de 25 kDa.

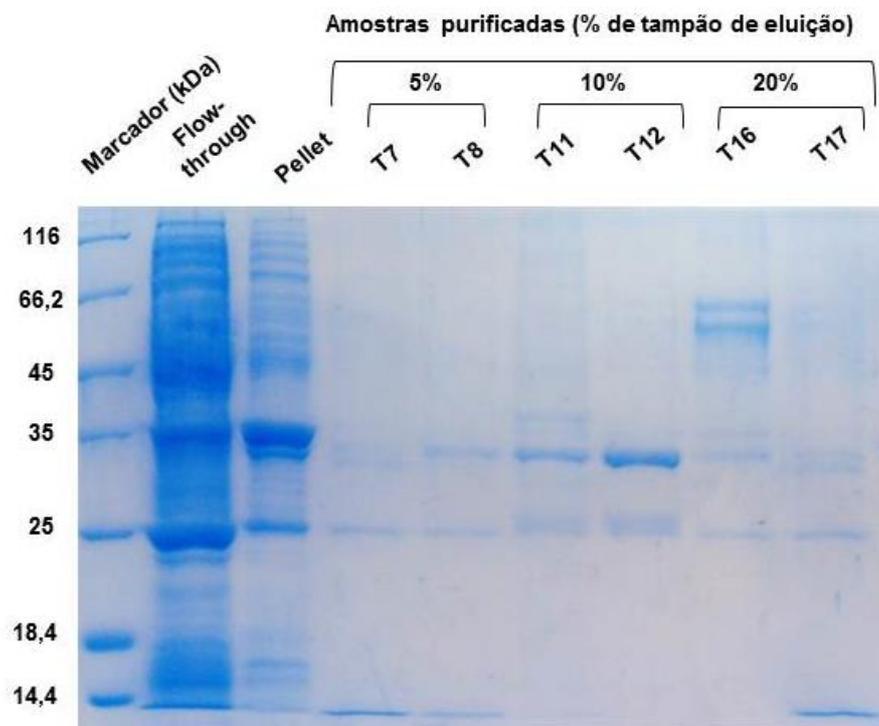


Figura 30. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37C11 extraído com ureia 8 M.

Para fins comparativos, os clones LUP37A10 e LUP37D11 foram expressos e purificados nas mesmas condições. As cromatografias dos respectivos scFv podem ser visualizadas nas Figuras 31 e 32, enquanto os géis podem ser observados nas Figuras 33 e 34. Enquanto LUP37A10 foi purificado sem a presença de contaminantes a 5%, a proteína LUP37D11 apresentou um resultado semelhante ao LUP37C11 – presença do scFv em 5% e 10% de tampão de eluição, ambos com a presença de outros contaminantes. É interessante denotar, portanto, que LUP37C11 e LUP37D11 possuem não apenas uma alta similaridade em suas sequências, mas também em suas expressividades e purificações.

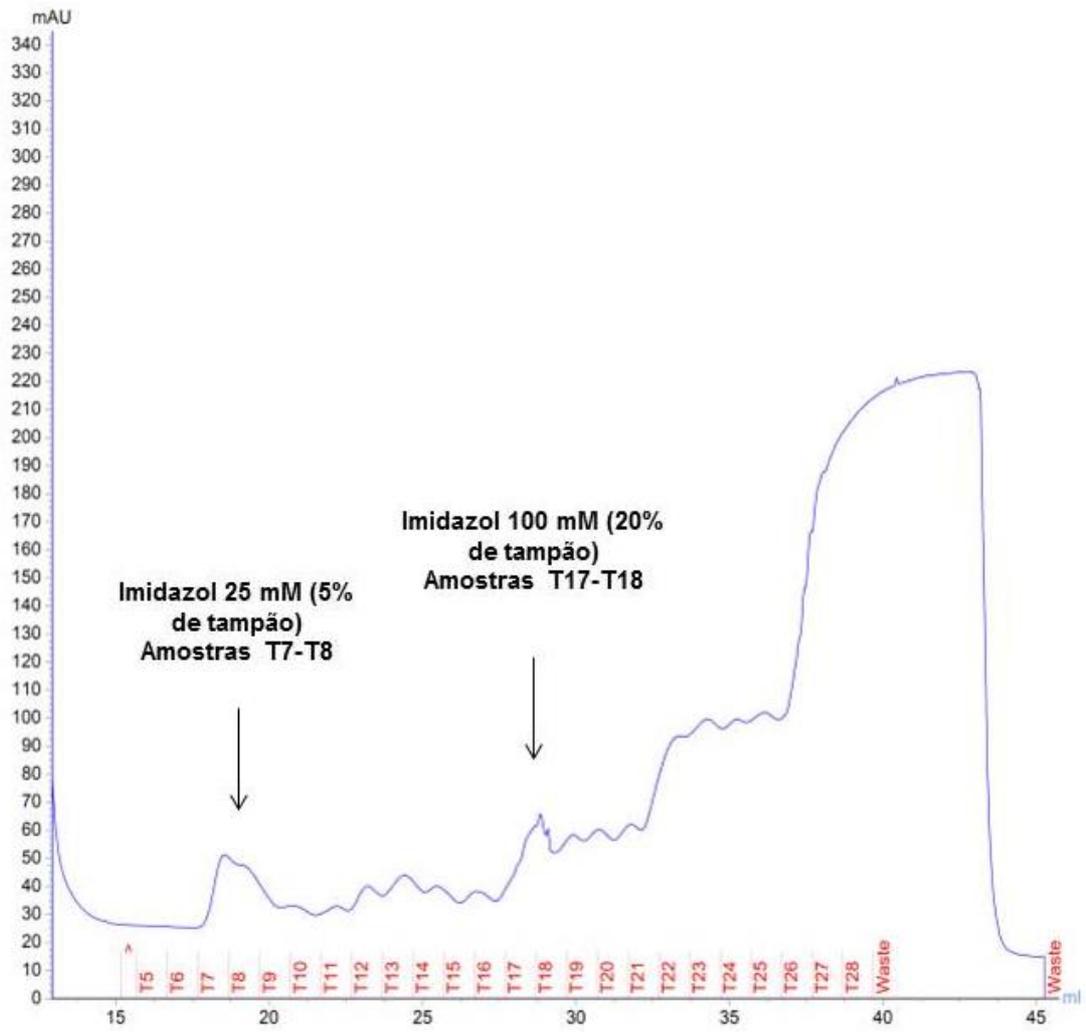


Figura 31. Cromatograma de LUP37A10 extraído com ureia 8 M.

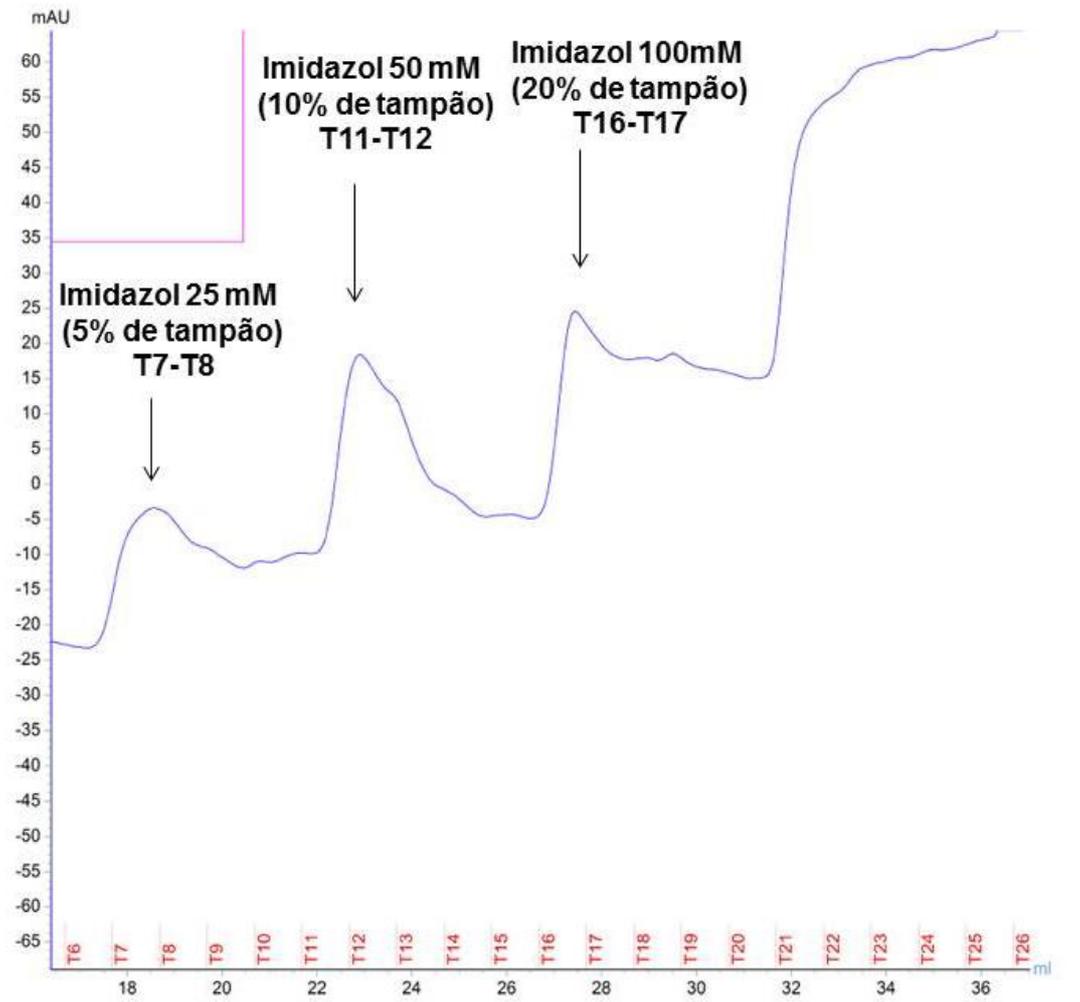


Figura 32. Cromatograma de LUP37D11 extraído com ureia 8 M.

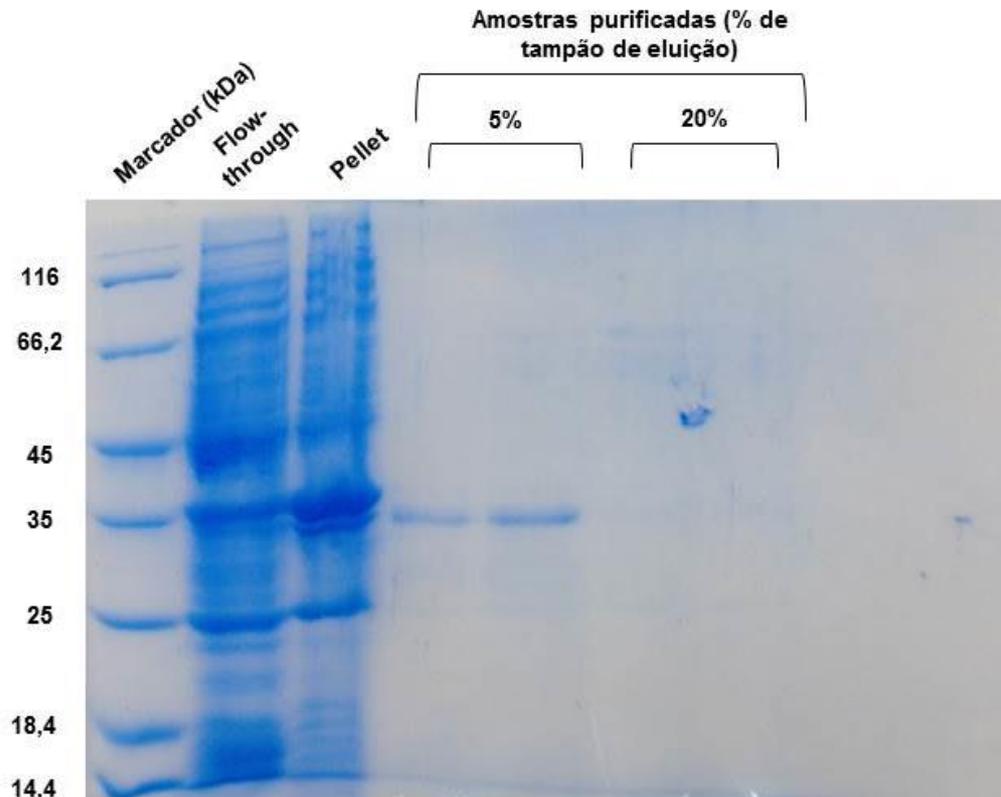


Figura 33. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37A10 extraído com ureia 8 M.

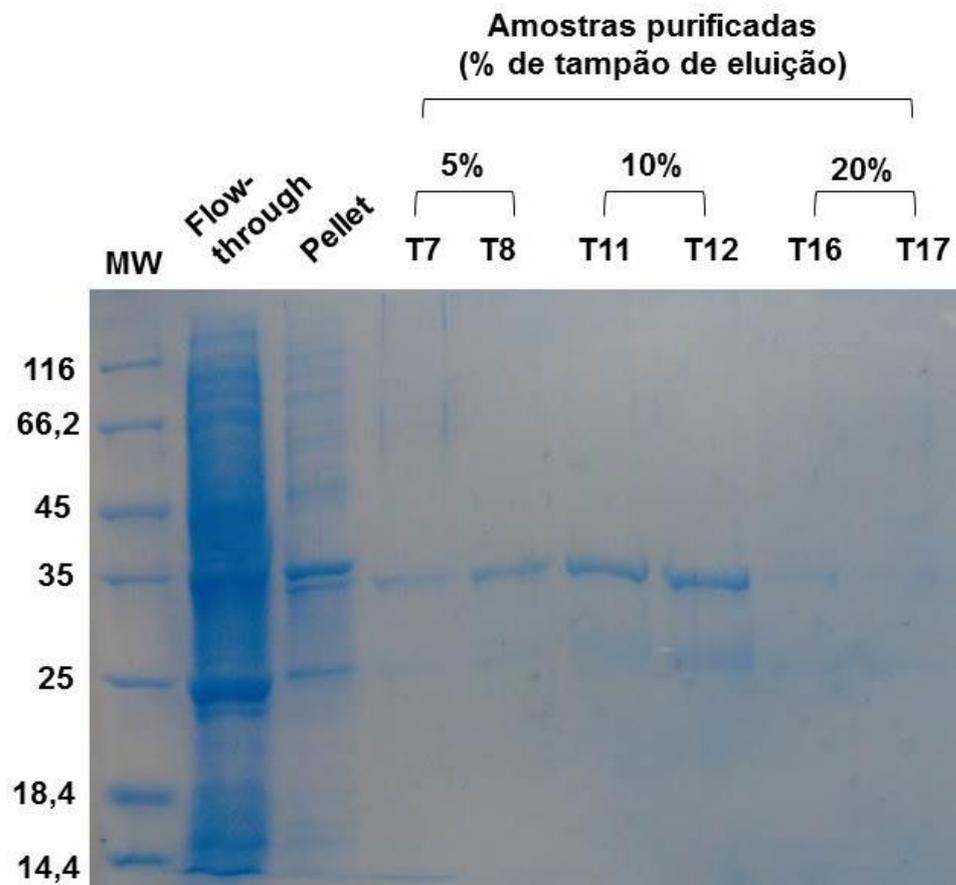


Figura 34. Gel SDS-PAGE 10% dos picos de purificação de LUP37D11 extraído com ureia 8 M.

Ainda mais, a purificação de LUP37A10 apresentou vários ruídos durante todo gradiente de eluição, sendo distinguidos apenas dois picos mais notórios, em 5% e 20% de tampão de eluição. Entretanto, a banda do scFv foi observada na menor concentração de imidazol (25 mM), sem contaminantes. A hipótese é que os demais ruídos da cromatografia foram resultantes da contínua diluição de contaminantes, uma vez que, observando-se os géis dos outros clones, os contaminantes mais concentrados foram encontrados nos picos de 10% e 20% de tampão, sem a presença de tais ruídos.

Todas as amostras eluídas com 25 mM de imidazol dos três clones foram concentradas e aplicadas novamente em gel SDS-PAGE 10% e analisadas via *western blotting* (35 e 36). A única amostra medida, devido a sua pureza, foi o LUP37A10, com concentração de 85 ng/ μ L, totalizando 42,4 μ g de proteína. Através das concentrações, foi possível evidenciar ainda mais a presença de contaminantes, precisamente de aproximadamente 66 e 25 kDa, juntamente com os scFv LUP37C11 e LUP37D11 expressos. Para o *blotting*, as amostras dos LUP37C11 e D11 foram diluídas na proporção 1:2 e adicionados apenas 10 μ L das diluições, enquanto que para LUP37A10 foram adicionados 20 μ L de amostra não diluída, culminando em bandas de mesma intensidade para todos os anticorpos, demonstrando que os anticorpos LUP37C11 e D11 foram obtidos em uma concentração aproximadamente quatro vezes maior que LUP37A10.

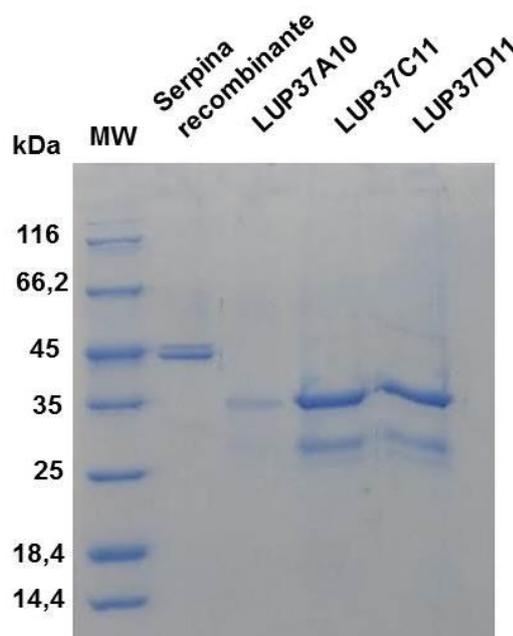


Figura 35. Gel SDS-PAGE 10% das amostras contendo os três scFv concentrados.

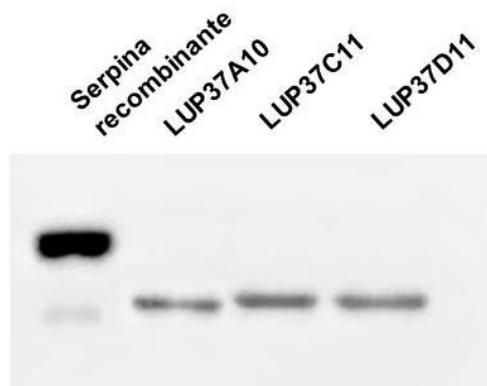


Figura 36. Western blotting das amostras dos três scFv concentradas.

Ainda assim, a purificação por cromatografia de afinidade de His-tag não se demonstrou um método eficaz, uma vez que apenas um dos três clones foram obtidos puros, diferentemente de outras proteínas purificadas pelo grupo de pesquisa no mesmo sistema de cromatografia. A contaminação na cromatografia de afinidade com uso de His-tag por proteínas intrínsecas de *E. coli* não é um fenômeno completamente incomum em estudos de biologia molecular. As bactérias possuem proteínas que carregam sequências de resíduos de histidina que também possuem afinidade pelo níquel, como a SlyD (20,8 kDa), uma proteína que atua no dobramento de certos polipeptídios e que possui uma sequência C-terminal com 15 resíduos de histidina. Já a ArnA (74,3 kDa) possui resíduos de histidina separados na estrutura primária que, quando enovelados na estrutura terciária, são expostos na superfície da molécula formando *clusters* possuintes de afinidade ao níquel (ANDERSEN; LEKSA; SCHWARTZ, 2013). Um mecanismo semelhante também ocorre na glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (66 kDa), que possui resíduos de histidina sequencialmente próximos, atuante na conversão de frutose-6-fosfato para glucosamina-6-fosfato para utilização do nitrogênio na célula (ROBICHON *et al.*, 2011).

Outras proteínas, como a anidrase carbônica II (25 kDa), essencial para a intercoversão de gás carbônico e bicarbonato, e o componente E1 do complexo piruvato desidrogenase (99 kDa), presente na conversão de piruvato em acetil-CoA e CO₂, também apresentam resíduos de histidina que influenciam a afinidade com o níquel da coluna cromatográfica (ROBICHON *et al.*, 2011).

Diversos outros métodos foram estabelecidos na tentativa de aumentar a pureza de proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*. Dentre eles, destacam-se a utilização de linhagens de *E. coli* modificadas para expressar uma glutamina-frutose-6-fosfato

aminotransferase cujo *clusters* de histidina são substituídos por grupamentos de alanina (ROBICHON *et al.*, 2011), linhagens onde algumas das demais proteínas supracitadas são expressas de modo fusionado a um sítio de ligação à quitina para exclusão pelo uso de resina de quitina (ROBICHON *et al.*, 2011), e bactérias com modificações nos genes da SlyD e ArnA (ANDERSEN; LEKSA; SCHWARTZ, 2013).

A clonagem do gene da proteína de interesse em outros vetores com *tags* mais específicas também podem corroborar com uma purificação mais limpa. O epítipo FLAG é uma sequência polipeptídica de aproximadamente 1 kDa que se liga especificamente a anticorpos monoclonais anti-FLAG presentes na coluna cromatográfica, tornando-se um sistema de cromatografia de afinidade altamente seletivo. A Strep-Tag II é uma sequência polipeptídica de oito aminoácidos que possui forte afinidade à streptavidina, uma proteína isolada da espécie *Streptomyces avidinii*, também carregada em colunas cromatográficas (LICHTY *et al.*, 2005).

Todavia, devido à pandemia de COVID-19 e cenário de isolamento, não foi possível estudar e realizar outros métodos de purificações nos clones LUP37C11 e LUP37D11 para a obtenção desses scFv sem contaminantes. Assim sendo, foi optado por seguir adiante com os experimentos de IC₅₀ apenas com o clone LUP37A10.

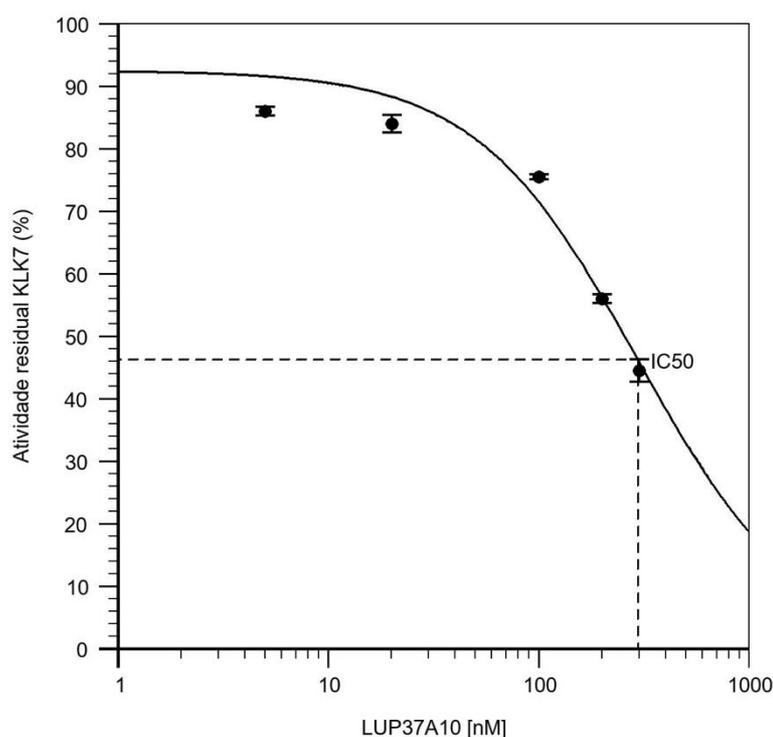
5.5. Teste de IC₅₀

Os valores de concentração do LUP37A10 utilizados juntamente com as atividades residuais medidas da KLK7 recombinante podem ser visualizados na Tabela 6, cuja representação gráfica está detalhada na Figura 37. A máxima concentração utilizada do anticorpo foi 300 nM; maiores concentrações acarretaram em precipitação nas amostras, impedindo leituras de fluorescência com $R^2 > 0,5$.

Através do ensaio, foi possível visualizar uma inibição máxima de 53% da atividade da KLK7 recombinante com 300 nM do scFv LUP37A10 (Tabela 6), culminando em um IC₅₀ de aproximadamente 297 nM (Figura 37). O resultado é divergente com o obtido previamente com o mesmo clone no formato scFv-Fc, que consegue inibir 50% da atividade de KLK7 recombinante em uma concentração de apenas 0,81 nM (LAUREANO *et al.*, 2020).

Tabela 6. Atividade residual de KLK7 recombinante (%) por LUP37A10.

LUP37A10 [nM]	Atividade residual KLK7 (%)
5	87 ± 1,4
20	83 ± 2,1
100	76 ± 0,7
200	57 ± 1,5
300	47 ± 2,6

**Figura 37.** Gráfico de IC₅₀ de LUP37A10 contra KLK7 recombinante.

Entretanto, o resultado ainda é corroborante com o encontrado em diversas bibliografias, que denotam que moléculas scFv possuem uma menor estabilidade quando comparados com seus clones scFv-Fc, apesar da variância de estabilidade entre anticorpos scFv distintos ser alta e ser precisamente objeto de estudo para a melhora da produção de moléculas mais estáveis (NIAN *et al.*, 2016).

Quanto à precipitação das amostras em ensaio de inibição em concentrações maiores que 300 nM do anticorpo, a estabilidade do scFv está relacionada em diferentes

graus com os fenômenos de agregação e precipitação proteica, além de proteólise e hidrólise (MILLER *et al.*, 2010). Uma vez que os demais clones scFv não foram completamente purificados, a escassez de um estudo comparativo entre as moléculas impede uma conclusão se o aspecto de precipitação é exclusivo da molécula LUP37A10 ou se é compartilhado com as outras sequências selecionadas.

O grau de estabilidade de um anticorpo scFv muitas vezes está associado com instabilidades intrínsecas das sequências VH e VL (WÖRN; PLÜCKTHUN, 1999) e como os três clones variam apenas na região VL, seria interessante visualizar se os LUP37C11 e D11 apresentariam resultados semelhantes. Apesar de outras bibliografias sobre scFv de outros alvos não constar aspectos de precipitação, não existe, até o dado momento do presente trabalho, bibliografia publicada de outros anticorpos scFv produzidos especificamente contra a KLK7 e suas atividades inibitórias, inviabilizando ainda mais comparações.

Todavia, é importante ressaltar que uma biomolécula com IC_{50} menor que $1 \mu M$ é considerada como um potencial ponto de início para avançar em estudos de química medicinal (MACINTYRE; RAMACHANDRUNI; BURROWS *et al.*, 2018), e o scFv descrito está dentro dessa possibilidade. Apesar de ser também almejado moléculas finais com um IC_{50} menor que 10 nM (MACINTYRE; RAMACHANDRUNI; BURROWS *et al.*, 2018), deve ser levado em conta que a geração de um anticorpo scFv em bactéria é notoriamente mais barata que a geração de clones scFv-Fc em células de mamíferos, cujas manutenções exigem meios de cultura e soros mais caros, sendo o quesito econômico um ponto positivo em contrapartida da atividade dos fragmentos de anticorpos. Sendo assim, apesar do clone LUP37A10 não ter demonstrado uma forte inibição quando comparado ao seu formato scFv-Fc, a sua purificação e caracterização inibitória é uma realização conspícua para o futuro dos estudos dessas moléculas e alvo.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O trabalho aqui apresentado visou ao estudo de anticorpos scFv anti-KLK7 selecionados via *phage display* expressados em *E. coli*, desde às sequências nucleotídicas e peptídicas, até a expressão, purificação, e ensaio de atividade inibitória. A pesquisa reafirmou as dificuldades presentes hoje no desenvolvimento biotecnológico quanto à obtenção de tais moléculas, tanto quanto à baixa expressividade como as problemáticas do conseguimento das proteínas efetivamente purificadas na produção em *E. coli*.

Ainda assim, certos resultados interessantes foram obtidos, como a seleção de uma linhagem de bactéria capaz de expressar tais clones, assim como a discussão de possíveis métodos que possuem potencial de minimizar a presença de contaminações na cromatografia de afinidade, dando a esse trabalho a possibilidade de ser revisado futuramente com outros métodos de purificação apresentados, visando à obtenção e comparação dos clones LUP37C11 e LUP37D11 não contaminados. Ainda mais, nosso laboratório possui scFv selecionados também contra as KLK3 e KLK6, de forma que esse trabalho e as dificuldades aqui apresentadas possam ser utilizadas em futuros projetos com demais scFv como uma base para novas estratégias de aquisição de clones anti-KLKs.

A única molécula purificada, LUP37A10, demonstrou o curioso caráter de precipitação, em concentrações acima de 300 nM, quando associado à KLK7 em ensaios de inibição. A absoluta escassez de bibliografia sobre outros scFv anti-KLK7 impede a confirmação que essa é uma característica exclusiva desse fragmento de anticorpo, ou se seria compartilhada com outros scFv anti-KLK7, possibilitando um estudo ainda mais aprofundado da relação antígeno-anticorpo. Não obstante, é de suma importância estudar se a concentração de 300 nM, ou demais concentrações aqui utilizadas, é capaz de alterar a desregulação epidérmica em modelos de Síndrome de Netherton.

Dessa forma, finaliza-se esse trabalho demonstrando-se que, apesar do forte potencial de moléculas scFv, ainda há muito a ser pesquisado e comparado para que um sistema bacteriano de expressão seja rentável e eficaz de modo universal aos fragmentos de anticorpos do tipo scFv, sendo essa pesquisa somada aos pontos cruciais que ainda precisam ser exaustivamente estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Zuhaida Asra *et al.* ScFv antibody: Principles and clinical application. **Clinical and Developmental Immunology**, [s. l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/980250>

ANDERSEN, Kasper R.; LEKSA, Nina C.; SCHWARTZ, Thomas U. Optimized E. coli expression strain LOBSTR eliminates common contaminants from His-tag purification. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [s. l.], v. 81, n. 11, p. 1857–1861, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.24364>

ARTIMO, Panu *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. W1, p. 597–603, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>

BORATYN, Grzegorz M. *et al.* BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 41, n. Web Server issue, p. 29–33, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt282>

CHANG, A. C.Y.; COHEN, S. N. Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of Staphylococcus plasmid genes in Escherichia coli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 1030–1034, 1974. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1030>

CHEN, Dequan; TEXADA, Donald E. Low-usage codons and rare codons of Escherichia coli. **Gene Therapy and Molecular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2006.

DEBELA, Mekdes *et al.* Structural basis for the Zn²⁺ inhibition of the zymogen-like kallikrein-related peptidase 10. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 397, n. 12, p. 1251–1264, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0205>

DEL ROSSO, James Q. Application of protease technology in dermatology: Rationale for incorporation into skin care with initial observations on formulations designed for skin cleansing, maintenance of hydration, and restoration of the epidermal permeability barrier. **Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 14–22, 2013.

DI BACCO, Alessandra *et al.* The SUMO-Specific Protease SENP5 Is Required for Cell Division. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 4489–4498, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.02301-05>

DI CERA, Enrico. Serine proteases. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/iub.186>

DIAMANDIS, Eleftherios P. *et al.* The new human kallikrein gene family: Implications in

carcinogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 54–60, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(99\)00225-8](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(99)00225-8)

EISSA, A. et al. Serum kallikrein-8 correlates with skin activity, but not psoriatic arthritis, in patients with psoriatic disease. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 2, p. 317–325, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0251>

ELISABETH EKHOLM, I.; BRATTSAND, Maria; EGELRUD, Torbjörn. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: A missing link in the desquamation process? **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 114, n. 1, p. 56–63, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00820.x>

EREZ, E.; FASS, D.; BIBI, E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 371–378, 2009. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature08146>

FARSHDARI, Farzaneh *et al.* The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in escherichia coli. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 56, p. 2–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000317861>

FAULKNER, Melinda J. *et al.* Functional plasticity of a peroxidase allows evolution of diverse disulfide-reducing pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 18, p. 6735–6740, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0801986105>

FENG, Wenke; JIANG, Xinqi; GENG, Xindu. The influence of urea on the retention of protein in hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 217–226, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826079508009233>

FISCHER, Jan; MEYER-HOFFERT, Ulf. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - From physiology to diseases to therapeutic options. **Thrombosis and Haemostasis**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 442–449, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1160/TH12-11-0836>

GALLENO, M.; SICK, A. J. Baculovirus Expression Vector System. In: FERNANDEZ, J.; JAMES, P. H. **Gene Expression Systems**. 1ª edição. Carlsbad, Estados Unidos. Elsevier, p. 331-363, 1999.

GROFF, K.; BROWN, J.; CLIPPINGER, A. J. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1787–1798, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.004>

GUPTA, Nishi *et al.* Mutations in the prostate specific antigen (PSA/KLK3) correlate with male infertility. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10866-1>

HAILFINGER, Stephan; REBEAUD, Fabien; THOME, Margot. Adapter and enzymatic functions of proteases in T-cell activation. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 232, n. 1, p. 334–347, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00830.x>

HAN, Donghui *et al.* A novel anti-PSMA human scFv has the potential to be used as a diagnostic tool in prostate cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 37, p. 59471–59481, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10697>

HEDSTROM, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cr000033x>

HU, Xuejun *et al.* Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 194–201, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.08.009>

HUST M, *et al.* Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. **Methods Mol Biol**. v. 1101, p. 305-320, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-721-1_14. PMID: 24233787.

HUST, M. *et al.* A human scFv antibody generation pipeline for proteome research. **Journal of Biotechnology**, v. 152, n. 4, p. 159–170, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.945>

IVANOVA, Nadezhda *et al.* We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . **Intech**, [s. l.], v. i, n. tourism, p. 13, 2016.

JACKSON, D., ROBERT H., BERG P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 69, n. 10, 1972, p. 2904-2909, 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.69.10.2904>

KATO, Tatsuya *et al.* Development of Rous sarcoma Virus-like Particles Displaying hCC49 scFv for Specific Targeted Drug Delivery to Human Colon Carcinoma Cells. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 3699–3707, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11095-015-1730-2>

KHADEMI, Fatemeh; MOSTAFAIE, Ali. Effect of urea on protein separation by ion-exchange chromatography. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 735–741, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jb/mvq008>

KISHIBE M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the

epidermis. **J Dermatol Sci.**, v. 95, n. 2, p. 50-55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.06.007>

KISHIBE M., *et al.* Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 8, p. 5834-5841, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M607998200>. Epub 2006 Dec 19. PMID: 17182622.

KOMATSU, N. *et al.* Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes [3]. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 126, n. 10, p. 2338–2342, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700379>

KOMATSU, N. *et al.* Proteolytic processing of human growth hormone by multiple tissue kallikreins and regulation by the serine protease inhibitor Kazal-Type5 (SPINK5) protein. *Clinica Chimica Acta*, v. 377, n. 1–2, p. 228–236, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.10.009>

LAUREANO, Ana Flávia S. *et al.* Generation of recombinant antibodies against human tissue kallikrein 7 to treat skin diseases. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 30, n. 23, p. 127626, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127626>

KÜGLER, J. *et al.* Generation and analysis of the improved human HAL9/10 antibody phage display libraries. *BMC biotechnology*, v. 15, p. 10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0125-0>

LICHTY, Jordan J. *et al.* Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 98–105, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.019>

LU, Rwei Min *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>

LUNDWALL, Å; BRATTSAND, M. Kallikrein-related peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 13, p. 2019–2038, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8024-3>

MACINTYRE, F.; RAMACHANDRUNI, H.; BURROWS, J. *et al.* Injectable anti-malarials revisited: discovery and development of new agents to protect against malaria. **Malar J.** v. 17, n. 402, p. 1-18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2549-1>

MAKSUM, *et al.* Safety Aspect of Recombinant Protein Produced by Escherichia coli: Toxin Evaluation with Strain and Genomic Approach. In: RODRIGO, Luís. E. *Coli Infections: Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. 1ª edição. **Intechopen**, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92031>

MASHOOF S, CRISCITIELLO MF. Fish Immunoglobulins. **Biology (Basel)**, v. 5, n. 45, p. 1-23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology5040045>

MILLER, Brian R. *et al.* Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 549–557, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/protein/gzq028>

MOREAU, Marie Eve *et al.* The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal of pharmacological sciences**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 6–38, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1254/jphs.SRJ05001X>

NIAN, Siji *et al.* Development and identification of fully human scFv-Fcs against *Staphylococcus aureus*. **BMC Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0146-z>

OBIEZU, Christina V.; DIAMANDIS, Eleftherios P. Human tissue kallikrein gene family: Applications in cancer. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 224, n. 1, p. 1–22, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.024>

OLIVEIRA, Jocélia P.C. *et al.* Vioserpin, a serine protease inhibitor from *Gloeobacter violaceus* possibly regulated by heparin. **Biochimie**, [s. l.], v. 127, p. 115–120, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.006>

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305–318, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)

PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. **Allergologia et Immunopathologia**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 579–591, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.011>

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 19–20, p. 2161–2172, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5160-x>

PUENTE, X. S. *et al.* A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 331–334, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST0330331>

RIBEIRO, Vanessa da Silva *et al.* Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 156, n. 1–2, p. 59–67, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.005>

RIEDL, Stefan J. *et al.* Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. **Nature**, [s. l.], v. 434, n. 7035, p. 926–933, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature03465>

ROBICHON, Carine *et al.* Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize E. coli Protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 13, p. 4634–4646, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00119-11>

SAN-MIGUEL, Teresa; PÉREZ-BERMÚDEZ, Pedro; GAVIDIA, Isabel. Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in E. coli is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>

SEBAUGH, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 128–134, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pst.426>

SENDER, Matthias *et al.* Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. **Gut**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 430–439, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-300771>

SEO, Min Jeong *et al.* Engineering antibody fragments to fold in the absence of disulfide bonds. **Protein Science**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 259–267, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.31>

SHEN, Zhihong *et al.* Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 1910–1917, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac7018624>

SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SMITH, S L. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. **Journal of transplant coordination: official publication of the North American Transplant Coordinators Organization (NATCO)**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 109–119; quiz 120–121, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/090591999600600304>

TAMMEN, Stephanie A.; FRISO, Simonetta; CHOI, Sang Woon. Epigenetics: The link between nature and nurture. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 753–764, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018>

TOLIA, Niraj H.; JOSHUA-TOR, Leemor. Strategies for protein coexpression in Escherichia coli. **Nature Methods**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 55–64, 2006. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/nmeth0106-55>

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2092>

TURK, Boris. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2092>

VEVERIS-LOWE, T. L. et al. Seminal fluid characterization for male fertility and prostate cancer: Kallikrein-related serine proteases and whole proteome approaches. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 33, n. 1, p. 87–99, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-958467>

VIDARSSON G, DEKKERS G, RISPENS T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. **Front Immunol.**, v. 5, n. 520, p. 1-17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. 4ª edição. Porto Alegre, Artmed, 2014.

WANG, Ming Rong *et al.* Bacterial expression and characterization of a novel human anti-IgE scFv fragment. **mAbs**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 495–499, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.3.5.16087>

WANG, You *et al.* An Engineered Rare Codon Device for Optimization of Metabolic Pathways. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep20608>

WIDDEL, Friedrich. Theory and Measurement of Bacterial Growth. [s. l.], p. 1–11, 2010.
WÖRN, Arne; PLÜCKTHUN, Andreas. Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: Identification, classification, and improvement by protein engineering. **Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 27, p. 8739–8750, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi9902079>

YOUSEF, George M.; KISHI, Tadaaki; DIAMANDIS, Eleftherios P. Role of kallikrein enzymes in the central nervous system. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 329, n. 1–2, p. 1–8, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00004-4)