

# CONSTRUÇÃO DE UM VETOR DE EXPRESSÃO PARA FRAGMENTOS DE ANTICORPOS ANTI-CD3 HUMANOS COM POTENCIAL IMUNORREGULATÓRIO

## CONSTRUCTION OF AN EXPRESSION VECTOR FOR FRAGMENTS OF HUMAN ANTI-CD3 ANTIBODIES WITH IMMUNOREGULATORY POTENTIAL

Rafaella Carvalho Lima Corrêa<sup>1</sup>, Marcelo de Macedo Brígido<sup>2</sup>

### Como citar:

Corrêa RCL, Brígido MM. Construção de um vetor de expressão para fragmentos de anticorpos anti-cd3 humanos com potencial imunorregulatório. Rev. Cient. Sena Aires. 2018; 7(2): 80-7.

### RESUMO

Construiu-se um novo vetor para expressão de fragmentos de anticorpos anti-CD3 humano (pMIREs FvFc R – Fc mutado) com potencial imunorregulatório. Foram utilizadas técnicas de clonagem no vetor pUC 57 e no vetor de expressão pMIREs FvFc R por meio de transformação bacteriana por choque térmico; seguida de preparação do DNA plasmidial em pequena e média escala; digestão dos mesmos com enzimas de restrição, e posterior análise e extração do DNA plasmidial por eletroforese. A clonagem foi confirmada pela técnica de sequenciamento de Sanger. Este trabalho resultou na construção de um novo cassete para expressão de fragmentos de anticorpos anti-CD3 humano contendo duas mutações na região variável e uma mutação na porção Fc, que se acredita que melhore a produção heteróloga do anticorpo. A construção deste novo vetor de expressão, com a adição da sequência de exportação de RNA e mutações na porção Fc, buscou contribuir para a caracterização e aprimoramento das características ligantes e efetoras dos anticorpos monoclonais anti-CD3.

**Descritores:** Anticorpos monoclonais; Anticorpos humanizados anti-CD3; Imunoterapia; Clonagem bacteriana.

### ABSTRACT

We built a new vector for expressing anti-CD3 human antibodies fragments (pMIREs FvFc R – Fc mutated) with immunoregulatory potential. We used cloning techniques for transferring a synthetic antibody fragment cloned in pUC 57 vector to the pMIREs FvFc R expression vector by bacterial transformation by heat shock; then preparation of plasmidial DNA in small and medium scale; as well as the digestion of the same with restriction enzymes and subsequent analysis and extraction of plasmid DNA by electrophoresis. Cloning procedure were confirmed by Sanger sequencing. This work resulted in the construction of a new cassette for expression of human anti-CD3 antibody fragments containing two mutations in the variable region and a mutation in the Fc portion, which is believed to enhance the heterologous production of the antibody. The construction of this new expression vector, with the addition of the RNA export sequence and mutations in the Fc portion, sought to contribute to the characterization and enhancement of the binding and effector characteristics of the anti-CD3 monoclonal antibodies.

**Descriptors:** Monoclonal antibodies; Humanized anti-CD3 antibodies; Immunotherapy; Bacterial cloning.

# REVISA

<sup>1</sup> Bióloga. Especialista em Análises Clínicas. Universidade de Brasília. Distrito Federal, Brasil.  
rclcorrea@gmail.com

<sup>2</sup> Biólogo. Doutor em Bioquímica. Universidade de Brasília. Distrito Federal, Brasil.  
brigido@unb.br

Recebido: 02/03/2018  
Aprovado: 12/04/2018

## INTRODUÇÃO

O sistema imunológico humano possui uma série de mecanismos de defesa contra agentes infecciosos que conferem um estado de imunidade ao indivíduo. Este sistema é composto por células, moléculas e tecidos que coordenam a ação contra antígenos gerando a chamada resposta imunológica.<sup>1</sup> No mecanismo de resposta imunológica adquirida, o indivíduo entra em contato com o antígeno e o organismo ativa uma imunidade humoral ou celular, mediada pelos linfócitos, requerendo uma rápida expansão e diferenciação linfocitária, eliminação dos microrganismos e formação de uma memória imunológica duradoura.<sup>1,11</sup> Este mecanismo é altamente especializado e eficaz devido às suas características de especificidade, memória, expansão clonal, especialização, contração e homeostasia, e não reatividade própria.<sup>1</sup>

O estado de imunidade humoral de um indivíduo é o processo de resposta imunológica mediada por moléculas proteicas denominadas anticorpos, produzidas pelo linfócitos B, que tem um papel fundamental na identificação e neutralização de antígenos. Este sistema de defesa imunológica é realizado pela ligação das imunoglobulinas aos aloantígenos ou autoantígenos, induzindo a neutralização do microrganismo, fagocitose e ativação do sistema complemento e outros mediadores de inflamação.<sup>1,11</sup> As reações de autoimunidade de um indivíduo ocorrem quando o sistema imune deste indivíduo não responde adequadamente aos estímulos antigênicos. Isto pode ocorrer devido ao baixo reconhecimento dos antígenos “não self” (estranhos ou aloantígenos), alta reatividade aos antígenos próprios, ou uma resposta indevida levando à estimulação imune e reação inflamatória.<sup>1,11</sup> Para isso, o sistema imune possui um mecanismo de ação reguladora que atua no reparo de tais eventos. Este sistema de regulação atua por meio do contato celular e dos mecanismos dependentes das citocinas, estimulando ou suprimindo o organismo. Entretanto, quando há falhas nos mecanismos de regulação da resposta imune ocorre o aparecimento de doenças como o câncer, doenças autoimunes, alergias e outras infecções.<sup>11</sup>

O papel central realizado pelas células T consiste no reconhecimento dos alo ou autoantígenos, produzindo uma resposta imune.<sup>1,17,18</sup> Contudo, alguns indivíduos não reconhecem determinados antígenos e podem desenvolver falhas na sua tolerância imunológica, perdendo capacidade de diferenciar os antígenos próprios e os não próprios, e favorecendo o surgimento de doenças autoimunes por meio do comportamento da células T reativas.<sup>1,11,12,21</sup>

Com os estudos envolvendo o papel do sistema imunológico e dos anticorpos, em 1975 George Köhler e Cesar Milstein avançaram nas pesquisas clínicas com a descoberta dos anticorpos monoclonais, por meio da técnica de hibridização, utilizando as células B de um animal imunizado com um antígeno e uma célula de mieloma linfocitário.<sup>1,7,16</sup> Esta técnica confere imortalidade aos clones e estes passam a produzir anticorpos com especificidade para apenas um determinado epítipo do antígeno.<sup>1,7,11</sup>

Inicialmente, a produção de anticorpos monoclonais, feita pela fusão de células de camundongos imunizados com mielomas murinos, provocou a rejeição do anticorpo por parte do sistema imunológico humano, pelo não reconhecimento das imunoglobulinas murinas.<sup>1,16</sup> Demonstrando que apesar do sucesso com o uso de anticorpos monoclonais, a aplicação clínica destes anticorpos murinos (Mabs) como imunobiológicos, poderia ocasionar uma série de respostas imunes prejudiciais ao paciente, conhecida como resposta HAMA (human anti-murine antibody).<sup>7,13,16</sup>

No entanto, devido ao grande potencial dos mAbs de uso terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes, infecciosas e câncer têm

sido buscadas estratégias para a diminuição da imunogenicidade das terapias com anticorpos monoclonais por meio do desenvolvimento de novas terapias imunossupressoras e terapias capazes de modular o efeito das células T autorreativas.<sup>7,9,10,12,14,15,17,21</sup> E terapias capazes de induzir a ação das células T reguladoras, tornando o indivíduo tolerante à antígenos próprios potencialmente antigênicos, limitando as respostas imunes e evitando o aparecimento das doenças autoimunes.<sup>1,3,4,11,14,21</sup>

O primeiro anticorpo monoclonal anti-CD3 humano, Orthoclone OKT3, aprovado em 1986 pela FDA (Food and Drug Administration – EUA) foi utilizado por décadas na prevenção da rejeição aguda em transplantes, mas teve seu uso interrompido por ocasionar o desenvolvimento de respostas imunogênicas adversas.<sup>3,4,14,17,18</sup>

As técnicas de humanização desses anticorpos e a manipulação molecular da sua porção Fc com propriedades imunossupressoras têm sido fundamentais para desenvolvimento de uma nova geração de anticorpos anti-CD3 humanos promissores na prevenção dos eventos de rejeição aguda e no tratamento de doenças autoimunes.<sup>2-4,10,12,14,17,18</sup>

Atualmente, a construção e a expressão de anticorpos recombinantes e seus fragmentos têm se tornando um importante instrumento diagnóstico e imunoterápico.<sup>2-5,7,8,17</sup> A manipulação desses fragmentos de anticorpos com a mesma especificidade de segmentação de mAbs inteiros têm minimizados alguns efeitos de imunogenicidade, estimulando a busca por novas técnicas alternativas para produção em grande escala, assim como o desenvolvimento das suas funções efetoras pela manipulação da região Fc, com a finalidade de minimizar as respostas imunológicas das imunoterapias.<sup>6,8</sup>

No grupo de Imunologia Molecular da UnB, nós estamos trabalhando com anticorpos recombinantes anti-CD3 humanizados com potencial imunorregulatório.<sup>4</sup> Nesse trabalho, construiu-se um novo vetor para expressão de fragmentos de anticorpos anti-CD3 humano (pMIREs FvFc R – Fc mutado), que contém a sequência codificadora de um fragmento de anticorpo anti-CD3 versão R com a porção Fc mutada, para posterior expressão em células de mamífero e caracterização das atividades ligante e efetora desse anticorpo, comparando com as construções de anti-CD3 humano já existentes.

## MÉTODOS

### Transformação bacteriana

Para a expressão de fragmentos de anticorpos anti-CD3 humanizados foi utilizada a técnica do DNA recombinante utilizando os vetores de clonagem pUC 57 e de expressão pMIREs FvFc R, construídos anteriormente.<sup>19</sup> Primeiramente, foi sintetizado um gene contendo uma mutação na região constante de cadeia pesada. A inserção deste gene no vetor plasmidial de clonagem pUC 57, dando origem ao vetor pUC 57  $\alpha$ -fc mutado, foi feita por transformação por choque térmico-CaCl<sub>2</sub>.<sup>20</sup> A linhagem bacteriana utilizada para a transformação dos fragmentos foi a *E. coli* Dh5 $\alpha$ .

### Preparação de DNA plasmidial

Foram feitas preparações do DNA plasmidial em pequena e média escala com os kits QIAGEN Plasmid Midi Kit e QIAprep Spin Miniprep Kit para confirmar a clonagem e obter um número suficiente de cópias do DNA plasmidial para a extrair os fragmentos.<sup>20</sup>

Digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição.

O vetor de clonagem pUC  $\alpha$ -fc mutado foi digerido com as enzimas Bam HI e Nhe I, e o vetor de expressão pMIREs com as enzimas Bgl II e Xba I. O DNA foi analisado e depois digerido com digestão cruzada para posterior eluição. As digestões dos plasmídios com as enzimas de restrição foram realizadas conforme as instruções dos fabricantes. E o tempo de incubação e a quantidade de material a ser digerido variavam de acordo com o interesse do experimento realizado.

Análise de DNA plasmidial em gel de agarose.

O DNA digerido foi analisado por eletroforese em gel de agarose. A agarose era preparada numa concentração de 0,7 a 1,0% em tampão TEB 1X ou TAE 1X com 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídeo e submetida à eletroforese em tampão TEB ou TAE 0,5X.<sup>20</sup> Foram utilizados também os marcadores 1 kb plus DNA Ladder, Low Mass DNA Ladder e High Mass DNA Ladder da Invitrogen para quantificação.

Eluição de fragmentos de DNA

Após a eletroforese, os fragmentos de DNA a serem eluídos foram cortados do gel de agarose, e a eluição do DNA do gel foi feita pelo método de Freeze-Squeeze, com as colunas para extração de DNA de gel de agarose Ultrafree DA @Centrifugal Unit.<sup>4</sup>

Ligação de fragmentos de DNA

Logo após a eluição dos fragmentos de DNA obtidos dos vetores pUC 57  $\alpha$ -fc mutado e pMIREs FvFc R, foi feita a ligação destes fragmentos pela enzima T4 DNA ligase. As concentrações de DNA (vetor e inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento, aplicando-se a seguinte fórmula: ( $\eta$ g vetor x tamanho do inserto em pb) / tamanho do vetor em pb x razão inserto =  $\eta$ g de inserto.<sup>4</sup>

As reações de ligação foram preparadas em tampão de ligase 1X contendo 1 $\mu$ L de T4 DNA ligase. Os sistemas possuíam 10 a 20  $\mu$ L de volume final, sendo incubados por 16 horas à temperatura ambiente. Após este período, o sistema era transformado em células competentes de E. Coli.

Sequenciamento de Sanger

Após ter sido realizada uma análise de restrição e seleção dos clones positivos das células transformadas, os plasmídios foram sequenciados pelo método de sanger, pela Helixxa Serviços Genômicos, SP.

## RESULTADOS

O grupo de Imunologia Molecular da UnB construiu duas versões de anticorpos anti-CD3 humanizados e esses anticorpos mostraram um perfil imunorregulatório com promissor potencial terapêutico.<sup>19</sup> Neste trabalho foi construído um novo cassete para expressão de fragmentos de anticorpos anti-CD3 humano contendo duas mutações na região variável e uma mutação na porção Fc.

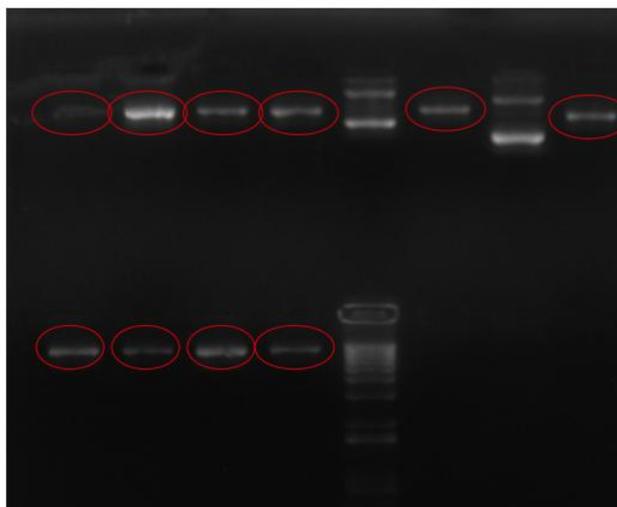
O novo vetor de expressão pMIREs R 17 anti-CD3 possui uma sequência de exportação de RNA, que acredita-se que melhore a produção heteróloga do anticorpo. Esse gene sintético foi desenhado por nós e produzido sob encomenda pela empresa Genescript. Foram feitas algumas tentativas de digestão do vetor de clonagem pUC 17  $\alpha$ -fc mutado e do vetor de expressão

pMIREs R, confirmadas por digestão pelas enzimas Bam HI, Nhe I, Bgl II, e Xba I (Figura 1).



**Figura 1**- Tentativa frustrada de digestão do pUC 17  $\alpha$ -fc mutado liberando um fragmento não correspondente à digestão com as enzimas Bam HI/Nhe I.

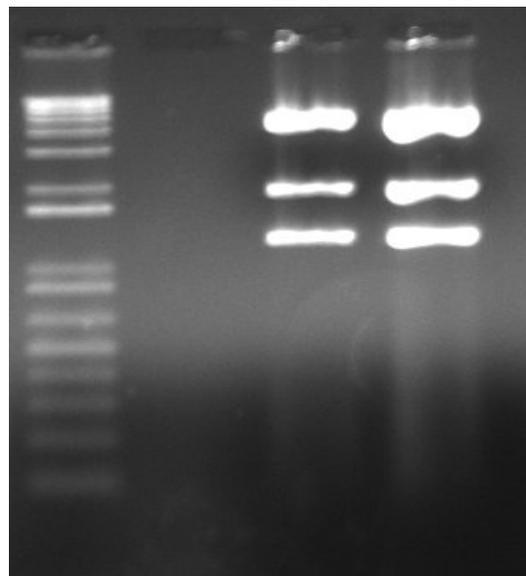
Após a confirmação da clonagem pelas enzimas Bam HI, Nhe I, Bgl II, e Xba I presentes no vetor de expressão pMIREs R, foram obtidos 12 clones da preparação deste DNA (Figura 2). Destes, dois clones foram utilizados para confirmar novamente a clonagem.



**Figura 2** -Confirmação dos 12 clones por digestão com a enzima de restrição xba I, confirmando os clones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11e 12. Brasília, 2016.

Os clones 9 e 11 foram confirmados por digestão com PflMI (presente no vetor resultante da clonagem) e eletroforese (Figura 3).

Após a clonagem, os clones da construção do vetor de expressão bicistrônico pMIREs FvFc R foram analisados utilizando a enzima de restrição PflMI (Figura 3) e o perfil originado estava de acordo com o esperado, confirmando a construção do vetor bicistrônico pMIREs 17 anti-CD3 (Figura 4).



**Figura 3-** Perfil de restrição confirmado por digestão com a enzima PflMI nos clones 9 e 11, respectivamente, revelando as bandas de tamanho 5021pb, 1946pb e 1259pb. Brasília, 2016.



**Figura 4-** Confirmação da clonagem do vetor pMIREs R, dando origem à construção pMIREs 17 anti-CD3. Brasília, 2016.

Posteriormente, foram confirmados por sequenciamento pelo método de Sanger. A montagem correta do vetor pMIREs17 foi confirmada. Dois clones (clone 9 e clone 11), dos 12 clones obtidos da preparação foram sequenciados pela Helixxa Serviços Genômicos, SP. Os reads obtidos confirmaram a clonagem proposta.

## CONCLUSÃO

A construção deste novo vetor de expressão, com a adição da sequência de exportação de RNA e mutações na porção Fc, buscou contribuir para a caracterização e aprimoramento das características ligantes e efectoras dos anticorpos monoclonais anti-CD3. Em uma nova etapa, passaremos para a caracterização dessa nova construção com a produção heteróloga e testes *in vitro* com a utilização da HEK293.

O trabalho obteve os resultados propostos esperados com a construção do novo vetor de expressão, apesar das dificuldades de clonagem devido à contaminação do material e dificuldades de digestão.

## REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
2. Andrade EV, Albuquerque FC, Moraes LMP, Brígido MM, Silva MAS. Single-Chain Fv with Fc Fragment of the Human IgG1. In: Construction, Pichia pastoris. Expression and Antigen Binding. Characterization J Biochem. 2000; 128: 891-95.
3. Bezerra MAG. Estratégias para expressão de um anticorpo anti-CD3 humanizado em células de mamífero. Brasília. Dissertação [Mestrado em Biologia Molecular] – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília; 2009.
4. Bezerra MAG. Estudo do perfil imunorregulatório de anticorpos humanizados anti-CD3. Brasília. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília; 2014.
5. Caldas C, Coelho VPCV, Rigden DJ, Neschich G, Moro AM, Brígido MM. Design and synthesis of germline-based hemi-humanized single-chain Fv against the CD18 surface antigen. Protein Engineering. 2000; 13(5): 353-60.
6. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6(5): 343-57.
7. Cordeiro MLS, Silva NLF, Vaz MRF, Nóbrega FFF. Anticorpos monoclonais: implicações terapêuticas no câncer. Rev Saúde Ciência On line. 2014; 3(3): 252-2.
8. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nat Biotechnol. 2005; 23(9): 1126-36.
9. Santiago KL. Construção e expressão de anticorpo humanizado a partir do anticorpo monoclonal contra proteína de 70 kDa de Sporotrix schenckii (P6E7). São Paulo. Tese [Doutorado – Faculdade De Ciências Farmacêuticas] - Universidade de São Paulo; 2013.
10. Lemos FBC, Moro AM, Rodrigues MTA, Garbuio A, Monteiro SM, Marques F, et al. A utilização do anti-CD3 Butantan no Transplante Renal. JBT. Jornal Brasileiro de Transplantes. 2006; 9:572-78.
11. Machado SL, Machado RD. Imunologia básica e aplicada às análises clínicas. Disponível em: <<http://www.cenapro.com.br/images/documentos/ImunologiaBasicaAplicadaaAnalisesClinicas.pdf>>.
12. Martin A, Tisch RM, Getts DR. Manipulating T cell mediated pathology:

- targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clin Immunol.* 2013;148(24): 136–47.
13. Pavlinkova G, Colcher D, Booth BJM, Goel A, Wittel UA, Batra SK. Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single-chain Fvs. *nt J Cancer.* 2001; 94(5):717-26.
  14. Penaranda C, Tang Q, Bluestone JA. Anti-CD3 therapy promotes tolerance by selectively depleting pathogenic cells while preserving regulatory T cells. *J Immunol.* 2011; 187(4): 2015–22.
  15. Rodrigues MTA, Moro AM. Anticorpos monoclonais para a clínica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 2001; 22(22): 32-5.
  16. Santos RV, Lima PMG, Nitsche A, Harth FM, Melo FY, Akamatsu HT, et al. Aplicações Terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.* 2006; 29(2): 77-85.
  17. Serpieri F, Inocencio A, Oliveira JM, Pimenta JAA, Garbuio A, Kalil J, et al. Comparison of Humanized IgG and FvFc Anti-CD3 Monoclonal Antibodies Expressed in CHO Cells. *Molecular Biotechnology.* 2010; 45: 218-25.
  18. Silva HM, Vieira PMMM, Costa PLN, Pimentel BMS, Moro AM, Kalil J, et al. Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology Letters.* 2009; 125: 129-36.
  19. Silva HM. Caracterização da atividade ligante e da função efetora de anticorpos humanizados anti-CD3 humano. Brasília. Dissertação [Mestrado] - Departamento de Biologia Celular - Universidade de Brasília; 2008.
  20. Souza MT, Brígido MM, Maranhão AQ. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. 2ª ed. Brasília: Editora UnB; 2016.
  21. Vieira PMMM. Estudo do perfil imunológico molecular em indivíduos transplantados renais com tolerância operacional. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Ciências] – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2009.