



**Francisco Bruno
Moreira Brás Gomes**

**SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MINI-
ANTICORPOS RECOMBINANTES ANTI-
CIPROFLOXACINA**



**Francisco Bruno
Moreira Brás Gomes**

**SELECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MINI-
ANTICORPOS RECOMBINANTES ANTI-
CIPROFLOXACINA**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Dr. João Paulo Medeiros Ferreira, Professor Auxiliar na Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa

À minha família por todo o apoio

o júri

presidente

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Doutor João Paulo Medeiros Ferreira
professor auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutora Sofia Marisa Volker Corte-Real
investigadora de pós-doutoramento da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

agradecimentos

A todos quantos contribuíram para a realização deste trabalho quero manifestar o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor João Paulo Ferreira, da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho, a orientação técnico-científica, o apoio, a motivação e o tempo dispendido desde o início das actividades experimentais até à revisão e discussão da presente dissertação. À Eng^a. Cristina Santos, pelo apoio técnico prestado na realização dos ensaios de HPLC. Ao Doutor António César Ferreira pelo apoio e ensinamentos relativamente às técnicas cromatográficas.

A todos os meus amigos e a todos os colegas de laboratório por todo apoio e camaradagem prestada durante a realização desta dissertação.

E um especial agradecimento ao Dr. Symon Riedstra, investigador de doutoramento da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, pela brilhante co-orientação, por tudo que me ensinou e pelas longas horas dispendidas nas realizações dos ensaios de laboratório, bem como discussão e escrita da dissertação. O meu sincero e profundo obrigado.

palavras-chave Imunoensaio, anticorpos recombinantes, *phage display*, fagos, ciprofloxacina, ELISA, esferas magnéticas, fragmentos de anticorpos

resumo

Este trabalho teve como objectivo central a obtenção de mini-anticorpos recombinantes com especificidade para o antibiótico ciprofloxacina (CPFX). A utilização em saúde humana, animal e vegetal deste antibiótico tornou-o, à semelhança de outros, um problema de contaminação ambiental. Actualmente, o doseamento de CPFX em amostras é feito, na maioria das vezes, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), o que é um método bastante moroso. Assim, há grande interesse em desenvolver métodos alternativos, rápidos e sensíveis para detecção daquele composto. Imunoensaios com recurso a anticorpos recombinantes, ou fragmentos de anticorpos, é uma via interessante e esta constitui o objectivo último desta investigação.

Para tal, neste trabalho escolheu-se efectuar uma selecção numa biblioteca de fagos (Griffin.1) que expressam mini-anticorpos de cadeia única (scFv's) à sua superfície (denominados phAbs), para isolar alguns com afinidade para CPFX, através da técnica de *phage display*.

O processo exigiu, num primeiro passo, a imobilização da CPFX num suporte sólido, tendo-se optado por esferas magnéticas. Efectuou-se a ligação covalente entre o grupo carboxílico da CPFX e os grupos amina à superfície das esferas por reacção com carbodiimida. Conseguiu-se uma aparente saturação dos grupos amina com CPFX. Para quantificação de CPFX nas soluções, foi previamente desenvolvido e validado um método de HPLC que se distingue de outros métodos reportados.

Seguidamente, efectuou-se um protocolo de selecção sobre a biblioteca de mini-anticorpos acima referida utilizando as esferas derivatizadas com CPFX. Em vários ciclos sucessivos de selecção, a eluição das esferas de phAbs (específicos) foi efectuada com quantidades decrescentes de CPFX livre em solução, e com tempos de eluição também decrescentes, de modo a promover uma pressão selectiva cada vez mais apertada. Desenvolveu-se também um método para separar phAbs eluídos da CPFX em solução, baseado em cromatografia de exclusão molecular.

Para testar a afinidade e especificidade de phAbs, desenvolveu-se com sucesso métodos de ELISA que empregam as esferas magnéticas derivatizadas com CPFX e os próprios phAbs (em vez dos mini-anticorpos separados dos fagos).

Após quatro ciclos de selecção, analisaram-se por ELISA 32 clones, tendo-se detectado cinco clones com afinidade por CPFX. Procedeu-se, então, à sequenciação dos genes dos fragmentos daqueles cinco clones, mas só três deles tiveram resultados conclusivos. Curiosamente, todos três correspondem a fragmentos V_L , e não a scFv's, sendo que dois são da mesma família (VKII). Produziram-se os phAbs dos três clones e analisaram-se em ELISA competitiva, a fim de identificar aqueles que ligam CPFX em solução, e não apenas CPFX imobilizada nas esferas. Apenas dois dos phAbs satisfizeram este critério, mas só um (correspondente ao clone 406) mostrou um comportamento regular na ELISA. Este ensaio mostrou um limite de detecção de CPFX de 9,3 nM. Analisou-se também por ELISA competitiva a especificidade deste phAb, verificando-se que ele possuía reactividade cruzada com outras três fluoroquinolonas, mas não com outros dois antibióticos não-quinolonas.

Os fragmentos V_L , separados dos fagos, do clone 406 foram produzidos com sucesso por cultura de *E. coli* em pequena escala, conforme confirmado por análise *dot blot*.

Este conjunto de resultados sugere como trabalho futuro a produção em maior escala de fragmentos isolados, bem como o desenvolvimento e a validação de imunoensaios para detecção e quantificação de CPFX em amostras ambientais.

keywords

Immunoassay, recombinant antibodies, *phage display*, phages, ciprofloxacin, ELISA, magnetic beads, antibody fragments

abstract

The main objective of this research was to obtain recombinant mini-antibodies with specificity for the antibiotic ciprofloxacin (CPFX). The use of this drug in human, animal and plant health turned it an environmental problem, like many other antibiotics. Currently, quantification of CPFX is carried out most often by high performance liquid chromatography (HPLC), which is a time demanding method. Therefore, it is of interest to develop rapid, sensitive, alternative methods for detection of that compound. Immunoassays using recombinant antibodies, or their fragments, constitute an interesting route and this is the ultimate goal of this research.

For that purpose, the strategy followed was to carry out a selection procedure in a library of phage particles (Griffin.1) that express single-chain antibodies (scFv's) at their surface (named phAbs), in order to isolate a few with affinity for CPFX.

This process required, as a preliminary step, the immobilization of CPFX on to a solid support. Magnetic beads were chosen for this purpose. The covalent linkage between CPFX molecules and amine groups at the surface of the beads was carried out by a carbodiimide-mediated reaction. An apparent saturation of the amine groups in the beads was attained. In order to quantify CPFX in the solutions, a HPLC protocol, different from others previously reported in the literature, was developed and validated.

Next, a selection procedure was executed on the above mentioned library and using the CPFX-derivatized beads. In the various cycles of selection, the elution of (specific) phAbs from the beads was attained with decreasing quantities of free CPFX in solution, and with decreasing contact times, in order to provide an increasing selective pressure. A method to separate the eluted phAbs from CPFX in solution based on size-exclusion chromatography was also developed.

In order to test the affinity and specificity of phAbs, ELISA methods employing the magnetic beads-CPFX and the phAbs themselves (instead of the mini-antibodies separated from the phages) were successfully developed.

After four rounds of selection, 32 clones were analysed by ELISA. Of these, five showed affinity for CPFX. The sequencing of the genes of the antibody-fragments in those five clones was then carried out, but with conclusive results only for three of them. Curiously enough, all three correspond to V_L fragments, and not to scFv's. Two of them belong to the same family (VKII). The phAbs of the three clones were produced and then tested in competitive ELISA, in order to identify those that bind CPFX in solution, besides CPFX bound to the beads. Only two of the phAbs fulfilled this criterion, but only one (corresponding to clone 406) showed a regular pattern in ELISA. This assay showed a limit of detection of CPFX of 9.3 nM. The specificity of this phAb was also studied by competitive ELISA. It was observed that it has cross-reactivity with three other fluoroquinolones, but not with two other antibiotics non-quinolones.

V_L fragments, separated from the phage, from the clone 406 were successfully produced by *E. coli* culture in small scale, as confirmed by *dot blot* analysis.

This set of results suggest as future work the production in larger scale of isolated antibody fragments, followed by the development and validation of immunoassays for detecting and quantifying CPFX in environmental samples.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice	ix
I – Introdução	1
1 - Antibióticos como problema ambiental	3
1.1 - Fluoroquinolonas como promotores de resistência bacteriana	4
1.2 - Métodos de detecção de fluoroquinolonas	6
2 – Imunoensaios	7
2.1 - Selecção de anticorpos clássica: anticorpos policlonais e monoclonais	7
2.2 - Selecção de anticorpos recombinantes	8
3 - <i>Phage display</i>	9
3.1 – Formatos de anticorpos recombinantes	11
3.2 - Bibliotecas e tipos de bibliotecas	13
3.3 - Selecção por afinidade	14
3.4 - Expressão e purificação de anticorpos recombinantes	16
3.5 - <i>Phage display</i> de <i>haptens</i>	16
3.6 - Biblioteca Griffin.1 e pHEN2	18
4 – Objectivos e estratégia do trabalho	20
II – Procedimentos	21
1 – Imobilização de ciprofloxacina em esferas magnéticas	23
1.1 – Material	23

1.2 – Métodos	24
1.2.1 – Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detector UV	24
1.2.2 – Reacção de imobilização de ciprofloxacina	24
2 – <i>Phage display</i>	26
2.1 – Material	26
2.1.1 – Material biológico	26
2.1.2 – Reagentes e meios	26
2.2 - Métodos gerais	27
2.2.1 - Extração de DNA por fervura	27
2.2.2 - Amplificação dos fragmentos por PCR	27
2.2.3 – Electroforese em gel de agarose	27
2.2.4 – Análise de restrição dos produtos de PCR com enzima de restrição <i>Bst</i> NI	28
2.2.5 - Amplificação e purificação de phAbs resultantes	28
2.2.6 - Titulação de phAbs	29
2.2.7 - ELISA a partir de esferas magnéticas	29
2.3 – Métodos	30
2.3.1 – Análise da diversidade da biblioteca Griffin.1	30
2.3.2 – Cromatografia de exclusão molecular dos phAbs eluídos	30
2.3.3 – Ciclos de selecção por <i>Phage Display</i>	31
2.3.4 – ELISA dos fagos obtidos ao longo dos ciclos de selecção	32
2.3.5 – PCR de clones individuais	33
2.3.6 – ELISA de clones individuais	33
2.3.7 – RFLP de clones individuais	33
2.3.8 – Sequenciação dos fragmentos isolados	34
2.3.9 – ELISA competitiva	34
3 – Análise do fragmento V _L isolado	35
3.1 – Produção em pequena escala	35

3.2 – <i>Dot blot</i>	36
III – Resultados e Discussão	37
1 – Imobilização de CPFX em esferas magnéticas	39
1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) com detector UV	39
1.2 – Reacção de Imobilização de CPFX	40
2 – Selecção por <i>phage display</i>	43
2.1 – Análise da diversidade da biblioteca Griffin.1	43
2.2 – Cromatografia por exclusão molecular dos phAbs eluídos	43
2.3 – Ciclos de selecção por <i>phage display</i>	46
2.4 – ELISA dos fagos obtidos ao longo dos ciclos de selecção	49
2.5 – PCR de clones individuais	51
2.6 – ELISA de clones individuais	53
2.7 – RFLP de clones individuais	54
2.8 – Sequenciação dos fragmentos obtidos	55
2.9 – ELISA Competitiva	56
2.10 – ELISA competitiva com outras fluoroquinolonas e com outros antibióticos	58
3 – Análise do fragmento isolado	60
3.1 – Produção em pequena escala e <i>dot blot</i>	60
IV – Conclusões	63
V – Proposta para trabalho futuro	69
VI – Bibliografia	73
VII – Anexos	81

I – Introdução

1. - *Antibióticos como problema ambiental*

Os antibióticos são uma ferramenta valiosa no tratamento de infecções bacterianas, tendo a sua introdução revolucionado a indústria farmacêutica. Para além do tratamento de infecções humanas, eles têm outras aplicações. Uma grande quantidade de antibióticos é usada no meio agro-pecuário, tanto para prevenir, como para tratar doenças e infecções; a adição de pequenas doses à alimentação animal promove o seu crescimento. Os antibióticos são igualmente utilizados para controlar infecções bacterianas em frutas e vegetais. Devido ao seu uso generalizado, não é surpreendente que resíduos de antibióticos sejam encontrados no meio ambiente, incluindo lençóis de águas de superfície (rios, lagos, etc.) e subterrâneos (Hartmann *et al.*, 1998).

A presença de antibióticos no meio ambiente tem perturbado o delicado balanço dos microrganismos nos ecossistemas. Ao longo de milhares de anos, as bactérias têm desenvolvido uma variedade de estratégias para coexistirem, incluindo a capacidade de produzir antibióticos para competir umas com as outras. Outros microrganismos ganharam a capacidade de destruir estes antibióticos, tornando-se estirpes resistentes. Ambos os tipos de bactérias sempre coexistiram. No entanto, antes do uso generalizado dos antibióticos, as estirpes resistentes eram apenas uma pequena fracção no ecossistema. O seu consumo em larga escala provocou desequilíbrios no ecossistema por actuarem sobre as bactérias susceptíveis e criarem assim um ambiente favorável para o crescimento de estirpes resistentes (Hartmann *et al.*, 1998). Assim, as estirpes resistentes (quer nocivas, quer não nocivas) têm vindo a substituir as bactérias susceptíveis. Um factor importante que contribui para esta resistência é a transferência de genes de resistência entre diferentes estirpes e/ou diferentes espécies, processo designado por transferência genética horizontal. Os elementos genéticos transferidos (geralmente presentes em plasmídeos) contêm muitas vezes factores de resistências a mais de um tipo de antibiótico. Quando estes elementos são transferidos, formam-se estirpes multi-resistentes, que resistem a várias classes de antibióticos distintos. São cada vez mais frequentes os surtos de infecções perigosas causadas por estas estirpes (Hartmann *et al.*, 1998).

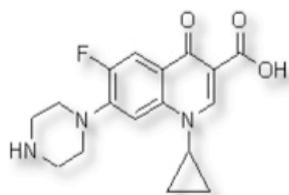
Vários factores, como características dos doentes, factores epidemiológicos locais,

políticas de utilização (uso em excesso, auto-medicação), falta de informação, uso generalizado em animais, etc., podem contribuir para a ocorrência de organismos resistentes (*American Society for Microbiology*, 1995). Ao longo das últimas décadas, os antibióticos permitiram controlar várias doenças graves. No entanto, à medida que as estirpes resistentes aumentaram, os antibióticos deixaram de ser uma ferramenta tão eficiente como foram no passado (Hartmann *et al.*, 1998).

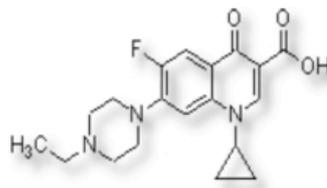
A monitorização dos antibióticos é uma parte integral do controlo de resistências, sendo necessárias medidas para identificar, monitorizar e estudar a resistência de bactérias, tanto no meio ambiente, como em meios clínicos e da indústria alimentar. Assim, uma parte importante da monitorização é a detecção e quantificação de antibióticos naqueles meios.

1.1 - Fluoroquinolonas como promotores de resistência bacteriana

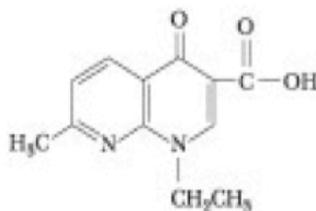
As quinolonas são uma classe de antibióticos derivada do ácido nalidíxico e são divididas em gerações (da 1ª à 4ª geração), baseadas no seu espectro antimicrobiano. A maioria das quinolonas com uso clínico pertence ao subgrupo das fluoroquinolonas, que contêm um átomo de flúor ligado ao anel central (Figura 1.1). As primeiras gerações são, geralmente, de maior espectro que as últimas. As de 1ª geração incluem o ácido nalidíxico e o ácido piromídico, entre outros. A ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina e ofloxacina, entre outros, pertencem à 2ª geração.



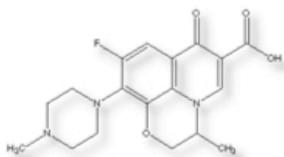
Ciprofloxacin



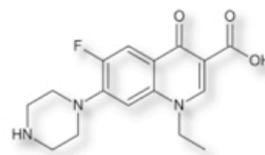
Enrofloxacin



Ácido nalidíxico



Ofloxacin



Norfloxacin

Figura 1.1 - Estrutura molecular do ácido nalidíxico e das quatro fluoroquinolonas mais comuns: ciprofloxacin, enrofloxacin, ofloxacin e norfloxacin.

A ciprofloxacin (CPFX) é uma fluoroquinolona estruturalmente relacionada com o ácido nalidíxico. Esta possui um átomo de flúor na posição 6, um grupo piperazina na posição 7 e um anel ciclopropilo na posição 1. As restantes fluoroquinolonas diferem nomeadamente no anel propilo e/ou no grupo piperazina (Brown, 1996).

As fluoroquinolonas são antibióticos bactericidas de largo espectro. Elas inibem a função das topoisomerasas, afectando a replicação e transcrição do DNA (Hawkey, 2003). Para a maioria das bactérias Gram-negativas, o alvo é a topoisomerase II (DNA girase), enquanto que para a maioria das bactérias Gram-positivas o alvo é a topoisomerase IV. Dado que as células eucarióticas não possuem DNA girase nem topoisomerase IV, as quinolonas não actuam nelas. As quinolonas entram facilmente nas células, sendo assim usadas para tratar patógenos intracelulares, tais como

Legionella pneumophila e *Mycoplasma pneumoniae*.

Na Europa, bem como em outras partes do mundo, as fluoroquinolonas são largamente utilizadas em aplicações humanas e veterinárias (Brown, 1996). A ciprofloxacina, no seu estado hidrocloreídrico é provavelmente a fluoroquinolona mais utilizada. Este antibiótico tem recebido atenção considerável nos últimos tempos porque foi aprovado nos EUA para o tratamento de antraz inalado (Hartmann *et al.*, 1998).

Sendo antibióticos de largo espectro, altamente eficientes, o seu uso extensivo tem provocado o desenvolvimento de estirpes resistentes (Acar e Goldstein, 1997; Blondeau e Yaschuk, 1996). A resistência a quinolonas pode desenvolver-se rapidamente, até mesmo durante o tratamento. Vários patogénios, incluindo *Staphylococcus aureus*, *enterococos* e *Streptococcus pyogenes* encontrados em diferentes locais do mundo, exibem resistência (Acar e Goldstein, 1997; Jacobs, 2005).

1.2. - Métodos de detecção de fluoroquinolonas

Devido ao uso extensivo nos centros urbanos, grandes quantidades de fluoroquinolonas têm sido encontradas em águas municipais, bem como em águas de superfície à volta destes centros (Hartmann *et al.*, 1998). A ciprofloxacina tem sido detectada em amostras de águas residuais em concentrações que variam desde 3 a 86 µg/L (Hartmann *et al.*, 1998). Outras fluoroquinolonas foram detectadas em efluentes primários e terciários, em níveis que variam entre 27 e 489 ng/L (Golet *et al.*, 2001; Golet *et al.*, 2003; Castiglioni *et al.*, 2005), bem como em águas de rios (Calamari *et al.*, 2003).

Em 1999, a Comissão Europeia estipulou limites máximos residuais para fluoroquinolonas presentes em carnes de várias espécies para consumo humano, em valores entre 100 e 300 µg/kg (European Commission, 1999). Desde então, têm sido desenvolvidos diversos métodos de detecção e quantificação destes antibióticos, sobretudo métodos cromatográficos (Ferdig *et al.*, 2004; Krol *et al.*, 1995; Manceau *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1992; Tuerk *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2001). No entanto, estes métodos cromatográficos são morosos e requerem uma extensiva limpeza da amostra.

Alguns imunoensaios contra fluoroquinolonas foram também desenvolvidos, que provaram ser mais sensíveis que o HPLC (Yuan *et al.*, 2001).

2. – *Imunoensaios*

Com o crescente apeto no controlo de qualidade alimentar, bem como de contaminação ambiental e de áreas clínicas, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e precisos para a detecção de contaminantes biológicos e químicos. Têm particular interesse testes que permitam dar respostas em minutos ou horas, a fim de serem tomadas acções correctivas com brevidade.

Uma alternativa rápida e de fácil execução (podendo ser automatizada, dependendo do método), são os imunoensaios. Estes são testes analíticos que utilizam moléculas específicas, geralmente anticorpos, como elementos de reconhecimento.

Os anticorpos tornaram-se, no século XX, uma das principais ferramentas da investigação em ciências da vida. Os diagnósticos baseados em anticorpos, tais como os imunoensaios, são largamente utilizados devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, bem como simplicidade, quando comparados com as técnicas cromatográficas.

2.1. - *Seleção de anticorpos clássica: anticorpos policlonais e monoclonais*

Diversos imunoensaios utilizam anticorpos policlonais. Estes são obtidos através de imunização de um hospedeiro adequado (rato, coelho, ovelha, etc.) com o antigénio alvo. Quando o título é satisfatório, o sangue é colhido, separam-se as células por centrifugação e obtém-se o soro contendo uma mistura de anticorpos (policlonais) que se ligam a diferentes epítomos do antigénio. Se necessário, pode-se purificar os anticorpos desejados por cromatografia de bioafinidade, utilizando uma coluna com antigénio imobilizado.

Apesar deste método não ser complicado, quando se necessita de mais anticorpos, é preciso repetir o processo, resultando em anticorpos policlonais com características diferentes dos do primeiro processo.

Os anticorpos monoclonais são produzidos por linhagem segregada e imortalizada de linfócitos B. Num primeiro passo, tal como no processo de obtenção de anticorpos policlonais, imuniza-se um hospedeiro adequado, estimulando-se a população de linfócitos B. Após alguns meses, estas células são colhidas e testadas para a produção de anticorpos específicos. Os linfócitos B sobrevivem em culturas apenas durante alguns dias, uma limitação contornada por fusão com linhagens de células cancerígenas, originando hibridomas imortais, que produzirão os anticorpos monoclonais.

Este método convencional de selecção e produção de anticorpos monoclonais em hibridomas resulta em linhas celulares com grande capacidade de produção, mas é bastante moroso e particularmente dispendioso.

2.2. - *Seleccção de anticorpos recombinantes*

Em 1989, desenvolveu-se um novo método de selecção de anticorpos, baseado na clonagem dos genes que codificam as regiões variáveis de cadeia pesada (V_H) e leve (V_L) da imunoglobulina G (Figura 1.3) em *Escherichia coli*. Estes genes eram expressos nestas bactérias como fragmentos de anticorpos responsáveis pela ligação ao antigénio. Nesta técnica eram criados repertórios de combinações variáveis de fragmentos V_H e V_L , designados bibliotecas combinatórias, com grande diversidade (milhões de anticorpos recombinantes diferentes) (Ward *et al.*, 1989).

Para seleccionar os anticorpos de interesse a partir destas bibliotecas combinatórias, um método difícil e lento de selecção de colónias utilizava antigénio radioactivo para identificar a pequena quantidade de clones produtores de anticorpos específicos (Hoogenboom, 2005). Um ano mais tarde, foi descrito um método baseado na expressão de fragmentos funcionais de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, denominado *phage display* (disposição em fagos) (McCafferty *et al.*, 1990). Esta técnica permite uma rápida selecção de anticorpos recombinantes a partir de bibliotecas de grande tamanho (Hoogenboom, 2005).

3. - *Phage display*

Phage display é uma técnica *in vitro* que permite o isolamento de anticorpos a partir de bibliotecas de anticorpos recombinantes, usando uma das plataformas de selecção que basicamente imitam o processo *in vivo*. Várias destas plataformas partilham quatro passos chave: 1º: geração da diversidade genotípica; 2º: emparelhamento do fenótipo com o genótipo; 3º: aplicação de pressão selectiva; 4º: amplificação dos genótipos/fenótipos seleccionados (Hoogenboom, 2005).

Várias são as plataformas de selecção de anticorpos recombinantes a partir de uma biblioteca, entre as quais: *phage display*, *ribosome display*, *yeast display*, etc. A disposição de anticorpos na superfície de fagos filamentosos (M13, fd e f1) é actualmente o método mais utilizado para a selecção de uma vasta colecção de anticorpos (Hoogenboom, 2005).

Em *phage display*, o peptídeo ou proteína de interesse é geneticamente fundido com uma proteína de superfície do bacteriófago, resultando na sua expressão à superfície do fago. O DNA codificante do produto da fusão é integrado no genoma do fago (Figura 1.2). Os fagos contendo fragmentos de anticorpos (tipicamente 1 a 5 cópias de um fragmento por fago) são denominados *phage antibodies* (phAbs).

Este processo de *phage display* é particularmente aplicado sobre colecções de genes de anticorpos recombinantes. Esta colecção de genes é então clonada num vector, a montante de um gene de proteína da superfície do fago, promovendo uma interligação entre o fenótipo do anticorpo e o seu material genético. A biblioteca de anticorpos é enriquecida por sucessivos ciclos de selecção contra o antigénio alvo. Após alguns ciclos, clones individuais são identificados e avaliam-se as suas especificidade e afinidade para o antigénio alvo.

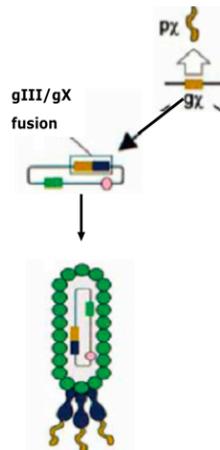


Figura 1.2 - Representação esquemática da ligação, por *phage display*, entre o genótipo (num fagemídeo) e o fenótipo, expresso na superfície do fago, de uma proteína pX, codificada pelo gene gX em fusão com o gene gIII da proteína de superfície pIII do fago. Adaptado de Willats, 2002.

A interligação entre a proteína disposta à superfície e o seu DNA codificante permite uma selecção rápida de uma enorme quantidade de proteínas ou peptídeos diferentes, por simples procedimento *in vitro*, chamado "selecção por afinidade" (*affinity selection*). Esta selecção por afinidade permite a identificação e o enriquecimento de phAbs que se ligam especificamente ao antígeno.

Num primeiro passo, o antígeno é imobilizado num suporte sólido; depois é incubado com a biblioteca de phAbs; os phAbs que não se ligam são retirados por lavagem e os que se ligam especificamente são eluídos por diferentes métodos, tais como mudança de pH, ou adição de agentes oxidantes, agentes proteolíticos ou de antígeno livre (Hoogenboom, 2002; Hoogenboom, 2005). Os phAbs eluídos são depois amplificados por infecção em *E. coli* podendo-se assim realizar novo ciclo de selecção. Os phAbs são analisados no final de cada ciclo, de modo a identificar o enriquecimento em clones específicos.

O sucesso da aplicação de *phage display* de anticorpos deve-se aos seguintes factores: o isolamento *de novo* de anticorpos de elevada afinidade a partir de bibliotecas, incluindo anticorpos contra antígenos do próprio organismo (auto-antígenos); geração de anticorpos com afinidades na ordem do picomolar, usando selecção por afinidade *in vitro*; descoberta de anticorpos com propriedades únicas em bibliotecas não imunes e bibliotecas imunes (Hoogenboom, 2005).

3.1. - Formatos de anticorpos recombinantes

Os anticorpos (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD) são moléculas altamente específicas de elevado peso molecular. O IgG, o principal anticorpo do soro sanguíneo, tem peso molecular aproximado de 150 kDa e possui um formato em forma de "Y". Esta molécula contém multi-domínios proteicos e os locais de ligação ao antígeno estão situados nos domínios Fab e as funções efectoras são mediadas pelo domínio Fc (Figura 1.3).

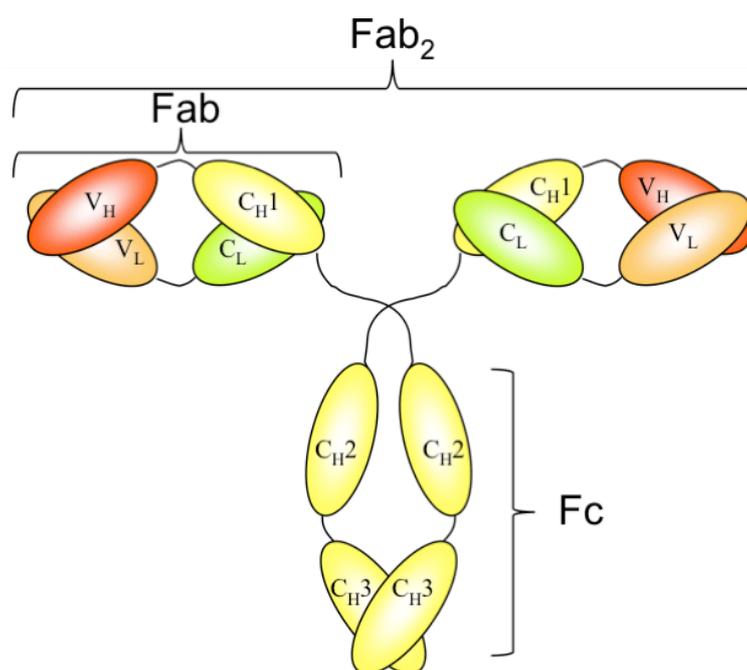


Figura 1.3 – Representação esquemática da estrutura de um anticorpo IgG. O domínio de ligação do antígeno consiste nas regiões variáveis da cadeia leve (V_L) e da cadeia pesada (V_H), representadas pela cor laranja e vermelho, respectivamente. Os domínios constantes de cadeia pesada C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} estão representados a amarelo e os domínios constantes de cadeia leve C_L , a cor verde. Imagem retirada de Joosten *et al.*, 2003.

Em IgG, os domínios Fab são constituídos por pares de segmentos de cadeia pesada/cadeia leve, em que cada cadeia possui regiões constantes e, nas extremidades, regiões hipervariáveis, específicas para determinado antígeno (Figura 1.3). Cada região variável possui três regiões complementares determinantes (*complementary determining regions*, CDRs), que são locais hipervariáveis de ligação directa a epítomos de antígenos (Holliger e Hudson, 2005).

Os IgG são bivalentes e esta característica permite um grande aumento da afinidade

aparente (devido ao aumento da avididade), traduzindo-se numa ligação mais efectiva ao antígeno (Holliger e Hudson, 2005). O domínio Fc possui funções efectoras citotóxicas e promove longos tempos de semi-vida no soro. No entanto, existe uma série de aplicações em que este domínio não é requerido, e até indesejável. Por exemplo, longos tempos de semi-vida no soro podem promover efeitos citotóxicos adversos (Holliger e Hudson, 2005). Inicialmente, o domínio Fc era removido dos IgG por clivagem com proteases (lisina, pepsina). Mais tarde, por engenharia genética, foram criados diversos formatos de fragmentos de anticorpos (Figura 1.4). Vários destes produtos estão agora em testes clínicos e pré-clínicos para aplicação em terapia molecular (Holliger e Hudson, 2005).

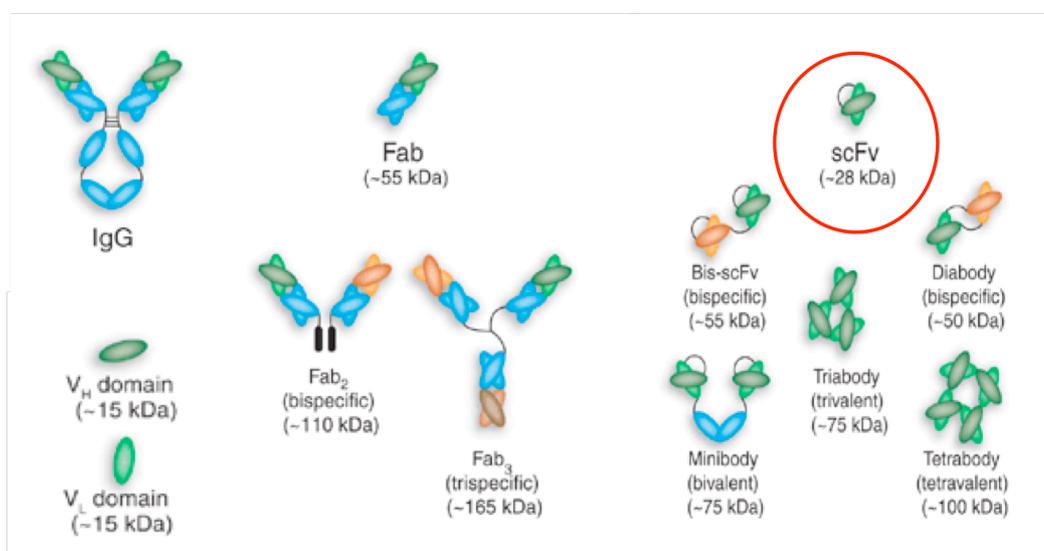


Figura 1.4 - Diferentes formatos de anticorpos recombinantes, construídos a partir da molécula de IgG (*Retirado de* Holliger e Hudson, 2005).

Os fragmentos Fv de cadeia única (*single chain Fv*, scFv) são um formato muito comum, formado pelos domínios V_H e V_L ligados por um polipeptídeo flexível, que previne a dissociação (Figura 1.4). Os formatos de Fab e scFv contêm ambos os domínios V_H e V_L e geralmente retêm a afinidade específica do IgG parental de forma monovalente, possuindo simultaneamente uma melhor capacidade farmacocinética de penetração em tecidos (Holliger e Hudson, 2005).

Vários formatos, aplicações, metodologias e sistemas de expressão de anticorpos recombinantes (Brown, 1996; Hudson e Souriau, 2003), bem como metodologias de selecção têm sido desenvolvidos nos últimos tempos (Hoogenboom, 2005), tendo revolucionado esta área da Biotecnologia.

3.2. - Bibliotecas e tipos de bibliotecas

As bibliotecas de anticorpos recombinantes são divididas em bibliotecas *naïve*, ou “não imunes” (bibliotecas obtidas a partir de animais não imunizados contra algo específico), e “imunes” (a partir de animais imunizados). Estas podem ser consideradas semi-sintéticas, caso haja manipulação em laboratório das sequências dos fragmentos de anticorpos, ou sintéticas, caso as sequências sejam inteiramente construídas *in vitro*.

As bibliotecas são construídas com genes de fragmentos V_H e V_L que são obtidos a partir de células B, por tecnologia de PCR, e clonados num vector de expressão apropriado. Estas bibliotecas são originadas por combinações aleatórias dos genes V_H e V_L , que são posteriormente seleccionadas para um determinado antigénio. Em comparação com a tecnologia de hibridoma, obtem-se uma quantidade mais vasta de anticorpos a partir de bibliotecas recombinantes imunes e, além disso, a selecção *in vitro* pode isolar anticorpos com raras especificidades (Hoogenboom, 2005).

As bibliotecas de anticorpos não imunes são compostas por fragmentos de anticorpos obtidos a partir de animais não imunizados e são construídas por rearranjos naturais de genes V, de modo a aumentar o repertório. Como tal, estes são úteis para seleccionar anticorpos contra uma maior variedade de antigénios. No entanto, tais anticorpos geralmente possuem menores afinidades do que os anticorpos obtidos a partir de bibliotecas imunes (Hoogenboom, 2005).

As bibliotecas sintéticas são construídas *in vitro* usando oligonucleotídeos que possuem regiões relativas aos CDRs de um ou mais genes V, completos ou degenerados. Estas bibliotecas possuem uma maior diversidade funcional.

As bibliotecas semi-sintéticas conjugam diversidade natural e sintética, sendo criadas de modo a aumentar a diversidade natural, mantendo um certo nível de funcionalidade. Por exemplo, estas bibliotecas são obtidas por introdução de rearranjos naturais e altamente funcionais de sequências CDR, em conjunto com a introdução de sequências sintéticas pequenas no local CDR3.

3.3. - Selecção por afinidade

Os diferentes anticorpos expressos na superfície de bacteriófagos são seleccionados com base na afinidade para um determinado antigénio, por uma técnica designada "selecção por afinidade" (*affinity selection*) (Figura 1.5). O processo consiste em ciclos sucessivos de selecção: os fagos, contendo anticorpos na sua superfície (phAbs), são incubados com antigénio imobilizado; seguem-se lavagens para remover os phAbs que não se ligam e posterior eluição para obter os phAbs que se ligam especificamente. A mistura de phAbs seleccionados é posteriormente amplificada, para utilização em novo ciclo de selecção.

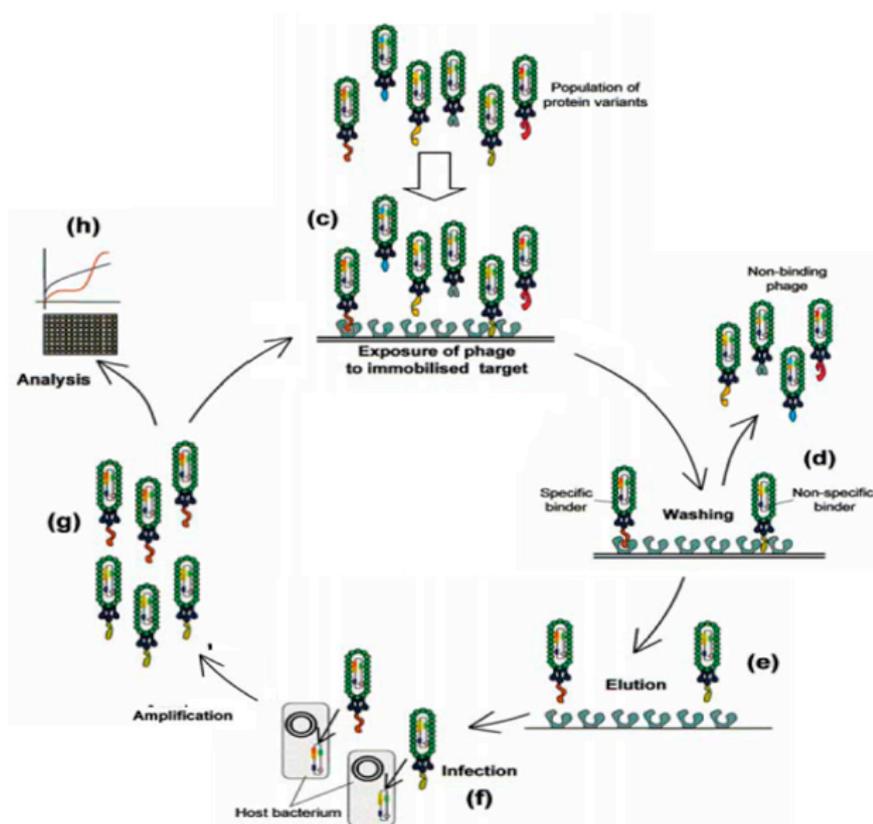


Figura 1.5 - Representação esquemática do processo de selecção por afinidade (*affinity selection*), em *phage display*. Numa fase inicial de selecção, a biblioteca de phAbs (fagos com fragmentos de anticorpos à superfície) é exposta ao antigénio imobilizado numa superfície (c). Após lavagem, os phAbs não específicos são removidos (d), os específicos são eluídos (ex: clivagem enzimática com tripsina) (e) e posteriormente utilizados para infectar *E. coli* (f) de modo a poder amplificar os phAbs seleccionados (g). Estes phAbs amplificados são posteriormente analisados ou utilizados para um novo ciclo de selecção. Retirado de Willats, 2002.

Qualquer método capaz de imobilizar o antígeno a um suporte pode ser usado para selecção em *phage display*. Os mais utilizados são: selecção com antígenos adsorvidos a tubos de plástico, ou covalentemente ligados a uma superfície; colunas com matriz activada com antígeno; selecção com antígeno biotinilado, entre outros (Hoogenboom, 2005). Outros métodos têm sido adaptados, nomeadamente utilização de citometria de fluxo, expressão do antígeno na superfície de células, etc. (Hoogenboom, 2005).

Após rejeição por lavagem dos phAbs que não se ligam especificamente, os phAbs ligados ao antígeno podem ser eluídos por diferentes métodos. Os mais utilizados são: modificação das condições físico-químicas do meio com soluções ácidas, como soluções de glicina-HCl, ou com soluções alcalinas, como trietilamina (Hoogenboom, 2005); clivagem enzimática entre o anticorpo e a proteína pIII, com uma protease (ex.: tripsina); eluição com antígeno em solução, o que permite a obtenção de phAbs específicos (McCafferty *et al.*, 1990).

Idealmente, apenas um ciclo de selecção seria necessário. No entanto, a ligação de phAbs não específicos limita o enriquecimento que pode ser alcançado num ciclo, pelo que, na prática, são necessários vários ciclos (Clackson *et al.*, 1991; Skerra *et al.*, 1991).

As escolhas das condições de selecção, a concentração do antígeno e a sua densidade na superfície de adsorção influenciam a eficiência da selecção e devem ser optimizadas durante o processo. Os primeiros ciclos de selecção são tipicamente feitos sobre condições de baixo rigor (concentrações altas de antígeno, tempos curtos de lavagem e tempos longos de eluição), permitindo manter ligandos raros entre a mistura de phAbs. As condições apertadas de selecção vão sendo aplicadas gradualmente ao longo dos ciclos, favorecendo os fagos com maiores afinidades. No final, obtêm-se clones individuais em placas de agar, para posterior caracterização das suas afinidades e especificidades.

Um método rápido e robusto de rastreio da afinidade e da especificidade de clones individuais é aplicado no fim do processo de selecção. Diferentes métodos básicos de rastreio incluem uma ELISA com antígeno ligado ou adsorvido e usando os próprios phAbs (chamado *Phage ELISA*) ou fragmentos de anticorpos solúveis (scFvs) produzidos em *E. coli* ou leveduras, entre outros bioensaios (McCafferty *et al.*, 1990; Clackson *et al.*, 1991). Para determinação da cinética e quantificação da afinidade de ligação, recorre-se a aparelhos com biossensores, tais como *surface plasmon*

resonance (SPR) ou *quartz cristal microbalance* (QCM) (Skerra *et al.*, 1991).

3.4. - Expressão e purificação de anticorpos recombinantes

Os fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv, Fab, *etc.*) são expressos em vários microrganismos, particularmente em certas estirpes de *E. coli*, tais como BL21, ER2537, TG1, entre outras.

Os fragmentos de anticorpos podem ser expelidos para o meio de cultura, ou acumularem-se no periplasma e/ou no citoplasma bacteriano. Isto depende de sinais particulares de sequências do fragmento de anticorpo (ex.: *pelB leader*). Enquanto as sequências de sinal que permitem a secreção de proteínas no periplasma e no meio levam a um rendimento final limitado, o ambiente oxidativo fora do citoplasma celular promove uma correcta formação de pontes dissulfureto. Os anticorpos expressos no periplasma podem ser recuperados por choque osmótico. Foram reportados rendimentos acima do 0,5 g/L de scFv expressos em *E. coli* (Holliger *et al.*, 2005).

Um método geral de purificação dos fragmentos usa um dos tags de selecção disponíveis, colocados no C- ou no N- terminal do scFv, sendo posteriormente necessário um ou dois passos de purificação. O IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) é um dos métodos mais utilizados na purificação de anticorpos produzidos em bactérias. Este método é baseado na afinidade de iões metálicos, como Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, a resíduos de histidinas (5-6 histidinas, *His-tag*), presentes no C- ou N- terminal do fragmento do anticorpo. Esta interacção tem lugar numa matriz cromatográfica com iões metálicos imobilizados (Skerra *et al.*, 1991).

3.5. - Phage display de haptens

Um *hapten* é definido como sendo um composto de baixo peso molecular que não é imunogénico por si só, mas quando ligado a uma proteína de transporte pode promover a produção de anticorpos anti-*hapten*. Tipicamente, os *haptens* possuem um peso molecular abaixo dos 1000 Da (Sheedy *et al.*, 2007). Estes são ubiqüitários no ambiente (entre eles estão os antibióticos, pesticidas, hormonas e diversos corantes), mas devido ao seu pequeno peso molecular, são difíceis de detectar no ambiente.

A maioria dos imunoensaios para detectar *haptens* utiliza anticorpos policlonais,

obtidos directamente do soro de animais imunizados. Para tal, os animais são imunizados várias vezes com *hapten*s immobilizados em proteínas de transporte (*carrier proteins*). Após várias injeções ao longo de vários meses, o animal produz resposta imunológica significativa contra o *hapten*. O soro é, então, retirado e são obtidos os anticorpos. No entanto, além de dispendiosa e morosa, a imunização do animal com certos *hapten*s tóxicos não é possível (Sheedy *et al.*, 2007). Devido a este e outros problemas, têm-se desenvolvido anticorpos recombinantes.

Os anticorpos recombinantes seleccionados a partir de bibliotecas não imunes tendem a ter menor afinidade (Sheedy *et al.*, 2007). Estas afinidades são comparáveis às de resposta imunológica primária em animais. Os anticorpos obtidos a partir de bibliotecas imunizadas ou de bibliotecas sintéticas tendem a possuir maiores afinidades do que os de bibliotecas não imunizadas (Sheedy *et al.*, 2007).

Vários métodos têm sido propostos para se atingirem maiores afinidades em anticorpos recombinantes obtidos a partir de bibliotecas. Tais procedimentos consistem na optimização de métodos de selecção, bem como posterior engenharia genética dos anticorpos por mutações e *affinity maturation* (maturação por afinidade). A selecção pode ser optimizada por aumento do rigor nas condições de selecção, como eluição dos pHAbs com o antigénio livre a baixas concentrações, pré-incubação com análogos do antigénio, *etc.* Tal como dito anteriormente, o uso de bibliotecas imunizadas, ou de bibliotecas sintéticas ou semi-sintéticas, aumentam a possibilidade de obtenção de anticorpos para antigénios pouco comuns.

Para o processo de selecção de anticorpos contra *hapten*s, mesmo em *phage display*, estes são geralmente ligados covalentemente a proteínas de transporte (a maioria das vezes, BSA ou HSA) e depois os complexos são adsorvidos em placas de poliestireno. Apesar de ser um método comumente utilizado e, de certo modo, eficiente, ele apresenta algumas desvantagens (Griffiths e Duncan, 1998). Nomeadamente, o anticorpo seleccionado pode detectar o *hapten* apenas quando este está covalentemente ligado à proteína de transporte, e não na sua forma livre, solúvel (Griffiths e Duncan, 1998). Este problema pode ser ultrapassado através da utilização de antigénio directamente ligado a superfícies sólidas, tais como esferas paramagnéticas, ou ligado indirectamente, via interacções biotina-estreptavidina (Griffiths e Duncan, 1998).

As esferas magnéticas tornaram-se uma ferramenta poderosa e versátil para uma variedade de aplicações analíticas e biotecnológicas. O uso de esferas magnéticas

aumenta consideravelmente a performance de um imunoenensaio porque: aumenta a área de superfície (Hoogenboom, 2002); melhora a cinética de ligação ao alvo analítico, devido ao facto de as esferas estarem em suspensão, o que diminui os percursos de difusão (Zacco *et al.*, 2006); as lavagens são facilitadas (Zacco *et al.*, 2006). Acresce que as esferas podem ser facilmente sedimentadas usando barras magnéticas.

3.6. – Biblioteca Griffin.1 e pHEN2

A biblioteca Griffin.1 é uma biblioteca construída a partir de um dador humano, em que os genes dos domínios V_H e V_L de anticorpos IgG são isolados e recombinados entre si (formando scFvs), de modo a aumentar a diversidade. Além disso, estes genes contêm mutações altamente diversificadas nos domínios CDR-3, permitindo aumentar ainda mais a sua diversidade. Estes fragmentos são clonados no vector fagemídeo pHEN2 (Figura 1.6). Os scFvs podem ser dispostos à superfície de bacteriófagos quando expressos em estirpes de *E. coli* supressoras (ex: TG1TR ou ER2537). Quando expressos de forma solúvel, os scFvs contêm também as sequências *myc-tag* e *His-tag* (Figura 1.6) (Griffiths *et al.*, 1994).

As colónias de bactérias portadoras de pHEN2 podem ser seleccionadas por resistência a ampicilina (Figura 1.6). Tais células (estirpes supressoras de *E. coli*) contendo pHEN2, quando infectadas com um *helper phage* (ex: M13KO7) produzem partículas virais não líticas, expressando o scFv na sua superfície. Após indução com IPTG (promotor do operão Lac), a célula produz scFvs solúveis, que são segregados para o periplasma bacteriano (devido à presença de um *pelB leader*). A detecção é facilitada pela presença do *myc-tag* e o *His-tag* permite a posterior purificação do scFv por IMAC.

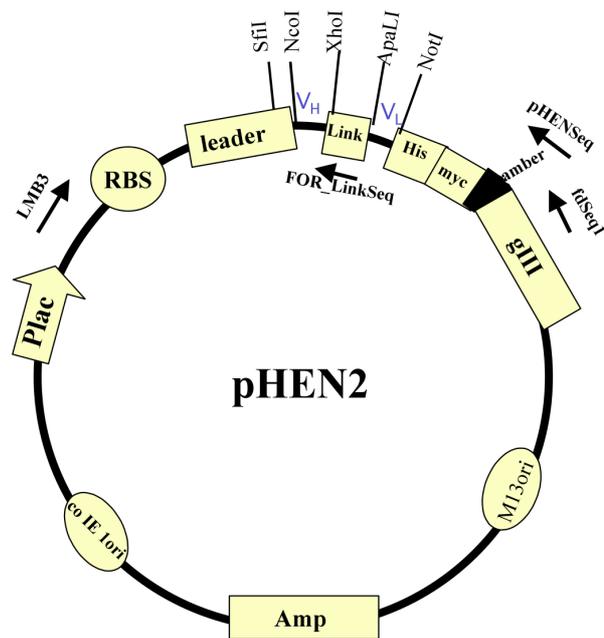


Figura 1.6 - Representação esquemática do fagemídeo pHEN2. O produto de transcrição é regulado através do promotor Lac (Plac, induzível com IPTG), onde os fragmentos V_H e V_L são clonados, respectivamente, a montante e a jusante do *linker* (polipeptídeo flexível que une os dois fragmentos). Este fragmento contém a jusante as sequências *His-tag* e *myc-tag*, para posterior purificação e detecção, respectivamente. A resistência à ampicilina permite a selecção de clones infectados. Os primers LMB3 (*forward primer*) e fdSeq1 (*reverse primer*) são utilizados para amplificação dos fragmentos de anticorpos. Imagem cedida por Riedstra (Riedstra *et al.*, 2007).

4. – Objectivos e estratégia do trabalho

O objectivo central deste trabalho é a obtenção de fragmentos de anticorpos específicos contra ciprofloxacina (CPFX). Estes fragmentos de anticorpos terão em vista a sua aplicação em imunoenaios para detectar e quantificar CPFX em amostras ambientais. Neste trabalho será utilizada a técnica de *phage display* para o isolamento dos fragmentos a partir de uma biblioteca semi-sintética humana, a biblioteca Griffin.¹ De modo a isolar esses fragmentos, a CPFX será imobilizada em esferas magnéticas, em detrimento da sua ligação a proteínas de transporte (BSA ou HSA), método mais usual para isolar anticorpos contra *haptens*. Preferiu-se este método devido ao facto de, usualmente, a ligação a proteínas de transporte promover o isolamento de anticorpos que apenas reconhecem os *haptens* quando ligados a essas proteínas, e não na sua forma isolada. Além disso, as esferas apresentam grande área de superfície.

Na eluição de phAbs específicos serão usadas, em ciclos sucessivos de selecção, quantidades decrescentes de CPFX solúvel. Este processo permite a obtenção de phAbs (e logo de fragmentos de anticorpos) que se ligam a CPFX em solução, em detrimento da CPFX imobilizada. Além disso, a diminuição da quantidade de CPFX, ao longo dos ciclos de selecção permite uma certa pressão selectiva de phAbs com maiores afinidades para a CPFX.

Após alguns ciclos de selecção, espera-se obter um conjunto de clones específicos contra a CPFX. Destes, analisar-se-ão, por ELISA competitiva, clones que se ligam à CPFX em solução. As especificidades destes clones serão analisadas também por ELISA competitiva, usando como competidores análogos da CPFX.

II – Procedimentos

1 – Imobilização de ciprofloxacina em esferas magnéticas

1.1 - Material:

O hidrocloreto de ciprofloxacina (CPFX) foi obtido de AppliChem (Darmstadt, Alemanha) na forma de pó, contendo um mínimo de 98 %. Para preparar uma solução a 10 mg/mL de CPFX, 100 mg de pó pesados numa balança analítica foram adicionados a 10 mL de água desionizada. Para promover a dissolução, foi necessário aquecer a solução até 50 °C durante 10 minutos, com agitação constante. De seguida, passou-se a solução por um filtro 0,22 µm (Millipore, Bellerica, EUA), distribuiu-se por microtubos e armazenou-se a -20 °C até utilização.

As esferas magnéticas "*MagnaBind Amine Derivatized Beads*" (Pierce, Rockford, EUA) contêm grupos amina livres à superfície, de maneira a permitir a reacção de imobilização. Para a separação das esferas magnéticas da solução aquosa, utilizou-se um suporte magnético para microtubos (Biometra, EUA). EDC (hidrocloreto de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) foi obtido de BioChemika (Portugal).

O sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizado foi um sistema Beckam (EUA), com um auto-amostrador 508, bombas 126, equipado com um módulo detector UV-VIS 162. Os dados foram recolhidos e processados usando o *software* "*System Gold*" (v6.0, Beckam, EUA). O comprimento de onda seleccionado para monitorizar e quantificar a CPFX foi 280 nm, valor este correspondente a um máximo de absorvância, previamente determinado por espectroscopia de absorção na zona do UV-VIS. A coluna utilizada foi uma Zarobax SB-C18 (3,0 x 250 mm, com 5 µm de diâmetro de partículas) (Agilent, Santa Clara, EUA).

Como solventes puros (grau HPLC), foram usados ácido fórmico (Fluka, Portugal) e acetonitrilo (Merck, Portugal).

1.2 - Métodos:

1.2.1 – Cromatografia Líquida de alta performance (HPLC) com detector UV

A quantificação da CPFX em solução por simples medição da densidade óptica a 280 nm em espectrofotómetro UV-VIS não foi possível, devido à presença de compostos interferentes em muitas amostras. Por isso, a CPFX foi quantificada por HPLC com detector UV. O procedimento foi baseado no método descrito por Tuerk *et al.* (2006), com algumas modificações.

Numa primeira etapa, observou-se que o comportamento cromatográfico da CPFX depende do seu estado de protonação. Assim, garantiu-se que o pH da solução a analisar levasse a que a CPFX estivesse no seu estado protonado. Sabendo que o pK_a do grupo carboxílico da CPFX é 5,6, as soluções foram ajustadas para pH 4.

A fase móvel consistiu em: solvente A: 0,1 % ácido fórmico; solvente B: 0,1 % ácido fórmico em acetonitrilo. O caudal foi de 0,3 mL/min. O gradiente de eluição foi: 0 - 1 min, 90 % A; 1 - 22 min, 30 % A; 22 - 24 min, 90 % A; 24 - 28 min, 90 % A.

A reprodutibilidade do método foi avaliada por 10 análises sucessivas de solução aquosa a 10,0 µg/L de CPFX. A linearidade do método foi analisada utilizando concentrações de CPFX entre 10,0 µg/L e 10,0 mg/L. Os limites de detecção e quantificação foram determinados em solução aquosa por ajuste de concentração de CPFX e a partir da amplitude do ruído, tal como descrito por Silva Ferreira *et al.* (2003).

De modo a quantificar a CPFX, as soluções problema foram diluídas até zona linear do método de HPLC, determinada por calibração de padrões.

1.2.2 – Reacção de imobilização de ciprofloxacina

A CPFX foi imobilizada em esferas magnéticas por activação, com EDC, do grupo carboxílico presente na CPFX e posterior reacção com grupos amina presentes na superfície das esferas magnéticas. Esta é uma reacção 1:1 de grupos carboxílicos (um grupo por CPFX) com grupos amina. A quantidade de grupos amina presentes numa dada quantidade de esferas magnéticas foi estimada com base na massa de esferas e informação do fabricante (240 µmol de grupos amina por grama de esferas magnéticas).

Amostra de 100 μL de suspensão de esferas magnéticas foi transferida para um microtubo previamente calibrado e a massa de esferas magnéticas foi avaliada. Para tal, as esferas foram sedimentadas com o auxílio do separador magnético, o líquido foi retirado com uma pipeta Pasteur e as esferas foram lavadas duas vezes com uma solução 1 M NaCl. Após remoção da última solução salina, as esferas foram pesadas numa balança analítica.

As esferas foram então suspensas em 400 μL de solução aquosa a pH 4, ajustado com HCl. Para cada ensaio, foram adicionadas diferentes quantidades de solução de CPF_X a 10 mg/mL (perfazendo 1, 1,5, 2,5, 3,5, e 4,5 mg de CPF_X). Por fim, 10 mg de EDC foram dissolvidos em 100 μL de solução aquosa a pH 4 e adicionou-se imediatamente à suspensão anterior. O volume final de todas as reacções foi ajustado para 1 mL e o pH foi ajustado para 4. O pH foi monitorizado ao longo da reacção, que decorreu à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante duas horas, com agitação constante. Foram realizadas reacções controlo em paralelo, em condições similares, mas sem a presença de esferas magnéticas.

No final de cada reacção, as esferas foram separadas da solução e esta foi guardada para posterior quantificação de CPF_X não reagida. As esferas foram também lavadas duas vezes com solução 1 M NaCl, de modo a remover CPF_X não covalentemente ligada. Estas soluções de lavagem foram igualmente guardadas para quantificação de CPF_X.

2 – Phage display

2.1 – Material

2.1.1 - Material biológico

A biblioteca semi-sintética Griffin.1 (Griffiths *et al.*, 1994) foi gentilmente cedida por Dr. Greg Winter do *MRC Centre for Protein Engineering* (Cambridge, Reino Unido). A biblioteca Griffin.1 é composta por scFvs humanos contendo uma elevada diversidade de CDR3s em ambos os domínios V_H e V_L . Esta biblioteca foi obtida por clonagem dos fragmentos no vector fagemídeo pHEN2. Ela contém um grande repertório de fragmentos de anticorpos distintos – cerca de 5×10^9 . As regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada (V_L e V_H) são ligadas por um curto peptídeo (*linker*, Figura 1.6) e expressos de forma acoplada a uma proteína estrutural (pIII) da superfície dos fagos filamentosos M13 (Griffiths *et al.*, 1994).

Escherichia coli ER2537 supressora (F' , $lacI^qD(lacZ)M15$ $proA^+B^+$, $/fhuA2$ $supE$ $D(lac-proAB)$ thi $D(hsdMS^-mrcB)5$ ($r_k m_k mcrBC^-$) I^-) foi obtida de *New England Biolabs* (Alemanha). Esta estirpe foi mantida em meio mínimo e armazenada a 4 °C. Para produzir culturas de trabalho, a *E. coli* ER2537 foi transferida do meio mínimo para meio líquido 2xTY e incubada durante a noite a 37 °C, sendo posteriormente subculturada (1%) em meio 2xTY e incubada a 37 °C até OD_{600} de 0,5, antes da infecção com fagos. Os fagos *helper phage* M13KO7 foram obtidos de Pharmacia (Uppsala, Suécia).

2.1.2 – Reagentes e meios

O meio utilizado para o crescimento bacteriano foi o 2xTY, contendo 16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levedura e 5 g/L de NaCl. Quando necessário, este meio foi suplementado com ampicilina a 100 µg/mL e 2% de glucose (2xTY_{AG}), ou com ampicilina a 100 µg/mL e kanamicina a 25 µg/mL (2xTY_{AK}). Para crescimento em placas, utilizou-se o meio TYE (5 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levedura, 15 g agar e 5 g/L de NaCl) e, quando necessário, suplementou-se com 100 µg/mL ampicilina e 2% glucose (TYE_{AG}). Todas estas soluções foram autoclavadas e mantidas estéreis.

Para bloquear as placas de ELISA, bem como as esferas magnéticas, utilizou-se uma solução a 2% de proteína de soja (PS). Solução PBS (50 mM fosfato de potássio, 150 mM NaCl; pH 7.2) foi utilizada nas lavagens das esferas magnéticas e, quando necessário, suplementada com 0,1% de Tween-20 (PBST). A solução utilizada para o desenvolvimento colorimétrico da ELISA foi a solução ABTS (0,5 mL de ABTS 0,2 %, 9,5 mL de citrato 0,1 M a pH 4 e 10 µL de H₂O₂ 10 %). As electroforeses em gel de agarose foram realizadas utilizando a solução TAE (40 mM Tris-acetato, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA, pH 8.0). Para a precipitação dos fagos, utilizou-se uma solução PEG/NaCl, contendo 20% de polietileno-glicol 6000 e 2.5 M NaCl.

2.2 - Métodos gerais:

2.2.1 - Extração de DNA por fervura

A partir de uma placa TYE_{AG} contendo colónias de *E. coli* portadoras do pHEN2, repicaram-se colónias individuais para um microtubo contendo 50 µL de água desionizada estéril e extraiu-se o seu DNA pela técnica de fervura. Para tal, ferveu-se o microtubo durante 10 min e centrifugou-se numa microcentrífuga (Eppendorf 5415 D, Alemanha), a 13200 g durante 10 min. O sobrenadante foi utilizado para realizar o PCR.

2.2.2 - Amplificação dos fragmentos por PCR

A mistura continha 0,2 pmol LMB3 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') e 0,2 pmol FdSEQ (5'- GAA TTT TCT GTA TGA GG-3'), 1 U GoTaq DNA polimerase, 0,4 mM cada dNTP, 3 mM MgCl₂, tampão apropriado e água ultrapura estéril até perfazer um volume de 50 µL por amostra. As condições utilizadas foram: 94 °C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 72 °C e 1,5 min a 72 °C; por fim, um ciclo de extensão a 72 °C durante 7 min. Este produto de PCR foi armazenado a 4 °C até análise ou utilização.

2.2.3 - Electroforese em gel de agarose

Para preparar o gel, dissolveu-se a agarose em TAE aquecido. A percentagem de

agarose no gel foi ajustada conforme a amostra a separar, em concentrações de 1, 1,5 ou 2% (m/v). Após baixar a temperatura da solução para 50 °C, adicionou-se brometo de etídio à concentração final de 0,5 µg/mL e verteu-se a mistura para *casters* e tinas (BioRad, Alemanha). A voltagem utilizada foi sempre 100 V, durante cerca de 30 a 40 minutos, salvo algumas exceções.

2.2.4 - Análise de restrição dos produtos de PCR com enzima de restrição BstNI

A variedade de scFvs presentes, tanto na biblioteca original, como no produto final da selecção por *phage display*, foi estimada por análise de restrição dos produtos de PCR, recorrendo a uma enzima de restrição que corta frequentemente nos genes V_H e V_L . Neste caso, utilizou-se a enzima BstNI (NEB, Alemanha) que corta frequentemente nos segmentos CDRs. As condições utilizadas foram: 5 U BstNI, 1,5 mg BSA e 1x tampão NEB2 (NEB, Alemanha). Adicionou-se água ultrapura estéril até um volume final de 20 µL.

2.2.5 - Amplificação e purificação dos phAbs resultantes

Inoculou-se 1 mL de *stock* da biblioteca bacteriana (contendo cerca de 5×10^9 clones) em 500 mL de 2xTY_{Ag} e incubou-se a 37 °C com agitação, até OD₆₀₀ de 0,5. Seguidamente, 25 mL desta cultura foi infectada com *helper phage* M13-KO7 a um rácio de 1:20 (números de células bacterianas : partículas *helper phage*, assumindo que OD₆₀₀ de 1 em cultura de células bacterianas corresponde a cerca de 8×10^8 bactérias/mL). Deixou-se incubar a 37 °C durante 30 min, sem agitação. Após infecção, centrifugaram-se as células a 3300 g (Hettich Rotina, 35R, Suécia) durante 30 min, ressuspensando posteriormente em 500 mL de 2xTY_{AK}, seguindo-se incubação durante a noite a 37 °C, para a produção dos phAbs. Os restantes 475 mL da cultura foi deixada crescer por mais 2 h, a 37 °C, com agitação; centrifugou-se durante 10 min a 3300 g, ressuspendeu-se o sedimento em 10 mL de 2xTY suplementado com 15 % glicerol e armazenou-se a -80 °C. Este constitui o *stock* da biblioteca em bactérias.

Os phAbs produzidos durante a noite foram separados das células por precipitação com polietileno-glicol (PEG 6000). Para tal, a cultura anterior foi centrifugada a 3300 g durante 30 min, adicionando-se de seguida ao sobrenadante 1/5 do seu volume de

PEG/NaCl. Incubou-se a 4 °C durante 1 h, agitando-se ocasionalmente.

De seguida, centrifugou-se novamente a 3300 *g* durante 30 min, removendo o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 5 mL de PBS, transferiu-se para microtubos e centrifugou-se novamente a 13200 *g* numa microcentrífuga durante 10 min, de modo a remover resíduos bacterianos remanescentes. Transferiu-se o sobrenadante para outro microtubo e adicionou-se glicerol à concentração final de 15 % para armazenamento a -80 °C por longos períodos de tempo.

2.2.6 - Titulação de phAbs

Os fagos filamentosos (Fd, M13, F1) são não-líticos e, quando infectam *E. coli*, transferem o fagemídeo que contém gene de resistência a ampicilina. Unidades tituladas (t.u.) dos fagos foram obtidas por contagem de colónias de *E. coli* ER2537 infectada com fagos e crescidas em placas com meio TYE_{AG}. As soluções de fagos foram tituladas por diluição em TE e incubadas com *E. coli* em fase exponencial de crescimento ($OD_{600} \sim 0,5$), a 37 °C, durante 30 min, sem agitação, e depois plaqueadas em meio TYE_{AG} durante a noite, a 37 °C, até obtenção de colónias visíveis (Griffiths *et al.*, 1994).

2.2.7 - ELISA a partir de esferas magnéticas

As esferas magnéticas previamente conjugadas com CPF_X foram utilizadas para determinar o enriquecimento de phAbs específicos após cada ciclo de selecção, bem como para determinar a especificidade de clones individuais, no final do processo de selecção.

Cerca de 20 µL de suspensão contendo 4 mg de esferas com ou sem CPF_X (controlo) conjugada, foram bloqueadas com 2 % PS durante 2 h, à temperatura ambiente e com agitação constante. A solução foi separada das esferas com a ajuda de um suporte magnético, o sobrenadante foi aspirado com uma pipeta Pasteur, seguindo-se uma única lavagem das esferas com PBS. Foram adicionados cerca de 10¹⁰ fagos a analisar (100 µL de solução com 10¹¹ t.u./mL em 1% PS) às esferas bloqueadas, incubando-se durante 2 h à temperatura ambiente, com agitação suave e constante (para evitar a sedimentação das esferas). Em seguida, lavou-se 3x com PBST e 3x

com PBS, deixando-se cada solução de lavagem em contacto durante cerca de 1 min, mais 1 min para separar a solução aquosa das esferas magnéticas (com a ajuda do suporte magnético). De seguida, as esferas foram incubadas com 200 µL de anticorpo anti-M13-HRP (Roche, Alemanha) diluído 5000 vezes em 0,1 % PS, durante 1,5 h à temperatura ambiente, com agitação. As esferas foram lavadas como descrito anteriormente (3x PBST + 3x PBS). As reacções colorimétricas de ELISA foram promovidas pela adição de 200 µL de solução ABTS. Após 30 min, a solução foi separada das esferas e transferida para microplacas de ELISA; os valores de absorvância foram medidos num leitor de microplacas, a 415 nm (biorad, modelo 680).

2.3 - Métodos:

2.3.1 - Análise da diversidade da biblioteca Griffin.1

A diversidade da biblioteca foi confirmada por amplificação por PCR (primers LMB3 e fdSeq) dos genes dos fragmentos de anticorpos recombinantes, inseridos no vector pHEN2 e posterior análise da diversidade por RFLP, com enzima BstNI.

Para tal, após plaqueamento da biblioteca em placas contendo TYE_{AG}, extraiu-se o DNA de 11 clones individuais, pela técnica de fervura anteriormente descrita. Após amplificação dos fragmentos por PCR e confirmação de amplificação por electroforese, o produto de PCR foi purificado usando o *QIAGEN PCR Purification Kit* (QIAGEN, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. Seguidamente, o produto de PCR foi sujeito a análise pela enzima de restrição BstNI, que corta frequentemente nos segmentos V_H e V_L. O padrão de restrição foi analisado por electroforese em gel de agarose e a diversidade da biblioteca foi estimada por diferenças entre esses padrões.

2.3.2 - Cromatografia de exclusão molecular dos phAbs eluídos

Para separar a CPFX da solução de phAbs resultantes de cada ciclo de selecção, utilizou-se uma coluna "*Econo Pac 10G desalting column*" (BioRad, Alemanha).

De modo a testar a eficiência do método de separação, equilibrou-se a coluna com cinco vezes o seu volume de PBS e adicionou-se 1 mL de amostra contendo 10¹² fagos e 25 mM CPFX (quantidade máxima utilizada nas eluições de phAbs). Eluíu-se com 8

mL de PBS, retirando-se amostras sucessivas de 0,5 mL. De modo a verificar que os fagos não ficaram adsorvidos, lavou-se a coluna com solução NaCl 1 M.

As fracções (0,5 mL) de eluente e de lavagem foram seguidamente analisadas em ELISA para verificar presença de fagos. Adicionaram-se 100 µL de amostra a cada poço de ELISA, realizada em placas maxisorp (Nunc), em triplicado. Deixou-se adsorver à temperatura ambiente, durante 1,5 h. Os poços foram depois lavados 3x com PBS. Os poços foram de seguida bloqueados com 2% PS em PBS, durante 1,5 h à temperatura ambiente. Lavou-se 3x com PBST e 3x com PBS. Adicionou-se posteriormente a cada poço 100 µL de anti-M13 HRP, diluído 5000 vezes em solução 0,1 % de PS em PBS e incubando por mais 1,5 h. Lavou-se novamente 3x com PBST e 3x com PBS. Revelaram-se os poços com solução ABTS durante 30 min. Leram-se os valores de absorvância a 415 nm num leitor de microplacas (BioRad, modelo 680).

Determinou-se também o volume de eluição da CPFX. Para tal, adicionaram-se fracções de 1 mL das soluções de eluição a 10 mL de meio 2xTY contendo 1 % de pré-inóculo de *E. coli*, e incubou-se a 37 °C durante a noite. Verificou-se a inibição do crescimento (presença de CPFX) nesse meio.

2.3.3 – Ciclos de selecção por phage display

1º ciclo de selecção:

A 20 µL de suspensão de esferas magnéticas, contendo aproximadamente 4 mg de esferas com 40 µg de CPFX imobilizada, adicionaram-se aproximadamente 10^{12} phAbs de biblioteca (0,5 mL de *stock* de phAbs), perfazendo-se um volume total de 1 mL. A solução desta suspensão consistia em 1% PS em PBS, de modo a minimizar a ocorrência de ligações não específicas. Incubou-se durante 1,5 h com agitação constante, à temperatura ambiente. De seguida, lavaram-se as esferas 6x com PBST e 6x com PBS, alternadamente, com 1 min de contacto para cada solução de lavagem, mais 1 min para separação da solução das esferas. Os sobrenadantes foram removidos e rejeitados.

Os phAbs foram de seguida eluídos com 1 mL de solução 25 mM de CPFX, incubada durante 30 minutos, à temperatura ambiente e com agitação constante. As esferas foram posteriormente separadas da solução. Esta solução foi depois passada por uma coluna de filtração por gel, como descrito na secção 2.3.2, de modo a separar os

phAbs de CPFX. Esta etapa é necessária para evitar a inibição do crescimento bacteriano durante a amplificação. Seguidamente, 0,5 mL da solução dos phAbs eluídos foi armazenada em 15 % de glicerol a -80 °C. A restante solução foi utilizada para amplificação em *E. coli* como seguidamente descrito.

Adicionou-se 0,5 mL dos phAbs eluídos no ciclo anterior a 9,5 mL de *E. coli* ER2537 em crescimento exponencial ($OD_{600} \sim 0,5$) e incubou-se a 37 °C durante 30 min, sem agitação. Os phAbs eluídos foram titulados. Centrifugou-se a solução a 3300 *g* durante 10 min a 4 °C, ressuspendeu-se o sedimento de seguida em 1 mL 2xTY e plaqueou-se numa placa "Nunc Bio-Assay dish" contendo TYE_{Ag}. Deixou-se crescer a 37 °C durante a noite.

No dia seguinte, adicionaram-se 5 mL de 2xTY contendo 15 % glicerol às placas "Nunc Bio-Assay dish" e recolheram-se as células com a ajuda de um espalhador. Inocularam-se 50 µL da suspensão de bactérias recolhidas em 100 mL de 2xTY_{AG} (verificou-se que o OD_{600} da solução permanecia abaixo de 0,1, de modo a promover um bom crescimento bacteriano). A restante cultura foi armazenada para *stock*, a -80 °C.

Deixou-se crescer a 37 °C com agitação até $OD_{600} \sim 0,5$. De seguida, infectaram-se 10 mL desta cultura com *helper phage* M13KO7, adicionando um rácio de 1:20 de células bacterianas:*helper phage* (tendo em conta que $OD_{600} = 1$ na cultura de bactérias corresponde aproximadamente a 8×10^8 bactérias/mL). Incubou-se a 37 °C sem agitação, durante 30 minutos. Centrifugou-se a cultura a 3300 *g* durante 10 min, a 4 °C. Ressuspendeu-se cuidadosamente o precipitado em 50 mL de 2xTY_{AK} e incubou-se durante a noite, a 30 °C, com agitação. No dia seguinte, purificaram-se os fagos, como descrito anteriormente.

Ciclos posteriores de selecção:

Posteriormente, realizaram-se mais três ciclos de selecção idênticos ao anterior, com alteração nas condições de eluição de ciclo para ciclo (concentração de CPFX na solução de eluição e tempo de incubação com as esferas). No 2º ciclo: 25 mM CPFX, 20 min; 3º ciclo: 2,5 mM CPFX, 15 min; 4º ciclo: 100 µM CPFX, 10 min.

2.3.4 – ELISA dos fagos obtidos ao longo dos ciclos de selecção

Os phAbs de cada ciclo foram amplificados e titulados e aproximadamente 10^{10} phAbs foram analisados em ELISA com esferas magnéticas, para determinar o

enriquecimento de phAbs positivos para a CPF_X, tal como anteriormente descrito (secção 2.2.7.).

2.3.5 – PCR de clones individuais

Alguns clones individuais obtidos no último ciclo de selecção foram analisados para determinar a presença de genes de anticorpos (V_H e V_L). Para tal, extraiu-se o DNA de 36 clones isolados em placa TYE_{AG}, por técnica de fervura, realizou-se PCR para amplificação dos fragmentos e analisou-se o produto deste passo por electroforese em gel de agarose a 1%.

2.3.6 – ELISA de clones individuais

De modo a determinar a percentagem de clones positivos e reduzir assim a quantidade de clones a analisar por RFLP e a sequenciar, realizaram-se ELISAs de phAbs obtidos a partir de oito clones individuais com segmentos inseridos (analisados anteriormente por PCR). Para tal, produziram-se, em pequena escala, phAbs a partir de clones individuais, deixando cada clone crescer em 10 mL de 2xTY_{AG} a 37 °C, com agitação constante, até $OD_{600} = 0.5$. De seguida adicionaram-se fagos *helper phage* (1:20 de células: *helper phage*), deixando infectar durante 30 min a 37 °C, sem agitação; centrifugou-se durante 10 min a 6000 *g* e ressuspendeu-se o sedimento em 10 mL de 2xTY_{AK}. Esta cultura foi incubada durante a noite a 30 °C, sob agitação. No dia seguinte, centrifugou-se durante 10 min a 6000 *g* e o sobrenadante foi directamente utilizado em ELISA com esferas magnéticas, como descrito anteriormente.

2.3.7 – RFLP de clones individuais

Os clones positivos, de acordo com a ELISA anterior, foram analisados por RFLP para avaliar a sua diversidade. Para tal, extraiu-se o DNA de uma colónia de cada clone por técnica de fervura, amplificaram-se os fragmentos por PCR e realizou-se uma análise de restrição por RFLP com a enzima BstNI, tal como descrito anteriormente.

2.3.8 – Sequenciação dos fragmentos isolados

De modo a confirmar a diversidade dos fragmentos, previamente estimada por RFLP, bem como para classificar esses segmentos, sequenciaram-se os respectivos genes.

A partir dos clones individuais, obtiveram-se os seus plasmídeos por miniprep (QIAGEN, Suécia), conforme protocolo do fabricante. De seguida, efectuou-se uma amplificação com o *primer* LMB3 e com o *kit* de sequenciação *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, EUA). Os produtos obtidos foram analisados num sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA). Os ficheiros obtidos, em extensão *.ab1*, foram lidos usando o *software* “4Peaks” (versão 1.7.2). Os genes V foram identificados através da base de dados VBASE, compilada por Tomlinson *et al.* (1995). Os CDR3s foram determinados tal como definido por Kabat *et al.* (1991).

2.3.9 – ELISA Competitiva

De modo a determinar a capacidade de ligação dos phAbs monoclonais à CPFX livre, para além da CPFX imobilizada, bem como para determinar a sensibilidade e especificidade desses phAbs, realizaram-se várias ELISAS competitivas. Estas foram realizadas na presença de diferentes concentrações de CPFX, ou de diferentes concentrações de uma de outras três fluoroquinolonas (enrofloxacina, ofloxacina e norfloxacina) e dois antibióticos não-quinolonas (penicilina e gentamicina).

Para tal, incubaram-se 20 µL de suspensão de esferas magnéticas (aproximadamente 4 mg) com cerca de 10^{10} phAbs (100 µL de solução com 10^{11} t.u./mL) e diferentes concentrações padrão de CPFX, ou outra molécula, em 1% PS, durante 2 h, à temperatura ambiente, com agitação suave e constante (para evitar a sedimentação das esferas). De seguida, lavou-se 3x com PBST e 3x com PBS, deixando cerca de 1 min cada solução de lavagem, mais 1 min para separar a solução aquosa das esferas magnéticas, com a ajuda do suporte magnético. As esferas foram, de seguida, incubadas com 200 µL de anticorpo anti-M13 diluído 5000 vezes em 0,1% PS, durante 1,5 h, à temperatura ambiente, com agitação. As esferas foram lavadas como anteriormente (3x PBST + 3x PBS). A ELISA foi revelada com 200 µL de solução ABTS. Após 30 min, a solução foi separada das esferas e transferida para microplacas de ELISA e os valores de absorvância foram medidos num leitor de microplacas (BioRad, modelo 680, Munique, Alemanha).

Construiu-se uma curva de calibração com a percentagem de ligação em função do logaritmo da concentração de CPFX. A percentagem de ligação foi definida como sendo a razão das absorvâncias obtidas na presença e na ausência de moléculas competidoras em solução nas amostras padrão, multiplicada por 100.

A sensibilidade do método foi definida como três vezes o valor do desvio padrão do menor valor de concentração de CPFX detectável, tal como anteriormente efectuado para o ensaio de HPLC. A precisão do ensaio foi determinada por análise repetitiva das amostras. Os coeficientes de variação inter- e intra-ensaios foram analisados para três valores diferentes de concentração de CPFX.

A especificidade dos phAbs foi analisada por ELISA competitiva com três análogos da CPFX (três fluoroquinolonas: enrofloxacina, ofloxacina e norfloxacina), bem como com dois outros antibióticos estruturalmente diferentes (penicilina e gentamicina), a três valores de concentração diferentes, tudo em triplicado. O valor de "reação-cruzada" foi determinado como sendo o número de moles de CPFX para uma ligação de 50 %, dividido pelo número de moles da outra molécula para uma ligação de 50 %, multiplicado por 100 (Duan e Yuan, 2001).

3 – Análise do fragmento isolado

3.1 – Produção em pequena escala

Produziu-se, em pequena escala e a três temperaturas diferentes, um dos fragmentos anti-CPF_X, e analisou-se a produção por *dot blot*. Para tal, repicou-se uma colónia de bactérias portadoras do fagemídeo (contendo o gene do fragmento anti-CPF_X) e deixou-se crescer em meio 2xTY_{AG} durante a noite, a 37 °C. Subculturou-se 1% deste pré-inóculo em 100 mL de 2xTY contendo ampicilina e 0,1% glucose, e deixou-se crescer a 37 °C, com agitação a 120 rpm, até OD₆₀₀ ~ 1. Retirou-se 1 mL de amostra para um microtubo ($t = 0$), e distribuíram-se 90 mL por três frascos diferentes (30 mL para cada frasco), adicionando-se IPTG à concentração final de 1 mM (de modo a induzir a produção de fragmento). Incubaram-se os frascos a 20, 25 e 30 °C, com agitação de 120 rpm. Retiraram-se amostras após 1, 2, 3, 4, 8, 20 e 24 horas.

Para cada amostra, centrifugaram-se os microtubos a 13200 *g* durante 10 min, de modo a separar o sobrenadante das células, armazenando-se amostras destas células a -20 °C até utilização. No final das amostragens, ressuspenderam-se os sedimentos

em 1/10 do volume inicial (100 μ L) de solução de sacarose (20 % sacarose, 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), deixando 1 h em gelo, misturando ocasionalmente. Centrifugou-se a 13200 *g* durante 10 min e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo (fracção de choque osmótico, OSF). Ressuspendeu-se o sedimento em 1/10 do volume inicial (100 μ L) de 5 mM MgSO₄ a 4 °C, e incubou-se durante 1 h em gelo, misturando ocasionalmente. Centrifugou-se a 13200 *g* durante 10 min, guardando o sobrenadante, que é a fracção periplásmica.

3.2 – *Dot blot*

Por fim, analisou-se em *dot blot* a mistura da fracção do choque osmótico com a fracção periplásmica de cada amostra, para uma quantificação relativa da produção do fragmento. Para tal, adicionaram-se 4 μ L da mistura de cada amostra a uma membrana de nitrocelulose. Deixou-se secar na estufa durante 10 minutos. Bloqueou-se a membrana com 2% PS em PBS, durante 1,5 horas, à temperatura ambiente, com agitação constante. Lavou-se a membrana 1x com PBS e incubou-se com anticorpo primário anti-*myc*-HRP (Roche, Alemanha), 1000 vezes diluído em 1% PS em PBS, à temperatura ambiente, durante 1,5 h, com agitação constante. Lavou-se 3x com PBST e 3x com PBS. Adicionou-se, então, a solução de revelação (substrato DAB, Pharmacia, Suécia). Incubou-se 10 a 30 min e concluiu-se sobre a presença de fragmentos nessas fracções.

III – Resultados e Discussão

1 – Imobilização de CPFX em esferas magnéticas

1.1 – Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) com detector UV

De modo a quantificar a CPFX covalentemente ligada às esferas magnéticas, determinou-se a quantidade de CPFX não reagida. Esta quantificação foi efectuada por análise em HPLC equipado com um detector UV, baseado no método descrito por Tuerk *et al.* (2006). No entanto, este método foi otimizado, sofrendo algumas modificações no que diz respeito à preparação da amostra e ao gradiente da fase móvel.

Numa fase preliminar, verificou-se que o comportamento cromatográfico da CPFX era dependente do seu estado de protonação, logo do pH da solução. Sendo o valor de pK_a do grupo carboxílico da CPFX de 5,6, o pH da solução foi ajustado para 4.

A gama de concentrações padrão testada para traçar o perfil de resposta linear do método foi de 10,0 $\mu\text{g/L}$ a 10,0 mg/L de CPFX, analisando-se cada concentração em triplicado. A curva de calibração é demonstrada na Figura 3.1. Em anexo encontram-se os respectivos valores (Tabela A2), bem como um exemplo de cromatograma. O coeficiente de correlação (R^2) entre estes valores foi de 0,9995.

Área do pico / 10⁶

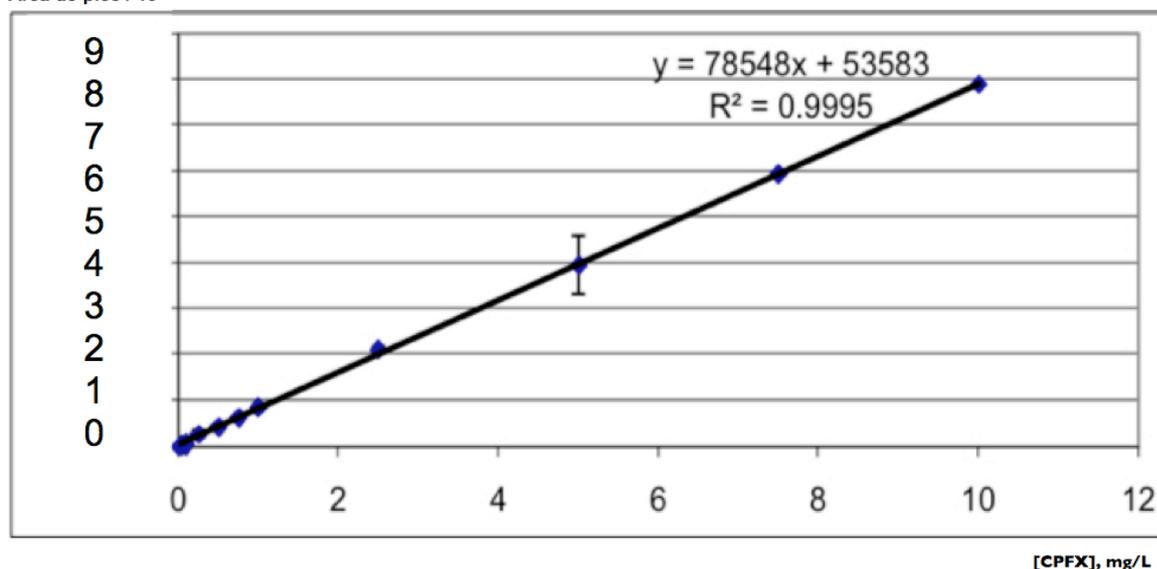


Figura 3.1 – Curva de calibração de CPF X a pH 4, por HPLC com detecção UV. Os valores utilizados para traçar esta curva encontram-se em anexo. O coeficiente de correlação (R^2) foi de 0,9995.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados em solução aquosa por ajuste de concentração de CPF X e a partir da amplitude do ruído, tal como descrito por Silva Ferreira *et al* (2003). Assim, os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 24,4 $\mu\text{g/L}$ (66,3 nM) e 98,0 $\mu\text{g/L}$ (266,1 nM).

1.2 – Reacção de Imobilização de CPF X

A imobilização da CPF X foi feita por activação do seu grupo carboxílico com uma carbodiimida (hidroclorato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida, EDC) e posterior reacção do derivado CPF X-EDC com os grupos amina presentes nas esferas magnéticas. Resulta uma ligação amida entre o grupo carboxílico da CPF X e os grupos amina das esferas. A sequência reaccional está esquematizada na Figura 3.2.

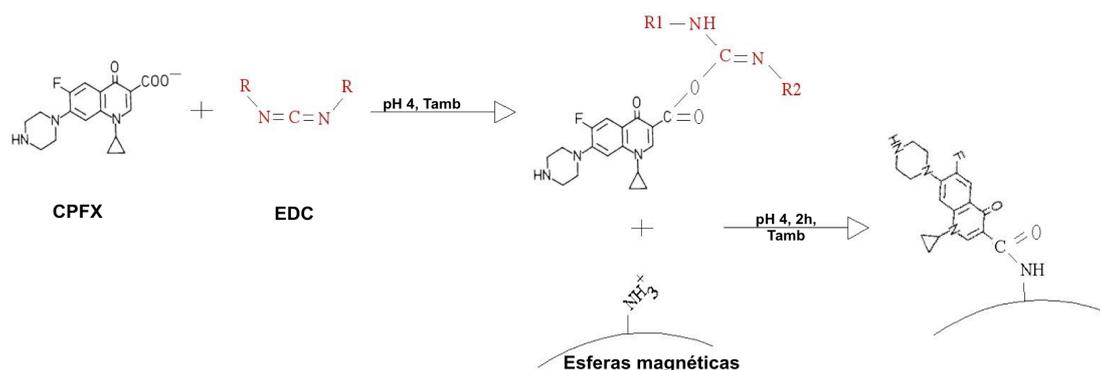


Figura 3.2 – Representação esquemática da sequência reaccional da imobilização da CPFX em esferas magnéticas, por activação dos grupos carboxílicos da CPFX com EDC e posterior reacção com os grupos amina das esferas magnéticas, a pH 4.

A determinação de CPFX no sobrenadante da reacção por simples medição da densidade óptica a 280 nm (comprimento de onda de máxima absorvância de soluções de CPFX em água) não é possível, devido a diversas interferências. Assim sendo, a quantificação da CPFX no meio reaccional foi efectuada por HPLC com um detector UV (secção 1.1).

Na Tabela 3.1 estão descritas as condições de imobilização. Em todas as reacções, utilizou-se um excesso de EDC em relação a grupos carboxílicos de, pelo menos, 20 vezes. O pH foi monitorizado para 4, valor considerado óptimo para a modificação de grupos carboxílicos por EDC (Nakajima e Ikada, 1995). De modo a poder estudar a eficiência da imobilização, testaram-se diferentes razões molares entre CPFX e grupos amina.

Tabela 3.1 – Imobilização de CPFX em esferas magnéticas: quantidades de CPFX e grupos amina e percentagem de saturação destes grupos.

Ensaio	CPF _X inicial (μmol)	NH ₃ ⁺ inicial (μmol)	Razão molar CPF _X /NH ₃ ⁺ inicial	CPF _X ligado (μmol)	Saturação de NH ₃ ⁺ (%)
1	2,27	3,12	0,73	2,04	65,4
2	3,40	3,83	0,89	3,11	80,5
3	5,67	5,16	1,10	4,78	92,6
4	7,93	6,23	1,27	6,98	112
5	10,19	4,03	2,53	4,23	105

Nas primeiras duas experiências, o número de moles de CPF_X adicionado foi menor que o de grupos amina nas esferas. Observou-se que boa parte da CPF_X reagiu (Tabela 3.1). Quando se adicionou um ligeiro excesso de CPF_X em relação aos grupos amina (ensaio 3), observou-se que 93 % dos grupos amina reagiram. Com um excesso de CPF_X de 1,3 e 2,5 vezes (ensaios 4 e 5), os resultados sugerem saturação total. Note-se que, para determinar com maior exactidão o grau de derivatização das esferas, a quantidade de grupos amina teria de ser experimentalmente avaliada (em vez de estimada), por um método apropriado.

Em paralelo a estas experiências, realizaram-se ensaios controlo das reacções, com condições em tudo análogas, mas sem a presença de esferas magnéticas (logo, de grupos amina). A quantificação final de CPF_X no meio reaccional indicou valores ligeiramente inferiores aos iniciais, com diferenças que nunca ultrapassaram os 2,2 %. Isto mostra que não houve reacções secundárias de significado.

Em síntese, foi conseguida uma precisa quantificação de CPF_X por cromatografia líquida de alta performance, bem como uma eficiente ligação covalente da CPF_X às esferas.

2 – Selecção por phage display

2.1 – Análise da integridade da biblioteca Griffin.1

Foi efectuado um teste de modo a analisar a integridade da biblioteca. Para tal, 11 fragmentos de anticorpos foram amplificados por PCR, seguido de análise por RFLP. Verificou-se que todos esses fragmentos possuíam, tal como desejado, um padrão de restrição diferente (Figura 3.3).

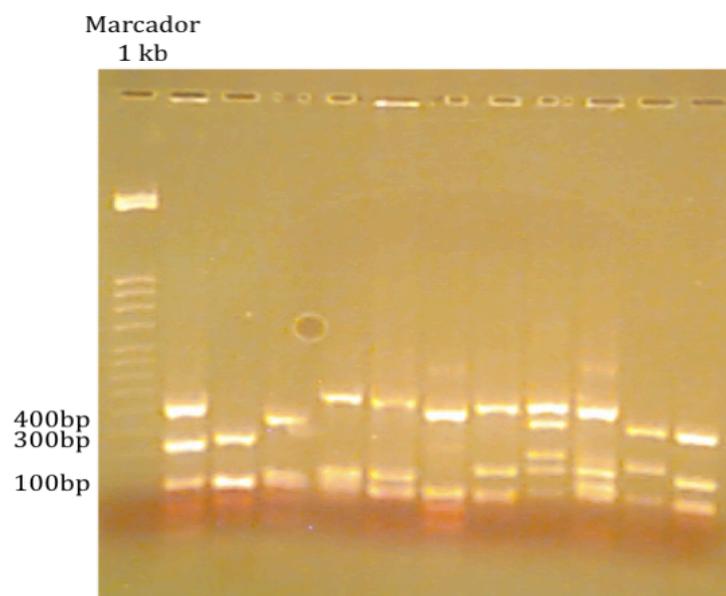


Figura 3.3 – Padrão de restrição de fragmentos de anticorpos recombinantes da biblioteca Griffin.1, utilizando a enzima de restrição BstNI. Observa-se que todos os 11 fragmentos possuem um padrão diferente.

2.2 – Cromatografia de exclusão molecular dos phAbs eluídos

Um método eficiente para a eluição dos fagos ligados às esferas magnéticas é a inclusão de CPFX livre na solução de eluição, com concentrações decrescentes ao longo dos vários ciclos de selecção. No entanto, sendo um agente antibacteriano, a presença de CPFX iria promover a morte de *E. coli* durante a etapa posterior de amplificação dos fagos eluídos. Portanto, é necessário um passo adicional para separar os fagos da CPFX nas soluções de eluição.

Inicialmente, testou-se a tecnologia de centrifugação com *centriprep* (BioRad, Alemanha), mas sem resultados satisfatórios. *Centriprep* é um dispositivo de ultra-filtração utilizado para purificar, concentrar ou desalinizar amostras biológicas. A separação é feita por uma membrana de nitrocelulose regenerada, de baixa adsorptividade. Utilizando o modelo YM-50 (que tem um limite de separação de 50000 Da), as moléculas de CPFX (~ 330 Da) ficariam no filtrado e os fagos ficariam retidos no líquido remanescente (retentato). No entanto, quando se contabilizaram os fagos no retentato, verificaram-se perdas significativas destes, mesmo após algumas tentativas de optimização do procedimento.

Um método alternativo para a separação pretendida é a cromatografia de exclusão molecular. Para tal, utilizou-se uma coluna *Econo Pac 10DG desalting* (BioRad, Alemanha). Estas colunas retêm moléculas de menores dimensões nos poros da matriz, enquanto excluem partículas de maiores dimensões. As colunas *Econo Pac 10DG* permitem a exclusão de moléculas acima de 6000 Da.

Começou-se por testar a eficiência do método. Após equilibrar a coluna com PBS, adicionou-se uma quantidade de fagos passível de ser determinada por simples ELISA. A esta solução adicionou-se também uma quantidade de CPFX capaz de inibir o crescimento de *E. coli*. Após passagem das amostras pela coluna, esta foi lavada com solução NaCl 1 M. A presença de fagos nas fracções de eluente e de solução de lavagem foi verificada por ELISA directa. Os resultados estão apresentados nas tabelas seguintes.

Tabela 3.2 – Ensaio de separação de fagos da CPFV por cromatografia de exclusão molecular. Após passagem pela coluna de uma mistura de fagos e CPFV, fracções de eluente foram analisados em ELISA directa para a determinação do volume de eluição dos fagos. Como controlo positivo da ELISA, utilizou-se a mesma quantidade de fagos, sem passar pela coluna, e como controlo negativo PBS sem fagos. Os sinais de ELISA são médias de triplicados.

Volume de eluição	Sinal ELISA, OD _{415nm}
0.5	0.37 ± 0.030
1	2.33 ± 0.190
1,5	2,55 ± 0,210
2	0,479 ± 0,010
2,5	0,074 ± 0,008
3	0,077 ± 0,020
3,5	0,063 ± 0,004
4	0,037 ± 0,008
4,5	0,029 ± 0,005
5	0,028 ± 0,010
5,5	0,016 ± 0,010
6	0,027 ± 0,003
6,5	0,031 ± 0,008
7	0,033 ± 0,007
7,5	0,044 ± 0,017
8	0,034 ± 0,014
8,5	0,033 ± 0,030
Lavagem com NaCl	0.028 ± 0.010
Controlo positivo	2.89 ± 0.108
Controlo negativo	0,025 ± 0,008

Através da Tabela 3.2, pode-se verificar que praticamente todos os fagos saem nos primeiros 2,0 mL de eluente (volume de exclusão). A partir daí, verifica-se a ausência de fagos. A lavagem final com concentrações elevadas de sal também não apresentou fagos, o que indica que estes não adsorvem à coluna.

A presença de CPFV nas amostras de eluição foi testada através da capacidade dessas fracções inibirem crescimento bacteriano. Este teste indicou (dados não incluídos) que a CPFV é eluída entre os volumes 7 e 8 mL do eluente.

Conclui-se, assim, que este processo de cromatografia de exclusão molecular é um método eficiente para separar a CPFV dos fagos eluídos.

2.3 – Ciclos de selecção por phage display

A biblioteca Griffin.1 foi utilizada para seleccionar fragmentos de anticorpos recombinantes contra CPFV immobilizada em esferas magnéticas, efectuando-se quatro ciclos de selecção. O processo é demonstrado no esquema seguinte (Figura 3.4).

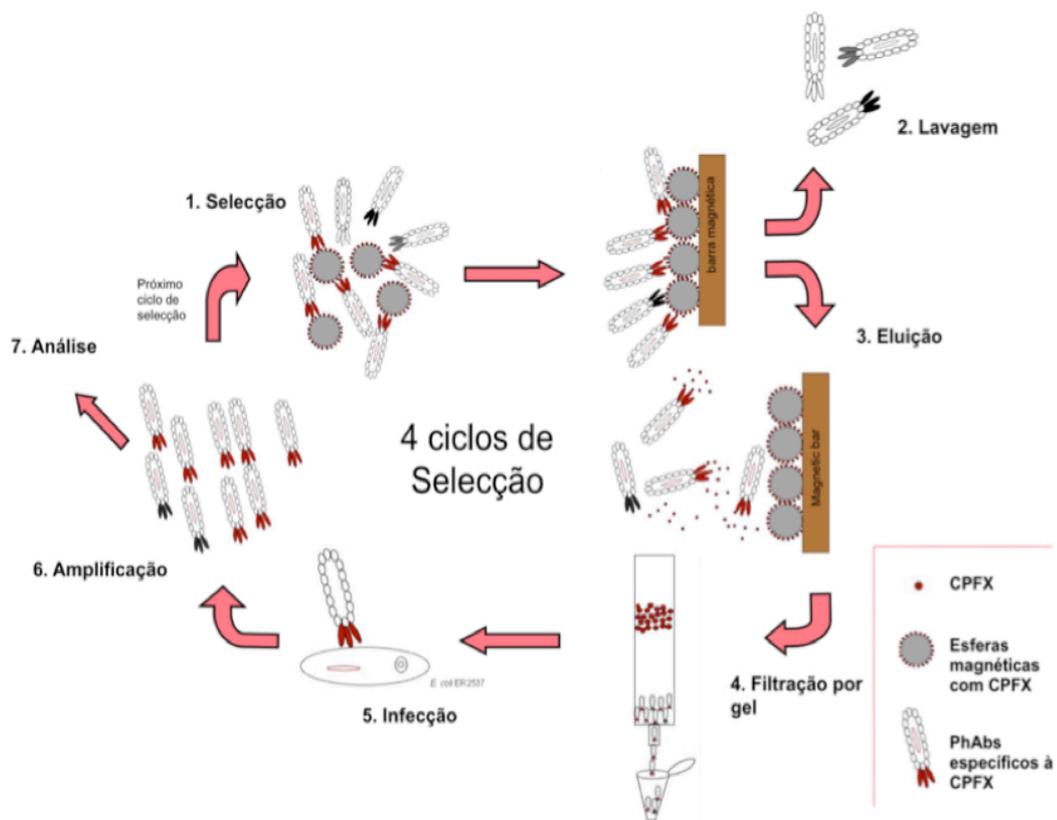


Figura 3.4 – Representação esquemática do processo de selecção de anticorpos recombinantes por *phage display*. Realizaram-se quatro ciclos de selecção de phAbs, partindo da biblioteca Griffin.1, com CPF immobilizada na superfície de esferas magnéticas (CPF representada com pontos vermelhos e esferas magnéticas com círculos cinzentos). Após lavagem de phAbs não específicos, efectuaram-se eluições específicas com CPF em solução.

O primeiro ciclo de selecção foi realizado a partir da biblioteca Griffin.1. Uma amostra desta biblioteca, contendo uma variabilidade de cerca de 10^{10} fragmentos de anticorpos à superfície de fagos, foi incubada com esferas magnéticas contendo CPF à superfície. A seguir, as esferas foram lavadas com PBST e PBS para remoção dos phAbs não específicos. Após eluição dos phAbs específicos com CPF livre, elas foram separadas desta CPF por cromatografia de exclusão molecular e posteriormente amplificadas. Devido a múltiplas interacções não específicas, realizaram-se quatro ciclos de selecção, no intuito de isolar phAbs de elevada especificidade.

O processo de selecção é dependente de vários factores, tais como tempo de incubação dos phAbs com a CPF immobilizada, frequências das lavagens, quantidade

de CPFY no eluente e tempo de incubação com esta CPFY livre (Griffiths e Duncan, 1998). Estes parâmetros foram otimizados e foram-se tornando mais restritivos ao longo dos ciclos de selecção (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Tempos de incubação, lavagens, quantidades de CPFY livre e tempos de eluição em cada ciclo de selecção

Ciclos	Tempo de incubação (h)	Lavagens	CPFY no eluente (mM)	Tempo de eluição (min)
1	2	4x PBST + 4x PBS	25	30
2	2	4x PBST + 4x PBS	25	20
3	1,5	8x PBST + 8x PBS	2,5	15
4	1	10x PBST + 10x PBS	0,10	10

Após cada ciclo de selecção, a quantidade de phAbs eluídos foi quantificada, a fim de determinar a percentagem de recuperação. Esta é definida como a razão entre a quantidade de phAbs eluídos e a quantidade de phAbs adicionados no início do ciclo, multiplicada por 100.

Este parâmetro permite ir monitorizando o processo de selecção (Griffiths *et al*, 1994). Caso a percentagem de recuperação seja muito baixa ao longo dos ciclos, tal significa que o procedimento é muito selectivo (poucos phAbs foram seleccionados). Se a percentagem de recuperação for muito elevada, poderá significar que a selecção não está a ser muito efectiva. Os valores deste parâmetro verificados neste trabalho estão na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Percentagens de recuperação dos phAbs eluídos em cada ciclo de selecção

Ciclo	Recuperação (%)
1	2×10^{-3}
2	7×10^{-6}
3	1×10^{-5}
4	3×10^{-4}

A diferença de recuperação entre o 1º e 2º ciclo pode dever-se à diferença de diversidade das amostras iniciais: no 1º ciclo existe uma grande diversidade, pelo que será de esperar uma selecção menos específica; no 2º ciclo, parte-se de uma diversidade muito menor, permitindo uma selecção deveras específica. Os ligeiros aumentos nos 3º e 4º ciclos podem explicar-se pela reduzida diversidade das amostras iniciais destes ciclos, levando a um comportamento mais homogéneo dos seus phAbs.

2.4 – ELISA dos fagos obtidos ao longo dos ciclos de selecção

Os phAbs obtidos no final de cada ciclo de selecção foram analisados por ELISA, de modo a determinar o enriquecimento em fagos positivos contra CPFX.

Num primeiro passo, tentou-se realizar a ELISA em placas tradicionais que contêm grupos amina livres à superfície, “*Nunc NH Modules*” (Nunc, Nova Iorque, EUA). Tentou-se imobilizar a CPFX por método semelhante ao utilizado para as esferas magnéticas, bem como pelo protocolo sugerido pelo fabricante, mas sem sucesso em ambos os casos.

Tentou-se, então, utilizar as próprias esferas magnéticas como suporte para o ensaio de ELISA. Após várias modificações no procedimento (volumes e tempos de incubações, bem como etapas de lavagens) atingiu-se uma boa reprodutibilidade no

método (como se pode observar pelos desvios padrão apresentados na Tabela 3.6). Neste imunoensaio, verificou-se um aumento de sinal ao longo dos ciclos de *panning* (Tabela 3.6. e Figura 3.5).

Tabela 3.6 – Resultados dos ensaios de ELISA (OD a 415 nm) com os fagos policlonais obtidos nos vários ciclos de selecção (4 ciclos). Os valores são médias de triplicados.

	Controlo	Biblioteca	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	4º Ciclo
Média Sinal (OD _{415nm})	0,059	0,112	0,118	0,199	0,249	0,652
± desvio padrão	± 0,012	± 0,026	± 0,021	± 0,025	± 0,032	± 0,047

O facto de a ELISA ter funcionado nas esferas magnéticas, e não nas placas, pode dever-se a diversos factores. Em primeiro lugar, pode não ter ocorrido ligação de CPFX às placas. Este facto poderia ter sido elucidado realizando quantificação de grupos amina livres nas placas. Em segundo lugar, as esferas magnéticas aumentam a área de superfície sólida onde se apresenta a CPFX, facilitando o acesso dos phAbs à CPFX. A própria estrutura tridimensional convexa das esferas, em lugar da estrutura plana das placas, poderá facilitar o acesso dos fagos a locais de ligação muito próximos

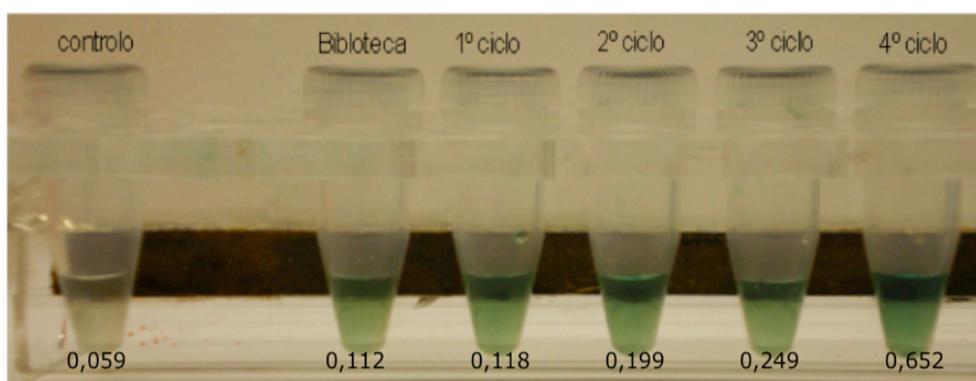


Figura 3.5 – Ensaio de ELISA de phAbs policlonais obtidos ao longo dos quatro ciclos de selecção. Verifica-se um aumento gradual na intensidade do sinal ao longo dos ciclos de selecção.

Outros autores chegaram a resultados semelhantes, na selecção por *phage display* de phAbs contra fosfatase alcalina (Kala *et al.*, 1997). Estes, apesar de observarem um aumento no número de phAbs eluídos ao longo de diversos ciclos de selecção, não observaram qualquer sinal de enriquecimento através de ELISA convencional (em microplacas). No entanto, esse enriquecimento foi observado através de ELISA com esferas magnéticas.

2.5 – PCR de clones individuais

No final do 4º ciclo de selecção, analisaram-se clones individuais, quer para determinar a presença de fragmentos de anticorpos, quer para avaliar posteriormente a variabilidade entre os clones.

Para o primeiro objectivo, amplificou-se por PCR o segmento correspondente ao *insert* scFv + *tags* com os *primers* LMB3 e FdSEQ (ver Figura 1.6). Escolheram-se aleatoriamente 32 clones obtidos no 4º ciclo de selecção. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (Figura 3.6).

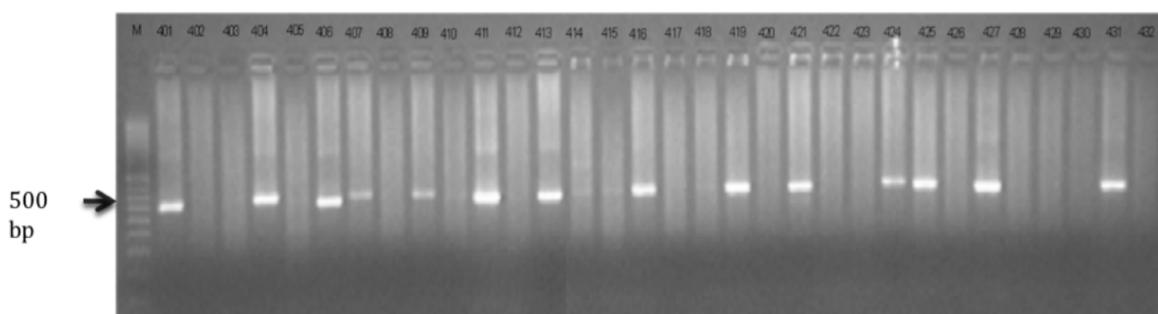


Figura 3.6 – Electroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de PCR dos segmentos correspondentes aos fragmentos de anticorpos, de clones individuais obtidos no 4º ciclo de selecção. Os *primers* utilizados foram o LMB3 e o FdSEQ (Griffiths *et al.*, 1994).

Verificou-se que, dos 32 clones individuais, apenas 17 possuíam um segmento de anticorpo (401, 404, 406, 407, 409, 410, 411, 413, 414, 415, 416, 419, 421, 424, 425, 427, 431). Esta ausência de fragmentos já foi previamente relatada e constitui uma limitação da técnica de *phage display* (Berdichevsky *et al.*, 1999). Segundo estes

autores, após vários ciclos de selecção, poderá haver uma acumulação de clones que perdem o *insert*, ou simplesmente estes são enriquecidos ao longo dos mesmos ciclos.

Curiosamente, verificou-se que os *inserts* (<500 pb) correspondem, todos eles, a apenas uma cadeia do anticorpo (V_H ou V_L), e não ao scFv inteiro (que possui cerca de 800 bp). Uma selecção preferencial de fagos contendo apenas cadeias V_L , em vez de scFv completos, em ciclos sucessivos de *panning* da mesma biblioteca Griffin.1 foi previamente observada e analisada por Bruin *et al.* (1999). Usando um protocolo padrão com eluição por trietilamina 0.1 M durante 10 min, estes autores verificaram um enriquecimento sucessivo nesses fagos. Eles apontam duas causas possíveis: 1) eluição preferencial desses fagos, de menor afinidade, pelo protocolo anterior; 2) enriquecimento dos clones com *inserts* curtos durante o crescimento bacteriano. O trabalho mostrou que a primeira hipótese ocorre e que estes clones não resultam de perda de material genético de *inserts* inteiros. Refira-se que a biblioteca original já contém fagemídeos apenas com a região V_L (e outros com apenas V_H), dado o modo como ela é construída. Aqueles autores estudaram ainda a influência das condições de eluição, sobretudo o tempo, tendo observado que o enriquecimento em fragmentos curtos é invertido em ciclos avançados de selecção (tipicamente, a partir do 4º ciclo), quando se utiliza um tempo de contacto da solução de trietilamina de 30 min. Ou seja, os resultados deste artigo não são claramente conclusivos quanto à origem do enriquecimento em fagos com fragmentos curtos.

O aparecimento de *inserts* incompletos pode ser explicável se atendermos a que a biblioteca foi construída por reclonagem, separadamente dos domínios V_H e V_L . Assim, é natural que a biblioteca contenha clones com apenas uma cadeia variável (V_H ou V_L). Conforme explicado anteriormente, estes fragmentos encurtados apresentam vantagens na selecção. Por último, o tamanho reduzido do antigénio (CPFX), pode também favorecer a selecção de fragmentos de anticorpos mais pequenos, em detrimento de scFvs inteiros.

2.6 – ELISA de clones individuais

Oito dos clones anteriores que continham *insert* foram escolhidos aleatoriamente para análise em ELISA com esferas magnéticas, a fim de determinar a sua especificidade contra a CPFV. Os resultados encontram-se na Tabela 3.7 e Figura 3.7.

Tabela 3.7 – Valores do sinal (OD a 415 nm) de ELISA em esferas magnéticas de oito clones individuais obtidos no 4º ciclo de selecção. Seis clones foram identificados como positivos contra a CPFV imobilizada nas esferas (clones 401, 404, 406, 411, 413 e 419), enquanto dois eram negativos (407 e 410).

	Controlo	401	404	406	411	413	419	407	410
Média Sinal									
OD _{415nm}	0,028	0,204	0,184	0,384	0,354	0,234	0,194	0,041	0,050
± desvio padrão	± 0,021	± 0,017	± 0,020	± 0,019	± 0,025	± 0,003	± 0,011	± 0,010	± 0,009

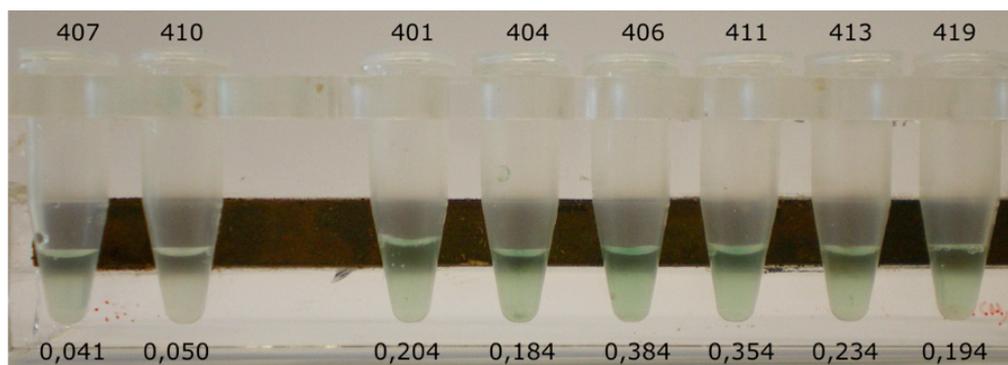


Figura 3.7 - ELISA em esferas magnéticas de oito clones individuais (correspondentes aos da Tabela 3.7), obtidos no 4º ciclo de selecção. Visualizaram-se as diferenças de sinal dos seis clones identificados como positivos contra a CPFV imobilizada nas esferas (clones 401, 404, 406, 411, 413 e 419), em relação aos dois clones negativos (407 e 410).

Dos oito clones analisados, verificou-se que seis eram positivos contra a CPFX – 401, 404, 406, 411, 423, 419 – enquanto dois eram negativos – 407 e 410. Os resultados estão na Figura 3.7 e Tabela 3.7. Os clones foram considerados positivos quando o seu sinal ultrapassou o sinal do ensaio controlo somado a três vezes o respectivo desvio padrão (positivo com $OD_{600} > 0,084$).

2.7 – RFLP de clones individuais

A fim de avaliar a diversidade dos seis clones positivos, estes foram analisados por RFLP com a enzima BstNI, que corta frequentemente nos fragmentos V_H e V_L .

Verificou-se que os clones 401, 404, 413 e 419 possuíam padrões de restrição diferentes entre si (Figura 3.8). Os clones 406 e 411 apresentaram padrões de restrição iguais entre si (mas diferentes dos restantes), podendo tratar-se ou não do mesmo fragmento. Estes dados foram posteriormente corroborados por sequenciação dos seis fragmentos.

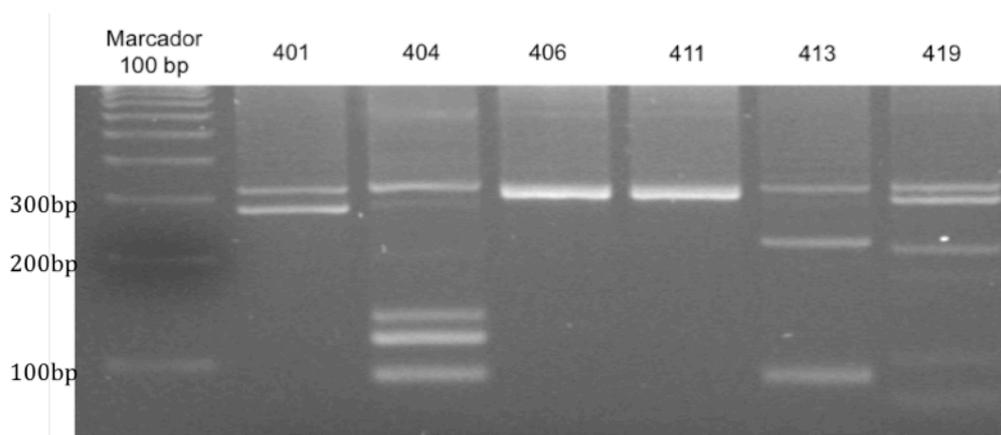


Figura 3.8 – Padrão de restrição, por RFLP, dos seis clones positivos contra CPFX em ELISA. Verifica-se que os clones 406 e 411 possuem o mesmo padrão de restrição. Todos os outros clones possuem padrões de restrição diferentes.

2.8 – Sequenciação dos fragmentos obtidos

A variabilidade entre os clones, bem como a identificação do tipo de fragmento presente (V_H ou V_L) foi determinada por sequenciação.

A reacção de sequenciação foi feita utilizando um *kit* específico e seguindo as instruções do fabricante. Utilizou-se o *primer* LMB3 e, como alvo, o pHEN2 com o fragmento anti-CPFX inserido, obtido através de um *miniprep*. A sequência foi lida utilizando um sequenciador automático.

Dos seis fragmentos, obtiveram-se as sequências de apenas quatro (404, 406, 411 e 419), devido a problemas ocorridos durante a sequenciação (electroforetograma e sequências obtidas encontram-se em anexo). Tomando em consideração que os restantes dois fragmentos foram eliminados com base em resultados de ELISA competitiva (ver secção 3.9), a sequenciação deles não foi repetida. Os clones 406 e 411 revelaram serem idênticos. Na Tabela 3.8 encontra-se o resumo das três sequências obtidas e em anexo encontra-se o resultado completo da sequenciação, os electroforegramas, bem como as respectivas sequências completas de aminoácidos.

Curiosamente, os três fragmentos sequenciados com sucesso indicaram serem todos segmentos V_L . Talvez o facto da CPFX ser uma molécula de pequeno tamanho tenha contribuído para uma selecção desses fragmentos, em detrimento de scFvs completos. Outras razões já foram discutidas na secção 2.5. O facto de se tratar de segmentos V_L , e não V_H , é de explicação mais difícil porque é conhecido que o CDR-H3 (presente em V_H) é a zona de IgG mais envolvida na ligação ao antigénio.

Tabela 3.8 – Sequências dos segmentos CDR-3s e dos segmentos das linhas germinativas dos genes V, obtidos a partir dos clones 404, 406, 411 e 419. Os genes V foram sequenciados e a linha germinativa foi identificada baseada na homologia obtida através da base de dados VBASE, compilada por Tomlinson *et al.* (1995). Os CDR-3s foram determinados tal como definido por Kabat *et al.* (1991).

Fragmento	Família	Segmento	CDR-L3
404	VkI	DPk9	QQSYSTCQ
406/411	VkII	DPk17	TQATQFCT
419	VkII	DPk15	MQALQTLWIT

2.9 – ELISA Competitiva

Para aplicação em diagnóstico, é de interesse que os fragmentos tenham capacidade de ligação à CPFX em solução e não apenas à CPFX imobilizada. Essa capacidade foi avaliada por ELISAs competitivas com esferas magnéticas, contendo diferentes concentrações de CPFX livre em solução e utilizando phAbs obtidos a partir dos clones 401, 404, 406, 413 e 419. A utilização de phAbs em vez de fragmentos de anticorpos na sua forma solúvel está reportada em bibliografia (Petrenko e Smith, 2000; Petrenko, 2008).

Para cada um daqueles clones foram realizados três testes de modo independente, e os respectivos valores de absorvância encontram-se em anexo (Anexo A5). A síntese de resultados está na Figura 3.9.

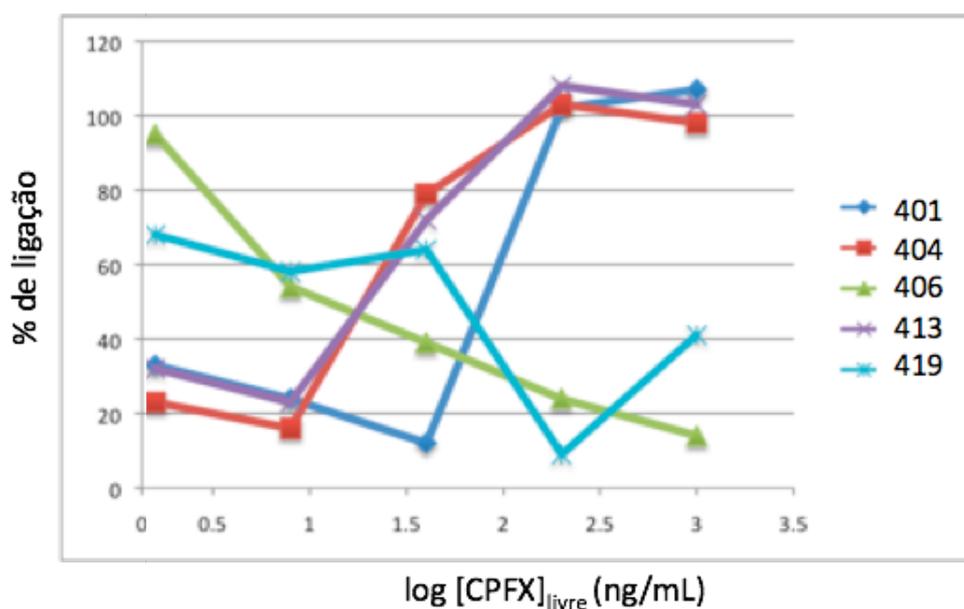


Figura 3.9 - Representação gráfica do comportamento de clones individuais em ELISA competitiva. Os valores de concentração de CPFX referem-se a valores de CPFX em solução, em competição com a CPFX imobilizada nas esferas magnéticas.

A percentagem de ligação é definida como a razão entre o sinal de ELISA de um ensaio e o sinal do ensaio branco, multiplicado por 100.

Apenas o clone 406 apresentou um decréscimo linear na percentagem de ligação à medida que a concentração de CPFX em solução aumentou. Este é o comportamento esperado, uma vez que os phAbs ligam-se à CPFX em solução, libertando-se da CPFX imobilizada nas esferas magnéticas (ELISA competitiva). No entanto, em todos os outros clones, esta correlação não aconteceu. Isto pode dever-se ao facto destas ELISAs serem realizadas com phAbs (e não com os fragmentos isolados), que poderão promover múltiplas interacções não-específicas. Observa-se que o clone 406 apresenta um comportamento relativamente linear, tendo sido seleccionado para estudos posteriores. A equação de ajuste linear dos resultados encontra-se no Anexo A5.

O limite de detecção de CPFX por ELISA usando este phAb foi calculado com base no valor médio de absorvância do ensaio em branco e subtraindo três vezes o seu desvio padrão. O limite de quantificação foi calculado com base no mesmo valor médio de absorvância, mas subtraindo dez vezes o valor do desvio padrão. O valor de concentração para cada limite foi então calculado usando a equação de regressão que figura no Anexo 5. Refira-se que o valor de absorvância do ensaio branco do clone 406 foi de $0,039 \pm 0,015$. Portanto:

Limite de detecção: 3,7 ng/mL ou 9,3 nM

Limite de quantificação: 13,1 ng/mL ou 33,1 nM

Observa-se que os limites de detecção e de quantificação deste ensaio são bastante baixos. Comparativamente a métodos de HPLC apresentados em bibliografia, estes limites apresentam-se dentro da mesma gama ou são cerca de dez vezes inferiores (Krol *et al.*, 1995; Manceau *et al.*, 1999). O método de HPLC desenvolvido neste trabalho tem também limites de detecção e quantificação cerca de dez vezes superiores. Refira-se que o método cromatográfico não foi optimizado com o objectivo de atingir elevada sensibilidade.

2.10 – ELISA competitiva com outras fluoroquinolonas e com outros antibióticos

Para avaliar a especificidade do fragmento 406, realizaram-se ensaios de ELISA competitiva com outras moléculas semelhantes à CPFX. Para tal, utilizaram-se três outras fluoroquinolonas: ofloxacina (OFLOX), norfloxacin (NOR) e enrofloxacin (ENRO). Analisaram-se ainda dois antibióticos não pertencentes ao grupo das fluoroquinolonas, a penicilina e a gentamicina. Os resultados destes ensaios estão traduzidos na Figura 3.10.

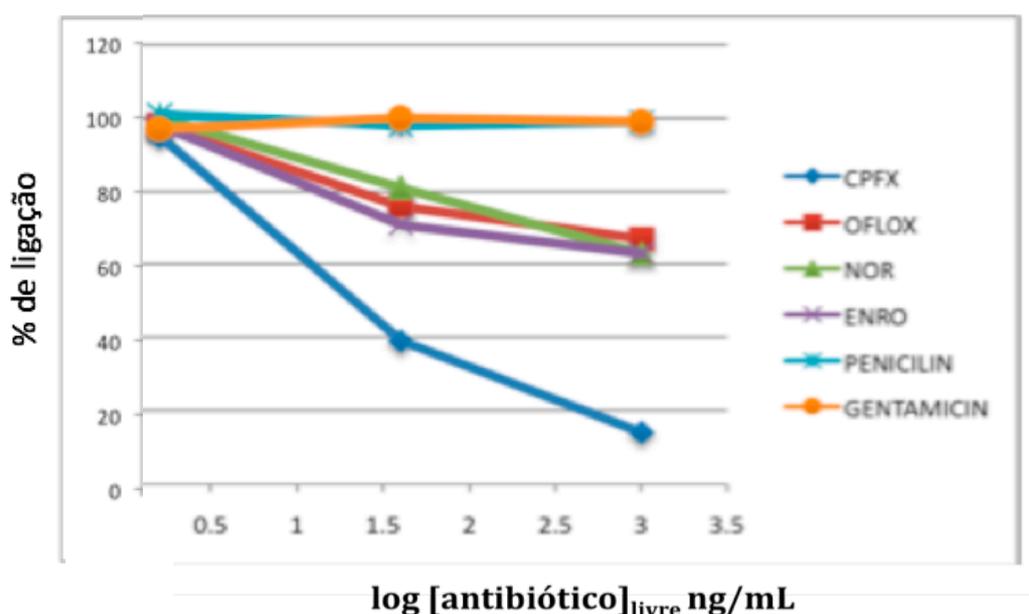


Figura 3.10 - Representação gráfica do comportamento do fragmento 406 em ELISAs competitivas com CPFX, outras três fluoroquinolonas (ofloxacina, norfloxacin e enrofloxacin) e com penicilina e gentamicina.

Por análise desta figura, observa-se um certo grau de reactividade cruzada do fragmento 406 com as três fluoroquinolonas analisadas. Isto não é surpreendente, uma vez que se tratam de moléculas de pequena massa molecular que partilham uma estrutura semelhante. Estas semelhanças explicam que o fragmento de anticorpo se ligue a esses epítomos. No entanto, é de salientar que o fragmento possui uma afinidade mais elevada para a CPFX.

A especificidade do clone e a reactividade cruzada entre CPFX e os restantes compostos podem ser quantificados através do parâmetro:

Percentagem de reactividade cruzada = (nmol CPFX para 50% ligação / nmol competidor para 50% ligação) x 100

Tabela 3.9 – Reactividades cruzadas dos phAbs do clone 406.

	% reactividade cruzada
CPFX	100
Ofloxacina	5,2
Norfloxacina	8,3
Enrofloxacina	12,3
Penicilina	<0,01
Gentamicina	<0,01

Através da Tabela 3.9 verifica-se que as restantes fluoroquinolonas analisadas têm baixos graus de competitividade com a CPFX. Em relação à penicilina e à gentamicina, verifica-se que estes phAbs não possuem qualquer afinidade para com essas moléculas, o que certamente se deve às suas estruturas serem bastante diferentes da de CPFX.

Tendo em conta que a CPFX utilizada para selecção dos phAbs foi imobilizada através do grupo carboxílico, este grupo terá baixa probabilidade de estar envolvido na ligação aos fragmentos de anticorpos. Observa-se que enrofloxacina apresenta maior reactividade cruzada. Este facto é também explicável quando se comparam as estruturas das moléculas (ver Figura 1.1). Observando que os phAbs possuem maior especificidade para a enrofloxacina do que para a norfloxacina e a ofloxacina, é possível presumir que os fragmentos de anticorpo poderão ter especificidade para locais próximos do grupo ciclopropilo, uma vez que este grupo está presente na CPFX e enrofloxacina, mas não nas restantes moléculas. Na ofloxacina o grupo ciclopropilo é substituído por um anel, apresentando talvez por isso a menor reactividade cruzada.

3 – Análise do fragmento isolado

3.1 – Produção em pequena escala e dot blot

De modo a aplicar este fragmento em ensaios para diagnóstico de CPFV, é necessário verificar até que ponto este é produzível em *E. coli*. Para tal, analisou-se a produção em *E. coli*, em pequena escala. Uma outra razão deste estudo é o facto de se tratar de um fragmento V_L isolado: vários estudos têm demonstrado que estes fragmentos de forma isolada possuem tendência a formar agregados (To *et al.*, 2005).

Na biblioteca Griffin.1, os scFv são clonados no vector fagemídeo pHEN2 a jusante da sequência de *pe/B leader*, que permite a expressão directa do scFv no periplasma. Esta expressão está sob o controlo do promotor *lac* (Figura 1.6) e é indutível com IPTG. No vector, entre a sequência myc-tag e o gene correspondente à proteína pIII, existe um codão *stop amber*, o qual, numa estirpe supressora, é por vezes lido como glutamina, outras vezes como codão *stop*.

Assim, é possível a produção directa dos fragmentos em *E. coli* ER2537 (supressora). Tentou-se, então, produzir o fragmento correspondente ao clone 406 (o melhor clone segundo ELISA competitiva). Fizeram-se crescimentos a 20, 25 e 30 °C e retiraram-se amostras a vários tempos (0, 1, 2, 3, 4, 8, 20 e 24 horas). Separaram-se o sobrenadante, a fracção periplásmica e a fracção do choque osmótico. A mistura do choque osmótico e da fracção periplásmica foi analisada por *dot blot* (Figura 3.11).

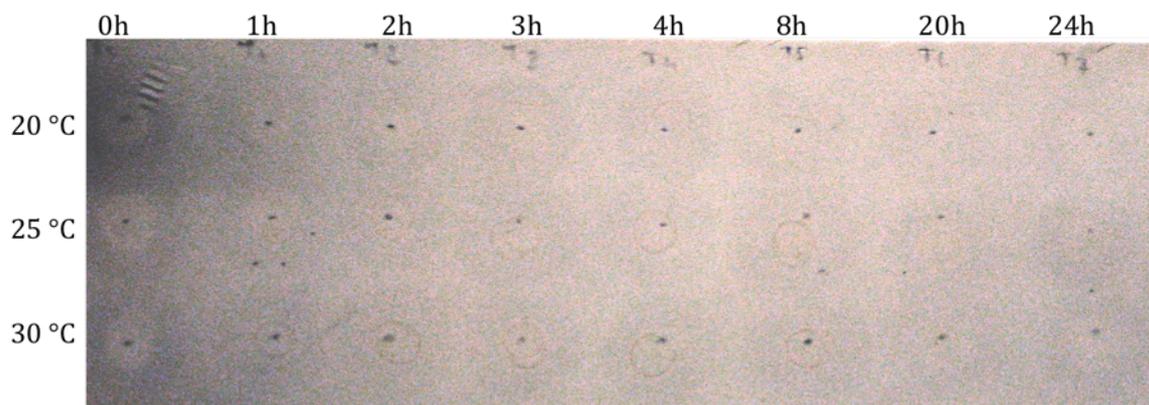


Figura 3.11 - Análise por *dot blot* da produção em pequena escala do fragmento V_L 406, a três temperaturas diferentes (20, 25 e 30 °C) e ao fim de diferentes tempos. A indicação da produção de fragmentos é dada pela presença de um anel de cor castanha; quanto maior a intensidade desse anel, maior a produção dos fragmentos.

Verificou-se, nas três temperaturas, um aumento de produção até um certo tempo, desaparecendo progressivamente o sinal do fragmento para tempos posteriores. Tal deverá significar que o fragmento é degradado.

Verificou-se que os melhores momentos de recolha do fragmento eram entre 4 e 8 horas, a 25 °C, ou entre 2 e 4 horas, a 30 °C. Nesta primeira fase, a produção de fragmentos VL a 37 °C não foi testada uma vez que a esta temperatura a bactéria possui uma taxa de crescimento máxima, sendo a maioria dos metabolitos produzida à sua taxa mais elevada. Isto pode levar à produção de interferentes indesejáveis (como proteases), ou favorecer a produção de agregados entre os fragmentos.

IV – Conclusões

A técnica de *phage display* é uma técnica poderosa, rápida, versátil e relativamente simples que, quando acoplada a esquemas de selecção e eluição de phAbs específicos e a diferentes processos de formação de bibliotecas, permite a obtenção de anticorpos altamente específicos e com diversas características.

Este trabalho teve como primeiro objectivo o isolamento de fragmentos de anticorpos recombinantes a partir da biblioteca semi-sintética Griffin.1. Posteriormente, caracterizaram-se a nível molecular os fragmentos isolados, quando expostos à superfície de fagos (phAbs) e analisou-se a sua capacidade para detectar e quantificar CPFX livre em solução.

Numa primeira etapa, foi necessária a imobilização da CPFX num suporte sólido, tendo-se optado por esferas magnéticas. Este processo foi feito por reacção química entre o grupo carboxílico da CPFX e os grupos amina presentes na superfície das esferas. De modo a determinar a eficiência da reacção, desenvolveu-se um método de HPLC para quantificar CPFX, baseado num outro descrito por Tuerk *et al.* (2006). O novo método apresentou um limite de detecção de 66,3 nM e um limite de quantificação de 266,1 nM.

Em relação à imobilização de CPFX, verificou-se que a adição de um ligeiro excesso de CPFX permite uma completa derivatização dos grupos amina das esferas magnéticas, quando a reacção é feita com uma concentração de carbodiimida adequada. Mais precisamente, a adição de CPFX em 1,5 vezes a quantidade de grupos amina é suficiente para saturar estes grupos. Uma vez que a cinética da reacção depende das concentrações dos intervenientes, este modelo será válido dentro das gamas de concentrações utilizadas neste trabalho: cerca de 10 mM CPFX / 8 mM NH₂ / 200 mM EDC. Verificou-se também que a adição de activadores frequentemente utilizados neste tipo de reacção, tais como N-hidroxisucínimida (NHS), é dispensável. Este processo de imobilização através da activação dos grupos carboxílicos com EDC poderá ser aplicado a outras fluoroquinolonas, bem como a outras moléculas de baixo peso molecular que apresentem grupos carboxílicos livres.

Numa segunda etapa, traçou-se um procedimento de selecção de fragmentos de anticorpos, por *phage display*, a partir da biblioteca de scFvs semi-sintética Griffin.1. Ao longo de quatro ciclos de selecção, utilizando um esquema de eluição contendo gradualmente menor quantidade de CPFX livre em solução e menores tempos de eluição, verificou-se um enriquecimento de phAbs específicos contra a CPFX. Ao fim

desses quatro ciclos, obtiveram-se seis clones específicos, conforme avaliado por um teste de ELISA com esferas magnéticas, previamente desenvolvido. Desses, apenas quatro foram correctamente sequenciados, mostrando estes serem fragmentos VL, e não scFvs inteiros (VH+VL, biblioteca Griffin.1). Destes, dois pertencem à mesma família VKII de segmentos (Tabela 3.9).

O isolamento preferencial de fagemídeos contendo *inserts* curtos foi previamente observado e estudado por Bruin *et al.* (1999), em selecções efectuadas com a mesma biblioteca Griffin.1. Estes autores apontaram para duas causas possíveis: eluição preferencial de fragmentos incompletos quando se utiliza um protocolo padrão (eluição com trietilamina durante 10 minutos); e enriquecimento dos clones com *inserts* curtos durante o crescimento bacteriano. Através de algumas experiências efectuadas, os autores apontam para o facto de as condições de eluição influenciarem a obtenção de scFv inteiros (supostamente, de maiores afinidades). Contudo, do estudo não se retira uma conclusão clara da origem do enriquecimento em fagos com fragmentos curtos.

Por análise em ELISA competitiva de phAbs obtidos a partir de clones individuais, verificou-se que dois deles (406 e 419) possuem a capacidade de ligar a CPFx em solução, para além da CPFx imobilizada nas esferas. No entanto, apenas o clone 406 apresentou um comportamento regular nessa ELISA. Os resultados com os restantes clones são de difícil explicação. Para clarificar, seria necessário produzir os fragmentos isolados e testá-los da mesma forma.

O ensaio de ELISA em esferas magnéticas a partir de phAbs obtidos do clone 406 possui uma sensibilidade de 9,3 nM e um limite de quantificação de 33,1 nM. Comparativamente ao método de HPLC desenvolvido e a vários outros apresentados em bibliografia (Krol *et al.*, 1995; Manceau *et al.*, 1999), estes valores são cerca de dez vezes inferiores.

Testes de ELISA para fluoroquinolonas previamente desenvolvidos (Duan e Yuan, 2001; Watanabe *et al.*, 2001) são mais sensíveis que o teste deste trabalho. Uma razão plausível da diferença é o facto daquelas ELISAs serem efectuadas com anticorpos produzidos a partir de animais imunizados. Este procedimento permite a obtenção de anticorpos com maiores afinidades, uma vez que há uma maturação *in vivo*. O fragmento de anticorpo do clone 406 foi obtido a partir de uma biblioteca não imunizada contra a CPFx, sendo improvável que nessa biblioteca existam fragmentos com afinidades tão elevadas. No entanto, o procedimento de imunização de animais é

bastante moroso, laborioso e caro, em comparação com o processo de selecção por phage display de bibliotecas sintéticas. Para além disso, a comparação de afinidades entre o fragmento agora isolado e os anticorpos da bibliografia seria mais correcta se efectuada com o fragmento solúvel, em vez de phAbs. A utilização de fagos em bioensaios, em substituição de anticorpos, não é, todavia, nova (Petrenko e Smith, 2000; Petrenko, 2008).

Através de ELISAS competitivas utilizando análogos à CPFX (enrofloxacina, ofloxacina e norfloxacina), verificou-se que os phAbs do clone 406 possuem reactividades cruzadas relativamente baixas. Através destes valores e por observação das estruturas das moléculas, foi possível presumir o local de ligação do fragmento de anticorpo à CPFX, concluindo-se que possivelmente possui afinidade para a zona onde se encontra o grupo ciclopropilo. Esta hipótese necessitaria de ser confirmada por análises estruturais da ligação do fragmento VL à CPFX.

Por fim, produziu-se o fragmento VL 406 em pequena escala. Nas condições utilizadas, verificou-se que a expressão era máxima ao fim de 4 a 8 horas, a 25 °C, e de 2 a 4 horas, a 30 °C. Concluiu-se, assim, que estes fragmentos são passíveis de serem produzidos em quantidades detectáveis, em estirpe de *E. coli* supressora. No entanto, quanto ao seu comportamento como fragmento livre, nada se pode concluir, sendo necessário para tal uma produção em maior escala, seguida de purificação e ensaios de ELISA semelhantes aos realizados. Estas etapas permitirão o desenvolvimento de ensaios de detecção e quantificação de CPFX em amostras problema (ambientais, alimentares ou clínicas).

V – Proposta para trabalho futuro

As etapas iniciais que geralmente se efectuam em tecnologia de *phage display* foram efectuadas neste trabalho. No entanto, são necessários estudos com fragmentos solúveis isolados, em lugar de phAbs. Assim, é necessária a produção em média escala (500 mL a 1 L de cultura) do fragmento de anticorpo correspondente ao clone 406. Esta produção deverá ser efectuada a 25 °C, durante 4 a 8 horas, seguindo-se uma purificação do fragmento a partir da fracção periplasmática da cultura induzida. A purificação será realizada por IMAC, com colunas carregadas com níquel, para interacção com o His-tag presente nos fragmentos. Após purificação, será necessária a confirmação da funcionalidade do fragmento (capacidade de ligação à CPFX) através de ELISAs.

Para determinar a afinidade destes fragmentos, poder-se-á recorrer a um teste de, por exemplo, SPR (*surface plasmon resonance*). O local de ligação do fragmento à CPFX pode ser elucidado por um estudo estrutural, tal como cristalografia de raios X.

Após caracterização completa do fragmento de anticorpo, podem-se desenvolver testes de detecção e quantificação de CPFX, por ELISA, em amostras problema (ambientais, alimentares ou clínicas).

VI – Bibliografia

Acar JF e Goldstein FW (1997) Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* **24 Suppl 1**: S67-73

American Society for Microbiology (1995) Report of the American Society for Microbiology Task Force on Antibiotic Resistance. Washington. 1-23

Berdichevsky Y, Ben-Zeev E, Lamed R e Benhar I (1999) Phage display of a cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* and its application as a tool for antibody engineering. *J Immunol Methods* **228**: 151-162

Blondeau JM e Yaschuk Y (1996) Canadian ciprofloxacin susceptibility study: comparative study from 15 medical centers. Canadian Ciprofloxacin Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1729-1732

Brown SA (1996) Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharmacol Ther* **19**: 1-14

Bruin R, Spelt K, Mol J, Koes R, Quattrocchio F (1999) Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* **17**: 297-399

Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R e Fanelli R (2003) Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environ Sci Technol* **37**: 1241-1248

Carratala J, Fernandez-Sevilla A, Tubau F, Callis M e Gudiol F (1995) Emergence of quinolone-resistant *Escherichia coli* bacteremia in neutropenic patients with cancer who have received prophylactic norfloxacin. *Clin Infect Dis* **20**: 557-60

Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R e Zuccato E (2005) A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr A* **1092**: 206-215

Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD e Winter G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-628

Duan J e Yuan Z (2001) Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *J Agric Food Chem* **49**: 1087-1089

Ferdig M, Kaleta A, Vo TD e Buchberger W (2004) Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro)quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples. *J Chromatogr A* **1047**: 305-311

Ferdig M, Kaleta A, Vo TD e Buchberger W (2004) Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro)quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples. *J Chromatogr A* **1047**: 305-311

Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA e Giger W (2001) Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chem* **73**: 3632-3638

Golet EM, Xifra I, Siegrist H, Alder AC e Giger W (2003) Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ Sci Technol* **37**: 3243-3249

Griffiths AD e Duncan AR (1998) Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 102-108

Griffiths AD, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann E, Jones PT, Low NM, Allison TJ, Prospero TD, Hoogenboom HR, Nissim A, Cox JPL, Harrison JL, Zaccolo M, Gherardi E e Winter G (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal* **13**: 3245-3260

Hawkey PM (2003) Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* **51 Suppl 1**: 29-35

Holliger P e Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23**: 1126-1136

Hoogenboom HR (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* **23**: 1105-1116

Hoogenboom HR (2002) Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol* **178**: 1-37

Hudson PJ e Souriau C (2003) Engineered antibodies. *Nat Med* **9**: 129-134

Jacobs M (2005) Worldwide Overview of Antimicrobial Resistance. *International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance*

Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA e Punt PJ (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Fact* **2**: 1

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS e Foeller C (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. *US Department of Health and Human Services*. Bethesda. USA

Kala M, Bajaj K e Sinha S (1997) Magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detects antigen-specific binding by phage-displayed scFv antibodies that are not detected with conventional ELISA. *Anal Biochem* **254**: 263-266

Krol GJ, Beck GW e Benham T (1995) HPLC analysis of ciprofloxacin and ciprofloxacin metabolites in body fluids. *J Pharm Biomed Anal* **14**: 181-190

Manceau J, Gicquel M, Laurentie M e Sanders P (1999) Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **726**: 175-184

- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G e Chiswell DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554
- Mehta AC, Hart-Davies S e Kay EA (1992) High-performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin in plasma. *J Clin Pharm Ther* **17**: 117-120
- Nakajima e Ikada Y (1995) Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjug Chem* **6**: 123-130
- Parshikov IA, Moody JD, Freeman JP, Lay JO, Williams AJ, Heinze TM e Sutherland JB (2002) Formation of conjugates from ciprofloxacin and norfloxacin in cultures of *Trichoderma viridae*. *Mycologia* **94**: 1-5
- Petrenko VA (2008) Landscape phage as a molecular recognition interface for detection devices. *Microelectron J* **39**: 202-207
- Petrenko VA e Smith GP (2000) Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng* **13**: 589-592
- Richard P, Delangle MH, Merrien D, Barille S, Reynaud A, Minozzi C e Richet H (1994) Fluoroquinolone use and fluoroquinolone resistance: is there an association? *Clin Infect Dis* **19**: 54-59
- Riedstra S, Cerejo L, Bras S, Costa PMP e Ferreira JPM (2007) Optimization of the conditions for the expression of anti-transthyretin scFv in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **131**: S179-S180
- Sheedy C, MacKenzie CR e Hall JC (2007) Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies. *Biotechnol Adv* **25**: 333-352
- Silva Ferreira AC, Hogg T e Guedes de Pinho P (2003) Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J Agric Food Chem* **51**: 1377-1381

Skerra A, Pfitzinger I e Pluckthun A (1991) The functional expression of antibody fv fragments in *E. coli* - improved vectors and generally applicable purification technique.

Biotechnol **9**: 273-278

To R, Hirama T, Arbadi-Ghahroudi M, MacKenzei R, Wang P, Xu P, Ni F, e Tanha J (2005)

Isolation of monomeric human V_HS by a phage selection. *J Bio Chem* **280**: 41395-41403

Tomlinson IM, Williams SC, Corbett SJ, Cox JPL e Winter G (1995) VBASE Sequencing

Directory. *MRC Centre for Protein Engineering*. Cambridge, UK

Tuerk J, Reinders M, Dreyer D, Kiffmeyer TK, Schmidt KG e Kuss HM (2006) Analysis of antibiotics in urine and wipe samples from environmental and biological monitoring -

comparison of HPLC with UV-, single MS- and tandem MS-detection. *J Chromatogr B Analyt*

Technol Biomed Life Sci **831**: 72-80

Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT e Winter G (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*

341: 544-546

Watanabe H, Satake A, Kido Y e Tsuji A (2001) Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological

matrices. *Analyst* **127**: 98-103

Willats WG (2002) Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* **50**: 837-854

Yuan Z, Duan J, Fan S e Kong K (2001) Comparison of an ELISA and a HPLC for

determination of ciprofloxacin residues in pork. *Food Agric Immunol* **13**: 199-204

Zacco E, Pividori MI, Alegret S, Galve R e Marco MP (2006) Electrochemical

magnetoimmunosensing strategy for the detection of pesticides residues. *Anal Chem* **78**:

1780-1788

VII – Anexos

Anexo 1 – Cromatograma de uma solução pura de CFX em solução aquosa a pH 4

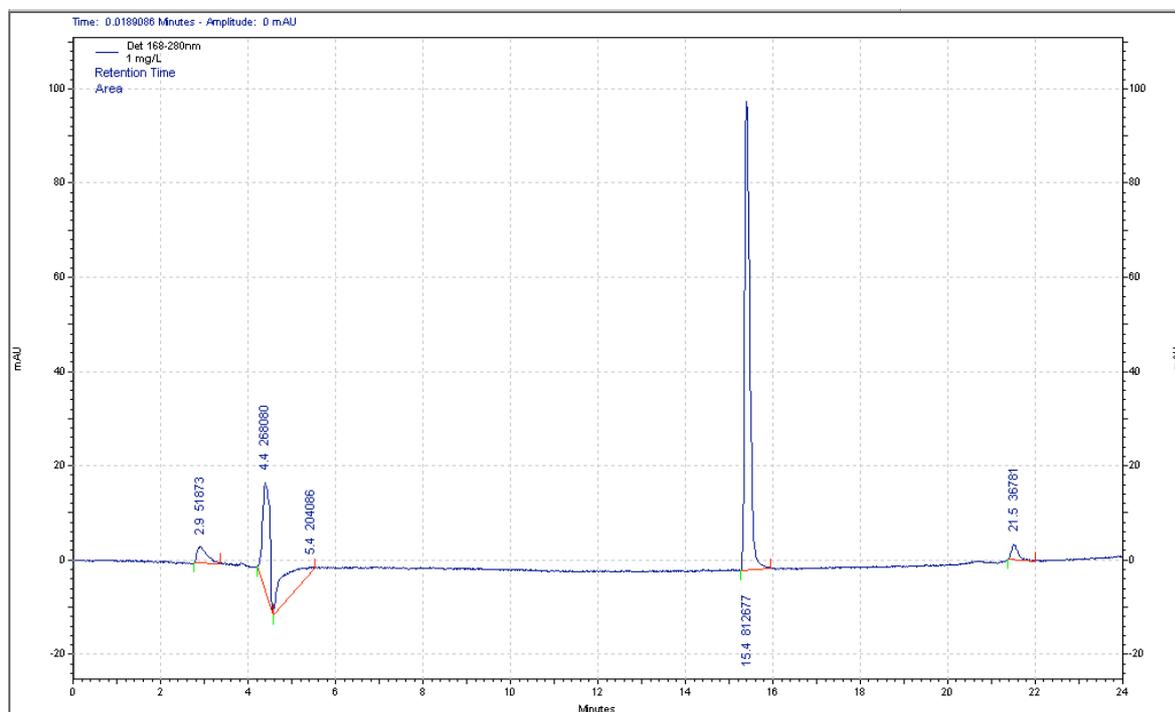


Figura A.1 – Cromatograma de uma solução pura de CFX a 1,00 mg/mL, em solução aquosa a pH 4.0. Por análise da Figura A1, verifica-se que o tempo de eluição da CFX é de 15,4 min. Observa-se ainda que o tempo de saída do volume *void* é de 4,4 min. Os valores das áreas dos picos foram obtidos através do *software* "System Gold" (v6.0, Beckam, USA).

Anexo 2 – Curva de calibração da área de pico de CPFY, em função da concentração.

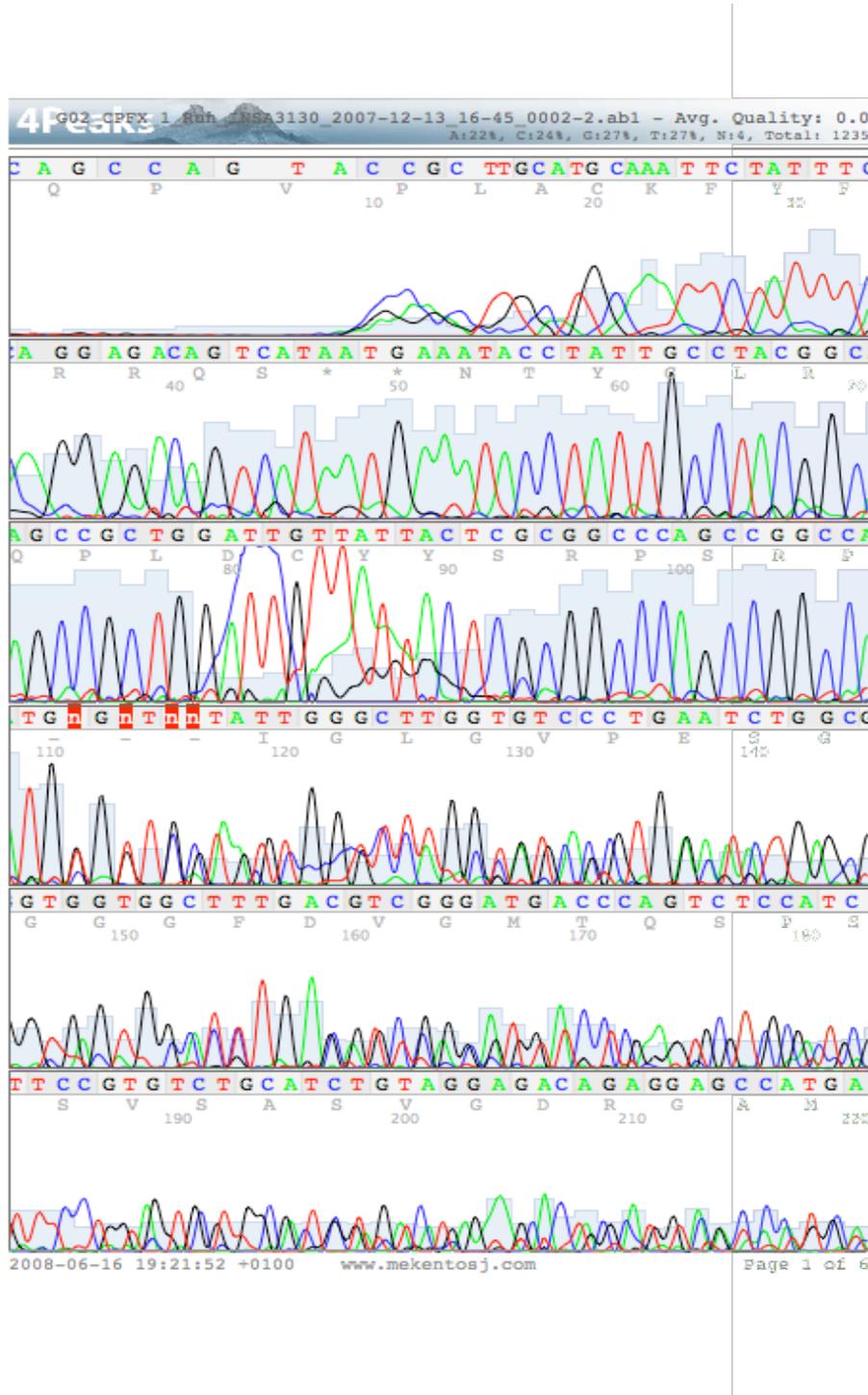
Tabela A.1 – Valores de áreas dos picos correspondentes a concentrações padrão de CPFY em solução aquosa a pH 4. Os ensaios foram efectuados em triplicado e os respectivos coeficientes de variação foram determinados pela razão entre o desvio padrão e a respectiva média. O coeficiente de correlação (R^2) entre estes valores foi de 0,9995.

Concentração CPFY(mg/L)	Média (3 ensaios)	Desvio padrão	Coeficiente de variação
0,010	4050	401	9,9%
0,050	71210	3698	5,2%
0,10	89696	7156	8,0%
0,25	286512	18862	6,6%
0,50	432668	12678	2,9%
0,75	637619	86730	13,6%
1,00	872143	58388	6,7%
2,50	2127512	20662	0,9%
5,00	3963671	50361	1,3%
7,50	5941391	55367	0,9%
10,0	7889403	633364	8,0%

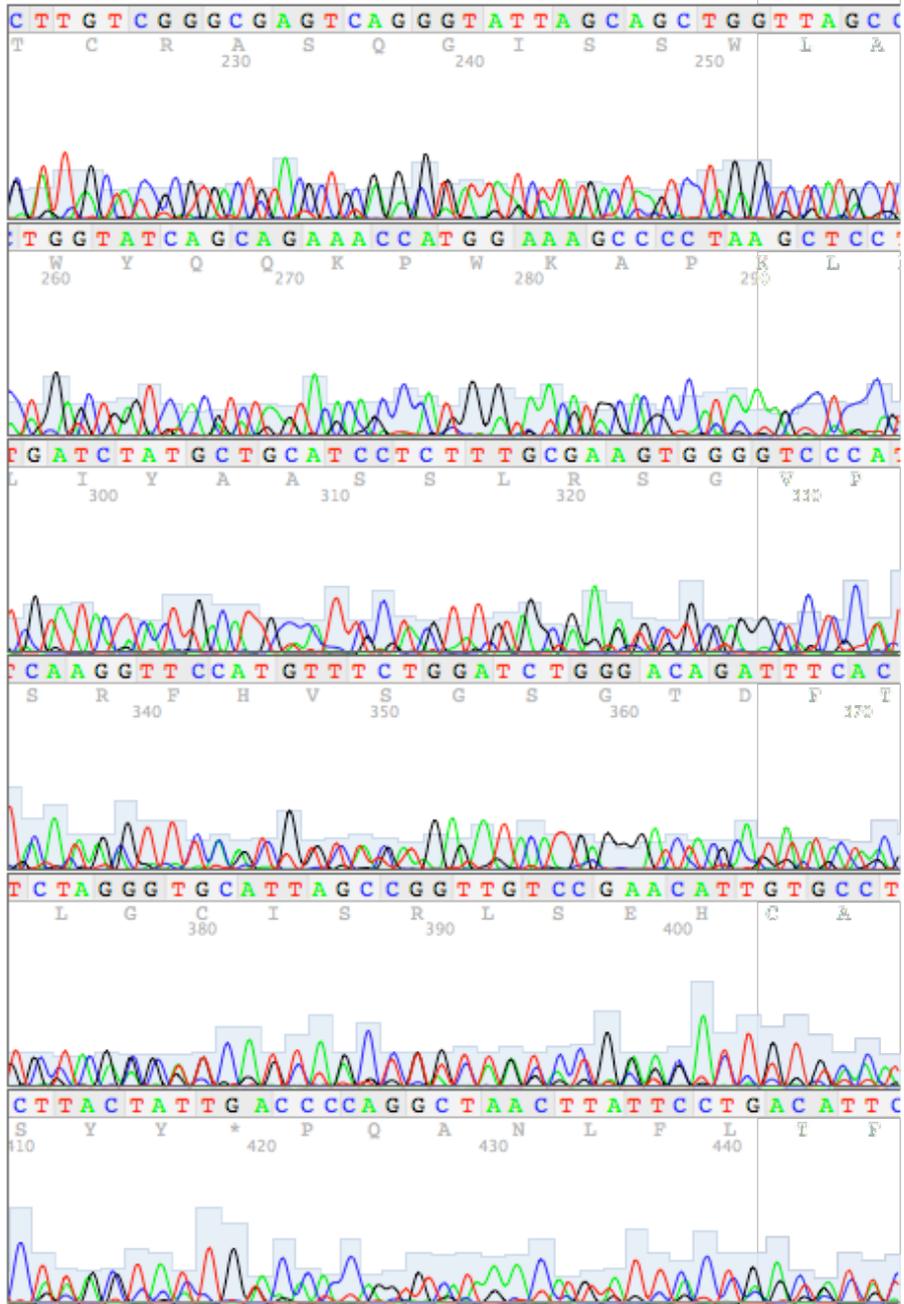
A reprodutibilidade do método de HPLC foi avaliada através de 10 análises de uma solução aquosa contendo 10 µg/L de CPFY. O coeficiente de variação destas análises foi de 9,8%

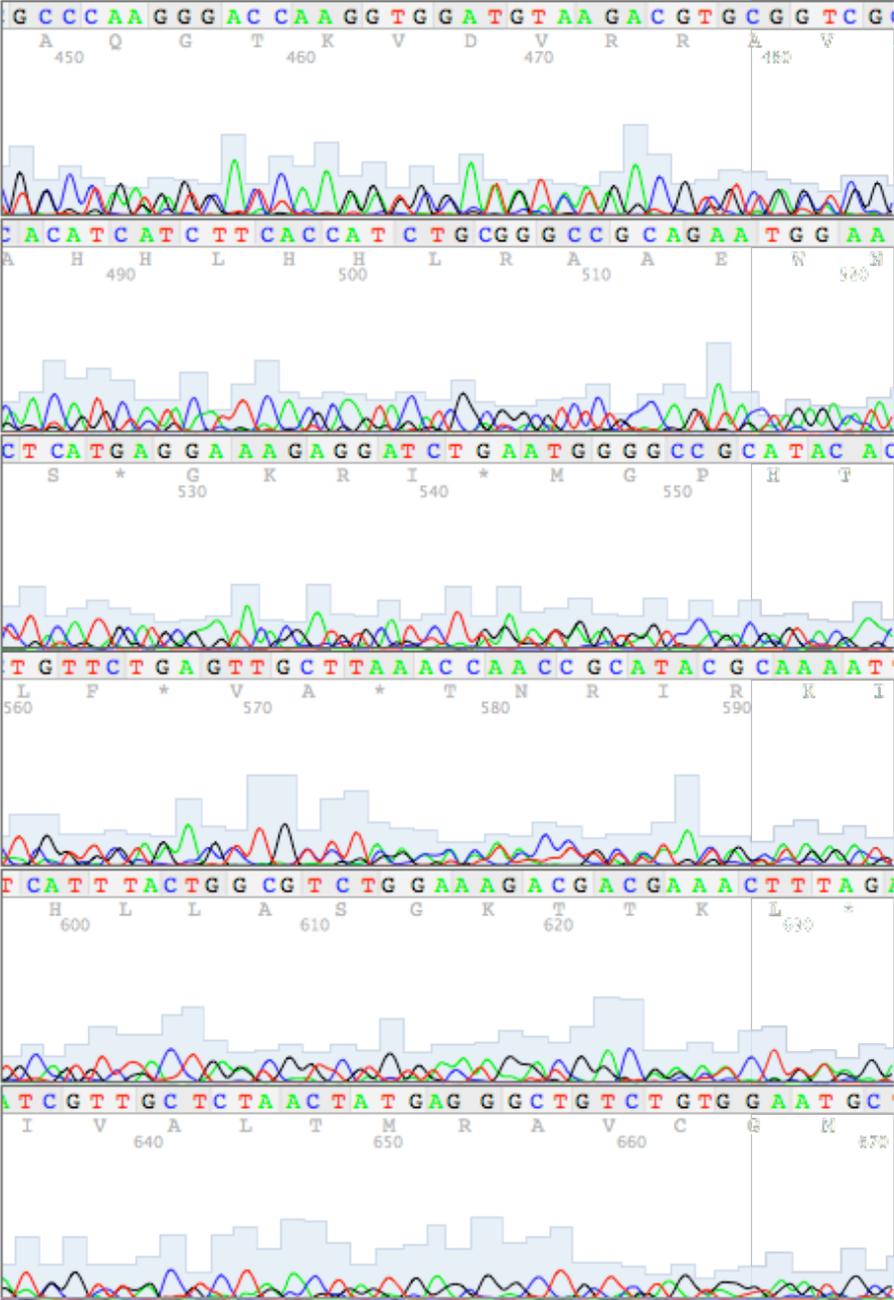
Anexo 3 - Electroforegramas dos fragmentos *anti*-CPF_X sequenciados

CLONE 401

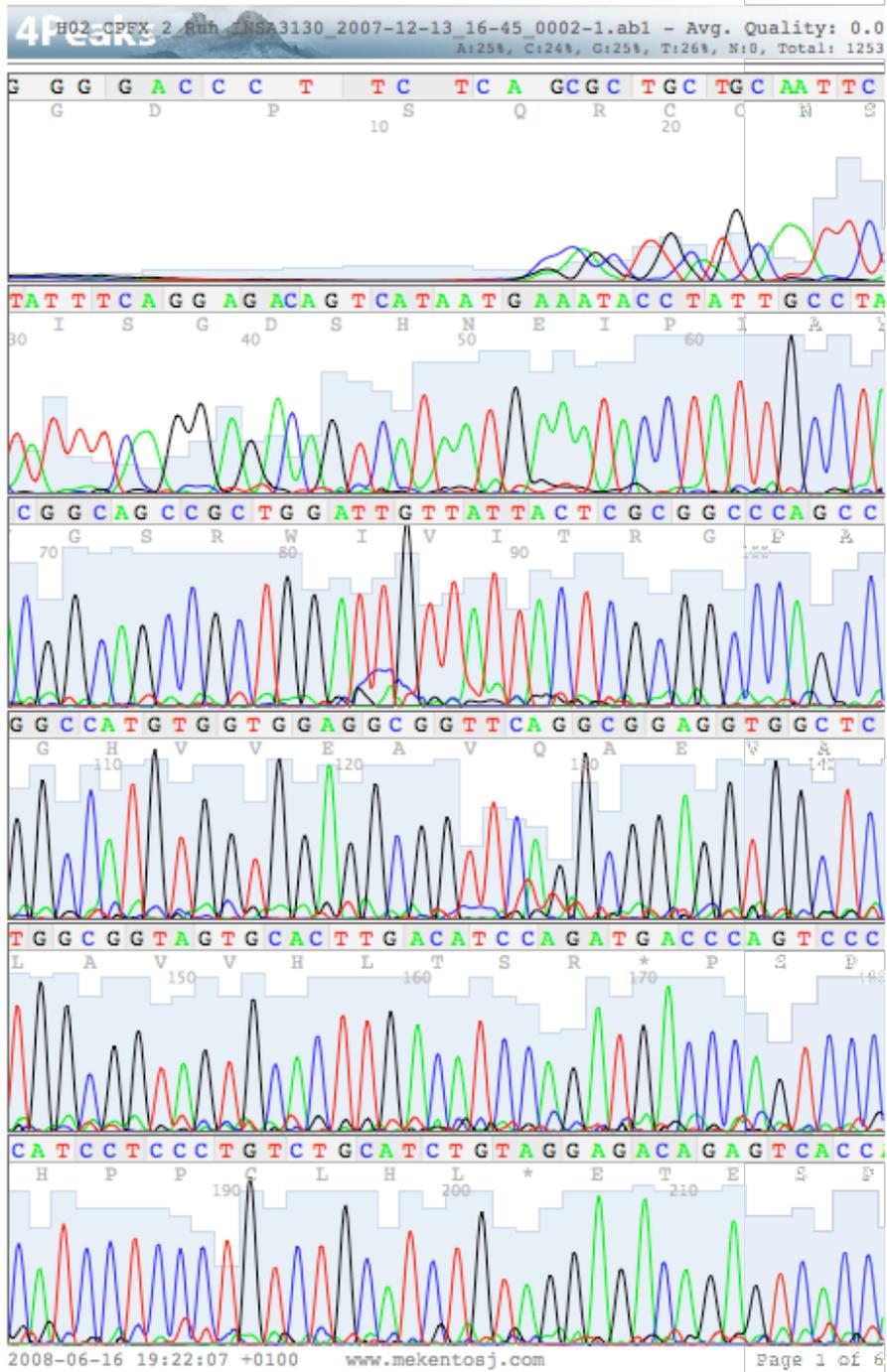


4Peaks G02_CPEX_1_Run_INSA3130_2007-12-13_16-45_0002-2.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:22%, C:24%, G:27%, T:27%, N:4, Total: 1235

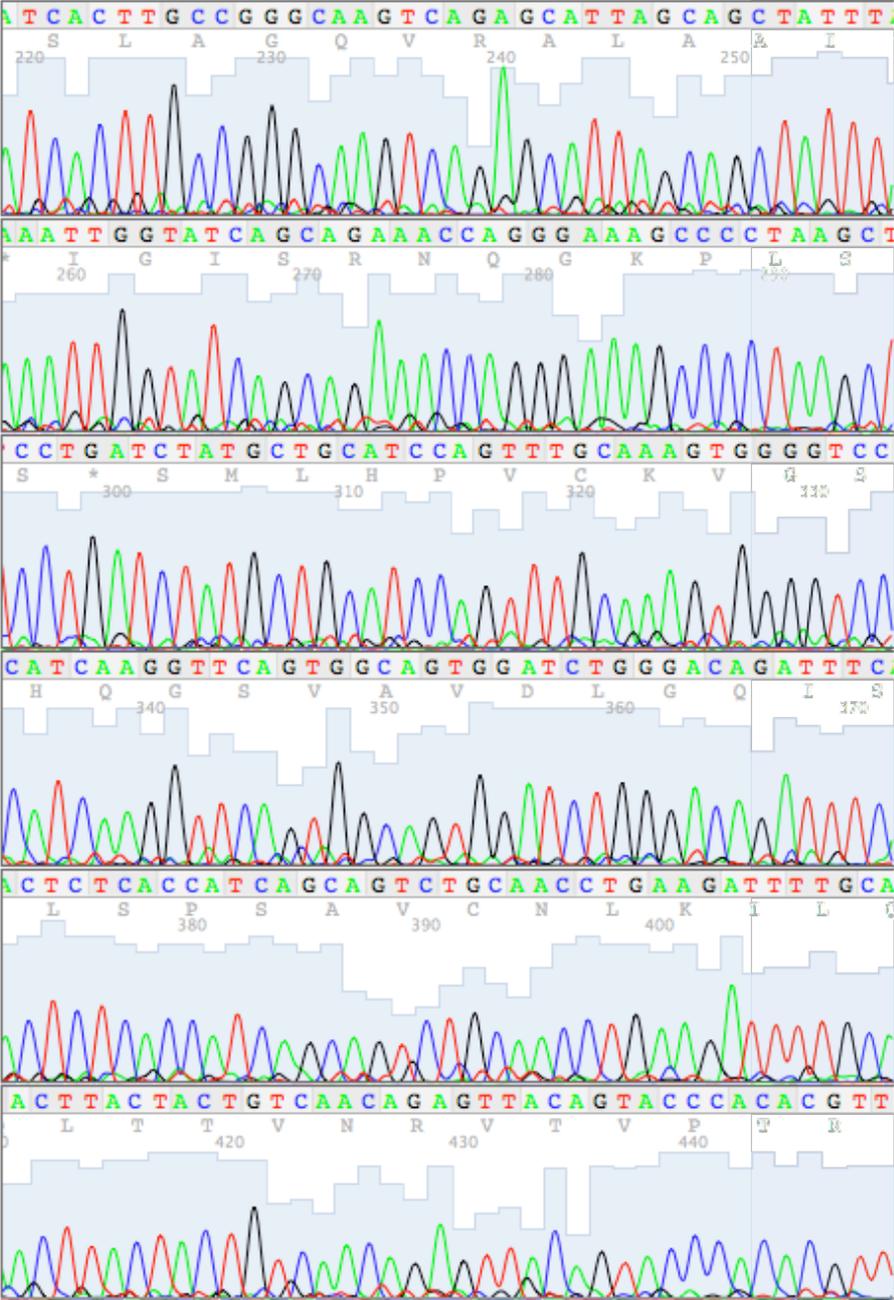


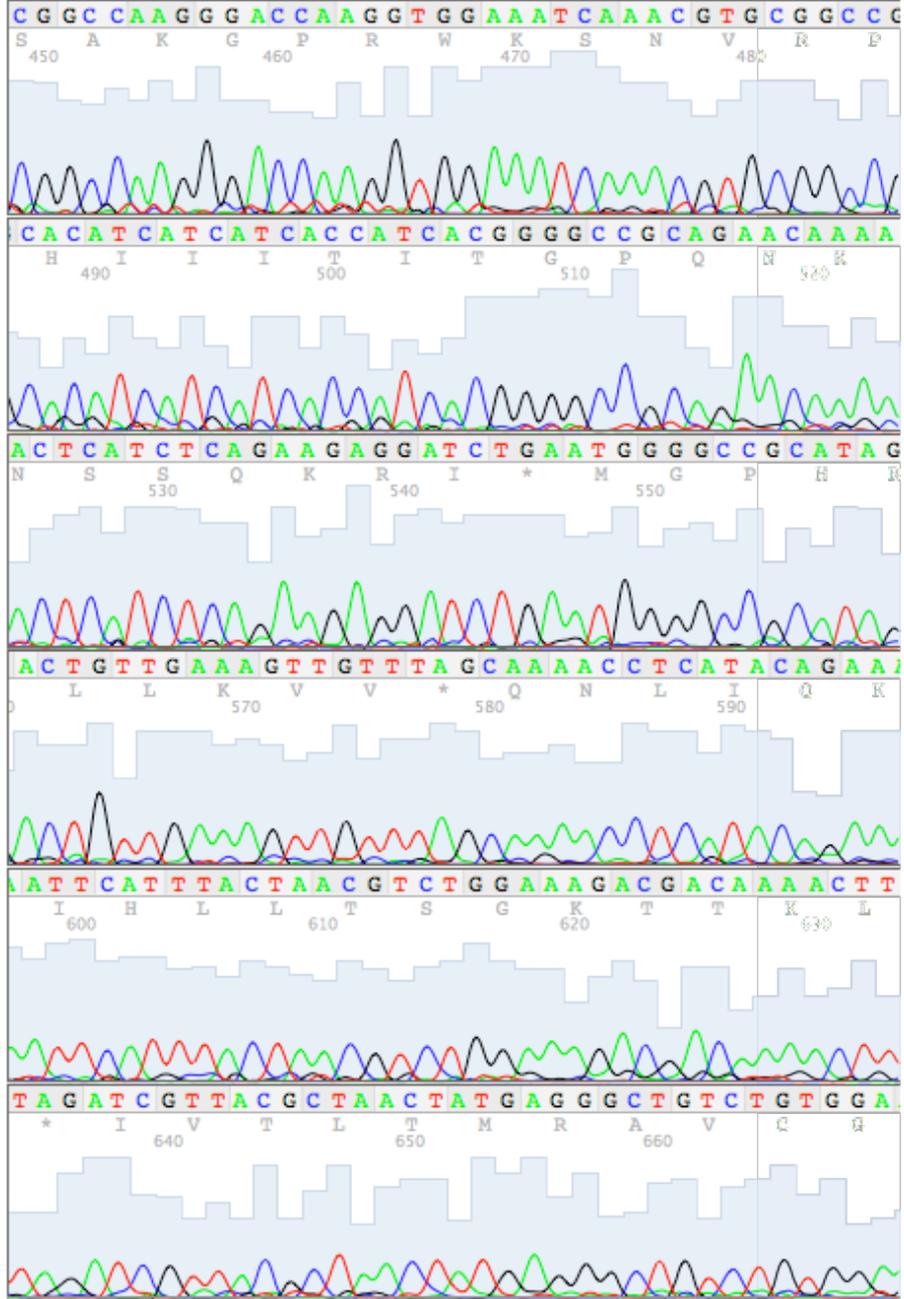


CLONE 404

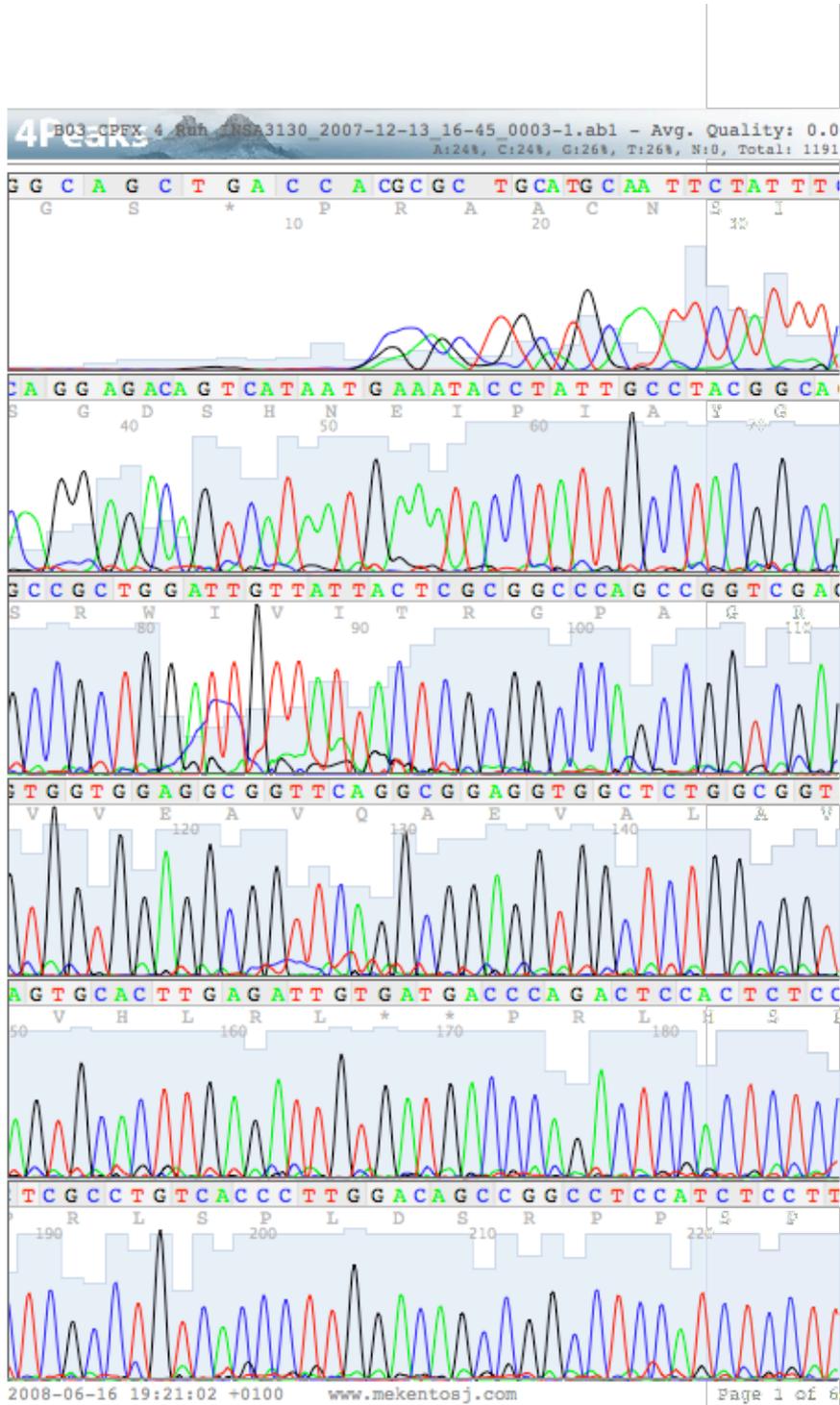


4 Peaks H02_CPEX_2_Run_TBSA3130_2007-12-13_16-45_0002-1.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:25%, C:24%, G:25%, T:26%, N:0, Total: 1253

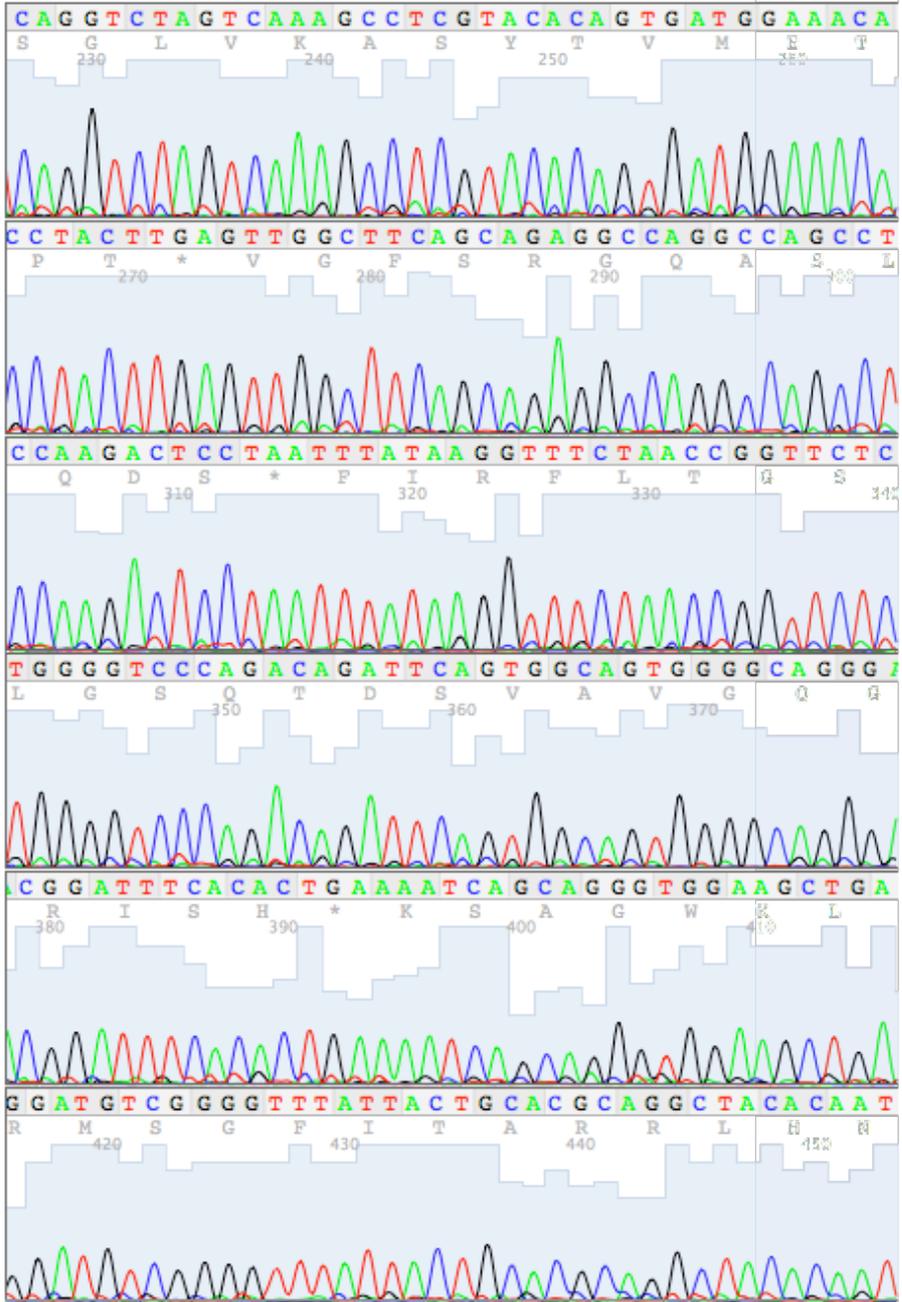




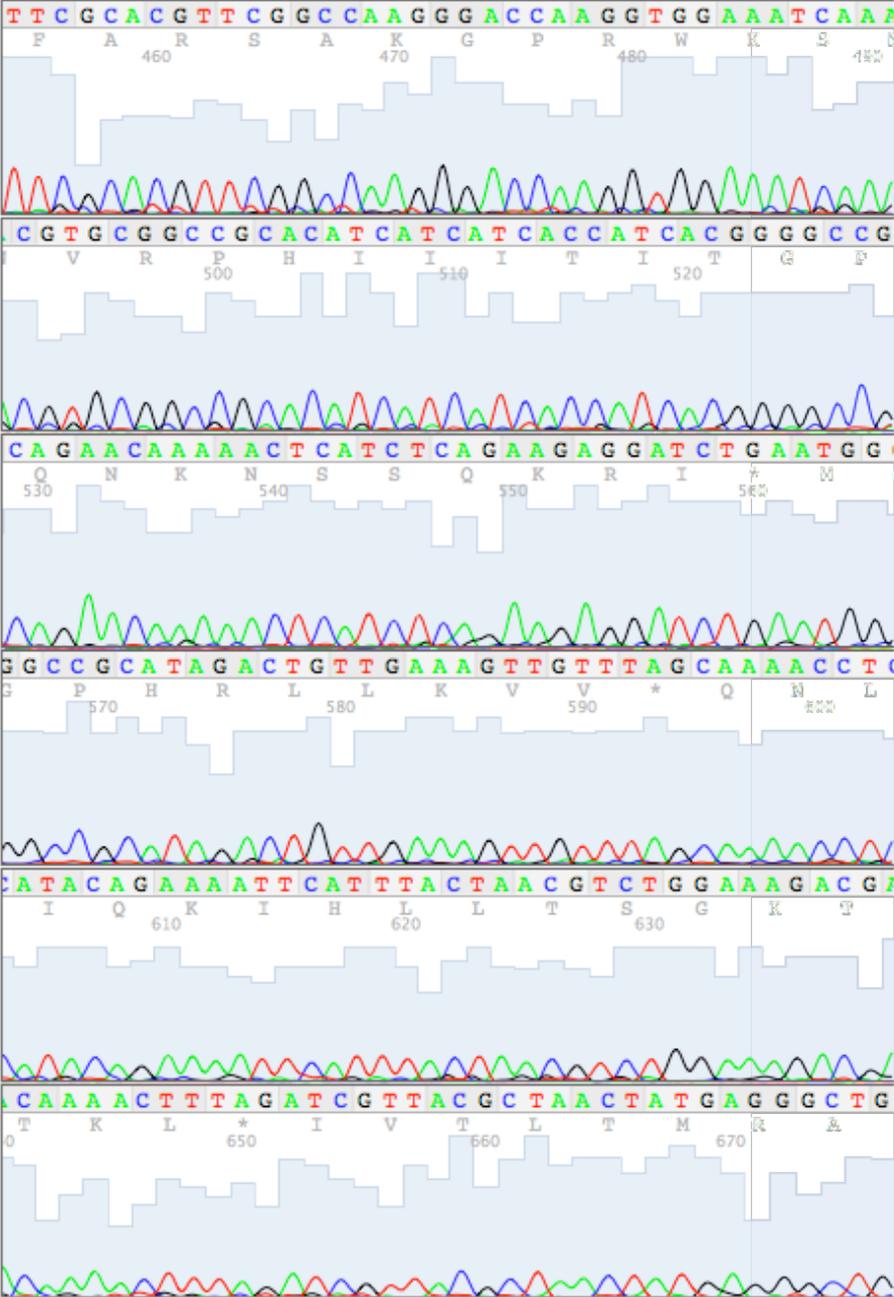
CLONE 406



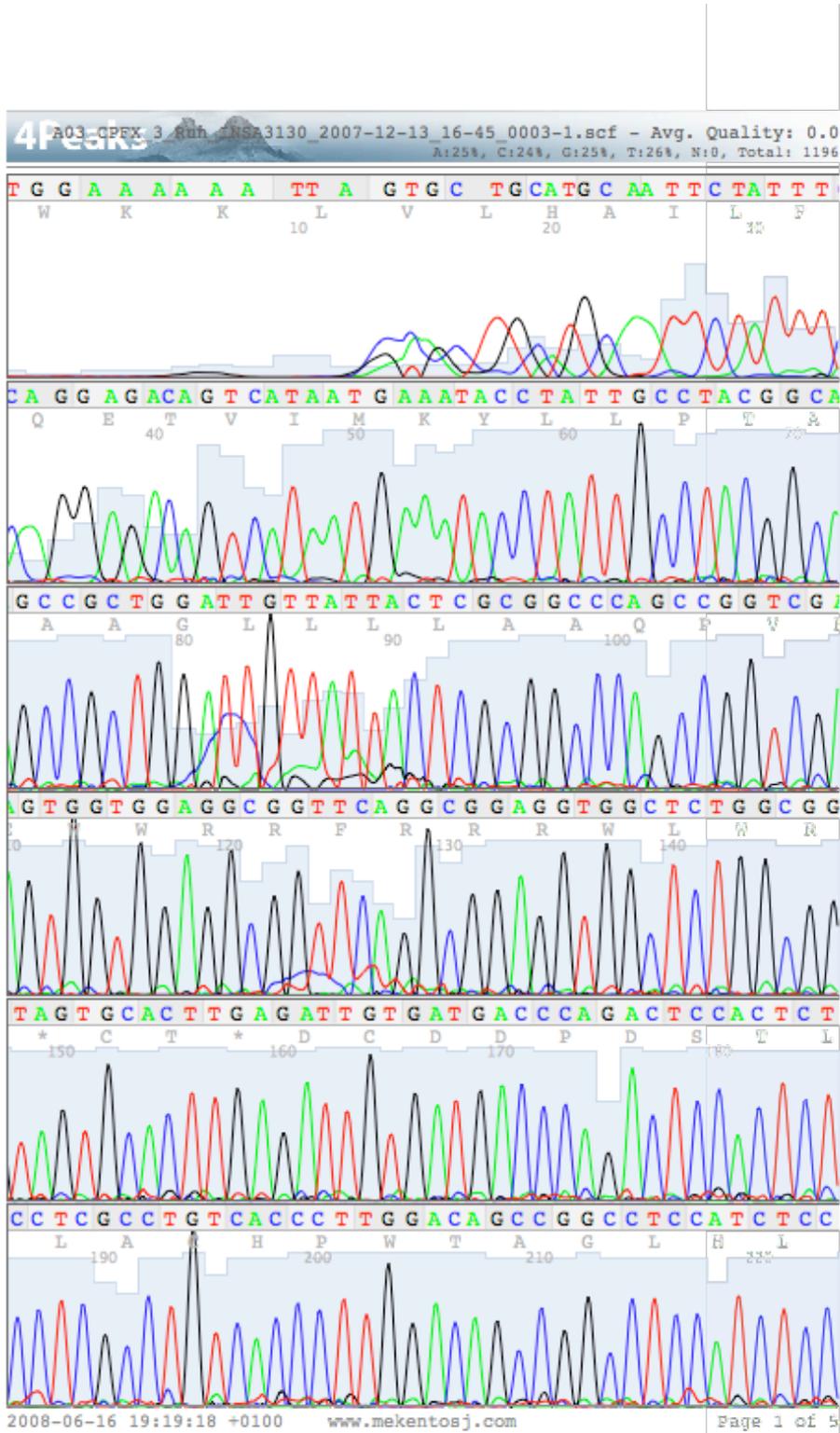
4Peaks B03_CPEX 4 Run: INSA3130_2007-12-13_16-45_0003-1.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:24%, C:24%, G:26%, T:26%, N:0, Total: 1191

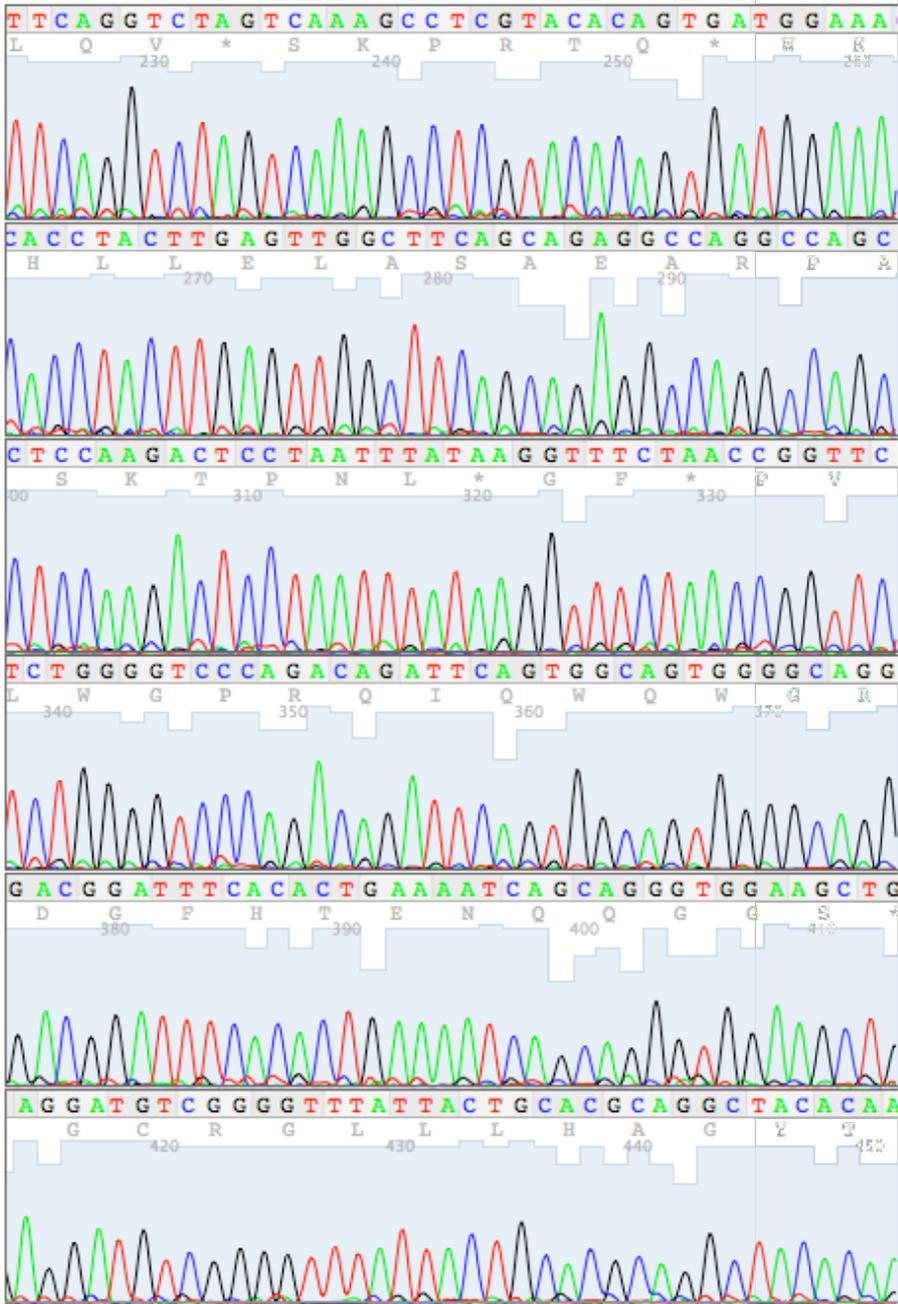


4 Peaks B03 CPEX_4_Run_TNSA3130_2007-12-13_16-45_0003-1.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:24%, C:24%, G:26%, T:26%, N:0, Total: 1191

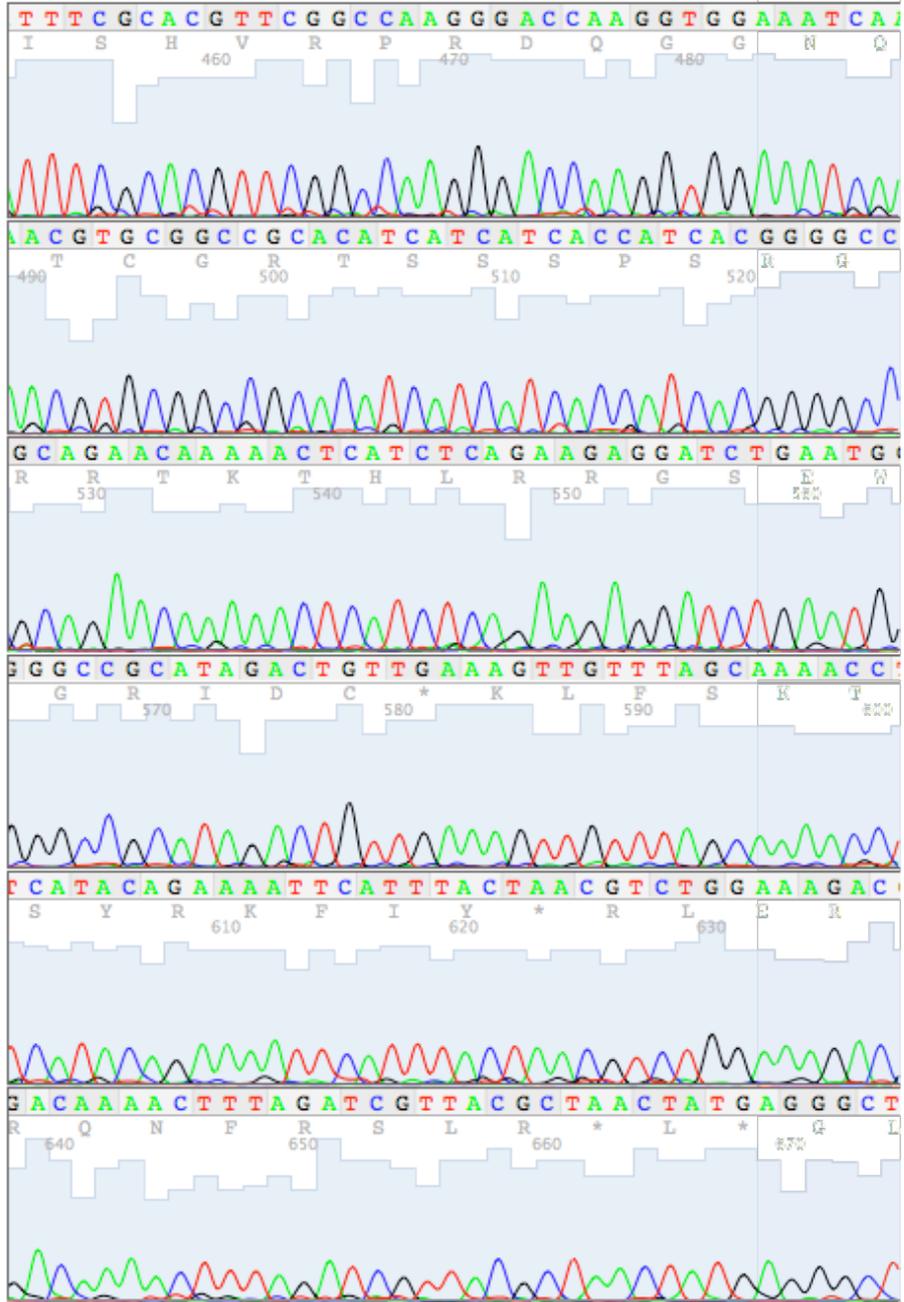


CLONE 411



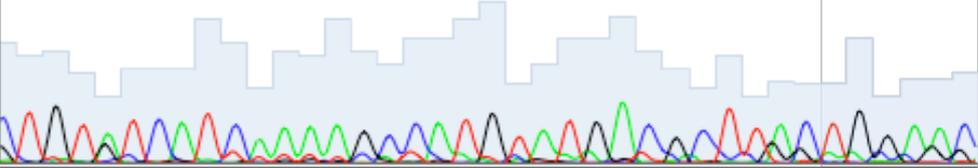


4Peaks A03_CPEX 3 Run: INSA3130_2007-12-13_16-45_0003-1.scf - Avg. Quality: 0.0
A:25%, C:24%, G:25%, T:26%, N:0, Total: 1196

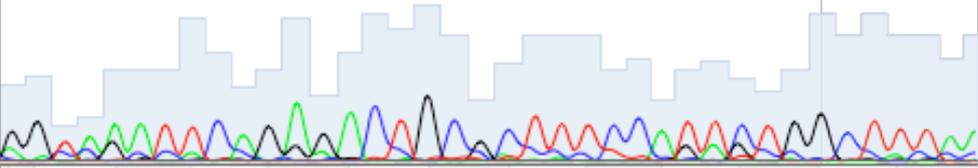


4Peaks 003 CPFX 5_Run_INSA3130_2007-12-13_16-45_0003-1.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:22%, C:23%, G:27%, T:28%, N:0, Total: 1188

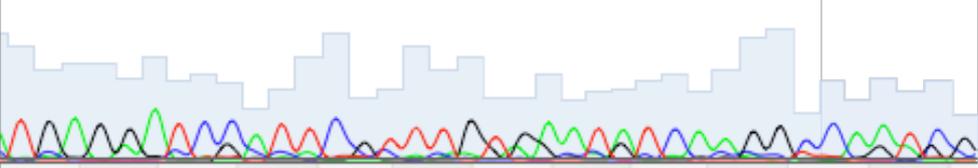
C T G T A T C A T C A A A A G C C A T G T A T G A C G C T T A C T G G A A C
P V 450 S S K 460 A M Y 470 D A Y W 480 N



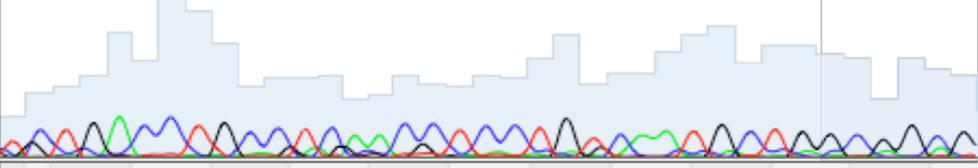
G G T A A A T T C A G A G A C T G C G C T T T C C A T T C T G G C T T T A A
G K 490 F R D C 500 A F H 510 S G P 520



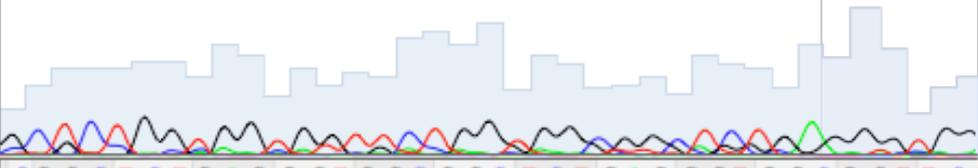
T G A G G A T C C A T T C G T T T G T G A A T A T C A A G G C C A A T C G
E D 530 P F V C 540 E Y Q 550 G Q S



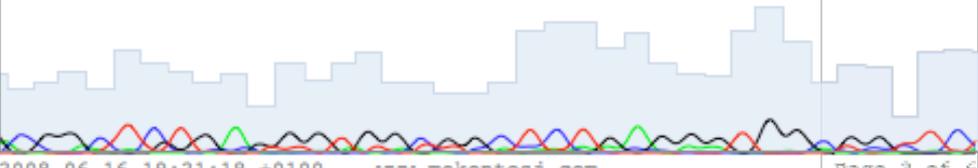
T C T G A C C T G C C T C A A C C T C C T G T C A A T G C T G G C G G C G
S D L P 570 Q P P 580 V N A 590 G G



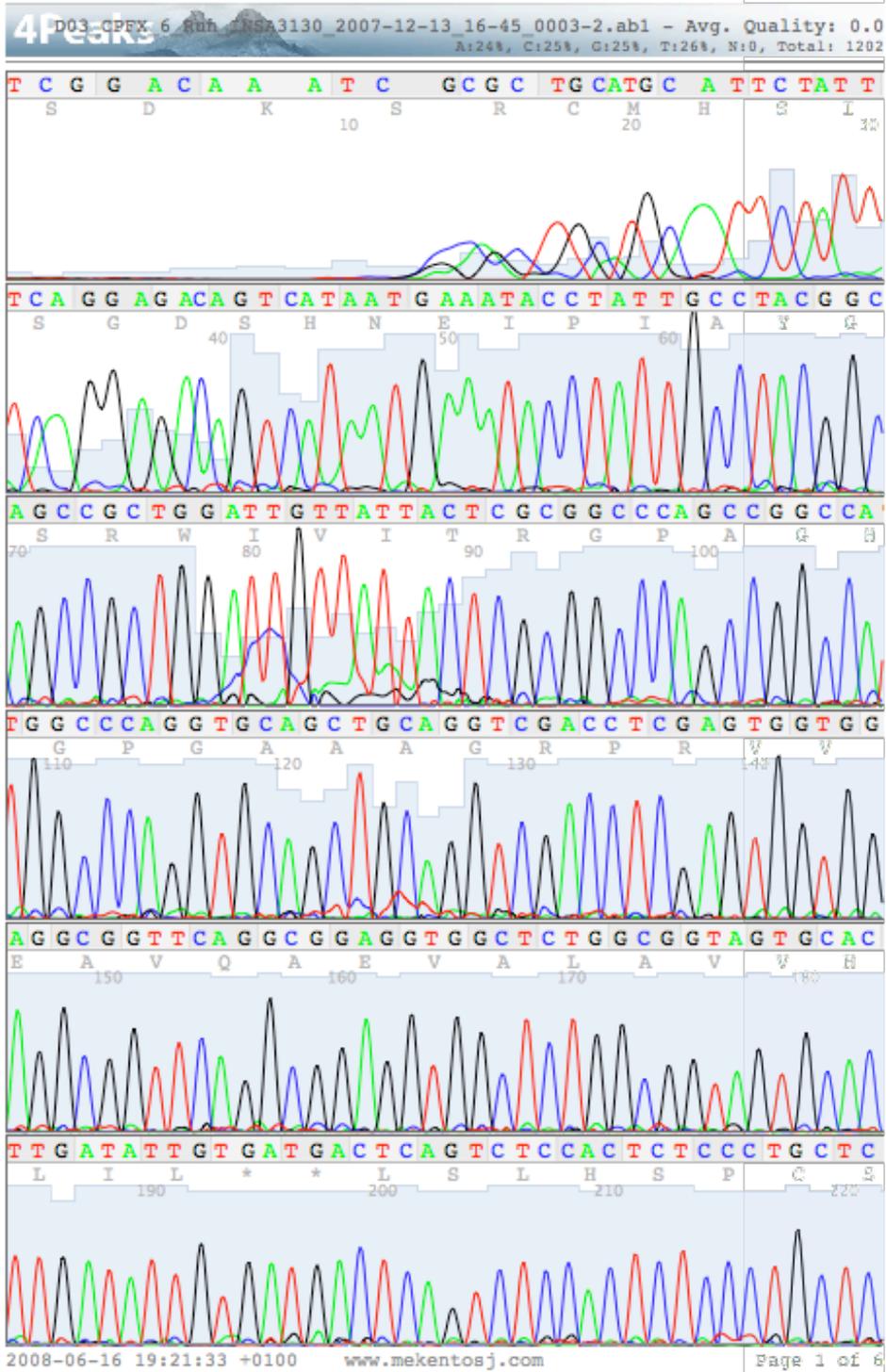
G C T C T G G T G G T G G T C T G G T G G C G G C T C T G A G G G T G G
G S 600 G G G 610 S G G 620 S E 630 G

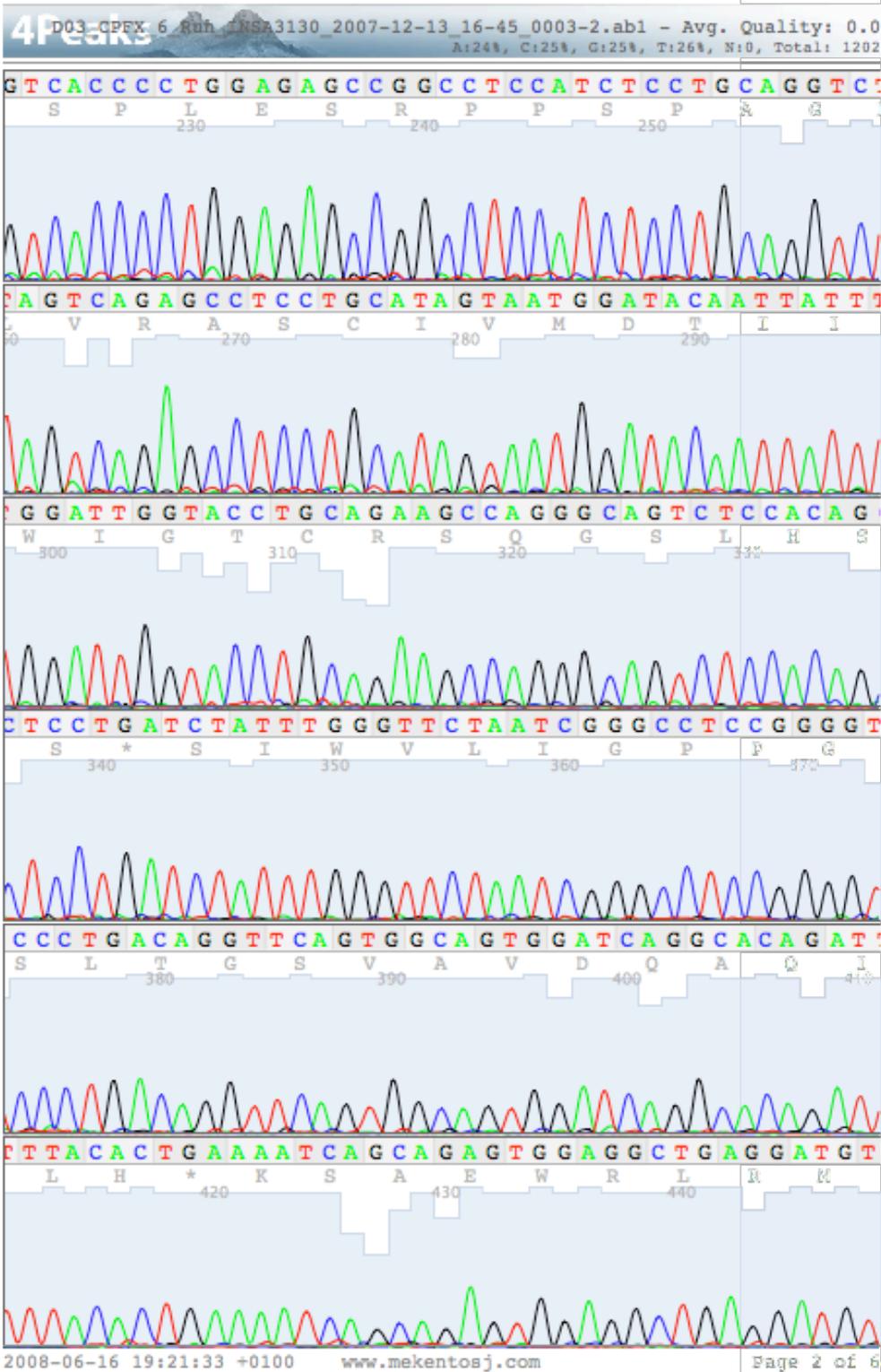


C G G C T C T G A G G G T G G C G G C T C T G A G G G T G G C G G T T C
G S 640 E G G 650 S E 660 G G S

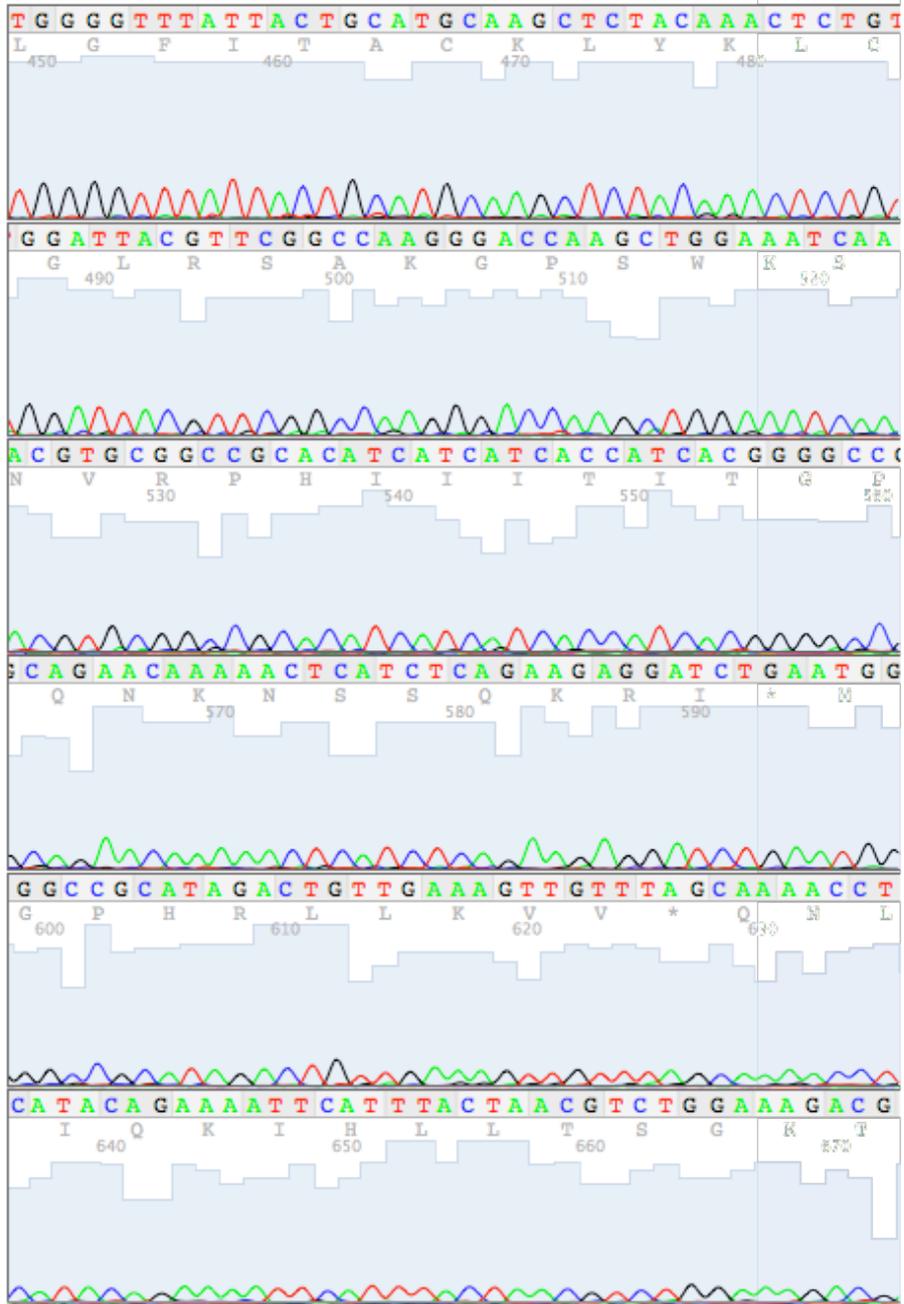


CLONE 419





4Peaks D03_CPEX 6 Run: INSA3130_2007-12-13_16-45_0003-2.ab1 - Avg. Quality: 0.0
A:24%, C:25%, G:25%, T:26%, N:0, Total: 1202



Anexo 4 – Sequências dos clones obtidos após selecção por *phage display*

Clone 404

TCTGGCGGTAGTGCACTTGACATCCAGATGACCCAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTA
GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTAT
CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGG
GTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG
CAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCACACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGCGGCCGCA

SEQ a.a.:

SGGSALDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTHTFGQGTKVEIKRAAA

CDR 1: CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT

CDR 2: GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT

CDR 3: CAA CAG AGT TAC AGT ACC CAC ACG

CDR 1 aa: R A S Q S I S S Y L N

CDR 2 aa: A A S S L Q S

CDR 3 aa: Q Q S Y S T C Q

Clone 406 (= Clone 411)

TCTGGCGGTAGTGCACTTGAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCCTT
GGACAGCCGGCCTCCATCTCCTTCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACC
TACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGGTTTCT
AACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACGGATTTCACT
GAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCACGCAGGCTACACAAT
TTCGCACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGCGGCCGCA

Clone 411 (= Clone 406)

TCTGGCGGTAGTGCACTTGAGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCGCCTGTCACCCTT
GGACAGCCGGCCTCCATCTCCTTCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACC
TACTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGACTCCTAATTTATAAGGTTTCT
AACCGGTTCTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACGGATTTCACT
GAAAATCAGCAGGGTGGAAAGCTGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCACGCAGGCTACACAAT
TTCGCACGTTGCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGCGGCCGCA

SEQ a.a.:

SGGSALEIVMTQTPLSSPVTLGQPASISFRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCTQATQFRFTFGQGTKVEIKRAAA

CDR 1:AGG TCT AGT CAA AGC CTC GTA CAC AGT GAT GGA AAC ACC TAC TTG AGT

CDR 2 : AAG GTT TCT AAC CGG TTC TCT

CDR 3 : ACG CAG GCT ACA CAA TTT CGC ACG

CDR 1 aa: R S S Q S L V H S D G N T Y L S

CDR 2 aa: K V S N R F S

CDR 3 aa: T Q A T Q F C T

Clone 419

TCTGGCGGTAGTGCACTTGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCTCGTCACCCCT
GGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAAT
TATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCT
AATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACT
GAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAAC
TCTGTGGATTACG TTCGGCCAAGGGACCAAGCTGGAATCAAACGTGCGGCCGCA

SEQ a.a.:

SGGSALDIVMTQSPLSLLVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR
ASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTLWITFGQGTKLEIKRAAA

CDR 1:AGG TCT AGT CAG AGC CTC CTG CAT AGT AAT GGA TAC AAT TAT TTG GAT

CDR 2: TTG GGT TCT AAT CGG GCC TCC

CDR 3: ATG CAA GCT CTA CAA ACT CTG TGG ATT ACG

CDR 1 aa: R S S Q S L L H S N G Y N Y L D

CDR 2 aa: L G S N R A S

CDR 3 aa: M Q A L Q T L W I T

Anexo 5 - Dados relativos aos ensaios de ELISA competitiva

Tabela A.2 - Percentagens de ligação (% +/- desvio padrão) dos phAbs dos vários clones, a diferentes concentrações de CPFY em solução.

log [CPFY], (ng/mL)	Clone 401	Clone 404	Clone 406	Clone 413	Clone 419
0,204	33,1 ± 0,884	22,3 ± 1,249	96,7 ± 0,021	33,2 ± 0,974	68,8 ± 0,915
0,903	23,7 ± 0,255	17,1 ± 1,159	56,3 ± 0,047	23,2 ± 1,854	59,1 ± 0,953
1,602	18,3 ± 0,091	80,4 ± 1,925	38,9 ± 0,032	72,1 ± 0,578	62,5 ± 0,235
2,301	101,7 ± 0,146	102,6 ± 0,753	21,8 ± 0,064	105,8 ± 2,043	9,7 ± 2,451
3	105,9 ± 0,126	98,7 ± 1,025	13,3 ± 0,069	102,1 ± 1,875	41,3 ± 1,385

Os resultados do clone 406 foram ajustados a uma recta por regressão linear, chegando-se à equação:

$$\% \text{ de ligação} = -28,79 \times \log[\text{CPFY}]_{(\text{ng/mL})} + 91,3$$

Com $R^2 = 0,925$