

IV Workshop de Divulgação da Química
Conselho Regional de Química – IV Região

Evolução dirigida de Proteínas

Dr. Ari José Scattone Ferreira
Centro Universitário FIEO

E-mail: ariferreira@unifieo.br

Evolução Natural de Proteínas

- Mutações aleatórias nos genes codificantes de proteínas podem levar à mudanças estruturais em domínios localizados, ou afetar completamente a estrutura tridimensional da proteína.
- Estrutura tridimensional global protéica define sua função.
- Mudanças estruturais pontuais podem afetar a função protéica positiva ou negativamente.

Evolução Natural de Proteínas

- As mudanças funcionais não-disruptivas da estrutura tridimensional global podem:
 - aumentar a eficiência catalítica de enzimas;
 - alterar a especificidade do substrato enzimático;
 - alterar a especificidade reacional de enzimas;
 - alterar a especificidade de interação proteína-ligante;
 - aumentar a força de interação proteína-ligante.
- Seleção natural definirá se as novas características funcionais serão mantidas no genoma do organismo.

Phage Display

- Técnica desenvolvida em 1985 por George P. Smith.
- Nobel de Química – 2018 dedicado a G.P. Smith, Gregory P. Winter (peptídeos e anticorpos em phage display) e Frances H. Arnold (evolução dirigida de proteínas).



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Frances H. Arnold



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

George P. Smith



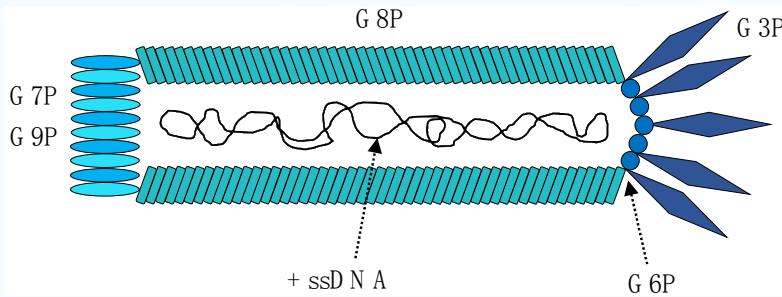
© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Sir Gregory P. Winter

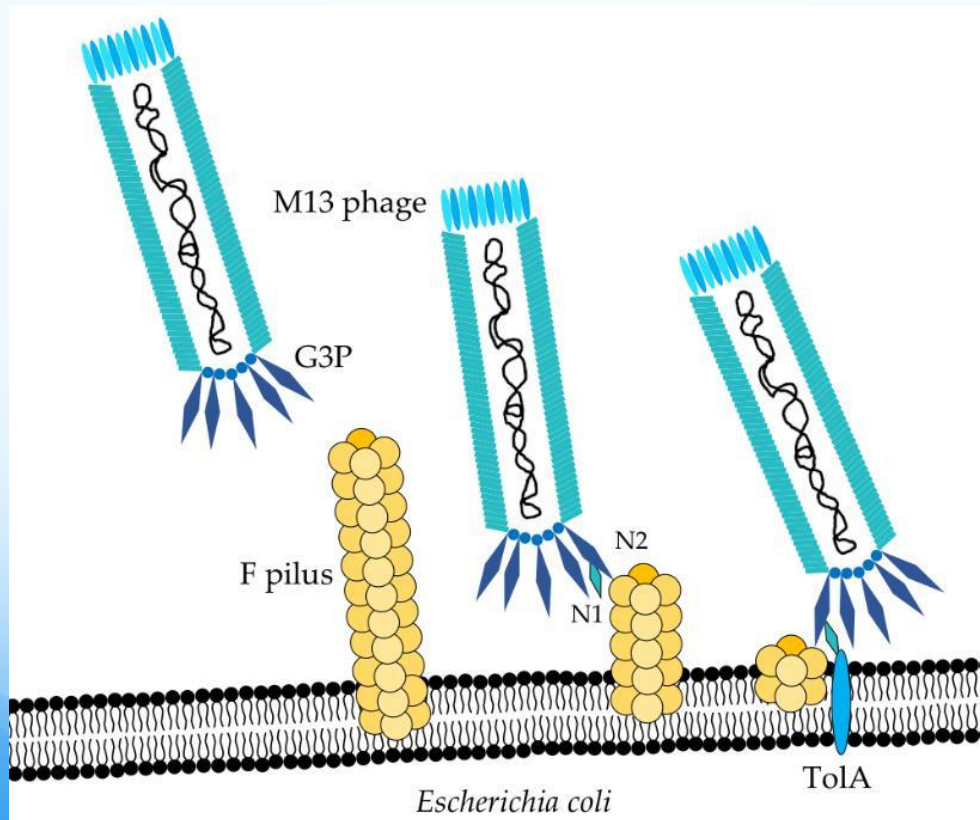
Phage Display

- Objetivo: apresentar proteínas, ou peptídeos, na superfície de bacteriófagos para estudar interação *in vitro* com ligantes/substratos.
- Atualmente utilizado principalmente para realizar a evolução dirigida de peptídeos e anticorpos para uso em diagnóstico e tratamento de doenças.

Phage Display – M13



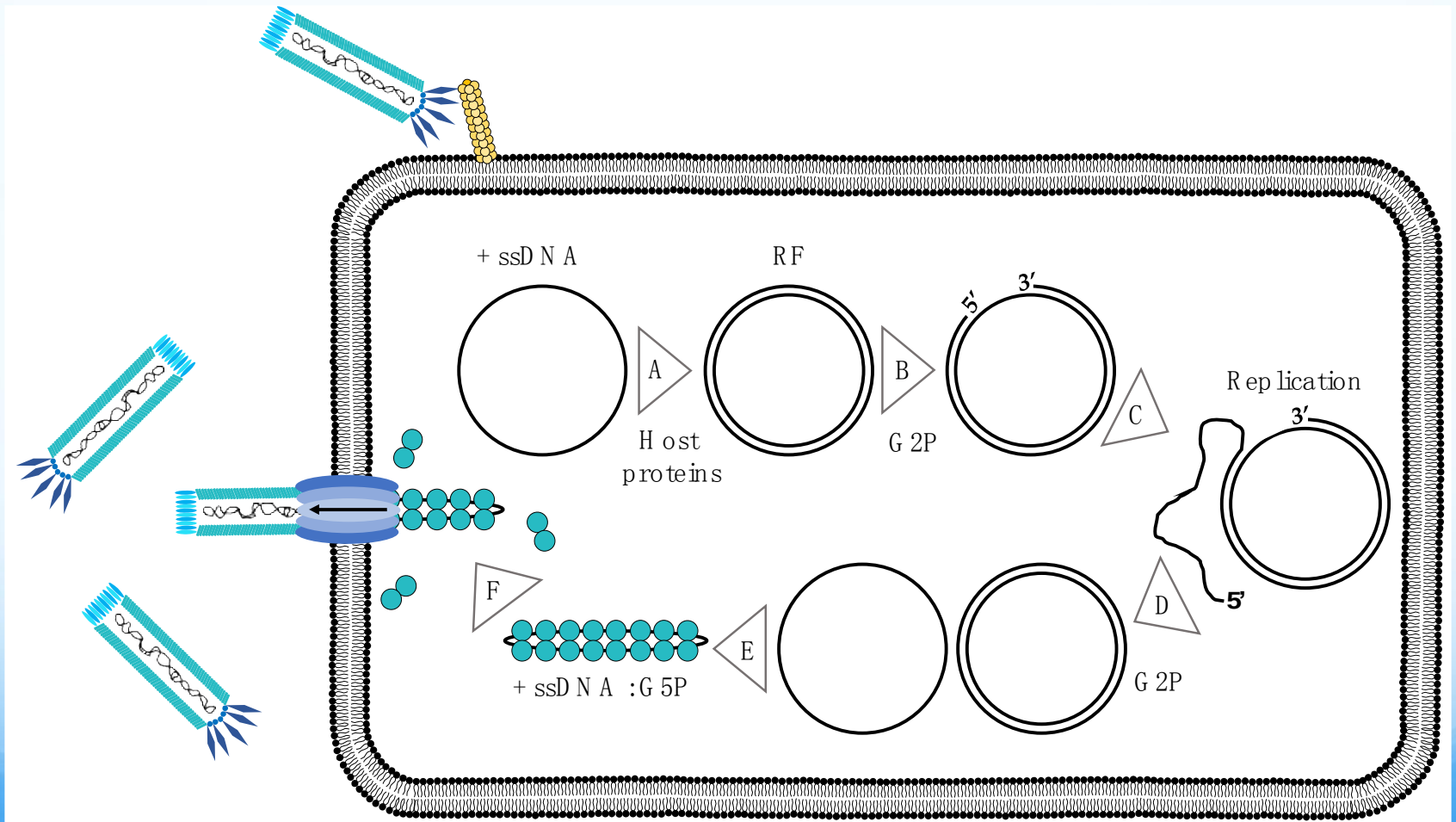
Bacteriophago M13



Infecção de *E. coli* por M13 depende da proteína G3P do capsídeo, por interação com o pilus F e ligação à proteína de membrana TolA, responsável por facilitar a inserção do material genético viral na bactéria.

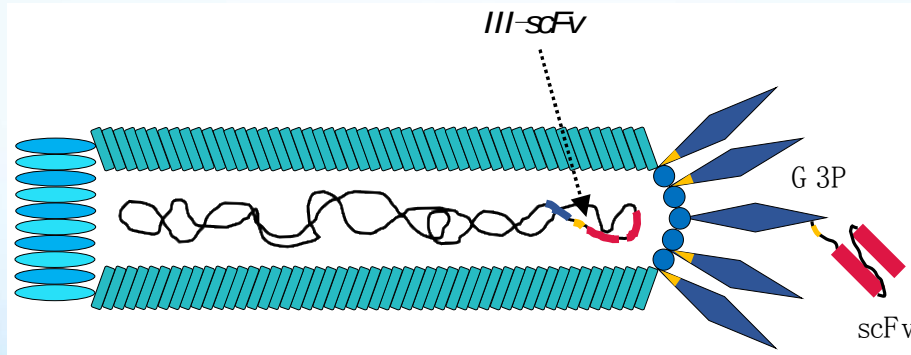
Phage Display – M13

Amplificação do fago: replicação e montagem de novos fagos.



Phage Display – M13 Recombinante

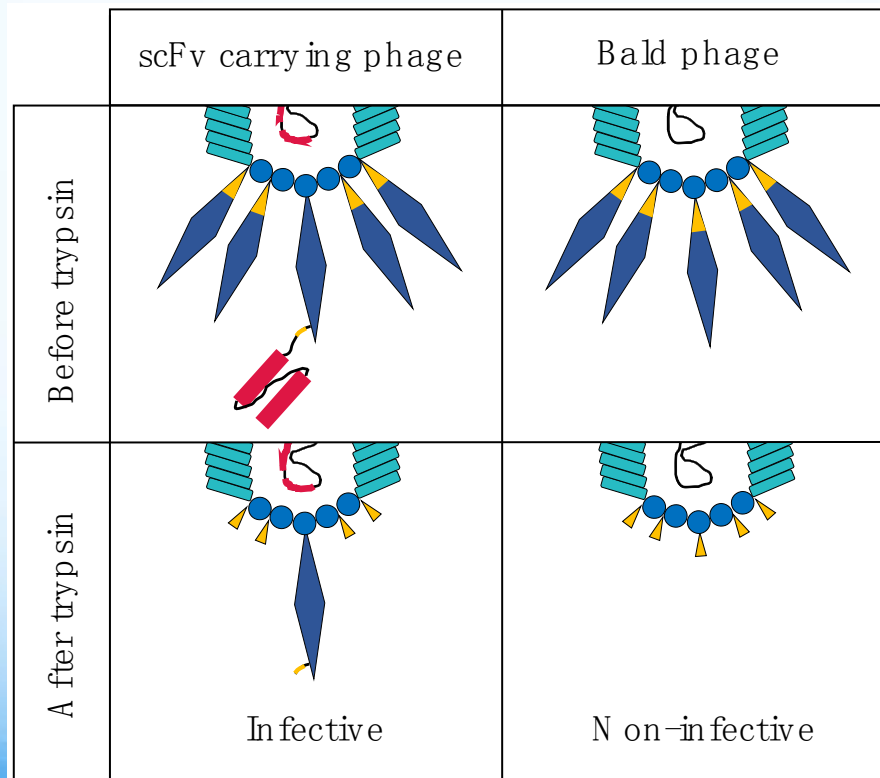
- Por meio de técnicas de Biologia Molecular, a região codificante de proteína/peptídeos é fusionada à região codificante da proteína G3P no DNA viral.



Fragmento protéico
fusionado à uma
G3P modificada.

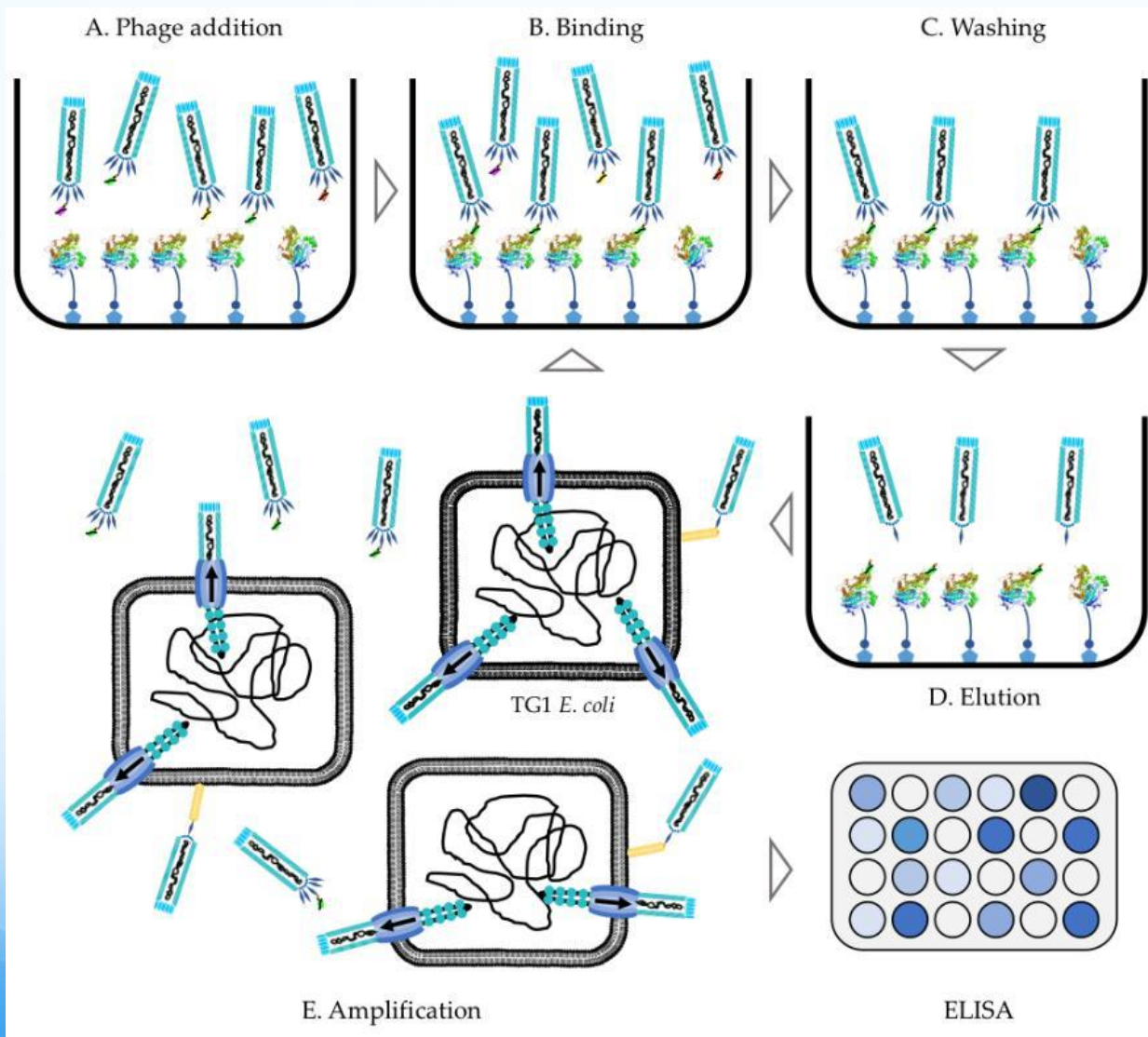
Phage Display – M13 recombinante

- Modificações no genoma viral insere sítios de digestão de tripsina nas proteínas G3P não-fusionadas.



Digestão com tripsina elimina G3P natural e o fragmento protéico fusionado, mas mantém a G3P à qual o fragmento estava ligado.

Phage Display



Etapas:

1. Seleção de fragmentos com boa interação com o ligante
2. Amplificação dos fagos positivos.
3. Novos ciclos de seleção e amplificação
4. Identificação dos melhores resultados pelo sequenciamento do DNA do fago.

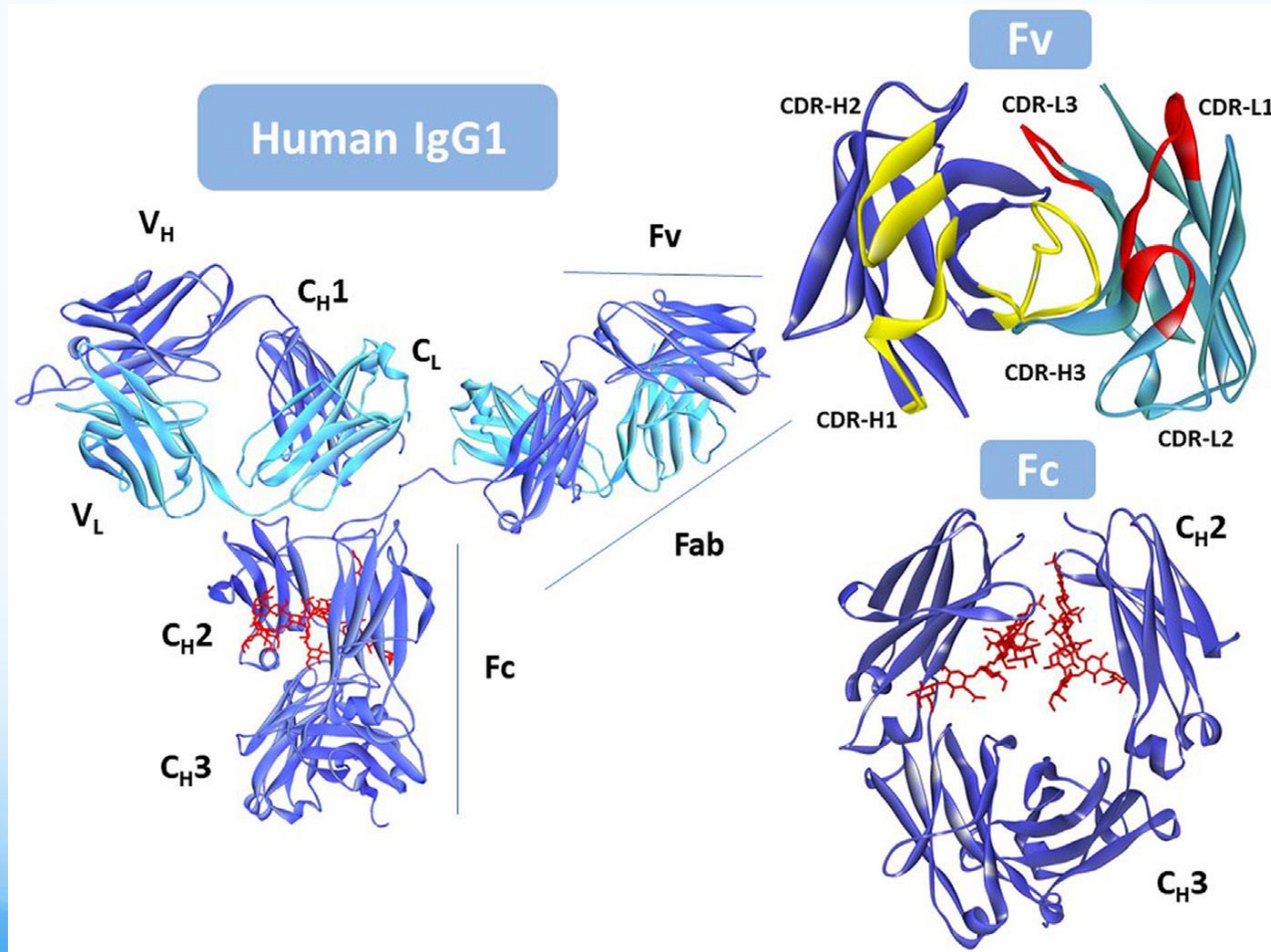
Phage Display e Evolução Dirigida

- Bibliotecas de peptídeos com mutações aleatórias, ou específicas, criadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) das regiões codificantes.
- Clonagem das bibliotecas em bacteriófagos M13 para criação de biblioteca de Phage Display.
- Seleção artificial *in vitro* e obtenção de peptídeos mutadas com interação muito específica e forte com o ligante de interesse.
- Novas proteínas/peptídeos não encontrados naturalmente, mas com melhor especificidade.

Phage Display e Evolução Dirigida

Exemplo: Desenvolvimento de anticorpos por evolução dirigida.

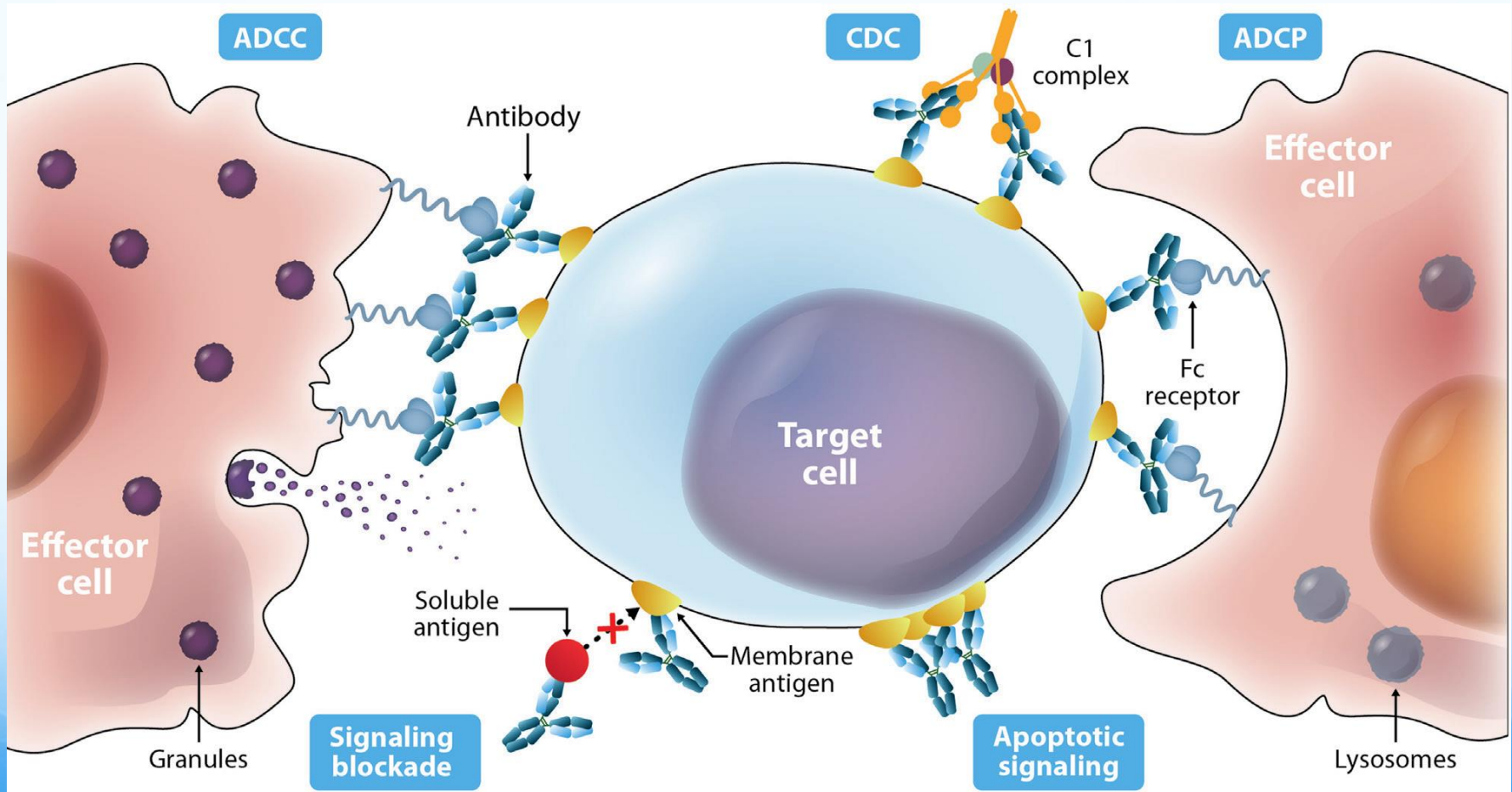
Estrutura de um anticorpo do tipo IgG.



Phage Display e Evolução Dirigida

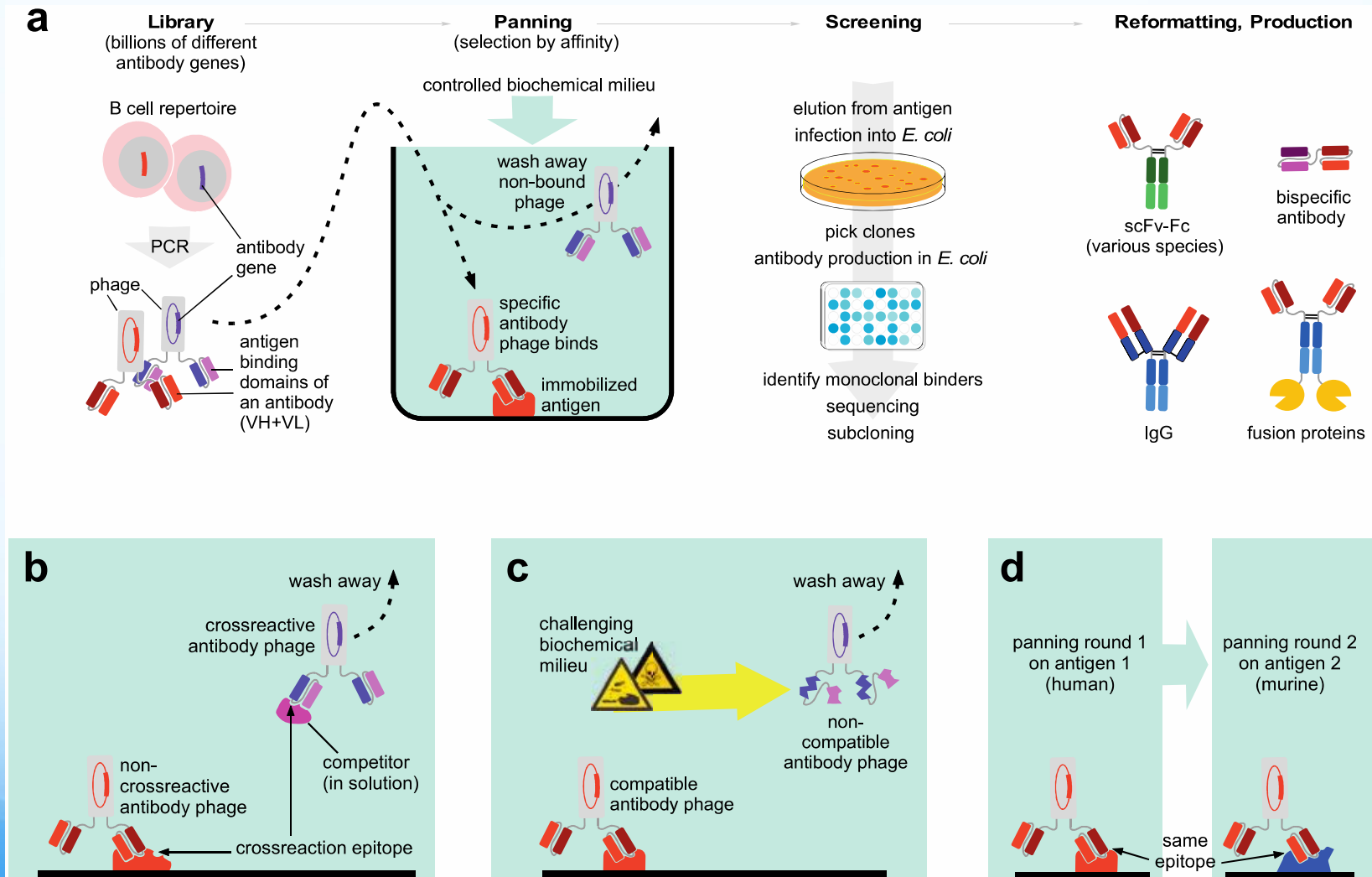
Exemplo: Desenvolvimento de anticorpos por evolução dirigida.

Mecanismos de ação de medicamentos baseados em anticorpos.



Phage Display e Evolução Dirigida

Exemplo: Desenvolvimento de anticorpos por evolução dirigida.



Phage Display e Evolução Dirigida

Alguns anticorpos comerciais desenvolvidos por evolução dirigida em phage display.

Nome Não-Proprietário	Alvo	Companhia	Fase de desenvolvimento	Indicação de tratamento
AdalimumAb	TNF	AbbVie	Aprovado (FDA, 2002)	Artrite reumatóide
RanibizumAb	VEGF A	Genentech	Aprovado (FDA, 2006)	Degeneração macular
BelimumAb	Estimulador do linfócito B	GSK	Aprovado (FDA, 2011)	Lúpus eritematoso sistêmico
RaxibacumAb	Antígeno protetor	GSK	Aprovado (FDA, 2012)	Anthrax
NecitumumAb	Receptor EGF	ImClone / Lilly	Aprovado (FDA, 2015)	Câncer de pulmão (SNSC)
RamucirumAb	Receptor 2 VEGF	ImClone / Lilly	Aprovado (FDA, 2014)	Câncer de estômago, cólon e de pulmão (SNSC)

Atualmente, já há mais de 20 anticorpos comerciais para tratamento de câncer aprovados pela FDA!