



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA

Vitória Meneghetti Minatel

Construção e validação de biblioteca *naïve* de VHH
apresentado por fagos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Pesquisa Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Prudencio

**Botucatu
2025**

Vitória Meneghetti Minatel

Construção e validação de biblioteca *naïve* de VHH
apresentado por fagos

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Pesquisa Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Prudencio

Botucatu

2025

M663c Minatel, Vitória Meneghetti
 Construção e validação de biblioteca naïve de VHH
 apresentado por fagos / Vitória Meneghetti Minatel. --Botucatu,
 2025

 37 p. : il., tabs., fotos

 Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual
 Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

 Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior
 Coorientador: Carlos Roberto Prudencio

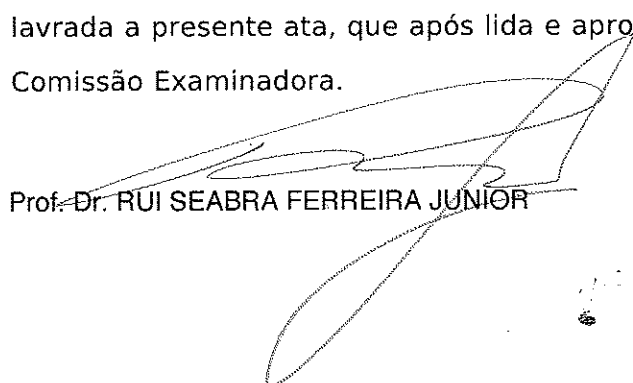
 1. Anticorpos de cadeia pesada. 2. Nanocorpos. 3. Phage display.
 4. Camelídeos. 5. Biotecnologia. I. Título

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados
fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VITÓRIA MENEGHETTI MINATEL, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA CLÍNICA, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 30 dias do mês de julho do ano de 2025, às 9h30min, no(a) Anfiteatro do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (Cevap) - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VITÓRIA MENEGHETTI MINATEL, intitulada **Construção e validação de biblioteca naïve de phage display exibindo VHHs**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. RUI SEABRA FERREIRA JUNIOR (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (Cevap) - Unesp, Profa. Dra. ANDREA QUEIROZ MARANHÃO (Participação Virtual) do(a) Depto de Biologia Celular / UnB - Brasília, Profa. Dra. CLARISSA FELTRIN (Participação Presencial) do(a) Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (Cevap) - Unesp. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: Aprovada. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. RUI SEABRA FERREIRA JUNIOR



Resumo

Anticorpos são proteínas essenciais na detecção de agentes estranhos, destacando-se pela alta especificidade e aplicabilidade em diagnóstico e terapias. Entre as suas variantes, os anticorpos de cadeia pesada (HCAbs), encontrados em camelídeos, como lhamas e alpacas, possuem como região de ligação ao antígeno o domínio variável VHH, com aproximadamente 15 kDa. Desde a aprovação do primeiro medicamento baseado em nanocorpos, o Caplacizumab, em 2019, o interesse pelo desenvolvimento dessas moléculas vem crescendo. Dentre as estratégias disponíveis, a construção e seleção de bibliotecas de *naïve phage display* tem se destacado pela possibilidade de rápida seleção de anticorpos, aproveitando o repertório imunológico natural dos animais. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo inicial de implementar e padronizar a construção de uma biblioteca *naïve* de VHHs exibidos em fagos, visando futuramente a geração de novas bibliotecas imunes contra alvos farmacêuticos de interesse. Para isso, foram coletadas amostras de sangue de quatro lhamas não imunizadas mantidas em fazendas, seguidas da separação de células mononucleares do sangue periférico por gradiente de centrifugação. O RNA total foi extraído e convertido em cDNA, e os genes de VHH amplificados por Nested PCR. Os fragmentos obtidos foram clonados no vetor pCOMB3XSS por digestão com *SfiI* e ligação com T4 DNA ligase. Vinte e uma alíquotas de *E. coli* eletrocompetentes foram transformadas via eletroporação, resultando em $6,39 \cdot 10^7$ transformantes. A avaliação por PCR de colônia e sequenciamento por Sanger revelou uma taxa de inserção correta de 26%. As análises demonstraram uma variabilidade clonal de 100%, resultando em um tamanho estimado real de $1,66 \cdot 10^7$ clones funcionais. Apesar das tentativas de otimizar as etapas de clonagem, a nova biblioteca obtida resultou em $2,82 \cdot 10^6$ transformantes. Assim, alternativas para otimizar o processo de clonagem estão sendo estudadas para os próximos passos. Ainda, esse projeto contribui para o fortalecimento da capacidade nacional na construção de bibliotecas de nanocorpos, e abre caminhos para a construção de bibliotecas imunes direcionadas a alvos de interesse farmacêutico com potencial aplicação em biotecnologia e saúde.

Palavras-chave: anticorpos de cadeia pesada; VHH; nanocorpos; *phage display*; biblioteca *naïve*; camelídeos; biotecnologia.

Construction and validation of a naïve VHH phage display library

Abstract

Antibodies are essential proteins involved in the detection of foreign agents, standing out for their high specificity and applicability in diagnostics and therapy. Among their variants, heavy-chain antibodies (HCAbs), found in camelids such as llamas and alpacas, have as their antigen-binding region the variable domain VHH, which is approximately 15 kDa. Since the approval of the first nanobody-based drug, Caplacizumab, in 2019, interest in the development of these molecules has been growing. Among the available strategies, the construction and selection of naïve phage display libraries has gained prominence due to the possibility of rapidly selecting antibodies by leveraging the animals' natural immune repertoire. In this context, the present study aimed to implement and standardize the construction of a naïve VHH phage display library, with the future goal of generating immune libraries targeting pharmaceutical-relevant antigens. To achieve this, blood samples were collected from four non-immunized llamas kept on farms, followed by peripheral blood mononuclear cell separation through density gradient centrifugation. Total RNA was extracted and converted into cDNA, and the VHH genes were amplified by Nested PCR. The resulting fragments were cloned into the pCOMB3XSS vector through digestion with SfiI and ligation with T4 DNA ligase. Twenty-one aliquots of electrocompetent *E. coli* were transformed via electroporation, yielding 6.39×10^7 transformants. Colony PCR and Sanger sequencing revealed a correct insertion rate of 26%. Analysis showed 100% clonal variability, resulting in an estimated actual size of 1.66×10^7 functional clones. Despite attempts to optimize the cloning steps, the new library resulted in 2.82×10^6 transformants. Therefore, alternative approaches to optimize the cloning process are currently being investigated. Furthermore, this project contributes to strengthening national capabilities in nanobody library construction and paves the way for the development of immune libraries targeting pharmaceutical-interest antigens with potential applications in biotechnology and healthcare.

Keywords: heavy chain antibodies; VHH; nanobodies; phage display; naïve library; camelids; biotechnology.

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Anticorpos: Produção, Classes e Anticorpos Monoclonais	1
1.2 Anticorpos de cadeia pesada	2
1.3 Bibliotecas de <i>phage display</i> exibindo VHHs	5
1.4 Seleção dos VHHs por <i>biopanning</i>.....	7
1.5 Contexto econômico	9
2. Objetivo geral.....	9
2.1 Objetivos Específicos	10
3. Materiais e Métodos	10
3.1 Coleta de amostras de sangue de lhamas e isolamento de linfócitos periféricos	10
3.2 Amplificação dos genes dos VHHs e clonagem em vetor fagomídeo	11
3.4 Preparo das bactérias eletrocompetentes	13
3.5 Transformação das bactérias eletrocompetentes e construção da biblioteca de fagos exibindo VHHs	14
3.6 Caracterização da Biblioteca <i>naïve</i> de fagos exibindo VHHs	16
4. Resultados e Discussões.....	16
5. Conclusões	28
6. Referências	29

1. Introdução

1.1 Anticorpos: Produção, Classes e Anticorpos Monoclonais

Anticorpos ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas que desempenham um papel crucial na detecção de agentes estranhos devido à sua elevada especificidade aos diferentes alvos, e por isso, são considerados uma das melhores biomoléculas para diagnóstico e tratamentos alvo-específicos (1). As imunoglobulinas G (IgG) são compostas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Na extremidade C-terminal, encontram-se os domínios constantes pesados (CH1, CH2 e CH3). Já na extremidade N-terminal, estão presentes as regiões variáveis, VH e VL, que conferem a capacidade desses anticorpos se ligarem à alvos distintos (2).

A região variável é constituída pela região de framework (FR, do inglês *framework region*) e pela região hipervariável, que abrange uma grande diversidade de aminoácidos, o que confere a especificidade do anticorpo ao antígeno (3). Os anticorpos apresentam diversidades no reconhecimento antigênico devido à variação das regiões determinantes de complementariedade (CDR, do inglês *complementary determining regions*).

O conjunto dessas regiões, constituem a estrutura complexa das imunoglobulinas, que corresponde a aproximadamente 150 kDa e é produzida por células B em resposta ao reconhecimento de proteínas ou polissacarídeos de patógenos (Figura 1) (3).

Atualmente, os anticorpos constituem ferramentas fundamentais no desenvolvimento de novas terapias e na produção de insumos para kits diagnósticos. Entre eles, destacam-se os anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês, *monoclonal antibodies*), produzidos por uma única célula B secretora e capazes de reconhecer um único alvo com elevada especificidade (4). O mercado de biofármacos evidencia o potencial desses anticorpos, com projeções que estimam um faturamento superior a USD 729 bilhões até 2033, em razão de sua versatilidade de aplicação em diversas doenças (5).

Diante desse potencial, diferentes métodos de produção de anticorpos monoclonais vêm sendo continuamente desenvolvidos. Atualmente, existem quatro classes diferentes de mAbs, de acordo com a estratégia empregada em sua geração. Os

primeiros mAbs produzidos foram os murinos, obtidos a partir da fusão de linfócitos B de baço de camundongos com células imortalizadas de mieloma. Embora inicialmente desenvolvidos para aplicações terapêuticas, sua elevada imunogenicidade limitou seu uso clínico, restringindo-os principalmente a ensaios diagnósticos e insumos laboratoriais. Ainda assim, os mAbs murinos permanecem como base para o desenvolvimento de classes subsequentes, como os quiméricos e humanizados (4,6).

A classe dos mAbs quiméricos incorporam apenas as regiões variáveis, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, dos anticorpos murinos, enquanto o restante das cadeias leves e pesadas é de origem humana, resultando em um construto híbrido com aproximadamente 65% de estrutura humana. Já os mAbs humanizados apresentam um grau ainda maior de “humanização”, sendo apenas as regiões hipervariáveis murinas (CDRs) são enxertadas nas cadeias leve e pesada cadeias leve e pesada da estrutura do anticorpo humano, o que confere cerca de 95% de similaridade com anticorpos humanos (4).

A mais recente categoria é composta pelos anticorpos monoclonais totalmente humanos. Sua produção envolve camundongos transgênicos portadores de genes de imunoglobulinas humanas, bem como técnicas de seleção *in vitro*, como *phage display* e *yeast display*. Essa classe representa atualmente a maior proporção de candidatos em ensaios clínicos (4,6).

Nesse contexto, diversas estratégias e alternativas continuam sendo desenvolvidas para atender à crescente demanda por anticorpos monoclonais, ampliando o leque de candidatos para aplicações clínicas.

1.2 Anticorpos de cadeia pesada

Uma categoria de anticorpos, chamada de anticorpos de cadeia pesada (HCAbs, do inglês *heavy chain antibodies*), é encontrada em camelídeos, como as lhamas, alpacas, camelos e dromedários. Esses anticorpos se destacam por não possuírem cadeias leves e o domínio pesado CH1 em sua estrutura. Nesses anticorpos, os domínios CH2 e CH3 estão ligados ao domínio variável dos anticorpos de cadeia pesada (VHH), totalizando em uma estrutura com cerca de 90 kDa (7).

Os camelídeos apresentam as imunoglobulinas convencionais (IgG1) e as especiais (IgG2 e IgG3), que correspondem aos HCAbs. Nos camelos, essas imunoglobulinas especiais podem representar até 70% do total de IgGs, enquanto nos

demais camelídeos esse valor pode chegar a 50%, o que representa uma notável importância em seus respectivos sistemas imunes (3).

Com relação à sua função, os VHHs correspondem à região de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *Fragment Antigen-Binding*) dos anticorpos convencionais, mas com apenas 15 kDa (8,9). Além disso, o domínio variável dos camelídeos geralmente apresenta loops de CDRs mais longos, especialmente nos CDR1 e CDR3, quando comparados com o domínio VH (Figura 1) (10,11). Essas características conferem acesso a epítomos que normalmente não estão disponíveis aos anticorpos convencionais, uma vez que o parátipo dos VHHs se projeta, permitindo sua inserção em cavidades crípticas das estruturas complexas dos antígenos, às quais os anticorpos convencionais não conseguem acessar devido às suas características estruturais (12,13).

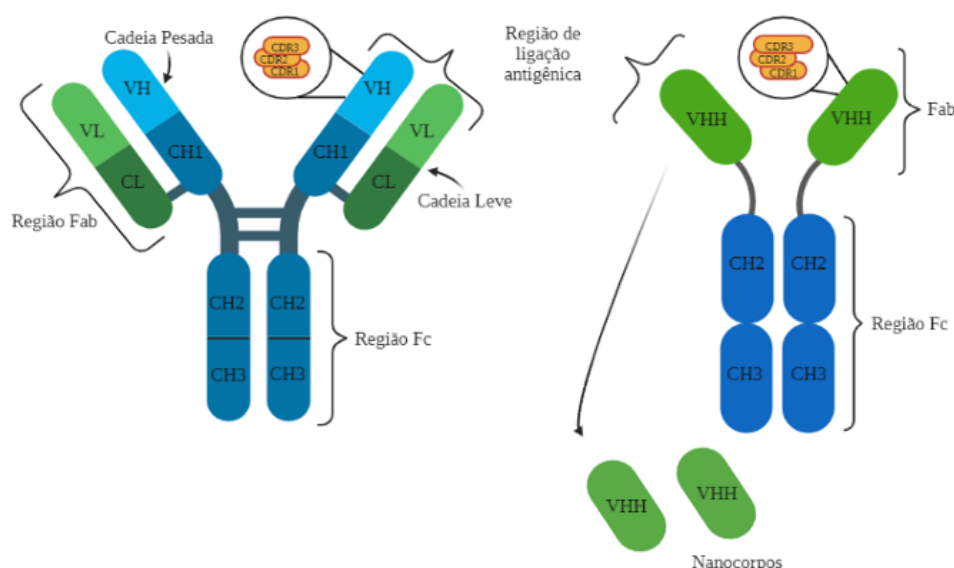


Figura 1 - Estrutura da IgG humana à esquerda, com representação das cadeias leves e pesadas, bem como os domínios variáveis e constantes, com um enfoque para os CDRs. Estrutura do HCAb de camelídeos à direita, com representação da cadeia pesada e dos domínios variáveis e constantes. Abaixo, a representação dos Nbs. Fonte: Minatel VM, Prudencio CR, Barraviera B, Ferreira RS. Nanobodies: a promising approach to treatment of viral diseases. Front Immunol. 2024 Jan 23; 14:1315935.

A predominância de aminoácidos hidrofílicos na composição dos VHHs confere maior solubilidade e estabilidade térmica, frente aos fragmentos de anticorpos convencionais, como Fab e scFv. Em vista dessas propriedades físico-químicas, um tamanho reduzido e uma maior facilidade de manipulação genética, permitindo sua produção em maior escala, os VHHs têm despertado grande interesse nas áreas

terapêuticas e de diagnósticos, sendo principalmente conhecidos como nanocorpos (Nb, do inglês *nanobody*) (9,11).

A trajetória translacional dos nanocorpos se iniciou em dezembro de 2001 com a biofarmacêutica Ablynx, que visava investigar as aplicações terapêuticas e as formas de produção desses VHHs, com foco na produção de novos biofármacos (14). Entre 2003 e 2010, em vista do seu grande potencial de aplicação na medicina, as publicações envolvendo o uso dos Nbs como agentes terapêuticos cresceram exponencialmente, com diversas concessões de patentes a empresas de todo o mundo, principalmente à Ablynx (14). Nesse período, iniciaram-se estudos pré-clínicos e clínicos com a utilização dos VHHs como biofármacos e biomarcadores de exames de imagem (14). Assim, à medida que patentes relacionadas aos VHHs vêm expirando ou sendo flexibilizadas, as barreiras de propriedade intelectual, que antes limitavam seu uso por empresas e centros de pesquisa, foram consideravelmente reduzidas. Isso tem ampliado o acesso a essa tecnologia por parte da comunidade científica e da indústria farmacêutica, impulsionando o desenvolvimento clínico de diversas terapias baseadas nesses anticorpos (14,15).

Em 2018, a empresa Ablynx foi adquirida pela Sanofi por 3,9 bilhões de euros (16). No ano seguinte, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o primeiro medicamento à base de nanocorpos, o Caplacizumab (Cablivi™), indicado para o tratamento de púrpura trombocitopênica trombótica adquirida (PTTa) (14,15). O Cablivi™ é composto por domínios VHHs biespecíficos humanizados idênticos, que reconhecem o fator de von Willebrand, inibindo sua interação com as plaquetas (17). Mais recentemente, em setembro de 2022, a PMDA (*Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*) do Japão aprovou outro biofármaco baseado em nanocorpos, o Ozoralizumab (Nanozora™), para o tratamento de artrite reumatoide. O Nanozora™ é formado por anticorpos biespecíficos triespecíficos compostos por domínios VHHs humanizados, capazes de se ligar simultaneamente ao fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e à soroalbumina humana. Essas unidades são unidas por um ligante flexível de glicina-serina, que confere estabilidade à molécula (18).

Nesse cenário, diversas técnicas têm sido empregadas para a descoberta e geração de Nbs antígeno-específicos. Entre elas, o *phage display* se destaca como uma das principais ferramentas para a descoberta de anticorpos com alta especificidade ao alvo, devido à sua robustez, versatilidade, consolidação e menor custo em comparação a outras técnicas, como *yeast display* e *RNA display* (19,20).

1.3 Bibliotecas de *phage display* exibindo VHHs

Uma das técnicas mais frequentes para a seleção de proteínas e anticorpos é o *phage display*, também chamada de exibição em fagos. A fim de realizar essa seleção, a proteína de interesse é exibida na superfície do fago para, posteriormente, interagir com uma gama de moléculas alvo, em um processo chamado de bioseleção (*biopanning*). Esse processo permite o isolamento e o enriquecimento de ligantes específicos, no caso dos anticorpos, ligantes antígenos específicos (21).

A principal metodologia utilizada para a realização de *phage display* de anticorpos é por meio de vetores fagomídeos. Esses vetores contêm origem de replicação bacteriana, marcador de resistência a antibiótico, o gene de interesse fundido com a proteína pIII, localizada na extremidade do capsídeo viral, e a origem de replicação do fago (19,22). Assim, para a produção de fagos funcionais exibindo os anticorpos, é necessário a coinfeção das células de *E. coli* hospedeiras com um fago auxiliar, que contém todos os genes necessários para a sua montagem, replicação e infecção (Figura 2) (19,21).

Os fagos auxiliares mais utilizados no processo de *phage display*, como os f1, M13 e fd, pertencem à família de fagos filamentosos, que infectam exclusivamente bactérias Gram-negativas por meio do pili F (21,22). Após a infecção, esses vírus não causam lise bacteriana, mas exploram a maquinaria celular do hospedeiro para a produção e secreção contínua de novas partículas virais (21). O genoma desses fagos é composto por DNA de fita simples de sentido positivo (+ssDNA) circular. Ao infectar o hospedeiro, a maquinaria celular da bactéria sintetiza a fita complementar negativa, formando a estrutura do DNA de fita dupla, consistindo em sua forma replicativa. Esse genoma contém nove genes codificadores de onze proteínas distintas, que incluem proteínas estruturais, de replicação e montagem (21,22).

Dessa forma, o gene codificador do anticorpo é clonado *in frame* com o gene da proteína pIII do fago, e após infecção e montagem, são geradas partículas recombinantes que mantêm as propriedades bioquímicas do anticorpo, permitindo sua posterior seleção. Dessa forma, é gerado um conjunto diverso de fagos exibindo fragmentos de anticorpos que compõem uma biblioteca (Figura 2) (21). A seleção dos ligantes específicos ocorre por meio de bioseleção, enriquecendo fagos com maior afinidade ao antígeno alvo em ciclos sucessivos (22).

Por se tratar de uma ferramenta versátil, existem diferentes abordagens que possibilitam a construção de bibliotecas de *phage display* exibindo fragmentos de anticorpos, as quais são posteriormente utilizadas para a descobertas de novas moléculas candidatas. Entre as abordagens disponíveis, a construção de bibliotecas *naïve* se torna uma opção visando a rápida seleção de anticorpos com afinidade antígeno-específica. Essas bibliotecas são assim denominadas por não apresentarem viés para nenhum alvo específico, já que são derivadas do repertório natural do animal (23).

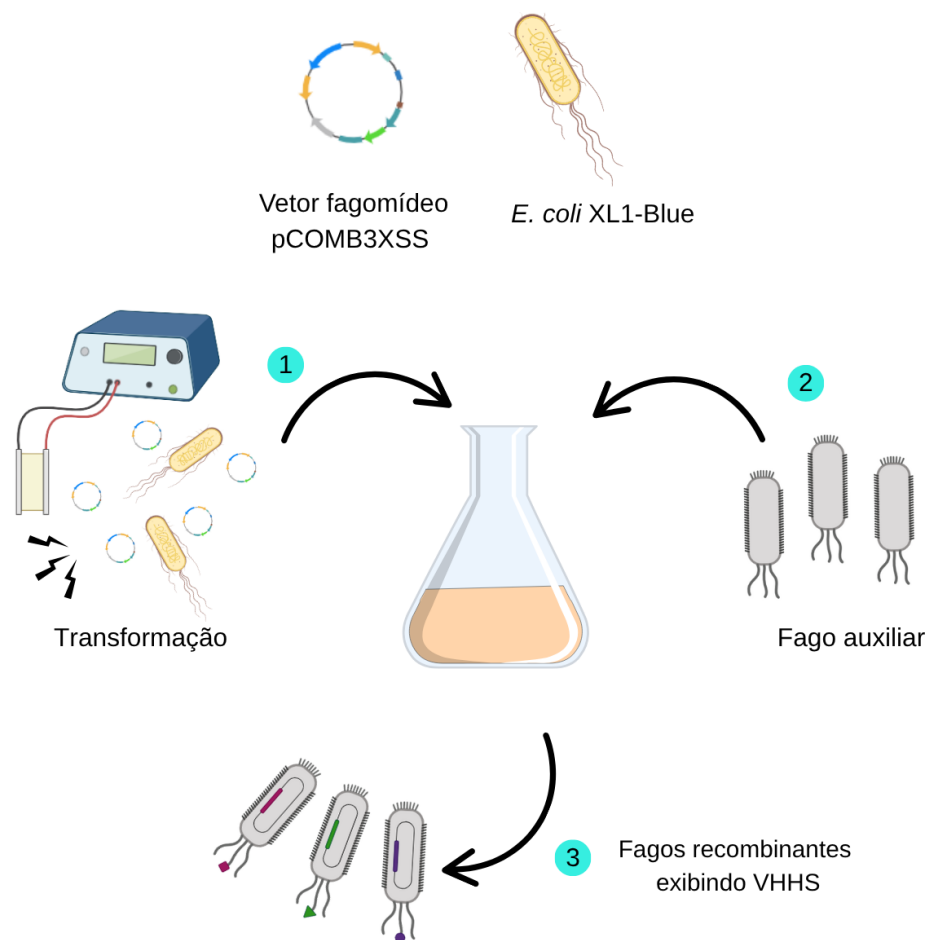


Figura 2 - Representação esquemática do processo de *phage display*. Produção de fagos recombinantes exibindo anticorpos a partir do uso de vetor fagomídeo e da infecção com fagos auxiliares. Na etapa 1, as bactérias são transformadas por eletroporação com o vetor fagomídeo contendo o inserto. Essas células são adicionadas ao meio de cultura e incubadas. Na etapa 2, os fagos auxiliares são adicionados para a montagem de novas partículas virais. Por fim, na etapa 3, os fagos recombinantes, exibindo os VHHS fusionados na proteína pIII. Feito com BioRender.com. Fonte: autoria própria, 2025.

A seleção de moléculas a partir de uma biblioteca *naïve* de fagos exibindo VHHS permite a rápida produção de anticorpos com afinidade relativa ao alvo, sendo

particularmente eficaz em situações de rápida disseminação de doenças, como foi o caso do vírus SARS-CoV-2 e a COVID-19. Além disso, essa abordagem possibilita a seleção de anticorpos específicos para uma ampla variedade de alvos, especialmente autoantígenos, antígenos tóxicos e antígenos de baixa imunogenicidade. Em contrapartida, as bibliotecas de *phage display* derivadas da imunização de animais são restritas a um único antígeno, demandando um tempo mais longo, de acordo com o calendário de imunização, além de serem mais onerosas devido à necessidade de grandes quantidades de antígenos para a imunização, bem como aos custos associados ao manejo e à manutenção dos animais (23,24).

Além disso, fragmentos de anticorpos, como os VHHs, derivados de bibliotecas imune de *phage display*, tendem a apresentar maior afinidade ao antígeno utilizado na imunização, uma vez que esses anticorpos passaram pelo processo de maturação *in vivo*. Essa abordagem é particularmente vantajosa quando se busca a obtenção de anticorpos de alta afinidade. No entanto, bibliotecas imunes apresentam, em geral, menor diversidade de variantes quando comparadas às bibliotecas *naïve*, que apesar de inicialmente conterem anticorpos com afinidades moderadas, oferecem um repertório inicial mais amplo para a seleção de ligantes contra diferentes antígenos (19). Essa diversidade é crucial, pois aumenta a probabilidade de encontrar anticorpos específicos para um determinado alvo dentro da biblioteca (23,24).

1.4 Seleção dos VHHs por *biopanning*

A partir das partículas dos fagos recombinantes, cada uma representando um clone distinto com variabilidade genética, usualmente é realizada a seleção de ligantes específicos por meio da técnica de *biopanning*. Nesse processo, apenas os fagos que reconhecem e se ligam aos antígenos de interesse são eluidos, sendo posteriormente enriquecidos em ciclos sucessivos de *biopanning* (Figura 3) (21). Como a seleção é baseada na afinidade entre anticorpo e antígeno, essa abordagem também se tornou uma estratégia eficaz para a identificação de nanocorpos com especificidade e afinidade desejadas (19).

Nesse sentido, além da construção de uma biblioteca de qualidade, levando-se em conta tamanho e diversidade, a obtenção de VHHs promissores também depende diretamente das etapas de seleção e da forma como o antígeno é apresentado aos fragmentos de anticorpo (25). Por isso, diferentes formas de seleção são empregadas,

sendo a mais utilizada, a imobilização do antígeno em placas por adsorção direta. No entanto, essa adsorção passiva do alvo, pode posicionar o antígeno de forma que obstrua o sítio de ligação antigênica, impedindo a sua ligação aos Nbs (26).

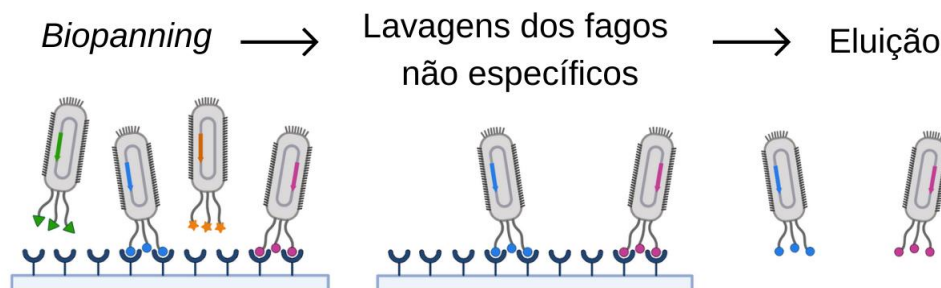


Figura 3 - Representação esquemática do processo de *biopanning*. Feito com BioRender.com.
Fonte: autoria própria, 2025. Criado com BioRender.com.

Uma alternativa, é a biotinylation do antígeno e a sua respectiva captura por moléculas de estreptavidina imobilizadas. Nessa estratégia é possível orientar o antígeno, reduzindo a chance de obstrução do epítipo. Apesar de eficiente, o custo desse processo é maior devido ao emprego dessas moléculas de imobilização, e demanda cuidados adicionais, já que os Nbs podem ser selecionados com afinidade indesejada por essas moléculas de captura. Por isso, etapas de seleção negativa contra essas estruturas de imobilização costumam ser incluídas no protocolo para evitar clones inespecíficos (26,27).

Outras abordagens de seleção também podem ser aplicadas, como o uso de células que expressam os antígenos na membrana ou, ainda, seleções realizadas *in vivo*, com a administração da biblioteca de fagos em animais ou humanos, o que proporciona maior fidelidade à conformação nativa do alvo de interesse (28,29). Assim, as estratégias de seleção são amplamente diversas, podendo-se ajustar o número de ciclos de *biopanning*, buscando um equilíbrio entre viés de seleção e afinidade, além de definir o rigor das etapas de lavagem e eluição. Outras possibilidades incluem o emprego de *biopanning* competitivo, seleção por subtração, ou até a combinação dessas abordagens. Essas estratégias devem ser bem definidas e planejadas, uma vez que podem favorecer e auxiliar na recuperação de VHHs com afinidades na faixa nanomolar, característica especialmente desejável para aplicações terapêuticas e no desenvolvimento de biofármacos.

Assim, outra vantagem dos nanocorpos é a sua versatilidade, que possibilita realizar modificações estruturais após as estratégias de seleção e obtenção. Dessa forma,

mesmo que os fragmentos inicialmente isolados não apresentem as afinidades ideais para determinada aplicação, é possível otimizá-los por meio de sua engenharia. Entre as estratégias disponíveis, destacam-se a construção de formatos multivalentes ou multiespecíficos, além da conjugação dos nanocorpos com a porção Fc de IgG humana, o que pode aumentar a meia-vida sérica e a eficácia terapêutica. Um exemplo dessa possibilidade é o Ozoralizumab (Nanozora™), um VHH biespecífico composto por dois VHHs humanizados direcionados ao alvo (TNF α) e um terceiro VHH com afinidade à albumina sérica, conferindo maior estabilidade e tempo de circulação no organismo (18). Além disso, um exemplo que ilustra a versatilidade dos VHHs é o idecabtagene vicleucel (Abecma™), aprovado pelo FDA em março de 2021. Trata-se de uma terapia celular CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cell therapy*), cujo receptor quimérico é constituído por VHHs direcionados ao antígeno BCMA (*B-cell Maturation Antigen*), frequentemente expresso em células de mieloma múltiplo (30).

1.5 Contexto econômico

Dessa forma, foi realizado um breve levantamento de mercado junto a empresas consolidadas no setor internacional, como a Creative Biolabs (<https://www.creative-biolabs.com/>), Oak Biosciences (<https://www.oakbiosciences.com/>) e ProteoGenix (<https://www.proteogenix.science/>), com o objetivo de obter cotações para a aquisição de bibliotecas de fagos exibindo VHHs. Os valores estimados para essas bibliotecas estavam em torno de U\$ 100.000,00, com a ressalva de que quaisquer produtos desenvolvidos a partir dessas bibliotecas estariam sujeitos a pagamento de *royalties*. Além disso, essas empresas também disponibilizam serviços de triagem de nanocorpos específicos para antígenos de interesse, com custos aproximados de U\$ 45.000,00.

Em vista disso, a construção de bibliotecas de *phage display* se justifica não apenas pela sua expressiva relevância científica, mas também pelo impacto econômico associado, contribuindo diretamente para o fortalecimento da pesquisa nacional. Além de reduzir os custos envolvidos no desenvolvimento e na consolidação dessa tecnologia no país, essa iniciativa amplia as perspectivas para a oferta de serviços especializados, favorecendo a inserção do CTS (*Center for Translational Science & Biopharmaceuticals Development* – FAPESP Proc. N° 2021/11936-3) no mercado internacional.

2. Objetivo geral

O objetivo geral do projeto é implementar e padronizar a construção de uma biblioteca *naïve* de fagos exibindo os domínios variáveis pesados de camelídeos (VHHs), com a finalidade de estabelecer uma plataforma robusta que permita, futuramente, a geração de bibliotecas *naïves* e imunes, destinadas à seleção de nanocorpos com potencial de aplicação farmacêutica.

2.1 Objetivos Específicos

O objetivo específico do projeto é implementar a construção da biblioteca de fagos derivada de lhamas, consolidando a metodologia de produção, por meio das etapas a seguir:

- Coletar amostras de sangue de lhamas e isolar os linfócitos do sangue periférico;
- Extrair o RNA total dos linfócitos e construir a biblioteca de DNA complementar;
- Amplificar a região de interesse do domínio variável dos HCABs e realizar a sua clonagem em vetor fagomídeo;
- Transformar bactérias eletrocompetentes com o vetor fagomídeo e construir a biblioteca de fagos exibindo os domínios VHH;
- Avaliar a biblioteca construída com relação ao tamanho e à diversidade clonal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Coleta de amostras de sangue de lhamas e isolamento de linfócitos periféricos

Para a construção da biblioteca *naïve* de fagos exibindo VHHs, foram coletados 80 mL de sangue periférico, em tubos contendo heparina, da veia jugular de quatro lhamas adultas (CEUA protocolo nº 000.373/2025). As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram isoladas por centrifugação em gradiente diferencial, utilizando Ficoll Paque Plus™ (Cytiva, USA).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs — *peripheral blood mononuclear cells*) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade, utilizando o reagente Ficoll-Paque Plus™ (Cytiva, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. O sangue heparinizado foi diluído em volume igual de tampão salino fosfatado estéril (PBS 1×), sobreposto cuidadosamente ao Ficoll em tubos cônicos e centrifugado a

400 × g por 30 minutos, à temperatura ambiente, sem freio. Após a centrifugação, o anel contendo os PBMCs foi cuidadosamente coletado com pipeta estéril e lavado duas vezes com PBS 1× para remoção de resíduos de plasma e plaquetas.

3.2 Amplificação dos genes dos VHHs e clonagem em vetor fagomídeo

Para a amplificação dos genes dos VHHs, o RNA total foi extraído com o reagente TRIzol™ (Invitrogen, USA) e com o PureLink RNA Mini Kit™ (Invitrogen, USA), utilizando colunas de sílica. Em seguida, o cDNA foi sintetizado com o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase™ (Invitrogen, USA), utilizando-se *primers* oligo-d(T). A eficiência da síntese foi confirmada por PCR utilizando os *primers* controle fornecidos no kit, *Control sense primer* e *Control antisense primer*.

Para a amplificação dos genes dos VHHs, foi realizada uma Nested-PCR. Inicialmente, na primeira PCR, foram amplificados os genes dos anticorpos de lhama com a enzima GoTaq Hot Start Polymerase™ (Promega, USA) e os *primers* CALL001 (5'-GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG-3') e CALL002 (5'-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3') (31). Esses *primers* se anelam a uma região conservada da sequência sinal líder e à região do segundo domínio constante da cadeia pesada (CH2) das imunoglobulinas, respectivamente. As condições da reação estão descritas na Tabela 1 a seguir. A banda correspondente aos HCABs, de aproximadamente 750pb, foi recortada do gel de agarose 1,5% e purificada com o PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA).

Tabela 1 – Condições da primeira reação de PCR para amplificação dos genes dos HCABs.

Temperatura	Tempo	Ciclo
95 °C	2 min	1
94 °C	1min	2-31
57 °C	1min	
72 °C	45 s	
72 °C	7 min	32

Os *amplicons* gerados na primeira PCR foram utilizados como molde para uma segunda reação de PCR. Inicialmente, foram testados três conjuntos de *primers*, conforme descrito na Tabela 2 a seguir. O melhor conjunto foi selecionado com base na otimização das condições da reação e na análise das bandas obtidas por eletroforese em gel de

agarose, considerando-se a nitidez e intensidade dos fragmentos amplificados de maneira visual. O conjunto selecionado foi composto pelo *primer forward* VHH-FR1, que se anela à região de *framework 1* (FR1) do gene VHH, e pelos *primers reverse* VHH-longR e VHH-shortR2 modificados para incluir sítios de clivagem da enzima *SfiI*, representados pelas sequências sublinhadas. Os *primers reverse* se anelam a regiões distintas da dobradiça dos subtipos de IgG (32). Todos os *primers* utilizados foram sintetizados pela empresa *ThermoFischer Scientific* Brasil.

Tabela 2 – Sequências dos conjuntos de *primers* testados para amplificação dos genes dos VHHs.

Referência	Nome	Sequência (5'-3')
(33)	VHH-Back	<u>GGCCAGGCCGGCC</u> GAGTCTGGRGGAGG
	VHH-For	<u>GGCCCAGGCGGCC</u> CTAGTGCGGCCGCTGGAGAC
<i>Primers</i> autorais	VHH-PF	<u>GGCCCAGGCGGCC</u> CAGGTGCAGCTSGTGGAGTC
	VHH-PR	<u>GGCCAGGCCGGCC</u> GAGACYGTGACCWGGGTSCCC
(32)	VHH-FR1	TCGCGGCCAGGCCGCCATGGCCSARGTRMARCTCGTGSARTCWGG
	VHH-shortR2	CGAGT <u>GGCCAGGCCGGCC</u> GGGGTCTTCGCTGTGGTGCG
	VHH-longR	CGAGT <u>GGCCAGGCCGGCC</u> TTGTGGTTTTGGTATCTTGGG

As condições da reação estão descritas na Tabela 3 a seguir. Os *amplicons* com cerca de 500 pb foram purificados do gel de agarose 2% com o PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA).

Tabela 3 – Condições da segunda reação de PCR para amplificação dos genes dos VHHs.

Temperatura	Tempo	Ciclo
95 °C	2 min	1
94 °C	30 s	2-20
56 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	21

O *pool* de fragmentos de DNA foi digerido *overnight* com a enzima *SfiI* rCutSmart™ (New England Biolabs, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. O vetor pCOMB3XSS foi digerido nas mesmas condições que os insertos. O fragmento do vetor, de aproximadamente 3373 pb, foi separado e purificado de seu respectivo *stuffer* pela extração do gel de agarose 1,5% com o PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA).

Os *amplicons* da PCR interna e o vetor digerido com *SfiI*, foram ligados com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen, USA) a 16 °C *overnight*. Foram realizados testes de ligação para determinar a melhor razão molar entre inserto e vetor. O vetor pCOMB3XSS foi posteriormente tratado com fosfatase alcalina rSAP™ (New England Biolabs, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, foram realizados testes de autoligação e ligação com *stuffer*.

Com a confirmação da qualidade da ligação do inserto ao vetor, foi realizado o escalonamento da reação de ligação, totalizando 19 reações individuais, todas conduzidas na mesma proporção da reação teste. Dessa forma, foram utilizados no total 1,4 µg de pCOMB3XSS linearizado e 625 ng de inserto, resultando na proporção 3:1. Em seguida, foi feito um *pool* dessas reações, que foi imediatamente precipitado com isopropanol.

3.4 Preparo das bactérias eletrocompetentes

O tamanho da biblioteca de anticorpos é diretamente dependente da eficiência de introdução do vetor contendo o inserto nas células de *E. coli*, sendo a eletroporação o método mais eficiente para a inserção de DNA exógeno em bactérias. Para isso, é essencial que as células bacterianas estejam em estado eletrocompetente, o que requer uma alta resistência elétrica, obtida pela redução da força iônica no meio. Assim, a preparação de bactérias eletrocompetentes consiste na lavagem repetida das células, a fim de remover os íons presentes, geralmente no meio de cultura, garantindo condições adequadas para a eletroporação (34).

Para isso, uma única colônia de *E. coli* XL1 Blue, proveniente de placa de Luria Bertani ágar suplementado com tetraciclina, foi inoculada em 50mL de meio SB (do inglês, *Super Broth*, contendo MOPS, triptona e extrato de levedura) e incubada a 37 °C, a 250 rpm *overnight*, para o preparo de bactérias eletrocompetentes. No dia seguinte, 25

mL dessa cultura foram transferidos para um Erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de meio SB. A cultura foi incubada a 37 °C e 250 rpm até atingir $DO_{600} = 0,8$.

Ao atingir a DO_{600} desejada, o frasco foi imediatamente transferido para um banho de gelo por 30 minutos. Todos os materiais e soluções utilizados a partir desse ponto estavam previamente resfriados a ponto de gelo. As células foram coletadas por centrifugação a $2000\times g$ durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado e lavado com UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen, USA) até completar o volume total do frasco de centrífuga. Esse procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em glicerol 10% gelado, completando metade do volume do frasco, e centrifugado novamente a $2000\times g$ por 20 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuscitadas em 10 mL de glicerol 10% gelado e submetidas a uma nova centrifugação sob as mesmas condições. Todo o restante de solução foi cuidadosamente removido e o *pellet* final foi ressuscitado em 1mL de meio GYT (*Glycerol*, *Yeast extract* e *Tryptone*). Por fim, alíquotas de 120 µL da suspensão de células foram preparadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

3.5 Transformação das bactérias eletrocompetentes e construção da biblioteca de fagos exibindo VHHs

Foram transformadas 21 alíquotas de bactérias eletrocompetentes, cada uma com 1 µL da reação de ligação, previamente precipitada com isopropanol, utilizando o Gene Pulser Xcell Total System™ (Bio-Rad Laboratories, UK). As alíquotas foram descongeladas em grupos de três à temperatura ambiente. As condições utilizadas para a eletroporação foram de 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Após o pulso, as bactérias foram recuperadas em 2mL de SOC (do inglês, *Super Optimal broth with Catabolite repression*, contendo triptona, extrato de levedura, NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄·7H₂O e glicose) e, em seguida, o *pool* de células foi incubado por 1 hora a 37 °C e 250 rpm.

Após incubação, foram adicionados 84 mL de meio SB pré-aquecido a 37 °C à cultura, juntamente com 25 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 252 µL de tetraciclina a 5 mg/mL. A cultura foi incubada novamente a 37 °C e 250 rpm por 1 hora. Em seguida, 37,8 µL de carbenicilina foi adicionado e a incubação prosseguiu por mais 1 hora sob as mesmas condições. Paralelamente, foi coletada uma alíquota da cultura logo após a

recuperação das células, para titulação realizada em triplicata, por meio de diluições seriadas até 10^{-6} . As diluições foram semeadas em placa de LB ágar contendo carbenicilina e glicose, incubadas a 37 °C *overnight*.

No dia seguinte, o número total de transformantes foi determinado pela média do número de colônias da placa de maior diluição, multiplicada pelo volume total da cultura e dividida pelo volume semeado (34). Foram coletados 12 mL do meio, dos quais 2 mL foram destinados para a preparação de alíquotas de 500 µL em glicerol, que foram armazenadas a -80 °C. O volume restante foi utilizado para inocular 200 mL de meio SB fresco, com o objetivo de promover a recuperação da biblioteca e realizar a purificação do plasmídeo utilizando o PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification Kit (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Foram adicionados meio SB pré-aquecido a 37 °C até completar 200mL em um novo Erlenmeyer de 2 L, seguido da adição de 2 mL de fago auxiliar VCSM13 a 10^{12} pfu/mL, 92,5 µL de carbenicilina a 100 mg/mL e 370 µL de tetraciclina a 5 mg/mL. A cultura foi incubada a 37 °C e 300 rpm por 2 horas. Após incubação, 280 µL de canamicina a 50 mg/mL foi adicionado e a cultura foi novamente incubada a 37 °C e 300 rpm *overnight*.

No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a $3.000\times g$ por 15 minutos a 4 °C. O pellet bacteriano foi armazenado a -20 °C e o sobrenadante utilizado nas etapas de precipitação dos fagos. Para isso, foi adicionado 8 g de PEG-8000 e 6 g de NaCl ao sobrenadante, dissolvendo os sólidos sob agitação a 37 °C e 300rpm por 5 minutos. A solução foi então incubada em gelo por 30 minutos.

Posteriormente, a solução foi centrifugada a $15.000\times g$ por 15 minutos a 4 °C, e todo o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente, virados para baixo, para garantir a remoção completa do sobrenadante. O *pellet* de fagos foi ressuspendido em 2 mL de TBS contendo 1% (m/v) de BSA e centrifugado a $15.000\times g$ por 5 minutos a 4 °C. Por fim, o sobrenadante contendo as partículas de fago foi coletado e armazenado a 4 °C.

O mesmo foi realizado no segundo ensaio de construção da biblioteca de VHHs apresentados por fagos. No entanto, apesar de utilizar as mesmas proporções para preparar as reações de ligação (1,4 µg de pCOMB3XSS linearizado e 625 ng de inserto),

o pool de ligação foi precipitado e ressuspendido em um volume menor, sendo realizadas 11 alíquotas de bactérias eletrocompetentes com 1 µL desse *pool* nas transformações.

3.6 Caracterização da Biblioteca *naïve* de fagos exibindo VHHs

Para a caracterização da biblioteca de fagos construída, inicialmente foram realizadas reações de PCR de colônias, com o objetivo de determinar a taxa de inserção correta do gene de interesse. Os *primers* utilizados foram o OMPSeq e Gback, que se anelam às regiões do vetor próximas ao sítio de clonagem (34). Em seguida, 50 colônias individuais foram inoculadas em 5 mL de meio SB e incubadas a 37 °C e 250 rpm *overnight*. No dia seguinte, os 50 tubos foram centrifugados a 2000×g por 15 minutos a 4 °C. As células coletadas seguiram para o processo de extração do vetor utilizando o PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

A partir do DNA obtido, novamente foram realizadas 50 reações de PCRs para a confirmação da presença e do tamanho adequado do inserto, analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Adicionalmente, foi realizada a digestão enzimática dos DNAs extraídos com a enzima MvaI (Invitrogen, USA) a 37 °C *overnight*. A reação de digestão foi analisada em gel de agarose a 1,5% e os perfis de fragmentos gerados foram analisados.

Por fim, as 50 amostras de DNA foram submetidas ao sequenciamento por Sanger, utilizando o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Invitrogen, USA), conforme as instruções do fabricante. O vetor pGEM foi utilizado como controle positivo. Os produtos das reações de sequenciamento foram purificados com acetato de sódio (NaOAc) e etanol. Em seguida, foi adicionada formamida, e as amostras foram enviadas ao Laboratório Estratégico do Instituto Adolfo Lutz (LEIAL) para leitura dos fragmentos marcados com os didesoxinucleotídeos fluorescentes e posterior obtenção das sequências.

O mesmo foi realizado com o novo ensaio de construção da biblioteca, no entanto, apenas 30 colônias individuais foram selecionadas e incubadas para posterior sequenciamento e análise da qualidade.

4. Resultados e Discussões

Para a construção da biblioteca, foi realizada a extração do RNA total dos linfócitos periféricos de quatro lhamas fêmeas. Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA obtido e a eficiência da síntese foi confirmada por PCR. Como resultado, foi obtida uma banda de aproximadamente 353 pb, compatível com o tamanho esperado, confirmando o sucesso da reação de transcrição reversa (Figura 4).

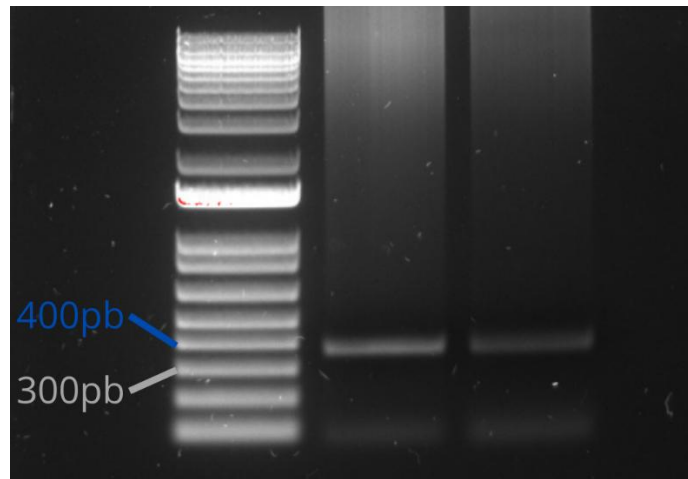


Figura 4 - Análise da síntese de cDNA a partir de RNA total extraído de PBMCs de lhamas. Fonte: autoria própria, 2025.

A partir do cDNA, a síntese dos genes dos VHHs foi realizada por meio da Nested PCR. Na primeira etapa, ocorreu a amplificação de duas bandas distintas no gel de agarose a 1,5%, compatíveis com os tamanhos esperados para os genes dos anticorpos convencionais (~900 pb) e para os HCABs (~750 pb) (31). Já na segunda etapa, foi obtida uma banda única e bem definida, com tamanho aproximado de 450 pb, compatível com os genes de VHHs, utilizando o conjunto de *primers* VHH-FR1, VHH-longR e VHH-shortR2 (Figura 5) (31).

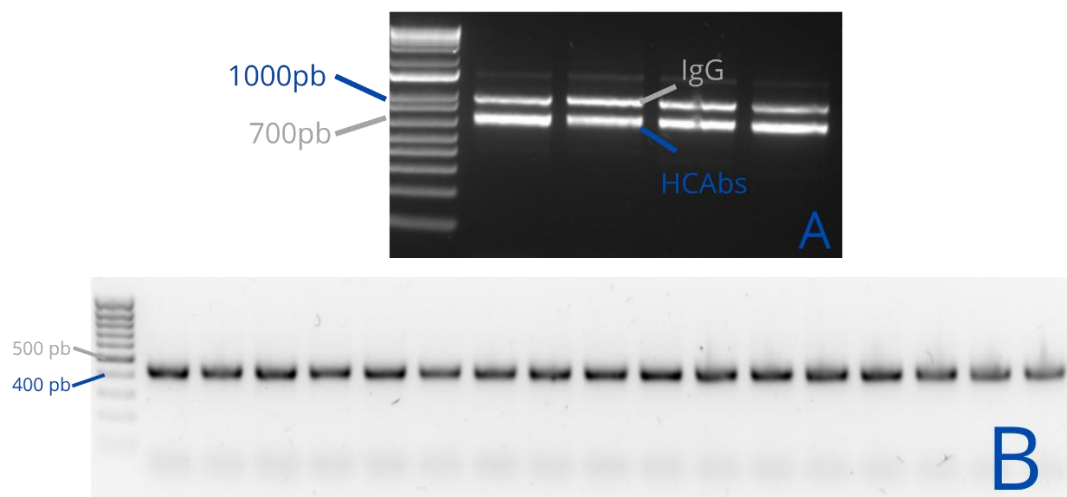


Figura 5 - Amplificação dos genes de anticorpos convencionais (IgG) e de anticorpos de cadeia pesada de lhama (HCABs). **(A)** Primeira PCR utilizando os *primers* CALL001 e CALL002. **(B)** Segunda PCR realizada com os *primers* VHH-FR1, VHH-LongR e VHH-ShortR2, amplificando a região dos VHHs. Fonte: autoria própria, 2025.

Em seguida, o *pool* dos fragmentos de DNA amplificados, correspondentes aos genes dos VHHs, foi digerido com a enzima *SfiI* *overnight*, assim como o vetor pCOMB3XSS, visando a preparação para o processo de clonagem. A digestão do vetor permitiu a remoção eficiente do fragmento *stuffer*, possibilitando a separação do fragmento linearizado de aproximadamente 3373 pb, que foi purificado por extração de gel (Figura 3) (34).

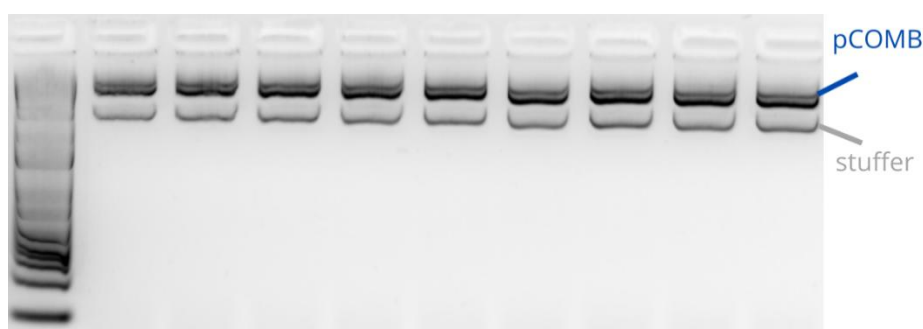


Figura 6 – Digestão do vetor pCOMB3XSS com a enzima *SfiI*, liberando o fragmento do *stuffer*. Fonte: autoria própria, 2025.

Após o preparo das bactérias eletrocompetentes (*E. coli* XL1 Blue), foram obtidas 25 alíquotas de 120 μ L cada de células. A eletrocompetência foi validada pela transformação com DNA plasmidial controle (pUC19) e de trabalho (pCOMB3XSS), alcançando uma média de 10^9 transformantes. Esse valor é compatível com os protocolos descritos na literatura (35,36), e os resultados confirmam a eficiência do protocolo utilizado. Portanto, garantindo a viabilidade e competência necessárias para as etapas subsequentes da construção e amplificação da biblioteca de fagos exibindo VHHs, idealmente para bibliotecas imunes.

Visando reduzir a autoligação do vetor, após a sua digestão, este foi tratado com fosfatase alcalina rSAPTM, o que se mostrou eficiente, uma vez que não foram observadas colônias nas placas de controle de autoligação após a eletroporação, confirmando a completa desfosforilação das extremidades do vetor.

Em seguida, com a digestão dos *amplicons*, obtidos pela *Nested* PCR, e do vetor, seguiu o processo de ligação com a T4 DNA ligase. Para otimizar a eficiência do processo,

os testes de diferentes proporções molares entre inserto e vetor, demonstraram que a razão de 3:1 proporcionou o maior rendimento de colônias transformadas, sendo, portanto, a condição escolhida para a construção da biblioteca.

Para estimar o número total de transformantes da biblioteca e assegurar que sua diversidade fosse suficientemente representada, foi realizada a titulação de uma alíquota da cultura logo após a recuperação das células transformadas. Com base nas contagens de colônias obtidas e nas diluições realizadas, foi estimado um número total de transformantes igual a $6,39 \times 10^7$ células transformadas, o que se encontra dentro da faixa considerada adequada para aplicações iniciais em diagnóstico e identificação de ligantes de interesse.

Inicialmente, na PCR de colônias, observou-se que todas as colônias analisadas apresentaram bandas com aproximadamente 500 pb, conforme ilustrado na figura 4. Esse resultado indicava, a princípio, que 100% das colônias possuíam o inserto de interesse, uma vez que o fragmento esperado para colônias contendo apenas o vetor sem inserto seria de aproximadamente 180 pb.

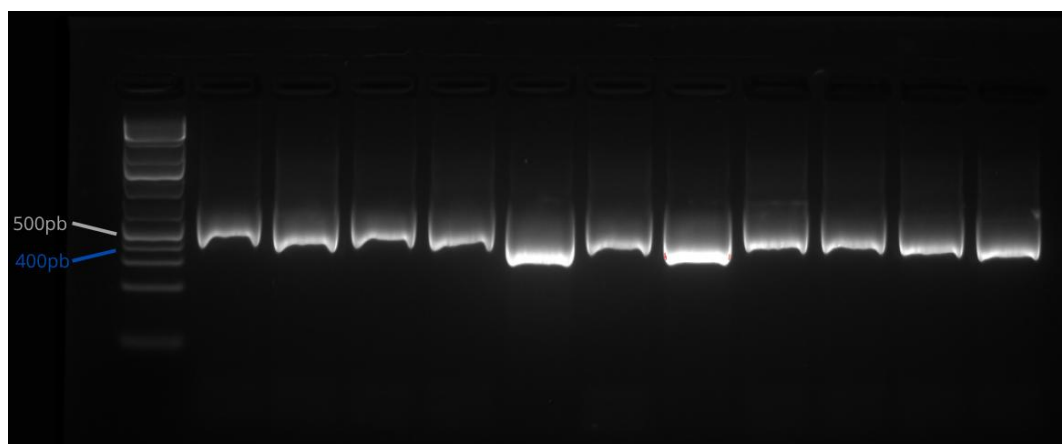


Figura 7 – PCR de colônia para confirmação do inserto. Fonte: autoria própria, 2025.

No entanto, mesmo após a repetição de novas reações de PCRs e a realização de outras corridas em géis de agarose, não foi possível melhorar a definição ou os aspectos das bandas obtidas. Além disso, ao submeter os DNAs purificados por miniprep à digestão com a enzima MvaI, foram observados alguns padrões de fragmentos distintos dos esperados, conforme ilustrado na figura 5 a seguir.

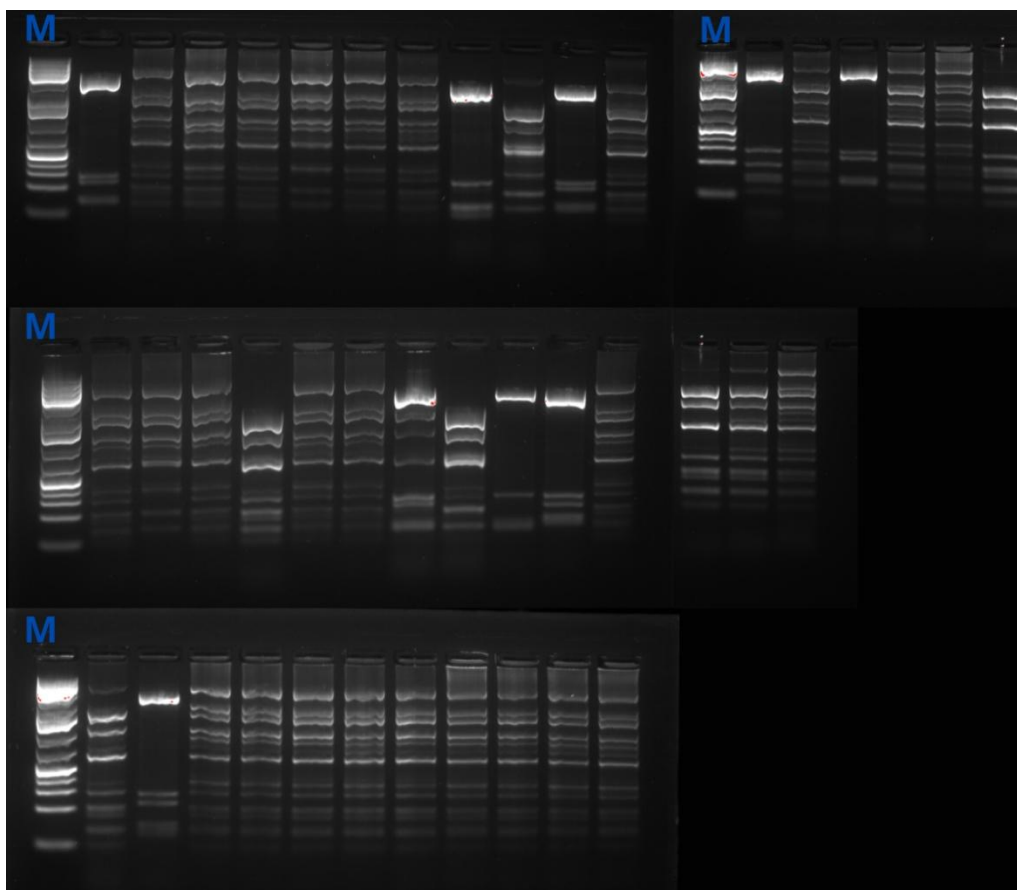


Figura 8 – Padrões de fragmentos obtidos após digestão com MvaI. Os marcadores de peso molecular estão representados com a letra M. Fonte: autoria própria, 2025.

Ao analisar os resultados obtidos no sequenciamento de Sanger, notou-se que apenas 26% das sequências correspondiam aos insertos de VHHs. O restante das amostras apresentou elevada identidade com o genoma do fago selvagem VCSM13, em comparação com a sequência depositada no banco de dados do NCBI, conforme análise realizada pelo BLASTN (Figura 9). Diante desse achado, foram levantadas algumas hipóteses, sendo a principal a possibilidade de contaminação dos clones pelo fago VCSM13.

Para verificar se a hipótese de contaminação era válida, clones individuais da biblioteca foram cultivados em meio SB suplementado com canamicina e incubados sob agitação a 250 rpm e 37 °C *overnight*. Paralelamente, clones individuais também foram semeados em placa de LB ágar contendo Canamicina e incubados *overnight* a 37 °C. Caso houvesse contaminação por fagos VCSM13, seria esperado o crescimento das bactérias, uma vez que esses fagos conferem resistência à canamicina. No entanto, ambos os testes

demonstraram ausência de crescimento bacteriano, o que permitiu descartar a hipótese de contaminação por VCSM13.

VCSM13 interference-resistant helper phage, complete genome
Sequence ID: [AY598820.1](#) Length: **8669** Number of Matches: **1**

Range 1: 3828 to 4227 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
722 bits(800)	0.0	400/400(100%)	0/400(0%)	Plus/Minus
Query 1	ACCGCCTCCCTCAGAGCCgcccacctcagaaccgccacctcagagccaccacctcaga	60		
Sbjct 4227	ACCGCCTCCCTCAGAGCCGCCACCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACCTCAGA	4168		
Query 61	gcccaccagaaccaccaccagagccgcccagcATTGACAGGAGTTGAGGCAGGTC	120		
Sbjct 4167	GCCGCCACCAGAACCACCACCAGAGCCGCCAGCATTGACAGGAGTTGAGGCAGGTC	4108		
Query 121	AGACGATTGGCCTTGATATTCACAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGAATGGAAAGC	180		
Sbjct 4107	AGACGATTGGCCTTGATATTCACAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGAATGGAAAGC	4048		
Query 181	GCAGTCTCTGAATTTACCGTTCCAGTAAGCGTCATACATGGCTTTTGATGATACAGGAGT	240		
Sbjct 4047	GCAGTCTCTGAATTTACCGTTCCAGTAAGCGTCATACATGGCTTTTGATGATACAGGAGT	3988		
Query 241	GTACTGGTAATAAGTTTAAACGGGGTCAGTGCCTTGAGTAACAGTGCCCGTATAAACAGT	300		
Sbjct 3987	GTACTGGTAATAAGTTTAAACGGGGTCAGTGCCTTGAGTAACAGTGCCCGTATAAACAGT	3928		
Query 301	TAATGCCCCCTGCCTATTTTCGGAACCTATTATTCTGAAACATGAAAGTATTAAAGAGGCTG	360		
Sbjct 3927	TAATGCCCCCTGCCTATTTTCGGAACCTATTATTCTGAAACATGAAAGTATTAAAGAGGCTG	3868		
Query 361	AGACTCCTCAAGAGAAGGATTAGGATTAGCGGGGTTTTGC	400		
Sbjct 3867	AGACTCCTCAAGAGAAGGATTAGGATTAGCGGGGTTTTGC	3828		

Figura 9 – Alinhamento feito pelo BLASTN (NCBI) das sequências depositada no banco de dados do fago auxiliar VCSM13 e da obtida em um dos clones por sequenciamento. Fonte: autoria própria, 2025.

Considerando que a estrutura do vetor fagomídeo pCOMB3XSS inclui regiões derivadas de fagos filamentosos, como o VCSM13, a suspeita é de que tenha ocorrido um evento de recombinação, possivelmente associado a falhas no processo de clonagem, resultando na recircularização do vetor sem o inserto. Como o pComb3XSS é construído a partir de elementos do genoma do VCSM13 (Figura 10), é esperado que determinados trechos do vetor apresentem alinhamento com genomas de fagos. Além disso, a presença de sequências repetitivas ao longo do vetor pode favorecer eventos de recombinação e rearranjos indesejados (34).

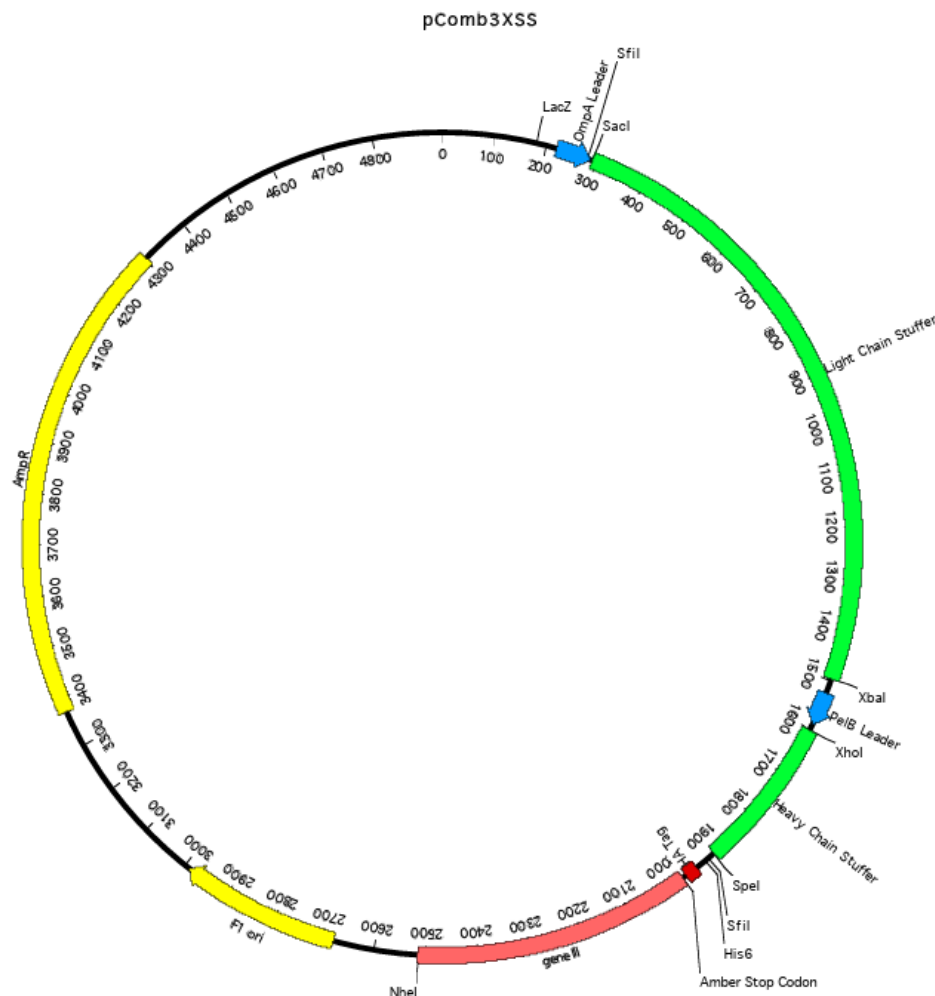


Figura 10 – Representação esquemática da estrutura do vetor fagomídeo pCOMB3XSS. Fonte: Barbas CF 3rd, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

No entanto, ao verificar as sequências obtidas dos VHHs (VHH1, VHH8, VHH10, VHH16, VHH17, VHH27, VHH29, VHH30, VHH33, VHH43 e VHH45), observou-se, por meio do alinhamento par a par das regiões dos genes dos CDR3s, que todas as sequências eram únicas, correspondendo a 100% de diversidade clonal (Figura 10).

Na figura 11, é possível observar a matriz de identidade par a par entre os clones de VHHs. Essa matriz permite avaliar o grau de similaridade entre as sequências de VHH obtidas na biblioteca construída. É possível observar que a maioria das comparações entre os VHHs resultou em percentuais de identidade variando entre 40% e 60%, indicando boa diversidade entre os clones selecionados. Algumas sequências, como VHH10 e VHH27, apresentaram identidade elevada (95,8%). Ainda assim, a presença predominante de

baixos valores de identidade entre os demais clones reforça a heterogeneidade clonal da biblioteca, característica desejável para aumentar as chances de seleção de anticorpos com diferentes especificidades e afinidades.

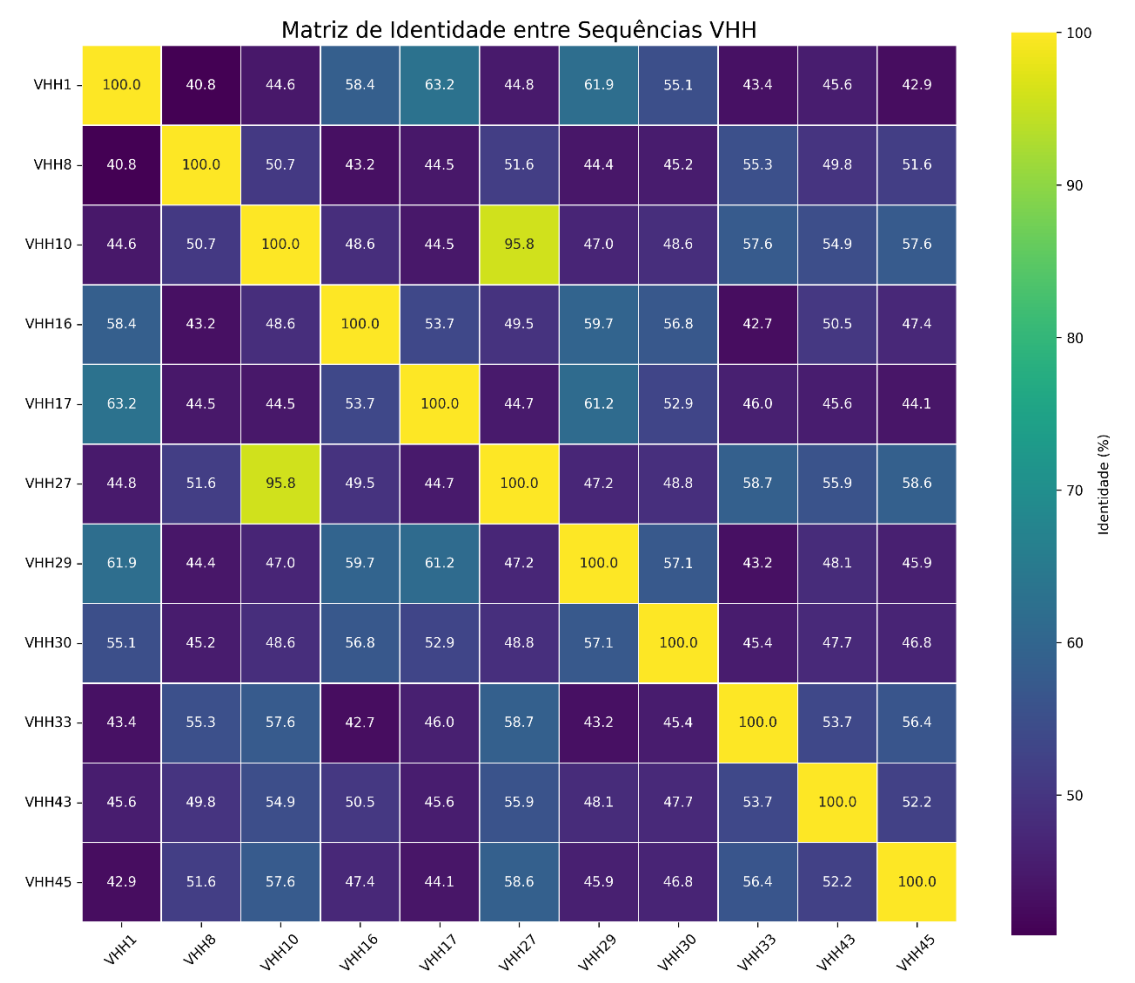


Figura 11 – Matriz de identidade do alinhamento par a par das regiões de CDR3 dos VHHs obtidos.
 Fonte: autoria própria, 2025.

As sequências foram traduzidas para aminoácidos e alinhadas para análise da diversidade entre os clones. A partir dos alinhamentos obtidos, também foi possível observar que os clones apresentaram 100% de diversidade (Figura 12 e 13). No entanto, análises bioinformáticas mais detalhadas ainda devem ser conduzidas para complementar a caracterização da diversidade e qualidade da biblioteca.

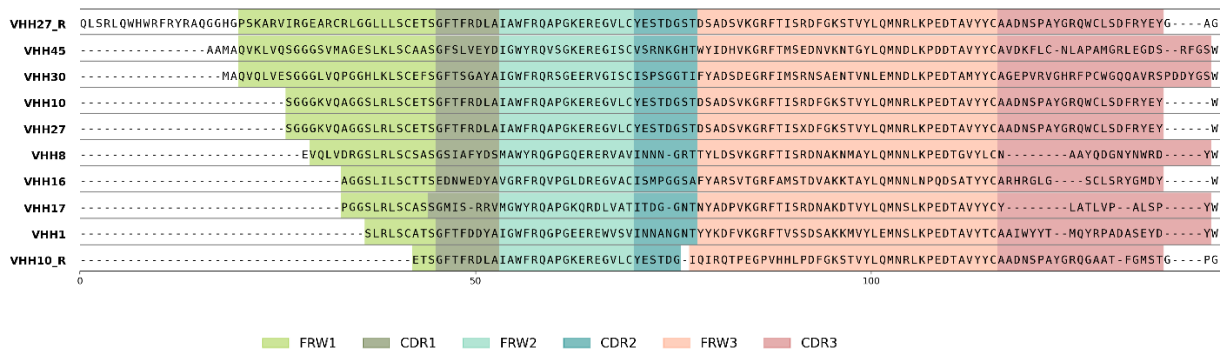


Figura 12 – Alinhamento das sequências peptídicas de VHH. Fonte: autoria própria, 2025.

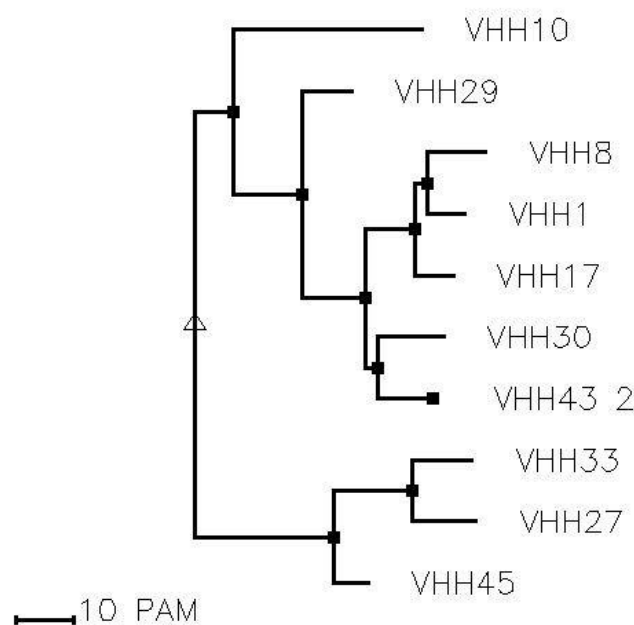


Figura 13 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos dos VHHs obtidos. Os ramos indicam a relação de similaridade entre os clones, evidenciando a diversidade entre as sequências analisadas. Fonte: autoria própria, 2025.

Outra análise relevante, é a fornecida pelo IMGT (*The International ImMunoGeneTics Information System*) (<https://www.imgt.org/3DstructureDB/cgi/DomainGapAlign.cgi#results>), que representa a estrutura predita de um dos domínios VHHs obtidos (VHH30). Essa estrutura está organizada de acordo com a topologia característica dos domínios das imunoglobulinas. Os resíduos estão dispostos em posições numeradas com destaque para as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), representadas pelas áreas com círculos coloridos (Figura 14). Os resíduos conservados, importantes para a estrutura e estabilidade do domínio variável, como as cisteínas formadoras de pontes de dissulfeto e os

aminoácidos hidrofóbicos, estão indicados por quadrados azuis. Além disso, destaca-se a presença do CDR3, com uma estrutura mais longa e variável entre as CDRs, característica marcante dos domínios VHH. Essa característica contribui significativamente para a capacidade desses anticorpos em reconhecer epítomos inacessíveis aos anticorpos convencionais, ampliando seu potencial de aplicação biotecnológica e terapêutica (14).

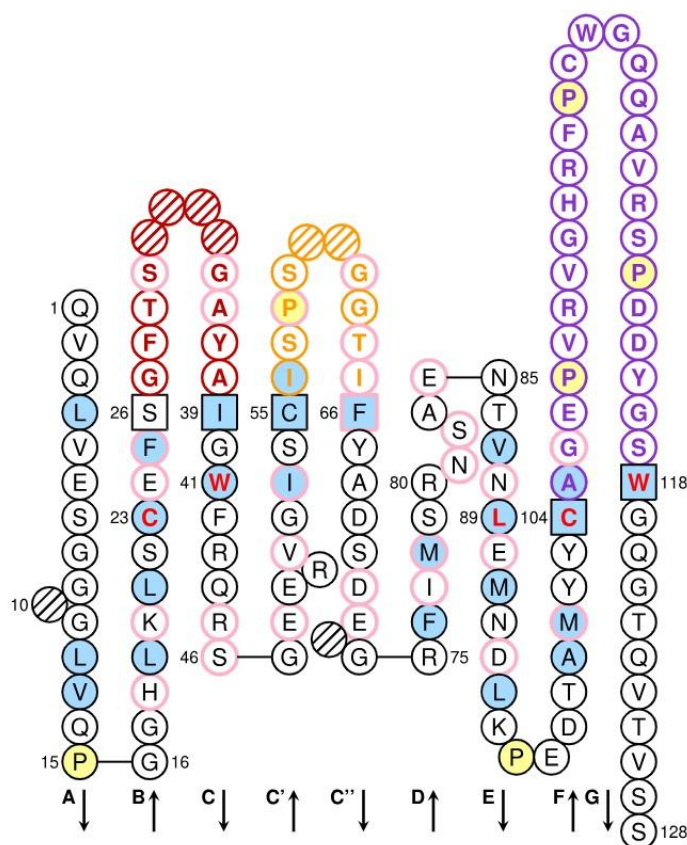


Figura 14 – Representação esquemática da estrutura predita do VHH30. Fonte: IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®. Collier de Perles tool [Internet]. Disponível em: <https://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/Collier-de-Perles.cgi>.

Dessa forma, para estimar o tamanho efetivo da biblioteca obtida, considerou-se o número total de transformantes, a taxa de inserção correta do gene de interesse e a diversidade clonal observada ($6,39.10^7 \times 26\% \times 100\%$), resultando em um tamanho estimado de $1,66.10^7$ clones (37).

Em vista da baixa taxa de inserção correta dos genes de VHHs, um novo processo de clonagem foi realizado para a posterior transformação e construção da biblioteca de VHHs exibidos por fagos. Para isso, algumas etapas foram otimizadas, como o uso de uma alíquota recém-purificada do vetor pCOMB3XSS obtida por Maxiprep, seguida de

uma nova digestão e consequente linearização com a enzima *SfiI*. O inserto também foi digerido com a mesma enzima de restrição.

As reações de ligação foram precipitadas com isopropanol, e o número de lavagens com etanol 70% foi aumentado, a fim de garantir maior pureza do pellet, que foi ressuspenso em água ultrapura livre de DNase (39). O processo de transformação por eletroporação foi conduzido inteiramente no gelo e no menor tempo possível.

As condições de cultivo e infecção foram mantidas conforme descrito no protocolo (30). Contudo, mesmo após as otimizações no processo de clonagem e transformação, o número total de transformantes obtidos foi de $2,82 \cdot 10^6$.

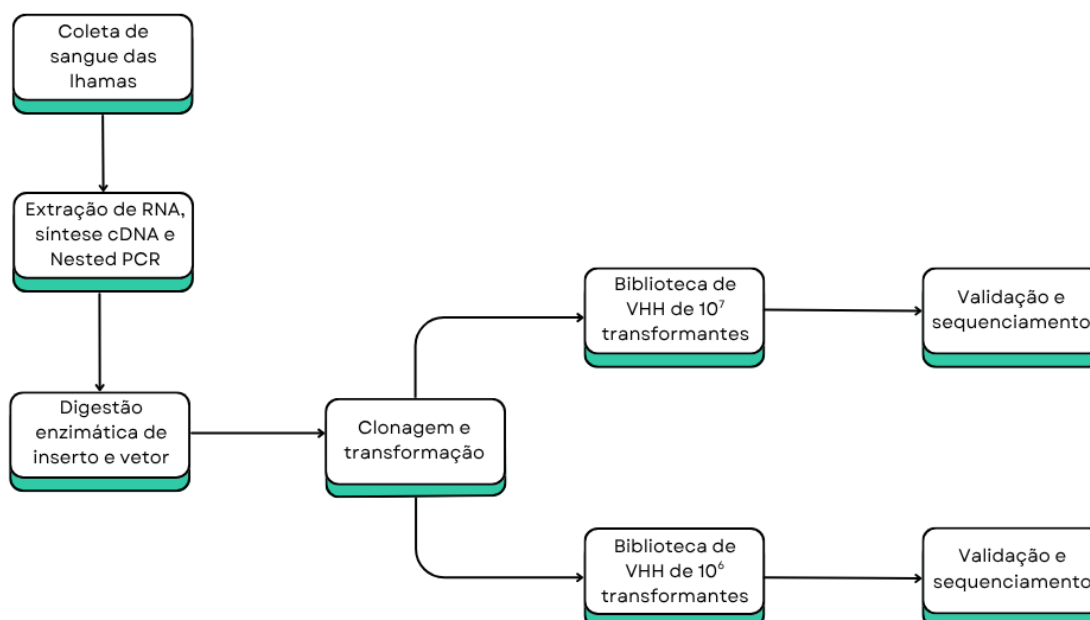


Figura 15 – Fluxograma das etapas realizadas para a construção das bibliotecas de VHHs. Fonte: da autora, 2025.

Estudos anteriores mostraram que, embora bibliotecas *naïve* idealmente alcancem tamanhos próximos a 10^{10} , para maximizar a diversidade e a chance de recuperação de ligantes de alta afinidade, essas bibliotecas com tamanhos aproximados de 10^7 clones já demonstraram ser capazes de gerar ligantes funcionais contra diversos antígenos (38,39).

No entanto, destaca-se que para bibliotecas amplas e altamente diversas, entre 10^9 a 10^{11} clones, seria necessária a coleta de maior volume de sangue, geralmente de mais de 10 animais, para assegurar a diversidade da biblioteca (23,40). Além disso, um maior número de animais pode reduzir o viés de processos alérgicos e processos infecciosos passados inerentes de cada animal (40). No presente estudo, a inviabilidade logística e

ética de coletar amostras de sangue de um número elevado de lhamas podem ter contribuído para a limitação da escala de construção da biblioteca. Ainda assim, o número de transformantes obtido é compatível com bibliotecas *naïves* descritas em estudos anteriores (38,39,41).

Por não terem passado pelo processo de maturação de afinidade *in vivo*, as bibliotecas *naïve* tendem a apresentar maior dificuldade na obtenção de ligantes com altas afinidades, quando comparadas às bibliotecas derivadas de animais imunizados. Isso reforça a importância de se construir bibliotecas grandes e altamente diversas, a fim de aumentar as chances de recuperação de clones com características desejáveis (23,31).

Nesse sentido, enquanto bibliotecas imunes costumam ter tamanhos estimados entre 10^6 e 10^8 clones independentes, o que é considerado adequado para a seleção de anticorpos de alta afinidade para o alvo imunizante, as bibliotecas *naïve* demandam tamanhos significativamente maiores, geralmente na faixa de 10^9 a 10^{11} clones (34,42). Esse aumento compensatório no tamanho busca superar a ausência de maturação de afinidade, ampliando a diversidade de sequências e, conseqüentemente, a probabilidade de se encontrar ligantes específicos e funcionais (42).

Apesar dessa limitação, diversos trabalhos têm relatado a utilidade de bibliotecas *naïve* na seleção de nanocorpos específicos contra diferentes antígenos, com afinidades na faixa nanomolar. Isso pode ocorrer desde que estratégias de enriquecimento adequadas sejam empregadas (26,27,43,44). Posteriormente, outras estratégias ainda podem ser realizadas para aprimorar as características dos nanocorpos, como construções de dímeros ou trímeros de VHHs, sua conjugação com a porção Fc de IgG humana, entre outras (31,43).

No entanto, a baixa taxa de inserção correta dos genes de VHHs sugere que o principal fator limitante esteja associado a falhas durante o processo de clonagem, uma etapa crítica na construção de bibliotecas, mas frequentemente sujeita a dificuldades técnicas (45–47). Dessa forma, é bastante provável que as falhas observadas estejam associadas a problemas conformacionais decorrentes das modificações introduzidas nos *primers* para a inserção dos sítios de reconhecimento da enzima *SfiI*, bem como à ineficiência no processo de digestão enzimática. Esses fatores podem ter favorecido a recircularização do vetor, resultando em viés de amplificação de clones bacterianos desprovidos do inserto.

Nesse cenário, há perspectivas futuras para o aprimoramento do processo de construção de bibliotecas de VHHs exibidos em fagos, através da técnica de *phage display*, em vista da grande relevância e o elevado potencial de aplicação dos nanocorpos. Entre essas melhorias, destaca-se a otimização da etapa de clonagem, com a substituição dos *primers* por sequências já consolidadas na literatura, que incorporam, de forma eficaz, os sítios de reconhecimento da enzima *SfiI* em suas extremidades (48–50).

Adicionalmente, considerando algumas limitações do vetor utilizado, como a elevada taxa de recombinação, a presença do fragmento *stuffer*, cuja remoção requer etapas adicionais de purificação, implicando em perdas do vetor linearizado, além de problemas recorrentes de recircularização devido à separação ineficiente dos fragmentos, e às dificuldades associadas ao uso da enzima *SfiI*, avalia-se a possibilidade de substituição do pCOMB3XSS (34,45). Uma alternativa promissora seriam os vetores da família pHEN, que, além de não possuírem o *stuffer* e, portanto, evitarem complicações relacionadas à sua remoção, também permitem a expressão de nanocorpos em cepas bacterianas não supressoras (51–53).

Como a construção de bibliotecas por *phage display* é um processo complexo e não trivial, qualquer estratégia que possibilite o encurtamento de etapas ou facilite procedimentos técnicos representa um avanço significativo e é de extrema relevância para otimizar tempo, recursos e eficiência. Assim, outra alternativa viável seria adotar a estratégia de clonagem por Golden Gate, um método mais ágil e rápido que dispensa etapas convencionais com enzimas de restrição, apresenta maior eficiência na inserção do inserto e, em determinadas situações, pode ser mais econômico (54,55).

5. Conclusões

A construção de uma biblioteca de VHHs exibidos por fagos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas, diagnósticas e terapêuticas. No entanto, os resultados obtidos neste estudo evidenciam as diversas complexidades envolvidas nesse processo, especialmente no que se refere à etapa de clonagem. A baixa taxa de inserção correta dos genes de VHHs, aliada à ocorrência de recombinação indesejada e ao viés de amplificação de clones sem inserto, destacou a criticidade dos processos de ligação e clonagem, como também o uso de vetores como o pCOMB3XSS.

Embora a biblioteca construída tenha alcançado um número de transformantes compatível com bibliotecas *naïve* descritas na literatura, os dados indicam a necessidade de melhorias no protocolo utilizado. A substituição dos *primers* por sequências previamente validadas, a reconsideração do uso da enzima *SfiI*, bem como a adoção de métodos alternativos de clonagem são caminhos promissores.

Como o objetivo deste trabalho foi iniciar uma padronização das metodologias para a implementação da construção de bibliotecas de VHHs no laboratório, os resultados obtidos representam um avanço significativo. A biblioteca gerada, apesar das dificuldades técnicas, apresenta um número de transformantes adequado para uma biblioteca *naïve* inicial, especialmente em um contexto de prova de conceito. Para aplicações futuras, embora dificuldades técnicas tenham sido observadas, o número de transformantes obtido foi compatível com bibliotecas imunes descritas na literatura, cujos tamanhos típicos variam entre 10^6 e 10^8 .

Portanto, este trabalho reforça a importância de uma análise crítica e contínua das ferramentas utilizadas na construção de bibliotecas por *phage display*, evidenciando que a otimização de cada etapa é essencial para garantir sua eficiência e qualidade. Tais avanços são fundamentais para que o potencial biotecnológico dos nanocorpos possa ser plenamente explorado em futuras aplicações.

6. Referências

1. Salvador JP, Vilaplana L, Marco MP. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem*. 2019 Mar 8;411(9):1703–13.
2. Abul K. Abbas AHLSP. *Cellular and Molecular Immunology*. 10th ed. 2021.
3. Kulkarni SS, Falzarano D. Unique aspects of adaptive immunity in camelids and their applications. *Mol Immunol*. 2021 Jun;134:102–8.
4. Asmani AZA, Zainuddin AFF, Azmi Murad NA, Mohd Darwis NH, Suhaimi NS, Zaini E, et al. Immunogenicity of monoclonal antibody: Causes, consequences, and control strategies. *Pathol Res Pract*. 2024 Nov;263:155627.
5. Pandey D, Shivarkar A. Monoclonal Antibodies Market Size, Share, and Trends 2025 to 2034. USA; 2024 Jun.
6. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct 3;9(10):767–74.
7. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JARG, Hamers R. Sequence and structure of V_H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. "Protein Engineering, Design and Selection." 1994;7(9):1129–35.

8. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 Jun;363(6428):446–8.
9. Minatel VM, Prudencio CR, Barraviera B, Ferreira RS. Nanobodies: a promising approach to treatment of viral diseases. *Front Immunol*. 2024 Jan 23;14.
10. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 Jun;363(6428):446–8.
11. White B, Huh I, Brooks CL. Structure of a VHH isolated from a naïve phage display library. *BMC Res Notes*. 2019 Dec 19;12(1):154.
12. Maeda R, Fujita J, Konishi Y, Kazuma Y, Yamazaki H, Anzai I, et al. A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. *Commun Biol*. 2022 Jul 6;5(1):669.
13. He L, Wu Q, Zhang Z, Chen L, Yu K, Li L, et al. Development of Broad-Spectrum Nanobodies for the Therapy and Diagnosis of SARS-CoV-2 and Its Multiple Variants. *Mol Pharm*. 2024 Aug 5;21(8):3866–79.
14. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid Single-Domain Antibodies: Promises and Challenges as Lifesaving Treatments. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 30;23(9):5009.
15. Papp KA, Weinberg MA, Morris A, Reich K. IL17A/F nanobody sonelokimab in patients with plaque psoriasis: a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2b study. *The Lancet*. 2021 Apr;397(10284):1564–75.
16. Dale A. Another One Gets Snapped Up: Ablynx has been Acquired by Sanofi for €3.9B. 2018 Jan 29;
17. Sargentini-Maier ML, De Decker P, Tersteeg C, Canvin J, Callewaert F, De Winter H. Clinical pharmacology of caplacizumab for the treatment of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019 Jun 3;12(6):537–45.
18. Tanaka Y. Ozoralizumab: first Nanobody® therapeutic for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*. 2023 Jul 3;23(7):579–87.
19. Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, McCafferty J, Laustsen AH. Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins (Basel)*. 2018 Jun 9;10(6):236.
20. Muyldermans S. A guide to: generation and design of nanobodies. *FEBS J*. 2021 Apr 28;288(7):2084–102.
21. Pacheco SSM. Phage display: Fundamentals and applications . In: Gómez I, editor. *Tools to Understand Protein-Protein Interactions*. 2012. p. 143–61.
22. Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Vashisth M, Bardajaty P, et al. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Curr Microbiol*. 2021 Apr 9;78(4):1124–34.
23. Almagro JC, Pedraza-Escalona M, Arrieta HI, Pérez-Tapia SM. Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies*. 2019 Aug 23;8(3):44.
24. Wu D, Cong J, Wei J, Hu J, Sun W, Ran W, et al. A Naïve Phage Display Library-Derived Nanobody Neutralizes SARS-CoV-2 and Three Variants of Concern. *Int J Nanomedicine*. 2023 Oct;Volume 18:5781–95.

25. Lakzaei M, Rasaee MJ, Fazaeli AA, Aminian M. A comparison of three strategies for biopanning of phage-scFv library against diphtheria toxin. *J Cell Physiol.* 2019 Jun 11;234(6):9486–94.
26. McConnell SJ, Dinh T, Le MH, Spinella DG. Biopanning Phage Display Libraries Using Magnetic Beads Vs. Polystyrene Plates. *Biotechniques.* 1999 Feb 22;26(2):208–14.
27. Bakhshinejad B, Zade HM, Shekarabi HSZ, Neman S. Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. *Amino Acids.* 2016 Dec 20;48(12):2699–716.
28. Giordano RJ, Cardó-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1249–53.
29. André AS, Moutinho I, Dias JNR, Aires-da-Silva F. In vivo Phage Display: A promising selection strategy for the improvement of antibody targeting and drug delivery properties. *Front Microbiol.* 2022 Sep 26;13.
30. Sheykhasan M, Ahmadih-Yazdi A, Vicidomini R, Poondla N, Tanzadehpanah H, Dirbaziyan A, et al. CAR T therapies in multiple myeloma: unleashing the future. *Cancer Gene Ther.* 2024 May 4;31(5):667–86.
31. Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc.* 2014 Mar 27;9(3):674–93.
32. Xiong L, Zhang X, Xu Y, Li Y, Liu D, Tu Z, et al. Anti-idiotypic VHH mediated environmentally friendly immunoassay for citrinin without mycotoxin. *Food Agric Immunol.* 2020 Jan 1;31(1):968–84.
33. Pardon E, Laeremans T, Triest S, Rasmussen SGF, Wohlkönig A, Ruf A, et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc.* 2014 Mar 27;9(3):674–93.
34. Carlos F. Barbas III; Dennis R. Burton; Jamie K. Scott ; Gregg J. Silverman,. *Phage Display: A Laboratory Manual.* 2001.
35. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990 Jan;96(1):23–8.
36. Green MR, Sambrook J. Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020 Jun 1;2020(6):pdb.prot101220.
37. Shen Y, Yang X, Dong N, Xie X, Bai X, Shi Y. Generation and selection of immunized Fab phage display library against human B cell lymphoma. *Cell Res.* 2007 Jul 10;17(7):650–60.
38. Sabir JSM, Atef A, El-Domyati FM, Edris S, Hajrah N, Alzohairy AM, et al. Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. *C R Biol.* 2014 Mar 20;337(4):244–9.
39. Liu JL, Anderson GP, Delehanty JB, Baumann R, Hayhurst A, Goldman ER. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(7):1775–83.
40. Wang M, Wei L, Xiang H, Ren B, Liu X, Jiang L, et al. A megadiverse naïve library derived from numerous camelids for efficient and rapid development of VHH antibodies. *Anal Biochem.* 2022 Nov;657:114871.
41. Gene RW, Kumaran J, Aroche C, van Faassen H, Hall JC, MacKenzie CR, et al. High affinity anti-Internalin B VHH antibody fragments isolated from naturally and artificially immunized repertoires. *J Immunol Methods.* 2015 Jan;416:29–39.

42. Hentrich C, Ylera F, Frisch C, Ten Haaf A, Knappik A. Monoclonal Antibody Generation by Phage Display. In: Handbook of Immunoassay Technologies. Elsevier; 2018. p. 47–80.
43. Wang Y, Fan Z, Shao L, Kong X, Hou X, Tian D, et al. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J Nanomedicine*. 2016 Jul;Volume 11:3287–303.
44. Li Q, Zhang F, Lu Y, Hu H, Wang J, Guo C, et al. Highly potent multivalent VHH antibodies against Chikungunya isolated from an alpaca naïve phage display library. *J Nanobiotechnology*. 2022 Dec 14;20(1):231.
45. Matsumura I. Why Johnny Can't clone: Common Pitfalls and Not So Common Solutions. *Biotechniques*. 2015 Sep 3;59(3).
46. Makvandi-Nejad S, Fjällman T, Arbabi-Ghahroudi M, MacKenzie CR, Hall JC. Selection and expression of recombinant single domain antibodies from a hyper-immunized library against the hapten azoxystrobin. *J Immunol Methods*. 2011 Oct;373(1–2):8–18.
47. Aripov VS, Volkova N V., Ilyichev AA, Shcherbakov DN. Problems of creating antibody phage libraries and their solutions. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024 Apr 11;28(2):249–57.
48. Gavira-O'Neill CE, Dong J, Trimmer JS. Development, Screening, and Validation of Camelid-Derived Nanobodies for Neuroscience Research. *Curr Protoc Neurosci*. 2020 Dec 13;94(1).
49. Zeng Y, Hu Y, Chen G, Feng Q, Wang R, Zhang Z, et al. Development of an Anti-Zearalenone Nanobody Phage Display Library and Preparation of Specific Nanobodies. *Curr Issues Mol Biol*. 2025 Feb 27;47(3):157.
50. Delfin-Riela T, Rossotti M, Alvez-Rosado R, Leizagoyen C, González-Sapienza G. Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody ELISA. *Biomolecules*. 2020 Dec 9;10(12):1652.
51. Rossey I, Hsieh CL, Sedeyn K, Ballegeer M, Schepens B, McLellan JS, et al. A Vulnerable, Membrane-Proximal Site in Human Respiratory Syncytial Virus F Revealed by a Prefusion-Specific Single-Domain Antibody. *J Virol*. 2021 May 10;95(11).
52. Gransagne M, Aymé G, Brier S, Chauveau-Le Friec G, Meriaux V, Nowakowski M, et al. Development of a highly specific and sensitive VHH-based sandwich immunoassay for the detection of the SARS-CoV-2 nucleoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 2022 Jan;298(1):101290.
53. Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *EMBO J*. 2021 Oct 9;40(19).
54. Bauer C, Ciesielski E, Pekar L, Krah S, Toleikis L, Zielonka S, et al. Facile One-Step Generation of Camelid VHH and Avian scFv Libraries for Phage Display by Golden Gate Cloning. In 2023. p. 47–60.
55. Romão E, Poignavent V, Vincke C, Ritzenthaler C, Muyldermans S, Monsion B. Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries. In 2018. p. 169–87.