



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS**

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

**EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO
MONOCLONAL RITUXIMABE: CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA PARA
SELEÇÃO DE MOLÉCULAS ANTI-CD20 COM ALTA AFINIDADE VIA PHAGE
DISPLAY**

FORTALEZA

2019

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL
RITUXIMABE: CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA PARA SELEÇÃO DE
MOLÉCULAS ANTI-CD20 COM ALTA AFINIDADE VIA PHAGE DISPLAY

Relatório de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Co-orientadora: Profa. Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B469e Bezerra, Marcus Rafael Lobo.
Evolução dirigida da região variável do anticorpo monoclonal Rituximabe : construção de uma biblioteca para seleção de moléculas anti-CD20 com alta afinidade via phage display / Marcus Rafael Lobo Bezerra. – 2019.
62 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.
Coorientação: Profa. Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca.
1. Evolução dirigida. 2. Phage display. 3. Fragmentos de anticorpos. I. Título.

CDD 660.6

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL
RITUXIMABE: CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA PARA SELEÇÃO DE
MOLÉCULAS ANTI-CD20 COM ALTA AFINIDADE VIA PHAGE DISPLAY

Relatório de dissertação apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
de Recursos Naturais da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia. Área de
concentração: Biotecnologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-CE)

Dr. Marcos Roberto Lourenzoni
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-CE)

Prof. Dr. Kaio César Simiano Tavares
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

À sociedade.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À FIOCRUZ, pelo apoio financeiro e formação via seus funcionários.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela excelente orientação e motivação.

À Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca, pelas contribuições durante a execução dos experimentos e pela co-orientação.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação acadêmica.

À Universidade de Fortaleza, em especial ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento e Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, pela infraestrutura cedida na realização dos experimentos e pela sólida parceria, a qual desejo que renda resultados que ajudem aos que precisarem.

À Andrea Maranhão, pelas boas sugestões aos projetos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ-PE, em especial às pesquisadoras Cássia Docena e Viviane Carvalho, pela excelente colaboração, imprescindível para a obtenção de importantes etapas deste trabalho.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho e na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

Atribuído a São Francisco de Assis

RESUMO

Rituximabe é um anticorpo monoclonal terapêutico usado no tratamento de doenças em que a depleção de células B pode ser benéfica, como linfoma não-Hodgkin e artrite reumatoide. É um biofármaco que, atualmente, o Sistema Único de Saúde precisa importar, já que não há produção nacional deste anticorpo. Os mecanismos de ação do Rituximabe estão intrinsicamente ligados a sua capacidade de interagir com o antígeno CD20, uma proteína de membrana presente em células B maduras. Portanto, estratégias de engenharia de proteínas, como evolução dirigida, podem ser usadas visando alterar a região de ligação ao antígeno deste anticorpo e aumentar sua afinidade. Fragmentos como scFv (single-chain fragment variable) podem ser usados, já que são moléculas pequenas e menos complexas, mas retêm os aminoácidos que compõem a porção variável dos anticorpos. Neste trabalho, uma biblioteca do gene scFv do Rituximabe foi construída, com o objetivo de maturar a afinidade deste anticorpo ao antígeno CD20. A variabilidade da biblioteca foi obtida através de error-prone PCR (epPCR), em que os componentes da PCR são alterados de forma a inserir mutações aleatoriamente na sequência de DNA. As sequências aleatoriamente mutadas foram clonadas em vetor pHEN2, transformadas em *E. coli* para construir a biblioteca de scFv e apresentadas na superfície de fagos após coinfeção com fago auxiliar (VCSM13). As partículas virais expressando scFv na superfície foram submetidas a etapas de seleção, baseadas na interação dos mutantes com um peptídeo sintético, correspondente ao epítipo do anticorpo nativo. A biblioteca construída, de $1,4 \times 10^5$ variantes, foi analisada por sequenciamento de DNA. A biblioteca mostrou uma taxa de mutação na sequência de DNA de 726 pb de 0,56% ($\pm 0,24$) e taxa de mutação de 1,07% ($\pm 0,76$) a nível de proteínas (242 aa). A seleção foi feita contra a alça extracelular maior do CD20 (peptídeo sintético biotilado). Duas etapas de seleção foram executadas com condições crescentes de adstringência (lavagens sucessivas para remover fagos de baixa ou nenhuma interação). Os fagos resultantes foram submetidos a PCR com *primers* específicos ao scFv e foram analisados por sequenciamento. É esperado que mutações pontuais observadas possam exercer um papel fundamental na maturação da afinidade. Se o efeito dessas mutações forem confirmados, é possível melhorar o efeito terapêutico do Rituximabe e esses mutantes podem ser explorados como biofármacos em diferentes formatos, como moléculas bispecíficas e receptores quiméricos de antígeno (CAR).

Palavras-chave: Evolução dirigida. *Phage display*. Fragmentos de anticorpos.

ABSTRACT

Rituximab is a therapeutic monoclonal antibody used in the treatment of diseases in which the depletion of B cells might be beneficial, such as Non-Hodgkin Lymphoma and rheumatoid arthritis. It is a biopharmaceutical that, currently, the Brazilian's public health system needs to import, since there is no national production of this antibody. The mechanisms of action of Rituximab are intrinsically linked to its capacity to interact with CD20 antigen, a membrane protein present on the surface of mature B cells. Therefore, protein engineering strategies, such as directed evolution, may be used towards altering the antigen binding region of this antibody, improving its affinity. Fragments such as scFv (single-chain fragment variable) can be used because they are small and less complex molecules, but retain the amino acids that comprise the variable portion of antibodies. In this work, a library of Rituximab's scFv gene was constructed, aiming to mature the affinity of this antibody to the CD20 antigen. The variability of the library was obtained through error-prone PCR (epPCR), in which the components of the standard PCR are altered in order to insert random mutations in the DNA sequence. The sequences randomly mutated were cloned into pHEN2 vector, transformed into *E. coli* to construct the scFv and presented on the phage surface after coinfection with helper phage (VCSM13). The viral particles expressing scFv on the surface were submitted to rounds of selections, based on the interaction of the mutants to a synthetic peptide, corresponding to the native antibody's epitope. The library has a size of 1.4×10^5 clones and was analyzed by DNA sequencing. The library showed a mutation rate in the DNA sequence of 726 bp of 0.56% (± 0.24) and a mutation rate of 1.07% (± 0.76) at protein level (242 aa). The selection was performed against the largest extracellular loop of CD20 (biotinylated synthetic peptide). Two rounds of selection were executed in crescent astringent conditions (successive washes to remove low- and non-binding phages). The resulting phages were submitted to PCR with scFv-specific primers and were analyzed by sequencing. It is expected that the observed point mutations might exert an important role on affinity maturation. If these effects are confirmed, it is possible to increase the therapeutic effect of Rituximab, and these mutants might be exploited as biopharmaceuticals in different formats, such as bispecific molecules and chimeric antigen receptors (CAR).

Keywords: Directed Evolution. Phage Display. Antibody fragments

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Evolução da quantidade de moléculas terapêuticas aprovadas por ano pelo FDA.....	18
Figura 2 -	Visão geral dos principais mecanismos efetores das imunoglobulinas do tipo IgG (anticorpos) pelo sistema imune de vertebrados.....	21
Figura 3 -	Representação estrutural de uma imunoglobulina IgG.....	22
Figura 4 -	Evolução do uso de anticorpos monoclonais terapêuticos.....	23
Figura 5 -	Representação estrutural quimérica do Rituximabe.....	24
Figura 6 -	Representação da proteína CD20 em célula B.....	25
Figura 7 -	Esquema dos principais mecanismos de ação do Rituximabe.....	26
Figura 8 -	Representação dos fragmentos de anticorpos mais frequentemente utilizados em engenharia de anticorpos.....	27
Figura 9 -	Representação da <i>epPCR</i>	29
Figura 10 -	Representação esquemática da técnica de <i>phage display</i>	30
Figura 11 -	Anticorpos anti-CD20 do tipo I e tipo II.....	31
Figura 12 -	Mapa do vetor de clonagem obtido comercialmente da empresa Genone, contendo o gene <i>scFv</i>	33
Figura 13 -	Fluxograma da metodologia utilizada para clonar o gene <i>scFv</i> em vetor pHEN2.....	35
Figura 14 -	Mapa do vetor pHEN2.....	37
Figura 15 -	Géis de agarose (1%) com amostras de <i>PCR</i> de colônia e teste de digestão.....	42
Figura 16 -	Foto de gel de eletroforese contendo duplicata de <i>epPCR</i>	43
Figura 17 -	Colônias da biblioteca <i>scFv</i>	44
Figura 18 -	Foto do gel de agarose de <i>PCR</i> de colônias da biblioteca construída.....	45
Figura 19 -	Análise das mutações na sequência de DNA do gene <i>scFv</i>	48
Figura 20 -	Transições e transversões.....	49
Figura 21 -	Resumo da análise das mutações em sequências <i>scFv</i>	49
Figura 22 -	Frequência, em números absolutos, de substituições.....	50
Figura 23 -	Frequência, em números absolutos de nucleotídeos substituídos.....	50
Figura 24 -	Análise das mutações na estrutura primária do <i>scFv</i>	51
Figura 25 -	Gel de eletroforese da <i>PCR</i> com fagos- <i>scFv</i>	53

Figura 26 - Géis de *PCR* de colônias pGEM-scFv..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação da correspondência de cada fago utilizado para amplificação do gene scFv.....	41
Tabela 2 - Dados do peptídeo sintético utilizado para <i>biopanning</i>	46
Tabela 3 - Títulos de <i>input</i> e <i>output</i> de cada rodada contra peptídeo sintético.....	47
Tabela 4 - Frequência de mutações por sequência.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	Food and Drug Administration
epPCR	<i>Error-prone Polymerase Chain Reaction</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
WHO	<i>World Health Administration</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mAb	Anticorpos monoclonais terapêuticos
Ig	Imunoglobulina
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
LB	Luria-Bertani
DO	Densidade ótica
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
MPBS	<i>Milk Phosphate Buffered Saline</i>
dATP,	<i>Deoxiadenosina trifosfato</i>
dGTP,	<i>Deoxiguanosina trifosfato</i>
dTTP,	<i>Deoxitimidina trifosfato</i>
dCTP	<i>Deoxicitosina trifosfato</i>
SOB	<i>Super optimum broth</i>
SOC	<i>Super optimum broth with catabolite repression</i>
CDR	<i>Complementarity-determining region</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
M	Molar
μL	Microlitro
Da	Dalton
US\$	Dólar
g	Gramma
L	Litro
®	Marca Registrada
mL	Mililitro
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
K_{on}	Constante de associação
$K_{\text{d}}/K_{\text{off}}$	Constante de dissociação
MnCl_2	Cloreto de manganês
MgCl_2	Cloreto de magnésio
HCl	Ácido clorídrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Uso de biofármacos no tratamento do câncer.....	17
1.2	Estrutura e função de anticorpos monoclonais terapêuticos.....	19
1.3	Terapias baseadas em anticorpos.....	22
1.4	O alvo terapêutico CD20 e o Linfoma Não-Hodgkin.....	24
1.5	Engenharia de anticorpos como aliada em terapias contra o câncer.....	27
1.6	Evolução dirigida e seleção por <i>phage display</i> : aprimoramento da terapia de LNH utilizando fragmentos scFv.....	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral.....	32
2.2	Objetivos específicos.....	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Amplificação do gene scFv por epPCR.....	33
3.2	Clonagem da biblioteca epPCR scFv em vetor para <i>phage display</i>	36
3.3	Produção de fagos scFv-pIII.....	37
3.4	Seleção de fagos por <i>biopanning</i>	38
3.5	Sequenciamento de DNA de variantes scFv.....	40
3.6	Identificação de sequências scFv após <i>biopanning</i>	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Amplificação do gene scFv por epPCR.....	42
4.2	Clonagem da biblioteca epPCR scFv em vetor para <i>phage display</i>	43
4.3	Produção de fagos scFv-pIII.....	45
4.4	Seleção de fagos por <i>biopanning</i>	46
4.5	Sequenciamento de DNA da biblioteca construída.....	47
4.6	Sequenciamento de DNA das variantes scFv.....	52
4.7	Contribuição de mutações pontuais para a afinidade do scFv ao peptídeo loop-CD20.....	55
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A – REAÇÕES ENZIMÁTICAS	63
	APÊNDICE B – PROTOCOLO MODIFICADO DE PURIFICAÇÃO	

1 INTRODUÇÃO

Doenças complexas como o câncer são tratadas utilizando diferentes estratégias baseadas em medicamentos biológicos ou biofármacos. Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para obter novas moléculas com potencial anticâncer tem crescido anualmente.

1.1 Uso de biofármacos no tratamento do câncer

Nas últimas décadas, apesar de vários avanços em termos de vigilância, integração de dados epidemiológicos que direcionam estratégias de saúde pública e tecnologias para o tratamento contra o câncer (cirurgias, radioterapias, terapias endócrinas e quimioterapias), o câncer ainda tem impacto relevante na saúde pública e na taxa de mortes. Em países desenvolvidos, este grupo de doenças está entre as principais causas de óbitos, diferente de países mais pobres, em que doenças infecciosas são mais expressivas (WHO, 2018). No Brasil, neoplasias são a segunda maior causa de morte entre crianças, adolescentes e jovens adultos (INCA, 2017), causando impacto negativo para o sistema público de saúde.

O INCA estima, para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer por ano (INCA, 2017). Dessa forma, o mapeamento eficiente de estratégias para a prevenção, diagnóstico e tratamento destas malignidades deve ser prioridade na pauta de discussão de soluções para a saúde pública brasileira. Apenas com assistência oncológica, em 2015, o Brasil gastou cerca de R\$ 3,5 bilhões. Mundialmente, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de óbitos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. Só em 2030, estima-se que a carga global será de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de óbitos (WHO, 2018).

Os biofármacos, medicamentos biológicos ou produtos biológicos são explorados para o tratamento de doenças complexas, como os cânceres. Segundo a ANVISA, produtos biológicos são medicamentos que contém uma molécula com atividade biológica conhecida, registrado, e que podem ser classificados em (ANVISA, 2010):

- I – vacinas;
- II – soros hiperimunes;
- III – hemoderivados;
- IV – biomedicamentos classificados em:

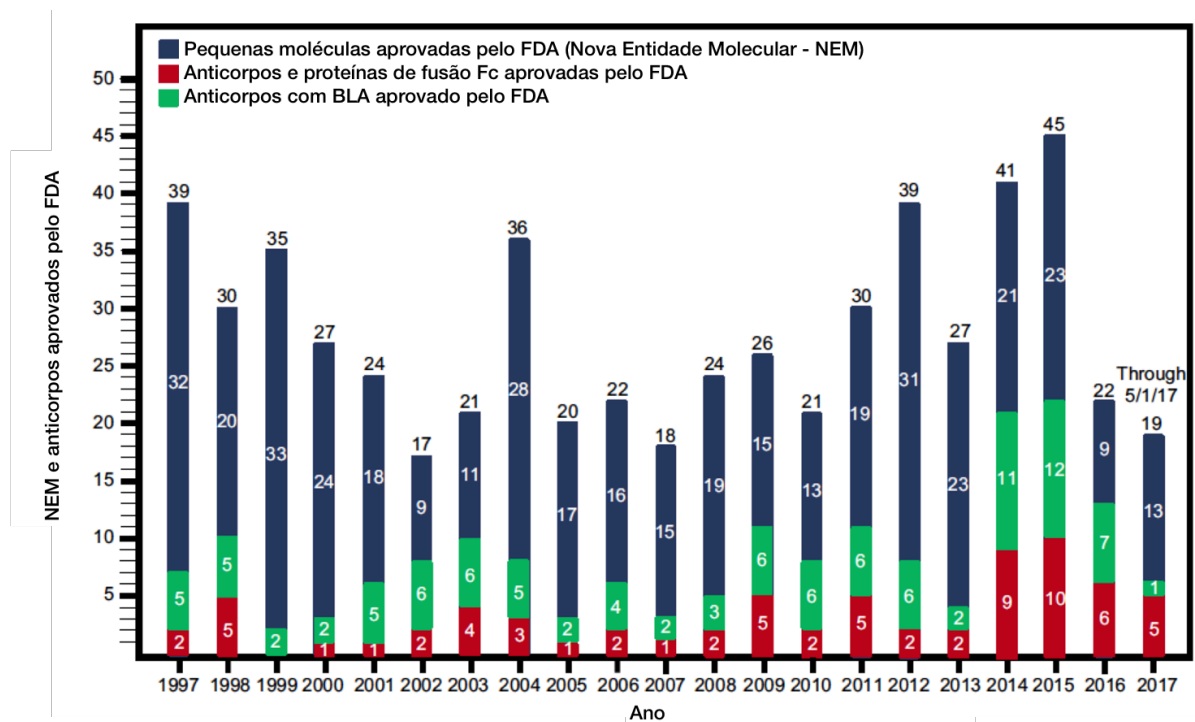
- a) medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou tecidos de origem animal; e
- b) medicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos.

V – anticorpos monoclonais;

VI – medicamentos contendo microorganismos vivos, atenuados ou mortos.

Desde 1986, quando o primeiro anticorpo monoclonal (muronomabe) foi aprovado, até maio de 2017, cerca de 74 produtos baseados em mAbs foram aprovados para comercialização por órgãos dos Estados Unidos da América, Japão ou União Europeia (anticorpos conjugados, anticorpos biespecíficos, Fab, Fc conjugados com proteínas e moléculas bioequivalentes) e 11 foram retirados do mercado por razões variadas. Esta aprovação é crescente a cada ano, como pode ser deduzido a partir da Figura 1. O número de moléculas em desenvolvimento também é maior em comparação com décadas passadas, especialmente quando se observa o alto número de moléculas em estágio clínico, que chega a 719 globalmente (STROHL, 2018) graças a validação de novos alvos, otimização da estrutura das moléculas, associação com toxinas e o uso da bioinformática.

Figura 1 – Evolução da quantidade de moléculas terapêuticas aprovadas por ano pelo FDA



Fonte: STROHL, 2018. O número de medicamentos biológicos ainda é inferior ao de moléculas sintéticas. A quantidade de anticorpos monoclonais e seus derivados é anualmente crescente e tendem ser a maior porção do total de medicamentos biológicos aprovados.

Os mAbs têm sido aplicados em combinação com outros fármacos e são importantes aliados no combate a neoplasias, o que justifica sua expressiva contribuição para um crescente mercado de biofármacos. Apenas com mAbs, estima-se uma movimentação de US\$ 125 bilhões em 2020, caso a taxa de crescimento de vendas seja mantida (BPTC, 2014).

Outro fator que torna os medicamentos biológicos atrativos do ponto de vista econômico é a menor taxa de falhas durante o processo de desenvolvimento de fármacos. Comparado com moléculas pequenas (sintéticas), que possuem taxa de aprovação para fase clínica de 13%, os biofármacos (incluindo os mAbs) têm taxa de aprovação de 32%, de acordo com um estudo que analisou 4000 fármacos de 50 empresas diferentes, por uma década (DIMASI et al., 2010).

No Brasil, os biofármacos também têm impacto muito expressivo na economia. De acordo com o Conselho Federal de Farmácia (CAMBRICOLLI, 2015), R\$ 12,9 bilhões foram destinados a compra de medicamentos pelo SUS em 2014 representando 13,9% do orçamento total para todo o custeio do SUS. Desse total, cerca de R\$ 5,5bi (43%) foram destinados a compra de biofármacos, apesar de equivalerem a apenas 5% do total de medicamentos comprados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014). Isto demonstra a grande dependência tecnológica que o Brasil tem, que onera o SUS e, conseqüentemente, as contas públicas, já que a maioria dos princípios ativos para aplicação em saúde pública precisa ser importado. Dos dez medicamentos mais vendidos no mundo em 2016, oito são biofármacos e precisam ser importados pois o Brasil não produz, apesar de possuir capacidade (STROHL, 2018). Tais gastos com saúde pública destaca a importância de desenvolver plataformas tecnológicas de origem nacional capazes de suprir a demanda destes medicamentos, desonerando os gastos do SUS. Dentre os maiores gastos, aqueles com medicamentos (em especial medicamentos biológicos com destaque para os anticorpos terapêuticos que representam a maior fatia) podem ser diminuídos pela substituição da importação por anticorpos desenvolvidos com tecnologia própria. É imprescindível, portanto, o desenvolvimento de versões nacionais destas moléculas. Além da justificativa orçamentária, estas estratégias estão diretamente ligadas com o aprimoramento de tecnologias de tratamento contra o câncer, como será discutido posteriormente.

1.2 Estrutura e função de anticorpos monoclonais terapêuticos

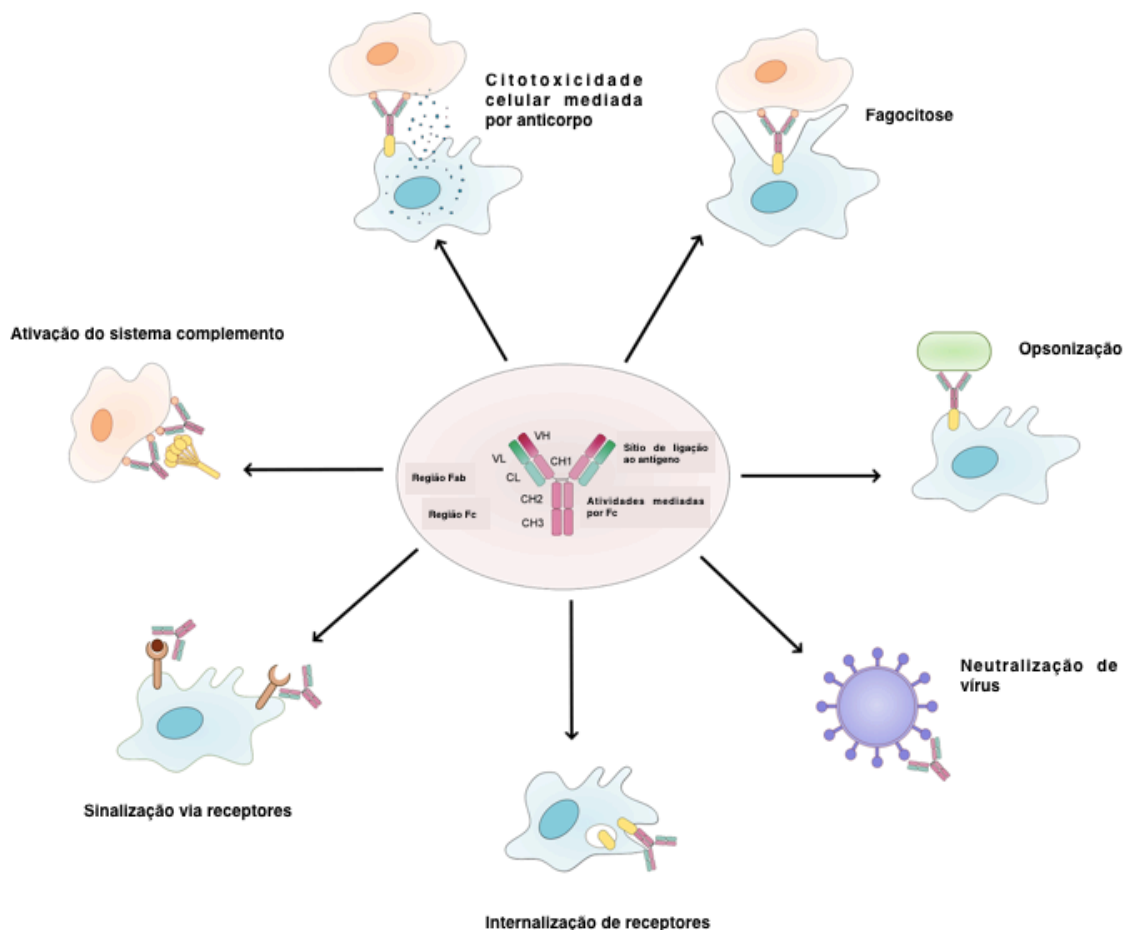
Anticorpos monoclonais representam uma classe importante de moléculas com atividade terapêutica contra várias doenças - incluindo o câncer - por causa de características

de afinidade e especificidade, desempenhando mecanismos de ação efetivos. O alto valor agregado destas moléculas está intimamente associado a aspectos importantes de sua estrutura e função, que implicam em um aumento na complexidade para produzi-las e testa-las.

Apesar de haver outras classes de imunoglobulinas (IgM, IgD, IgA e IgE – distinguidas pela região constante C-terminal), as do tipo IgG tornaram-se muito úteis nos estudos de características estruturais gerais dessas moléculas e são as mais utilizadas para aplicações terapêuticas.

Do ponto de vista bioquímico, os anticorpos são glicoproteínas circulantes produzidas por vertebrados através do sistema imune, conferindo uma alta especificidade a uma diversidade ampla de antígenos. Podem ser encontrados na superfície de membrana de linfócitos B ou secretados por plasmócitos (linfócitos B ativados após estimulação) e sua exploração terapêutica teve início em 1890, com uso de soro de animais imunizados (ABBAS, 2010). Desde então, suas funções e aplicações baseadas em diversos mecanismos vêm sendo estudadas (FIGURA 2).

Figura 2 – Visão geral dos principais mecanismos efetores das imunoglobulinas do tipo IgG (anticorpos) pelo sistema imune de vertebrados.

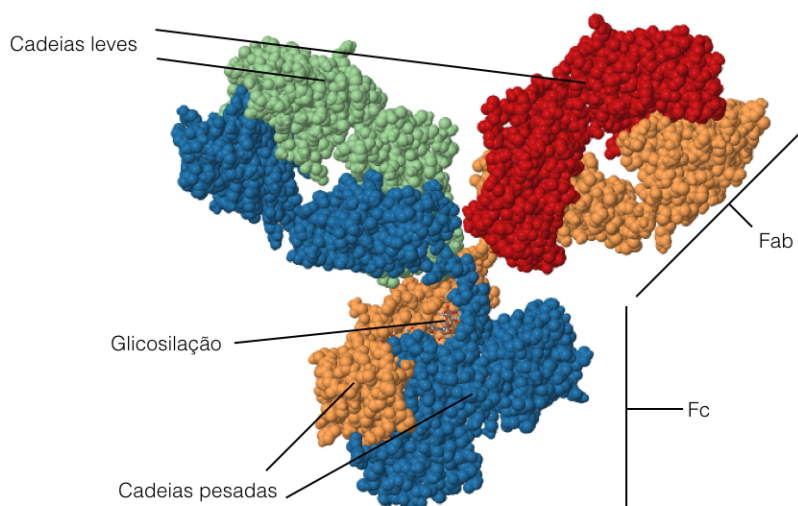


Fonte: (SPASEVSKA, 2014). A estrutura, formada pelas região variável e constante, desencadeia respostas celulares incluindo indução de apoptose, ativação do complemento, citotoxicidade celular mediada por anticorpo, fagocitose, opsonização (marcação para o sistema imune), neutralização e internalização de receptores.

As moléculas de anticorpos oriundas de clones diferentes de linfócitos B compartilham componentes estruturais básicos que conferem propriedades físico-químicas e funções efetoras semelhantes. A variabilidade entre os clones de linfócitos B e, conseqüentemente, na molécula de anticorpo, se dá na região de ligação ao antígeno, em que há uma alta variabilidade da estrutura primária (sequência de aminoácidos) (ABBAS, 2010). A molécula de anticorpo é composta por duas cadeias leves (C_L) idênticas e duas cadeias pesadas (C_H) idênticas. Os 110 aminoácidos das regiões aminoterminais de cada uma das cadeias (extremidades), tanto leves (V_L) quanto pesadas (V_H), são altamente variáveis e participam do reconhecimento do seu respectivo antígeno. Já as cadeias carboxiterminais, são

constantes e são as responsáveis pelas funções efetoras (HARRIS et al., 1999). Estes componentes básicos estão demonstrados na figura 3.

Figura 3 – Representação estrutural de uma imunoglobulina IgG



Fonte: Adaptado de PDB (número de acesso: 1IGY). Estrutura básica de uma IgG, destacando-se, em azul e laranja, as cadeias pesadas e, em vermelho e verde, as cadeias leves. O fragmento de ligação ao antígeno (Fab) corresponde à região de interação com o antígeno e o fragmento cristalizável (Fc) à região de interação com as molécula e células imunes necessárias para o desencadeamento das respostas efetoras.

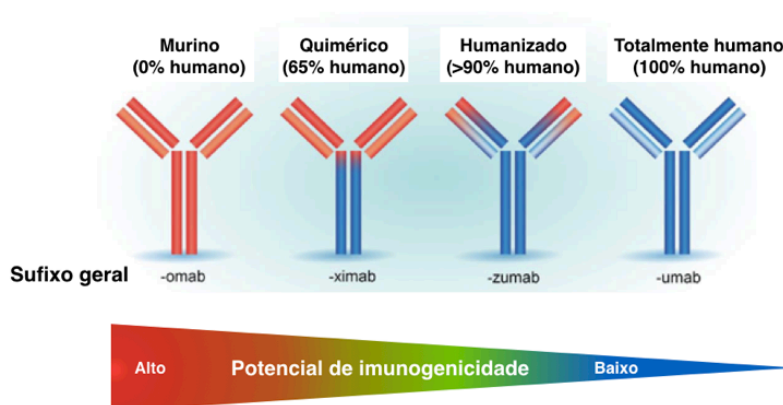
1.3 Terapias baseadas em anticorpos

Naturalmente, o sistema imune gera uma grande diversidade de células capazes de reconhecer uma ampla variedade de antígenos. Diferentes clones de células B podem produzir anticorpos que se ligam a epítomos diferentes de um mesmo antígeno e são chamados policlonais. As porções variáveis dos anticorpos policlonais são levemente diferentes e cada clone se liga a um epítomo diferente de um mesmo antígeno, apesar da alta especificidade. Clones individuais de células B podem ser isolados, cultivados e, então utilizados para produzir anticorpos que se liguem a um mesmo epítomo, chamados de anticorpos monoclonais. Esta metodologia, chamada tecnologia do hibridoma, vem sendo explorada desde 1975 (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) e ganhou grande espaço na indústria farmacêutica, permitindo a produção em larga escala de mAbs. Porém, os clones de células B eram obtidos de animais murinos e produziam mAbs que, quando aplicados como terapia em humanos, apresentaram problemas de incompatibilidade (imunogenicidade), induzindo efeitos colaterais intensos. Diferenças nas porções Fab e Fc induziam o sistema imunológico do paciente a

produzir respostas indesejadas, eliminando rapidamente as moléculas do corpo, ou, simplesmente, estes mAbs não interagem com as células e moléculas do sistema imune humano, não sendo eficazes para o uso terapêutico (CHAMES et al., 2009).

Com a finalidade de diminuir os problemas de imunogenicidade e baixa eficiência de ligação com as células e moléculas do sistema imune, estratégias de biologia molecular começaram a ser utilizadas para superar estas incompatibilidades, visando obter moléculas mais próximas dos anticorpos de origem humana, apesar de serem desenvolvidos em roedores. Esta evolução, chamada de humanização de anticorpos, proporcionou a obtenção de sequências quiméricas, humanizadas ou até mesmo inteiramente humanas (FIGURA 4), gerando os primeiros fármacos em 1994 (abciximab), 1997 (daclizumab) e 2002 (adalimumab), respectivamente (FOLTZ et al., 2013).

Figura 4 – Evolução do uso de anticorpos monoclonais terapêuticos.



Fonte: FOLTZ, 2013. Com o advento de novas técnicas de biologia molecular e, assim, novas metodologias para desenvolver anticorpos terapêuticos (como *phage display* e uso de ratos transgênicos), a engenharia de anticorpos tem sido capaz de produzir moléculas quiméricas, humanizadas ou humanas, reduzindo o seu potencial de imunogenicidade.

No caso de moléculas quiméricas, cerca de 65-70% da estrutura é de origem humana. Os 30% restantes são de origem murina, variáveis, que foram obtidas por imunização de roedores. Em anticorpos humanizados, esta relação diminui para 85-90% humana e 10-15% de origem murina (CHAMES et al., 2009).

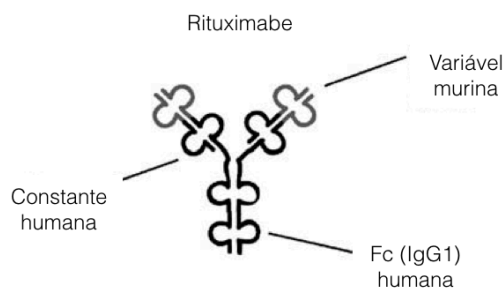
Os ganhos de tolerância, aliados às características de alta afinidade e especificidade melhoraram problemas de segurança e eficácia em testes clínicos, tornando os mAbs uma classe de produtos terapêuticos com alto valor agregado, com grande interesse por parte da indústria farmacêutica (ECKER et al., 2015).

1.4 O alvo terapêutico CD20 e o Linfoma Não-Hodgkin

Os mAb são amplamente utilizados no tratamento de neoplasias, uma classe de doenças caracterizada pelo crescimento desordenado de células anormais, com potencial invasivo, contemplando mais de 100 diferentes tipos de câncer. O Rituximabe (MabThera®/Rituxan®) foi o primeiro mAb aprovado para tratamento na área da oncologia, sendo também utilizado contra doenças autoimunes (MabThera® Bula). Desde sua aprovação nos EUA em 1997, tornou-se o medicamento biológico mais vendido em oncologia clínica, utilizado em combinação com outras terapias-padrão – quimioterápicos e radioterapia (MCLAUGHLIN *et al.*, 1998; HUHNS *et al.*, 2001; COIFFIER *et al.*, 2002; BYRD *et al.*, 2003; GHIELMINI *et al.*, 2004; MARCUS *et al.*, 2005) –, principalmente por aumentar o número de respostas completas ao tratamento, remissão a longo prazo e taxas de cura (COIFFIER *et al.*, 2002; HABERMANN *et al.*, 2006).

O Rituximabe é um anticorpo quimérico (FIGURA 5), possuindo uma porção de origem murina (região variável) e uma porção de origem humana (região constante), garantindo as funções efetoras envolvidas em seu mecanismo de ação (SMITH, 2003).

Figura 5 – Representação estrutural quimérica do Rituximabe.

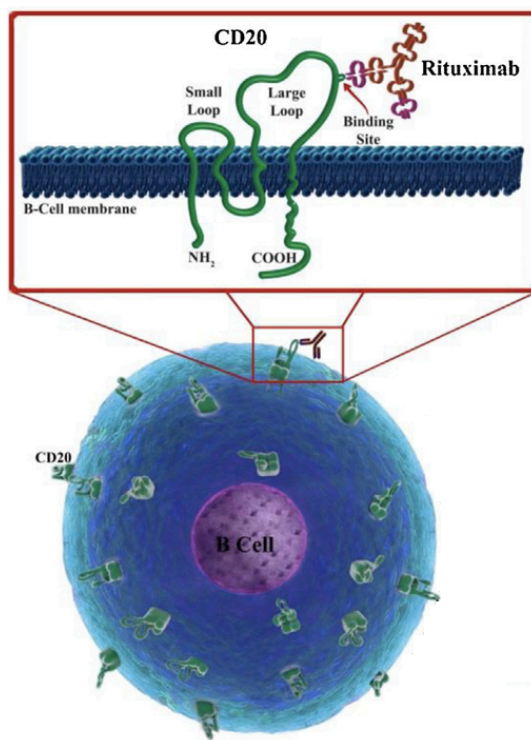


Fonte: SMITH, 2003. A porção murina variável, em destaque na porção superior, é responsável pela ligação específica com o ligante do Rituximabe, a proteína de membrana CD20.

O alvo do Rituximabe é a proteína de membrana CD20, presente em células B maduras. Dessa forma, estas moléculas são capazes de induzir apoptose devido a sua ligação com seu respectivo antígeno (MALONEY *et al.*, 1997), bem como inibição de crescimento celular, toxicidade celular dependente de anticorpo e lise celular mediada por complemento (REFF *et al.*, 1994), como demonstrado na figura 7. A proteína de membrana CD20 (35 KDa) é formada por quatro domínios e está presente na superfície de linfócitos B e em uma diminuta parcela de linfócitos T (HABERMANN *et al.*, 2006). O monômero desta proteína possui

quatro porções transmembranas, formando dois *loops* (FIGURA 6) e em um destes *loops* está o epítipo do Rituximabe.

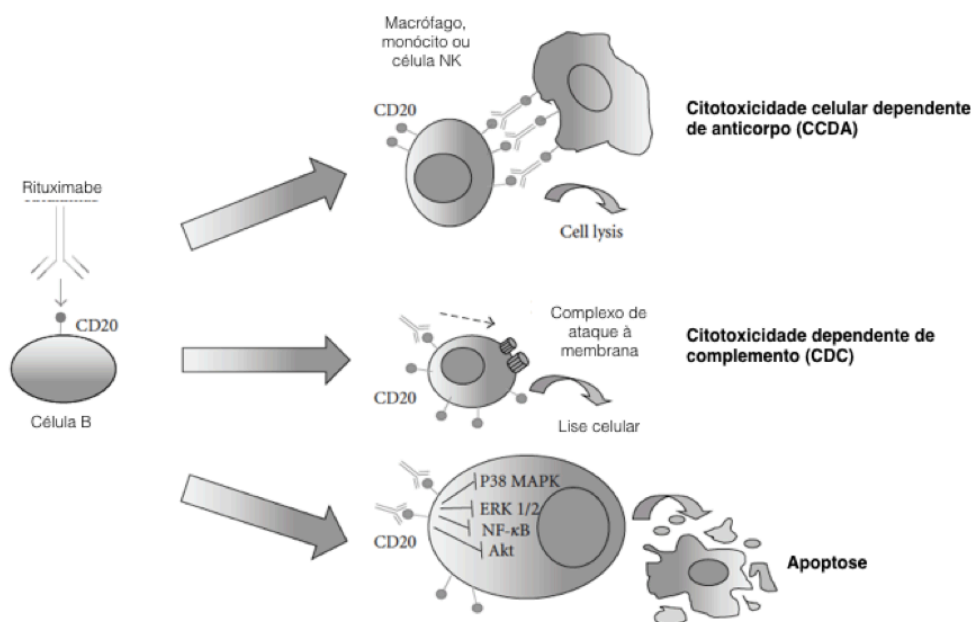
Figura 6 – Representação da proteína CD20 em célula B



Fonte: (SEYFIZADEH *et al.*, 2016). A proteína CD20 é expressa na membrana de células B maduras, o que a torna um bom alvo terapêutico contra estas células. O *loop* maior é o epítipo do Rituximabe.

Esta proteína não é expressa em fases iniciais ou finais de maturação, em outras células do corpo e nem em células-tronco, tornando-se um bom alvo terapêutico, já que está altamente expressa em células cancerosas (STASHENKO *et al.*, 1980). Acredita-se que sua função celular esteja associada ao transporte de íons como cálcio (BUBIEN *et al.*, 1993) e na ativação de sinais intracelulares (WALSHE *et al.*, 2008).

Figura 7 – Esquema dos principais mecanismos de ação do Rituximabe



Fonte: (MOTTA *et al.*, 2010). Apesar de não ter mecanismo *in vivo* completamente entendido, os principais mecanismos que induzem a morte celular de células B que expressam o CD20 incluem Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC), Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC) e indução da apoptose.

Também associado ao tratamento com Rituximabe, estudos demonstram a inibição de algumas proteínas (p38, NFκB, ERK1/2 e proteínas da via Akt) que culminam na superexpressão de PTEN e RKIP, resultando na sensibilização a tratamentos convencionais como quimioterapia com fármacos sintéticos e radioterapia (JAZIREHI *et al.*, 2004). Estes mecanismos estão intrinsecamente associados à capacidade do Rituximabe de se ligar ao CD20. Portanto, estratégias que induzam a morte celular de célula CD20⁺ são úteis no controle de malignidades diretamente relacionadas a anomalias em linfócitos B.

O linfoma não-Hodgkin (LNH) é uma doença maligna que afeta o tecido linfático, sendo o linfoma não-Hodgkin difuso de grandes células B o mais comum, afetando estas células do sistema imune. Para o biênio 2018-2019, há uma estimativa de 5370 novos casos para homens e 4810 casos para mulheres, tornando o LNH a 11^a neoplasia mais frequente entre os cânceres, excetuando-se câncer de pele não melanoma (INCA, 2017).

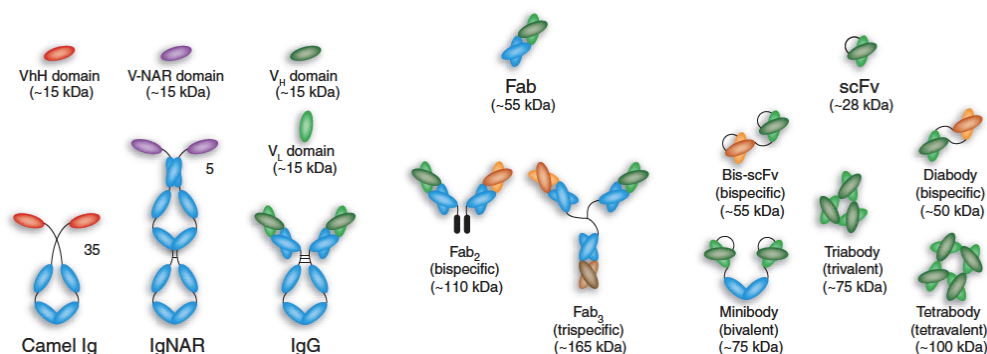
Apesar de ser um importante alvo, tanto o Rituximabe quanto outros mAbs anti-CD20 apresentam resistência por parte de alguns pacientes. No caso do Rituximabe, apenas 30-50% dos pacientes respondem adequadamente ao tratamento e até 60% dos que responderam, deixam de responder em caso de reaparecimento da doença (MÜLLER *et al.*, 2007). Neste

contexto, estratégias que possibilitam uma melhor resposta terapêutica e a superação dos mecanismos de resistência do LNH via tratamentos anti-CD20 são desejadas.

1.5 Engenharia de anticorpos como aliada em terapias contra o câncer

Tanto a porção variável quanto a porção constante podem ser manipuladas a fim de melhorar os mecanismos de ação de mAb. As alterações, via engenharia de proteínas por desenho racional ou evolução dirigida, podem ser aplicadas na porção constante para melhorar o recrutamento de células e moléculas do sistema imune e modular a meia vida em circulação das moléculas de anticorpo, como recentemente revisado (FONSECA *et al.*, 2018). A versatilidade estrutural dos anticorpos também possibilita que diferentes fragmentos possam ser manipulados *in vitro*. A porção variável pode ser engenheirada para modular a capacidade de ligação ao antígeno, melhorando a afinidade dos mAb visando melhoria em alguns dos seus mecanismos terapêuticos, induzindo mais apoptose por exemplo (AHMADZADEH *et al.*, 2014). Diferentes formatos baseados na molécula de anticorpo (FIGURA 8) podem ser utilizados como alvos para a engenharia de proteínas.

Figura 8 – Representação dos fragmentos de anticorpos mais frequentemente utilizados em engenharia de anticorpos



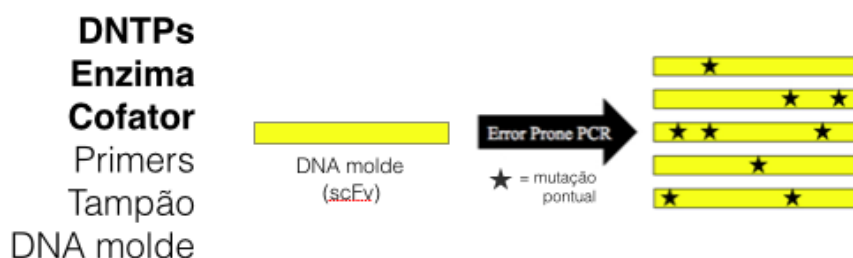
Fonte: (HOLLIGER; HUDSON, 2005). A estrutura completa da IgG pode ser fragmentada em porções peptídicas menores, de cadeia única. A menor estrutura demonstrada que possui ambas as cadeias V_H e V_L é denominada scFv (*single-chain fragment variable*). As duas cadeias são unidas por um *linker*, que é uma pequena sequência de aminoácidos de cadeia lateral simples (i.e., glicina e serina), de forma a manter sua capacidade de ligação ao antígeno. A divisão da sua estrutura em partes menores torna possível, também, o desenvolvimento de anticorpos bispecíficos, em que as duas regiões variáveis podem ter suas V_H e V_L diferentes entre si, formando moléculas que interagem com dois antígenos diferentes (SPASEVSKA, 2014).

A utilização desses fragmentos, em especial o scFv, permite que sistemas de expressão mais baratos e de simples manuseio, como o sistema bacteriano, seja utilizado sem comprometer sua afinidade e especificidade. Este fragmento também pode ser engenheirado por técnicas como *phage display* e, a partir de uma molécula melhorada, pode-se utilizá-la para construir anticorpos completos, conjuga-las a moléculas tóxicas ou fundir a outras proteínas. Os fragmentos também são utilizados para diagnóstico por imagem, radioterapia e entrega de fármacos, por conta da sua alta penetrabilidade e baixa meia-vida (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

1.6 Evolução dirigida e seleção por *phage display*: aprimoramento da terapia de LNH utilizando fragmentos scFv

Manipulações por engenharia de proteína que melhorem a capacidade do Rituximabe de se ligar ao CD20 podem melhorar o mecanismo de ação desse biofármaco. Esta característica podem ser manipulada utilizando apenas a sequência da região variável do anticorpo, como é o caso do scFv, por técnicas de produção de bibliotecas oriundas de mutações por *error-prone PCR* ou mutação sítio-dirigida (BREKKE; SANDLIE, 2003). O Rituximabe é um bom alvo para essas modificações, principalmente quando se compara sua constante de dissociação (K_d), estimada em $5,2 \times 10^{-9}$ (REFF *et al.*, 1994), enquanto outros anticorpos, como Adalimumabe, Infliximabe e Etanercept têm constantes de $3,04 \times 10^{-11}$, $2,73 \times 10^{-11}$ e $1,18 \times 10^{-11}$, respectivamente (KAYMAKCALAN *et al.*, 2009). Assim, o potencial para melhorar a afinidade do Rituximabe é significativo, quando comparado a estes outros anticorpos monoclonais. Alterações visando o aumento desta afinidade podem refletir em melhoras em alguns dos seus mecanismos terapêuticos.

A reação em cadeia da polimerase (*PCR*) pode ser modificada para introduzir mutações pontuais randômicas em genes clonados (FIGURA 9). Essas mutações podem ser inseridas em regiões estruturalmente e funcionalmente importantes, capazes de gerar alterações maléficas ou benéficas que podem ser selecionadas. Esta estratégia, acoplada a um eficiente método de *screening*, é útil quando não se conhece totalmente posições na sequência de aminoácidos de proteínas que causem alterações significativas (CADWELL; JOYCE, 1992).

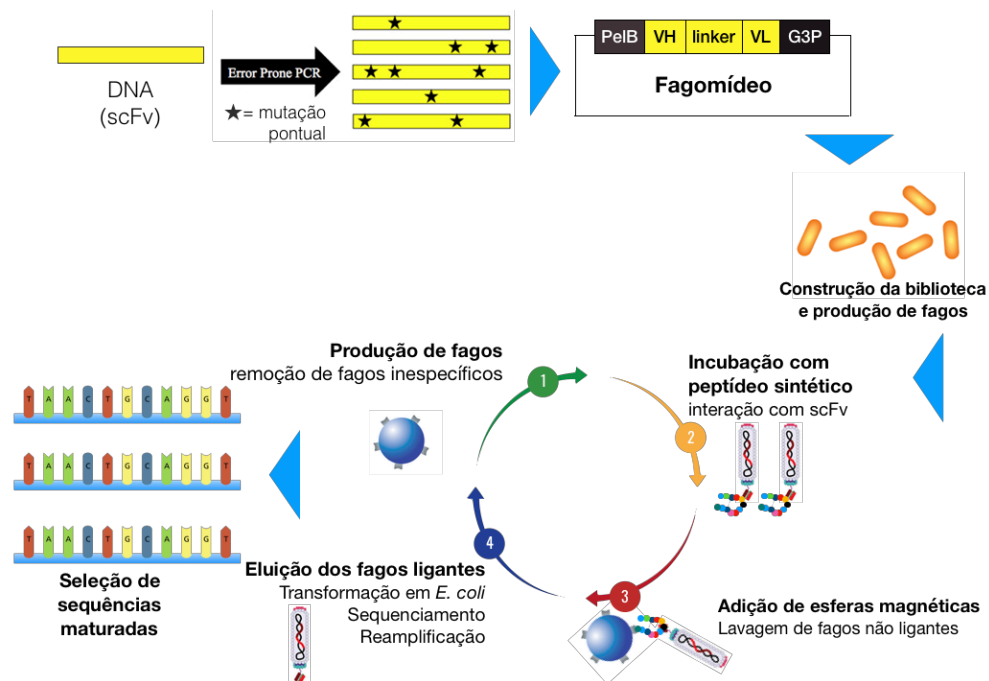
Figura 9 – Representação da *epPCR*

Fonte: (BARTEL *et al.*, 2011). Modificando componentes da reação comum de *PCR*, as fitas produzidas podem apresentar mutações pontuais em locais aleatórios, gerando grande diversidade.

A *epPCR* gera uma grande quantidade de sequências no decorrer dos ciclos de amplificação, e a quantidade de mutações adicionadas acaba gerando uma grande diversidade de clones, alterando a reação padrão com o uso de uma *DNA* polimerase de baixa fidelidade, alta concentração de dTTP e dCTP em relação a dGTP e dATP, uso de manganês e alteração no número de ciclos padrão da *PCR* (CADWELL; JOYCE, 1992). Essas alterações são capazes de gerar baixas (<0,1%), médias (1%) ou altas (>4,5%) taxas de mutação. Porém, taxas muito baixas acabam não gerando tanta diversidade e taxas muito altas acabam gerando mutações deletérias. Portanto, o ideal, de acordo com o que se observa na maioria dos trabalhos publicados, é utilizar condições que gerem taxas médias de mutação para um determinado número de ciclos, geralmente 25 a 30 (JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2005).

Os variantes gerados pela técnica de *epPCR* podem ser selecionados pela técnica de *phage display* (FIGURA 10), capaz de produzir e selecionar bibliotecas de até 10^{11} variantes diferentes por diversas etapas de seleção. A tecnologia foi inicialmente descrita para aplicações com mAb na década de 90 e faz o uso de bacteriófagos em sistema *in vitro*, substituindo o uso de animais e outras tecnologias, como a do hibridoma. O scFv pode ser expresso na superfície dos fagos e para isso, a sequência inteira é clonada em um vetor de expressão para *phage display* (fagomídeo), fusionada à região referente à porção N-terminal da proteína pIII. A proteína pIII é expressa na extremidade do fago, junto com a proteína de interesse (scFv) (MCCAFFERTY *et al.*, 1990) e é responsável pela infectividade da partícula viral.

Figura 10 – Representação esquemática da técnica de *phage display*.



Fonte: elaborado pelo autor. A biblioteca gênica (que pode ser oriunda de *epPCR* ou do DNA de células B humanas) contendo as sequências V_H e V_L , é clonada em um fagomídeo. Posteriormente, as sequências são expressas na superfície de um fago (geralmente, M13) após adição de um *helper phage* e os fagos produzidos são incubados com o ligante/alvo terapêutico. Após sucessivas lavagens (*biopanning*), os fagos com os peptídeos que apresentarem maior afinidade são selecionados. A sequência de nucleotídeos referente a este fago está empacotada na estrutura do fago e pode ser então expressa em sistema bacteriano.

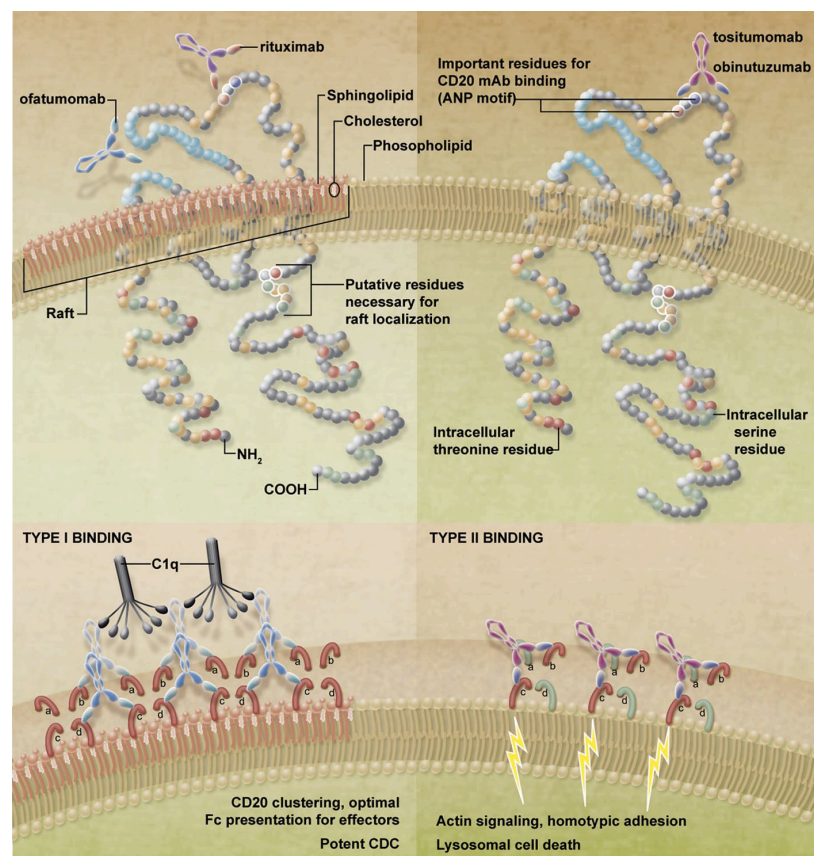
A expressão de um peptídeo ou uma proteína (scFv, por exemplo) é possível graças a um *helper phage*, que contém todos os genes que codificam as proteínas do capsídeo, de forma a construir um fago completo. Porém, por ter sua origem de replicação modificada, o *helper phage* não é empacotado no fago, mas sim o fagomídeo contendo a sequência clonada neste vetor (THIE *et al.*, 2009).

A biblioteca de mutantes pode ser construída, inclusive, a partir de genes inteiramente humanos. Esta foi a abordagem utilizada para desenvolver o primeiro anticorpo monoclonal terapêutico totalmente humano a ser aprovado para comercialização, Humira, que ocupa a primeira posição entre os medicamentos biológicos mais vendidos no Brasil (LORENZ, 2002). Os mutantes scFv:pIII podem ser selecionados por afinidade imobilizando seu ligante em superfícies sólidas como nitrocelulose, partículas magnéticas, matrizes cromatográficas, tubos de plástico ou placas de 96 poços e, após sucessivas lavagens, são eluídos com tripsina ou por mudanças bruscas no pH. Posteriormente, a técnica de ELISA pode identificar fagos individuais e determinar, comparativamente, mutantes com maior afinidade, que são, então,

sequenciados e expressos para análises bioquímicas e citotóxicas posteriores. Ao final de todo o processo, a sequência do anticorpo pode ser reconvertida para uma molécula completa, contendo as porções constantes (SCHIRRMANN *et al.*, 2011).

Tem-se discutido e revisado (CRAGG, 2011) que os anticorpos anti-CD20 possuem um mecanismo de ação único. De acordo com Cragg e Glennie (CRAGG; GLENNIE, 2004), a posição do epítipo e, conseqüentemente, a forma com que os mAb anti-CD20 se ligam ao CD20 podem afetar mecanismos efetores. Anticorpos do tipo I, como o Rituximabe e ofatumumabe, se ligam em regiões consideradas mais fechadas desta proteína de membrana, favorecendo a aglomeração de CD20 em balsas lipídicas e a indução de mecanismos efetores, como CDC. Já os anticorpos do tipo II, como obinutuzumabe, ligam-se em porções externas do CD20, fazendo com que interações bivalentes entre o anticorpo e outras moléculas de um mesmo tetrâmero de CD20 sejam favorecidas, induzindo mais apoptose do que os do tipo I (FIGURA 11).

Figura 11 – Anticorpos anti-CD20 do tipo I e tipo II.



Fonte: CRAGG (2011). Dependendo do epítipo (região) em que os anticorpos anti-CD20 se ligam, há o favorecimento de mecanismos efetores, como CDC, ou indução de apoptose.

O entendimento desse mecanismo sugere que, mais do que a afinidade, o epítopo é um grande influenciador no aumento da atividade de indução de apoptose do Rituximabe. Porém, o aumento da afinidade pode afetar mecanismos efetores do Rituximabe, que são os principais do ponto de vista terapêutico, como ADCC e CDC.

Ao aumentar a afinidade do Rituximabe ao alvo CD20, utilizando a evolução dirigida como ferramenta, espera-se uma melhora na resposta terapêutica, principalmente em pacientes resistentes ao anticorpo. Além disso, moléculas scFv com maior afinidade podem ser utilizadas para criar novas terapias baseadas em fragmentos de anticorpos, ou ainda a obtenção de um *biobetter* do Rituximabe, o que pode tornar o Brasil independente da importação desse biofármaco para tratamento de doenças ligadas a células B. Outras construções baseadas em scFv com afinidade maturada, além do anticorpo completo, também podem ser exploradas visando o tratamento e LNH, como é o caso de moléculas bispecíficas e receptores quiméricos de antígeno (CAR).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Construir uma biblioteca, por evolução dirigida, da região de ligação ao alvo do Rituximabe e selecionar, via phage display, variantes scFv com afinidade à proteína CD20 superior ao nativo.

2.2 Objetivos específicos

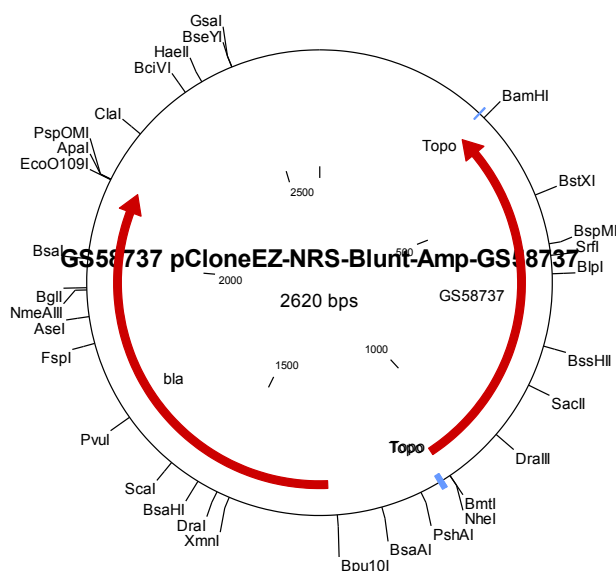
- Clonar o gene do scFv do Rituximabe em vetor para *phage display*;
- Amplificar o gene scFv por *epPCR*;
- Obter uma biblioteca gênica desta sequência em bactérias *E. coli* (TG1);
- Expressar a biblioteca scFv na superfície de fagos M13 (fagos-scFv);
- Submeter os fagos-scFv oriundos da biblioteca construída a etapas de seleção (*biopanning*);
- Sequenciar o DNA das variantes selecionadas;
- Discutir as contribuições estruturais e bioquímicas atribuídas aos mutantes selecionados.

3 METODOLOGIA

3.1 Amplificação do gene scFv por *epPCR*

O gene sintético do scFv do Rituximabe foi obtido comercialmente da empresa Genone em vetor de clonagem conforme a figura 12. A sequência foi baseada em dados do *Protein Data Bank* (PDB: 2OSL), contendo a porção variável V_H unida à porção variável leve V_L por um *linker* flexível composto de 15 aminoácidos.

Figura 12 – Mapa do vetor de clonagem obtido comercialmente da empresa Genone, contendo o gene scFv.



Fonte: Encarte fornecido pela empresa Genone. Vetor comercial, com gene *scFv*. O vetor possui, ainda, sequência referente ao gene de resistência ao antibiótico ampicilina ou carbenicilina, bem como sítios de restrição para enzimas *NheI* e *BamHI* flanqueando o gene do scFv, além de origem de replicação baseada no vetor pUC.

O gene possui 741pb. Estrutura primária (sequência de aminoácidos):

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN
 GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV
 WGAGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVS
 YIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQ
 QWTSNPPTFGGGTKLEIK. Em negrito, sequência *linker* conectando V_H , anterior ao *linker*,

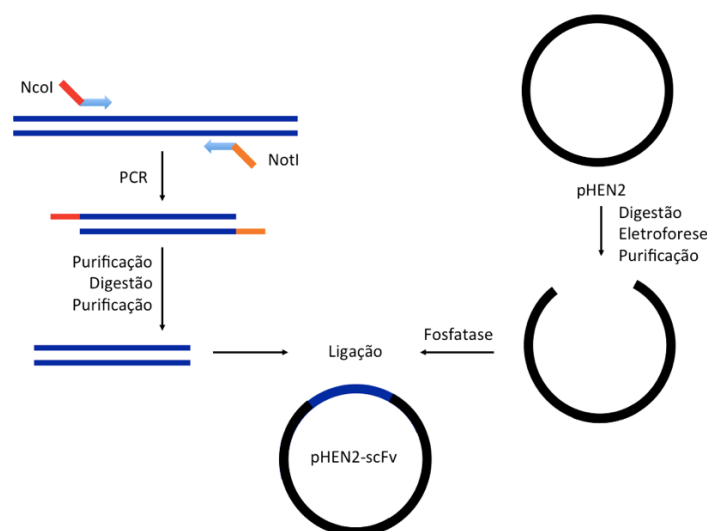
e V_L (formato V_H -linker- V_L). Total de aminoácidos: 242. Peso molecular: 25.392,1. Ponto isoelétrico teórico: 9,06.

O gene scFv foi, inicialmente, clonado em vetor pET28a, resistente a canamicina para facilitar a posterior subclonagem da biblioteca *epPCR* em pHEN2, resistente a carbenicilina. O uso de antibióticos diferentes evita que resquícios do vetor de origem (PUC-scFv) sejam transformados na biblioteca, junto com vetores pHEN, já que estes dois possuem resistência ao mesmo antibiótico. O vetor comercial PUC-scFv e o vetor pET28a foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α competentes por choque térmico. As bactérias competentes (50 μ L) foram descongeladas em gelo e adicionadas de 1 μ L de vetor (pET28a ou PUC-scFv), correspondendo a aproximadamente 50ng de DNA. Os tubos foram incubados em gelo por 30min, submetidos a choque térmico a 42°C por 1min, seguido de repouso em gelo por mais 2min. Aos tubos, foram adicionados 950 μ L de meio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido estéril. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação (200RPM do aparelho) por 1 hora, centrifugados a 10.000 xg por 6min, tiveram o sobrenadante removido (~950 μ L) e os 50 μ L restantes foram ressuspensos e plaqueados em meio LB-ágar contendo respectivo antibiótico de resistência (canamicina 40 μ g/mL ou carbenicilina 100 μ g/mL). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C e as colônias isoladas foram utilizadas para purificação de DNA plasmidial utilizando kit de extração (*Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* – Promega) e etapas de clonagem.

O gene scFv foi removido do vetor PUC-scFv através de digestão com enzimas *NheI* e *BamHI* e clonado em vetor pET28a utilizando reação T4 ligase, após digestão do vetor com as mesmas enzimas. A clonagem foi confirmada por *PCR* de colônias, utilizando *primers* T7 e digestão de DNA plasmidial, avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. As reações enzimáticas estão detalhadas no apêndice A.

O vetor resultante pET28a-scFv foi usado como molde para *epPCR*. Para a reação, *primers* denominados pHENF e pHENR foram utilizados para gerar sequências contendo sítio de restrição para *NotI* e *NcoI*, conforme figura 13.

Figura 13 – Fluxograma da metodologia utilizada para clonar o gene *scFv* em vetor pHEN2.



Fonte: Elaborado pelo autor. O gene *scFv* foi amplificado utilizando *primers* com sítios de restrição para *NcoI* e *NotI*. O produto de *PCR* foi digerido com estas enzimas, bem como o vetor de expressão para *phage display* pHEN2, que foi tratado com fosfatase alcalina antes de ser submetido à reação com *T4 ligase* para formar o vetor pHEN2-scFv.

A reação (*epPCR*) foi feita em volume 50 μ L, conforme a literatura (JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2005):

Primers Forward e Reverse: 0,4 μ M

Tampão GoTaq 5X: 5 μ L

dATP e dGTP: 0,2mM

dCTP e dTTP: 1mM

MgCl₂: 7mM

MnCl₂: 0,3mM

GoTaq *DNA Polymerase*: 10U

DNA: 1ng pET28a-scFv

Qsp 50 μ L de H₂O

Como conclusão de experimentos anteriores (dados não mostrados), escolheu-se a concentração de MnCl₂ 0,3mM por gerar taxas de mutação próximas das descritas na literatura. Entretanto, valores ligeiramente menores (0,25mM) ou maiores (0,5mM) de MnCl₂ podem ser utilizados caso taxas de mutação menores ou maiores, respectivamente, sejam desejadas.

A reação foi submetida a termociclagem por 25 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 3min. A reação (5µL) foi analisada em UV por eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando a amplificação do gene scFv. O resto da reação foi então purificado utilizando kit de purificação de produto de *PCR*.

3.2 Clonagem da biblioteca *epPCR* scFv em vetor para *phage display*

Cerca de 1µg de produto de *epPCR* e 1µg de vetor pHEN2 foram digeridos com enzimas *NcoI* e *NotI*, com cada reação em volume 50µL, por 3h a 37°C e inativados a 65°C por 15min. A reação com vetor foi posteriormente digerida com enzima fosfatase alcalina, adicionando-se os componentes à digestão, em volume final 60µL. Esta etapa visou evitar a recircularização do vetor pHEN2 sem o gene scFv através da remoção de grupos fosfato das extremidades do vetor, o que faria com que a biblioteca contivesse muitas bactérias sem variantes scFv. Após incubação por 3h a 37°C e inativação 65°C por 15min, o vetor foi submetido a eletroforese e a banda referente ao vetor linearizado foi removida com lâmina. Tanto a banda recortada quanto o produto de *epPCR* foram submetidos a purificação com *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*. Para aumentar o rendimento de material para montagem da reação com T4 ligase, as etapas sugeridas pelo fabricante do *kit* de purificação foram ligeiramente modificadas, conforme apêndice B.

O produto de *epPCR* e pHEN2 purificados foram quantificados por fluorimetria em *Qubit Fluorometric Quantitation System*, seguindo orientações do fabricante. Para a reação com T4 ligase, 50ng de vetor pHEN2 e 150ng de produto de *epPCR* foram utilizados, em reação detalhada conforme apêndice A, incubada *overnight* a 4°C, temperatura ambiente por 2h e inativada por 15min a 65°C.

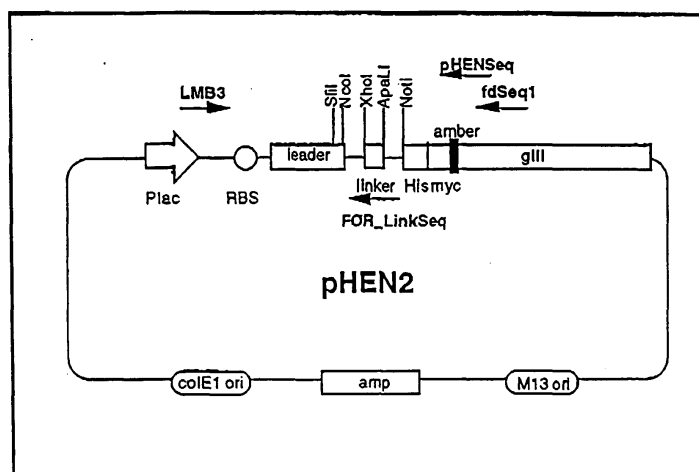
A reação (20µL) foi adicionada de 80µL de água ultrapura e este volume final (100µL) foi purificado com kit e concentrado em *SpeedVac* até um volume de 10µL. Duas reações foram igualmente montadas, totalizando 20µL. Os 20µL foram transformados em bactérias *E. coli* (TG1) eletrocompetentes, utilizando eletroporador LONZA® (programa 4), totalizando 10 transformações com 2µL cada. Cada transformação foi regenerada em 1mL de meio SOC por 1h a 37°C, sob agitação (200RPM). Os 20mL totais (10mL oriundos da ligação 1 e 10mL oriundos da ligação 2) foram divididos em duas placas 15x15cm com LB-ágar suplementado com 1% de glicose de carbenicilina 100µg/mL, aplicando-se 2mL, após centrifugação e remoção de 18mL de sobrenadante. Foi feita uma diluição seriada de cada uma das duas ligações transformadas para estimar o tamanho da biblioteca construída.

Em cada uma das duas placas, 1,5mL de LB (glicerol 15%) foram utilizados para raspar as colônias. Este raspado contendo todas as colônias (biblioteca) foi utilizado para produção de fagos scFv-pIII.

3.3 Produção de fagos scFv-pIII

A biblioteca é composta por bactérias, cada uma contendo o fagomídeo pHEN2 (FIGURA 14) com o gene scFv aleatoriamente mutado, clonado.

FIGURA 14 – Mapa do vetor pHEN2



Fonte: (GRIFFITHS *et al.*, 1994). O vetor pHEN2 tem resistência a ampicilina e contém uma das proteínas do fago M13, a pIII. Para expressar o scFv fusionado a esta proteína, uma cepa bacteriana que não reconhece o códon amber como *stop codon* deve ser utilizada. Caso contrário, a bactéria produzirá o scFv e não expressará a proteína pIII. As outras proteínas do capsídeo viral são expressas pela adição (coinfecção) de um fago auxiliar na cultura.

Esta biblioteca foi utilizada para produzir os fagos contendo os mutantes oriundos da *epPCR* na superfície (ligado a proteína pIII). Para montagem do fago M13, um *helper phage*, um fago auxiliar, foi utilizado. Este fago contém todas as proteínas, incluindo a pIII nativa, que encapsulam o vetor pHEN2-scFv de cada uma das bactérias.

Para isso, 100µL da biblioteca foram utilizados para inocular 200mL de LB suplementado com ampicilina 100µg/mL (antibiótico de resistência do pHEN2) e glicose 1%. As células foram cultivadas a 37°C sob rotação (200RPM do equipamento) até atingir densidade ótica em 600nm igual a 0,4. Destes 200mL, 150mL foram incubados por mais 2h, centrifugados 10.000 xg por 10min, teve o sobrenadante removido e o precipitado,

ressuspendido em 10mL de LB (glicerol 15%) e aliqotado em -80°C (estoque secundário da biblioteca).

Os outros 50mL foram divididos em dois tubos (25mL cada) e infectados com 60µL de fagos auxiliares VCSM13 a 2×10^{11} UFC/mL. Este valor foi calculado considerando uma proporção 1:20 (bactéria:fago auxiliar), considerando que, em $D.O._{600nm} = 0,4$, a quantidade de bactérias é igual a 8×10^8 por mL de cultura. Após adição do fago auxiliar VCSM13, os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria, sem agitação, por 40min. Os tubos foram centrifugados a 3.000g por 10min a 4°C, tiveram o sobrenadante descartado e foram ressuspendidos em 100mL de LB suplementado com 0,1% de glicose, ampicilina 100µg/mL e canamicina 40µg/mL. A cultura foi cultivada *overnight* a 30°C, a 200RPM do equipamento.

No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 3.300 xg por 30min a 4°C em dois tubos de 50mL. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi dividido em dois outros tubos (apenas ~35mL em cada tubo). A cada um destes dois tubos, 8mL de solução PEG/NaCl (20% PEG 6000, 2,5M NaCl) foram adicionados ao sobrenadante e os tubos foram fortemente agitados e, posteriormente, incubados em gelo por 2h. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 3.000 xg por 30min e o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi secado em papel toalha. Foram adicionados 1,5mL de tampão PBS pH 7,4 em cada um dos dois tubos, os precipitados foram ressuspendidos e novamente centrifugados a 11.600g por 10min. O sobrenadante foi então aliqotado em tubos de 1,5mL e armazenados em -20°C para posterior etapa de seleção de fagos.

3.4 Seleção de fagos por *biopanning*

Para etapa de seleção (*biopanning*), os fagos oriundos da etapa anterior foram inicialmente titulados para determinar sua concentração. Bactérias da cepa TG1 foram crescidas até $D.O._{600nm} = 0,4$ a 37°C, a 200RPM e 10mL desta cultura foram adicionados em dois tubos. A um dos tubos, 10µL da solução de fagos referentes a biblioteca foram adicionados e 10µL de PBS pH 7,4 foram adicionados ao outro tubo, como controle negativo. Os dois tubos foram incubados em banho-maria, 37°C, por 40min. Após, foram plaqueados 50µL da cultura infectada e do branco diluídos (fatores de diluição: 10^4 , 10^6 e 10^8) em placas contendo meio LB suplementadas com ampicilina 100µg/mL. As placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e contadas no dia seguinte.

Após contagem, os fagos foram submetidos a seleção. Os tubos utilizados na seleção foram incubados por 30min com solução PBS suplementada de leite 2% (MPBS 2%). Esta

etapa de bloqueio evita interações inespecíficas entre os fagos e o plástico do tubo, favorecendo a solubilização das partículas virais e consequente interação com o peptídeo sintético utilizado na seleção. A um destes tubos, foram adicionados 300µL de fagos scFv (em concentração $1,7 \times 10^{11}$ UFC/mL) e 50µL de solução contendo esferas magnéticas funcionalizadas com estreptavidina (PROMEGA) previamente lavadas três vezes com 1mL PBS e ressuspensas em 50µL de MPBS 2%. As esferas foram lavadas com ajuda de suporte magnético, que permite imobilização reversível das esferas e retirada do sobrenadante. O tubo foi incubado por 30min sob rotação (inversão) em temperatura ambiente. Após incubação, o tubo foi posicionado em suporte magnético para que as esferas fossem sedimentadas e o sobrenadante, contendo os fagos, removido. Esta etapa inicial visou a remoção de quaisquer fagos scFv que pudessem interagir inespecificamente com as esferas magnéticas de estreptavidina, garantindo, então, seleção de fagos específicos ao CD20.

O sobrenadante retirado foi incubado com 5µL de peptídeo sintético (loop-CD20) biotilado a 1mg/mL por 30min sob rotação, em temperatura ambiente, seguido de repouso por 15min em temperatura ambiente. Após incubação, 100µL de esferas magnéticas de estreptavidina, previamente lavadas conforme descrito anteriormente, foram adicionadas e o tubo contendo a solução foi incubado por 10min sob rotação. Após incubação, o tubo foi colocado em suporte magnético e o sobrenadante foi removido com uma micropipeta. As esferas foram então lavadas três vezes por inversão e remoção do sobrenadante com PBS adicionado de tween-20 (0,1%) e mais quatro vezes apenas com PBS, totalizando sete lavagens. Após as lavagens, a solução contendo as esferas magnéticas foi transferida para um novo tubo e adicionada de 1mL de tampão glicina (0,2M de glicina-HCl, pH 2,2) e incubado por 10min sob rotação. As esferas magnéticas foram sedimentadas e o sobrenadante, contendo fagos eluídos, foi transferido para um tubo estéril e neutralizado com 200µL de tampão Tris-HCl 1M, pH 8,5.

Os fagos eluídos foram titulados, conforme descrito anteriormente, por infecção de bactérias TG1. As placas utilizadas foram suplementadas com glicose 1% e ampicilina 100µg/mL, já que os fagos produzidos possuem o fagomídeo pHEN2-scFv.

As colônias resultantes da infecção com os fagos eluídos da rodada 1 foram coletadas e submetidas ao mesmo processo de crescimento até D.O. = 0,4; infecção com fago auxiliar; precipitação e titulação dos fagos. Os fagos precipitados da rodada 1, após titulação, serviram de *input* para a rodada seguinte. Para a rodada 2, tubos foram bloqueados com MPBS 2% por 30min e adicionados de 50µL de fagos precipitados da rodada 1, 445µL de MPBS 2% e 5µL do peptídeo a 1mg/mL. Após incubação por 30min por inversão e 15min em temperatura

ambiente, 100 μ L de esferas magnéticas previamente lavadas foram adicionados e incubados por 10min por inversão. As beads foram lavadas dez vezes com PBS-T 0,1% e três vezes com PBS, totalizando treze lavagens. Após as lavagens, os fagos foram eluídos e infectados em TG1, conforme descritos anteriormente.

As colônias resultantes da infecção com o eluído da rodada 2 foram infectadas com fago auxiliar, gerando fagos para a rodada 3 (*input*). A terceira rodada foi feita conforme a rodada 2, mas com dez lavagens com PBS-T 0,1% e cinco com PBS, totalizando quinze lavagens. Os fagos eluídos foram usados para infectar TG1 e as bactérias oriundas da infecção foram coletadas e estocadas em -80°C.

É importante destacar que no início de cada rodada, uma grande quantidade de fagos é utilizada para seleção contra o peptídeo sintético biotinilado. Após a seleção, uma quantidade menor de fagos é eluída, correspondendo aos fagos que resistiram às lavagens de cada rodada. Portanto, para que a próxima rodada pudesse acontecer, o eluído da rodada anterior (*output*) foi previamente amplificado e precipitado, podendo ser utilizado como *input* para a rodada posterior.

3.5 Sequenciamento de DNA de variantes scFv

Após transformação do vetor pHEN2-scFv oriundo da *epPCR*, 12 colônias tiveram seu DNA plasmidial extraído para sequenciamento por método de Sanger, via plataforma de sequenciamento da Fiocruz-PE. A análise do sequenciamento foi utilizada para confirmar o correto grau de indução de mutação da condição *epPCR*.

O sequenciamento de DNA também foi utilizado para acompanhar o enriquecimento de sequências scFv após cada etapa de seleção. Para isso, foram realizadas *PCR* utilizando como molde os precipitados da rodada 0 (direto da biblioteca), 1 e 2, bem como os eluídos das rodadas 1, 2 e 3. Reação para 25 μ L:

Tampão 5X GoTaq: 5 μ L

dNTP mix (10mM): 0,5 μ L

Primer pHENF (10 μ M): 0,5 μ L

Primer pHENR (10 μ M): 0,5 μ L

GoTaq Polymerase (5U/ μ L): 0,12 μ L

H₂O: qsp 25 μ L

Os fagos foram utilizados como DNA molde. Para isso, os fagos precipitados das rodadas 0, 1 e 2 foram diluídos cem vezes, já que sua concentração é maior do que os fagos

eluídos. Posteriormente, tanto os fagos precipitados e os eluídos das rodadas 1, 2 e 3 foram incubados a 100°C por 5min. Foram utilizados 15µL dos eluídos das rodadas 1, 2 e 3 como molde em cada reação, 2µL dos fagos precipitados das rodadas 0 e 1, e 5µL de fagos precipitados da rodada 2.

Tabela 1 – Identificação da correspondência de cada fago utilizado para amplificação do gene scFv

Origem do fago	Etapa correspondente	Quantidade utilizada
Precipitação da rodada0	Biblioteca	2µL
Eluído da rodada 1	Pós-rodada 1	15µL
Precipitação da rodada 1	Pós-rodada 1	2µL
Eluído da rodada 2	Pós-rodada 2	15µL
Precipitado da rodada 2	Pós-rodada 2	2µL
Eluído da rodada 3	Pós-rodada 3	15µL

Fonte: elaborado pelo autor. A concentração de fagos precipitados é alta, pois sucede a uma etapa de amplificação. A concentração de fagos eluídos é menor, já que sucede a uma etapa (rodada) com lavagens. Os fagos precipitados correspondem ao *input* de cada rodada, e os fagos eluídos correspondem ao *output* de cada rodada.

3.6 Identificação de seqüências scFv após *biopanning*

Os fagos eluídos de cada rodada (ER1, ER2 e ER3) foram utilizados para infectar TG1 conforme descrito anteriormente. Após infecção, colônias individuais foram coletadas para posterior análise por sequenciamento de DNA.

Os fagos da biblioteca (rodada) e os precipitados após rodadas 1 e 2 (R0, R1 e R2), além dos fagos eluídos das rodadas 1, 2 e 3 (ER1, ER2, ER3) foram utilizados como molde em *PCR*, visando detectar a presença do gene scFv, conforme descrito no item anterior. As bandas referentes ao gene scFv, na altura de aproximadamente 750 pb, foram excisadas, purificadas com *kit ReliaPrep™ DNA Cleanup and Concentration System* e clonadas em vetor pGEM T-Easy®, conforme recomendações do fabricante. Após transformação, colônias brancas foram testadas por *PCR* de colônia com *primers* específicos para o gene scFv. As colônias positivas tiveram seu DNA plasmidial purificado e foram submetidas a sequenciamento.

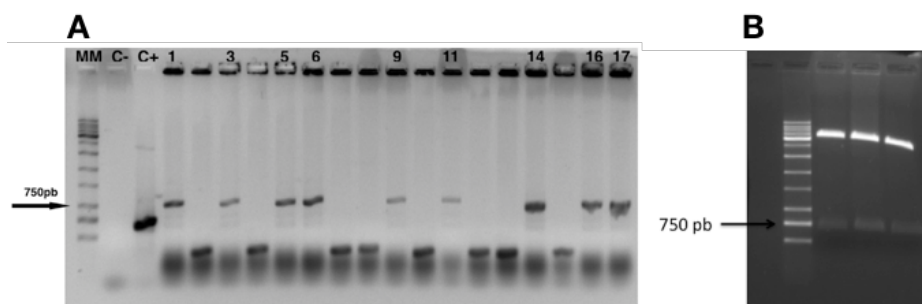
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Amplificação do gene scFv por *epPCR*

O gene scFv foi inicialmente clonado em vetor pET28a para facilitar a subclonagem em pHEN2. Como os dois vetores possuem resistência a diferentes antibióticos, utilizar o vetor pET28a-scFv como molde para *epPCR* evita que o DNA molde esteja presente na biblioteca, garantindo que apenas pHEN2-scFv sejam transformados.

Conforme mostrado (FIGURA 15), *PCR* de colônias utilizando *primers T7* comprovam a clonagem do gene scFv em pET28a. Também é mostrado o teste de digestão, em que o fragmento referente ao gene scFv é liberado.

Figura 15 – Géis de agarose (1%) com amostras de *PCR* de colônia e teste de digestão.

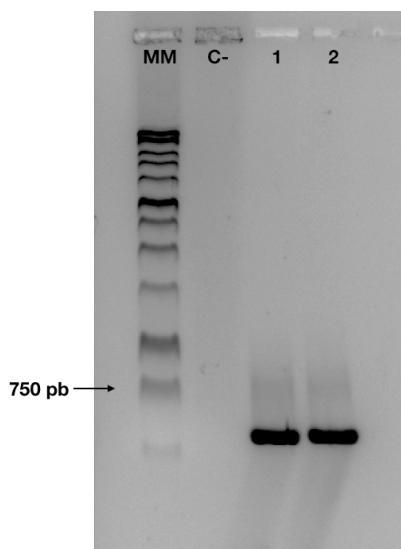


Fonte: elaborado pelo autor. À esquerda (A), nove colônias positivas para o gene scFv. À direita (B), três colônias foram testadas, tendo seu DNA plasmidial extraído e submetido a digestão com enzimas de restrição. A presença do fragmento na altura de 750pb confirma a clonagem do gene scFv no vetor pET28a.

O gene scFv amplificado por *epPCR* utilizando pET28a-scFv como molde (FIGURA 16) foi utilizado para clonagem em vetor pHEN2. Na reação, foram desbalanceados os nucleotídeos dGTP e dATP para concentração de 0,2mM e dCTP e dTTP para concentração 1mM, além do cofator MgCl₂ 7mM e MnCl₂ 0,3mM. O manganês, assim como o magnésio, auxilia na atividade enzimática da GoTaq, com a diferença que, por causa do seu tamanho menor, permite que nucleotídeos não pareáveis sejam adicionados na fita amplificada, favorecendo mutações. Além disso, como uma condição de baixa fidelidade tem propensão de adicionar dGTP e dATP, estes nucleotídeos foram adicionados em menor concentração, visando minimizar propensão de mutações apenas para adeninas e guaninas. Estes desbalanços na reação padrão, portanto, visam a adição de mutações com o mínimo de viés possível, proporcionando uma variabilidade adequada para a seleção. Para confirmação da

amplificação, 5 μ L da reação foram utilizados para detecção de banda única na altura de 750pb.

Figura 16 – Foto de gel de eletroforese contendo duplicata de *epPCR*



Fonte: elaborado pelo autor. Na raia 1, controle negativo. Raias 2 e 3, bandas referentes ao gene scFv amplificado por *epPCR*. As bandas estão abaixo da altura de 750pb.

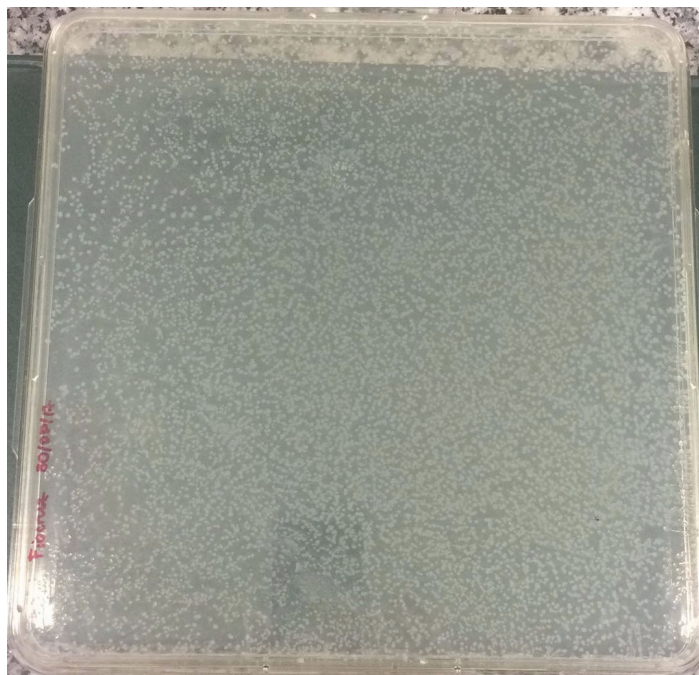
Essa diferença de migração pode ser associada ao corante de DNA utilizado, *Diamond™ Nucleic Acid Dye*, que pode afetar o padrão de migração do DNA. Porém, o sequenciamento de colônias aleatórias da biblioteca produzida confirmou a presença dos 726pb do gene scFv. O restante da reação (45 μ L) foi purificado, digerido e utilizado para clonagem em vetor para *phage display* e montagem da biblioteca scFv.

4.2 Clonagem da biblioteca *epPCR* scFv em vetor para *phage display*

A reação de ligação da T4 ligase foi transformada (2 μ L por transformação) em bactérias *E. coli* (TG1). Nesta etapa, é crucial que as bactérias possuam uma alta competência de transformação. A clonagem do gene scFv em vetor pHEN2 permite que os produtos de *epPCR* amplificados sejam contemplados na biblioteca. Portanto, uma alta eficiência de clonagem e alta competência garante que um grande volume de produtos de *epPCR* sejam inseridos em bactérias, aumentando a diversidade da biblioteca. Quanto maior a biblioteca, maior a diversidade e, conseqüentemente, maior a probabilidade de haver variantes scFv de alta afinidade ao antígeno.

A contagem de colônias, considerando os fatores de diluição aplicados, permite inferir que o tamanho total da biblioteca construída a partir do plaqueamento em placas de tamanho 15x15cm é de $1,4 \times 10^5$ células (FIGURA 17).

Figura 17 – Colônias da biblioteca scFv

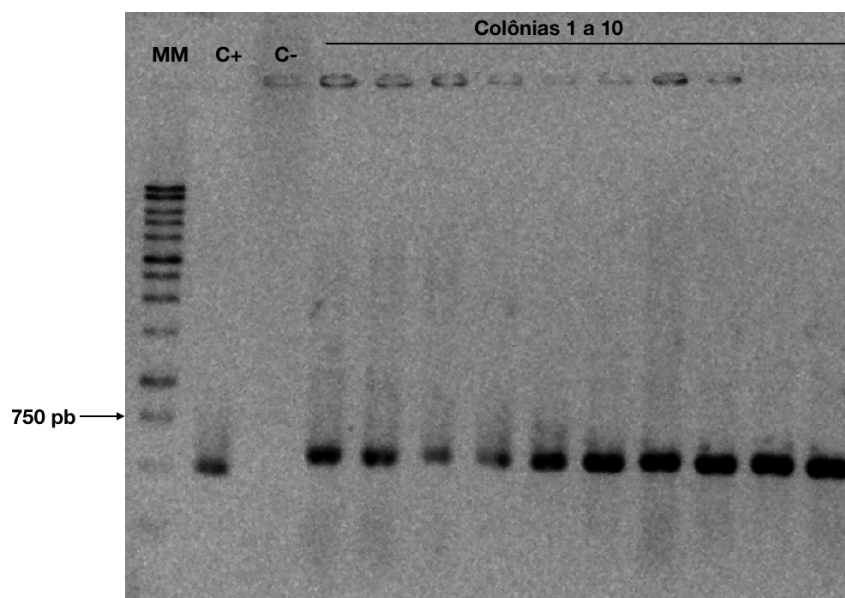


Fonte: elaborado pelo autor. Duas placas, cada uma contendo 7×10^4 células, foram construídas, totalizando uma biblioteca de $1,4 \times 10^5$ células.

A biblioteca visa a maturação da afinidade por evolução dirigida de um fragmento de anticorpo. Diferente de bibliotecas visando seleção de moléculas com alta afinidade a partir de uma diversidade de anticorpos que se ligam a diferentes epítopos, a biblioteca proposta neste trabalho tem origem a partir de um fragmento único, de um mesmo anticorpo (Rituximabe). Dessa forma, comparado a bibliotecas de peptídeos que podem chegar até 10^{10} UFC em tamanho, correspondendo a uma ampla diversidade, trabalhos na literatura mostram que, para maturação da afinidade, bibliotecas na faixa de 10^5 UFC são suficientes para obter vários mutantes de alta afinidade, com ganhos de até cem vezes em relação a afinidade da molécula nativa (JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2005; LEVIN; WEISS, 2006).

Análise de *PCR* de colônias aleatoriamente selecionadas (FIGURA 18) indicaram que todas as dez colônias continham o gene scFv.

Figura 18 – Foto do gel de agarose de *PCR* de colônias da biblioteca construída



Fonte: elaborado pelo autor. MM: marcador molecular, C+: controle positivo (vetor comercial com gene scFv), C-: controle negativo, C1 a 10: colônias da biblioteca. utilizando primers que se anelam no vetor pHEN2. As colônias foram amplificadas com primers que se anelam ao gene scFv. As dez colônias foram sequenciadas, conforme item 2.4.5, confirmando a presença do gene scFv.

O controle positivo e as colônias testadas foram amplificadas com *primers* que anelam no vetor pHEN2. As dez colônias aleatoriamente selecionadas para caracterização da biblioteca construída foram sequenciadas, utilizando os mesmos *primers*, por metodologia de Sanger, conforme descrito no item 3.5, confirmando a presença do gene scFv.

4.3 Produção de fagos scFv-pIII

A infecção do fago auxiliar confere resistência a canamicina, e o cultivo com este fago auxiliar, como já mencionado, garante a expressão, por parte da bactéria *E. coli* (TG1), das proteínas que compõem o vírus completo. Como a bactéria também possui o vetor pHEN2-scFv, cada bactéria, além de expressar as proteínas do vírus, vão expressar também a proteína pIII fusionada ao scFv, que também formará a cápsula viral. Cada bactéria possui uma variante scFv diferente, oriunda da clonagem do produto de *epPCR*. Portanto, fagos contendo diferentes variantes scFv na estrutura (fusionado à proteína pIII) são produzidos. Proteínas pIII não-fusionadas também compõem a estrutura do fago M13, expressas pelo fago auxiliar, mas em maior proporção do que proteínas pIII-scFv. Vale ressaltar que a proteína pIII-scFv só

é expressa em fusão pois a cepa TG1 não reconhece o códon *AMBER* como *stop codon*. Adicionalmente, esta cepa contém *pillus* sexual, que permite a infecção pelo vírus.

Os fagos produzidos a partir da biblioteca scFv tiveram concentração de $1,7 \times 10^{11}$ UFC/mL. Os valores são superiores a concentrações mínimas recomendadas para experimentos de *biopanning*, na ordem de 10^9 UFC/mL (NEW ENGLAN BIOLABS). Como a biblioteca construída possui tamanho de $1,4 \times 10^5$ UFC, é esperado que fagos na ordem de 10^{11} UFC/mL contemplem todos as variantes da biblioteca e os de maior afinidade podem, então, ser selecionados por *biopanning*.

4.4 Seleção de fagos por *biopanning*

Para a primeiro rodada, foram produzidos fagos a partir da biblioteca construída e estes fagos, então, são submetidos à etapa de *biopanning* contra o peptídeo sintético (tabela 2).

Tabela 2 – Dados do peptídeo sintético utilizado para *biopanning*

Sequência	Biotina-NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ
Peso molecular	3.075,48 Da
Pureza	95,6%
Concentração	1mg/mL em PBS pH 7,4

Fonte: elaborado pelo autor. Informações disponibilizadas pela empresa Biomatik, responsável pela síntese do peptídeo.

A quantidade de fagos utilizada ($300\mu\text{L}$ a $1,7 \times 10^{11}$ UFC/mL), denominada *input*, por ser muito maior do que o tamanho total da biblioteca ($1,4 \times 10^5$ UFC), teoricamente contempla todos os mutantes oriundos das bactérias transformadas. Após a primeira rodada de seleção, foi estimada uma quantidade menor de fagos selecionados, determinados a partir de diluição seriada, de 7×10^3 , determinada *output*. Essa drástica diminuição possivelmente se deve ao fato de que a maioria dos mutantes produzidos (e, conseqüentemente, dos fagos produzidos) são de baixa afinidade, proteínas defeituosas, truncadas ou simplesmente não funcionais, sendo, então, lavadas. Na tabela 3, pode-se observar a ordem de grandeza dos valores de título de entrada (*input*) e saída (*output*) de cada rodada.

Tabela 3 – Títulos de *input* e *output* de cada rodada contra peptídeo sintético

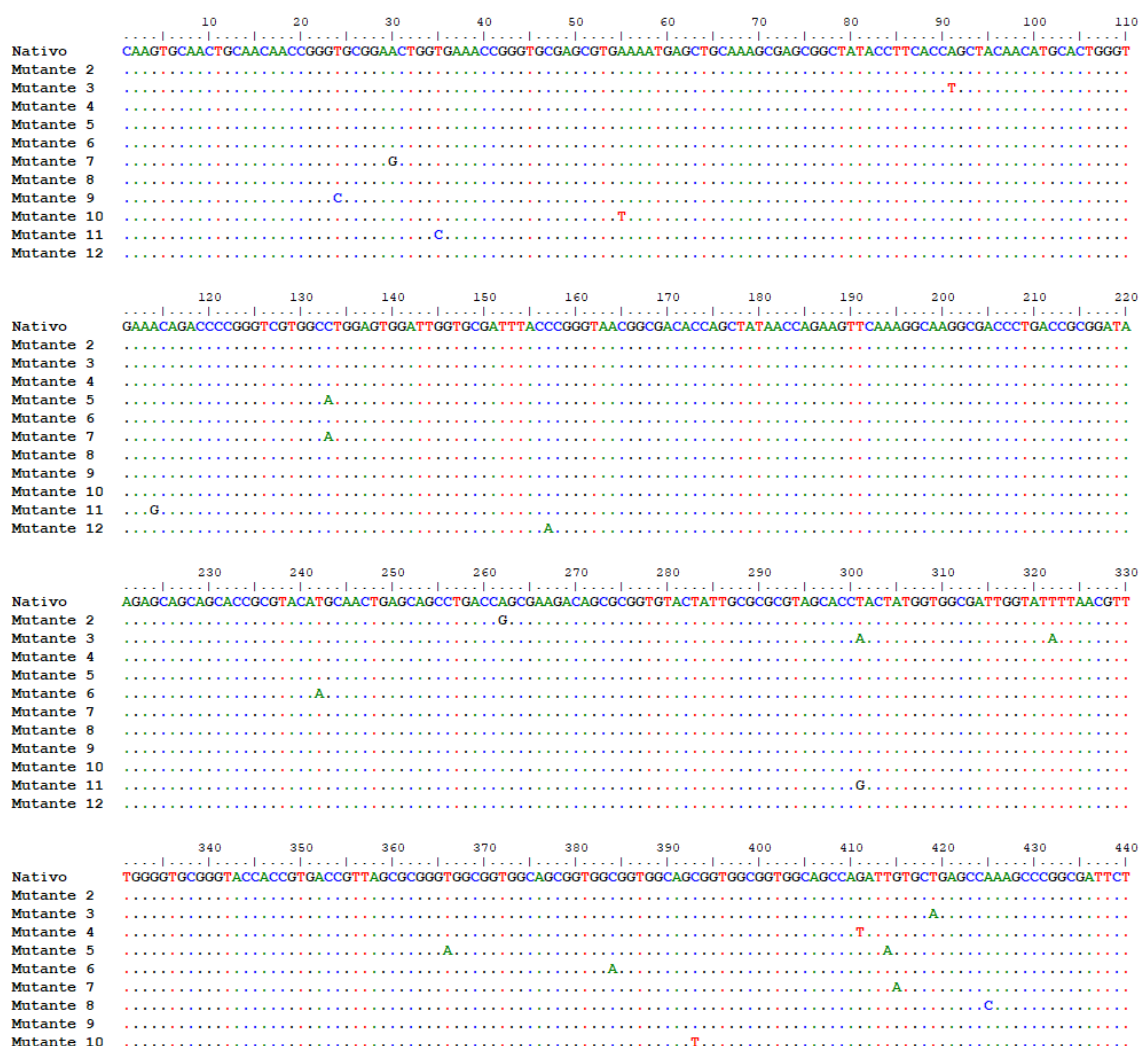
Rodada de seleção	<i>Input</i>	<i>Output</i>
1	5×10^{10}	7×10^3
2	$2,9 \times 10^{10}$	4×10^3
3	$2,5 \times 10^{10}$	$11,6 \times 10^3$

Fonte: elaborado pelo autor. A diminuição de fagos resultantes após cada etapa de seleção possivelmente se deve ao fato de que fagos de baixa ou nenhuma afinidade foram lavados. Após cada eluição, os fagos eluídos foram infectados em TG1 para produção de bactérias contendo estes fagos. Posteriormente, estes fagos foram amplificados para servirem como *input* para a etapa seguinte.

4.5 Sequenciamento de DNA da biblioteca construída

O sequenciamento foi utilizado para determinar a taxa de mutações contidas na biblioteca scFv construída. Conforme pode-se observar (FIGURA 19), mutações foram inseridas ao longo de toda a sequência scFv. Como estes mutantes foram aleatoriamente selecionados, as sequências não necessariamente representam proteínas funcionais, mas podem ser utilizadas como base para determinar se a condição de *epPCR* utilizada gera taxas de mutação condizentes com a otimização realizada para reação.

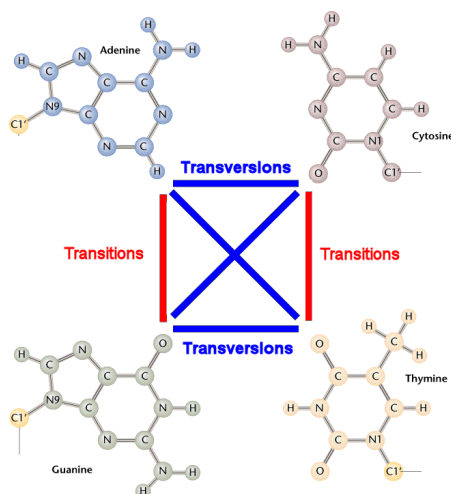
Figura 19 – Análise das mutações na sequência de DNA do gene scFv



Fonte: elaborado pelo autor. Foram utilizados 11 variantes aleatoriamente selecionados da biblioteca construída. As amostras foram sequenciadas a partir dos vetores pHEN-scFv utilizando *primers* que se anelam em regiões do vetor e que contemplam o sítio múltiplo de clonagem do gene scFv. Apenas 440 nucleotídeos estão destacados, pois o objetivo deste sequenciamento foi de determinar a taxa de mutação da condição de *epPCR* utilizada.

As sequências foram analisadas em *software* Bioedit e revelaram uma taxa de mutação de 0,55% ($\pm 0,24$), com uma média de 4 ($\pm 1,79$) mutações nos 726 pares de base que compõem a sequência scFv. A condição utilizada foi previamente proposta (CADWELL; JOYCE, 1992) visando igualar as taxas de transversão e transição (FIGURA 20), garantindo uma condição mutagênica com o mínimo de viés possível.

Figura 20 – Transições e transversões



Fonte: STEVEN, 2014. A troca de um nucleotídeo por outro (substituição) pode ser de dois tipos. Na transversão, nucleotídeos com bases nitrogenadas de dois anéis são trocadas por bases de um anel carbônico, ou vice e versa. Na transição, a troca é entre bases com mesmo número de anel carbônico na estrutura.

As condições de transição e transversão obtidas foram similares às condições descritas em alguns trabalhos pioneiros na área (CADWELL; JOYCE, 1992; GRAM *et al.*, 1992). A figura 21 resume as mutações encontradas.

Figura 21 – Resumo da análise das mutações em sequências scFv

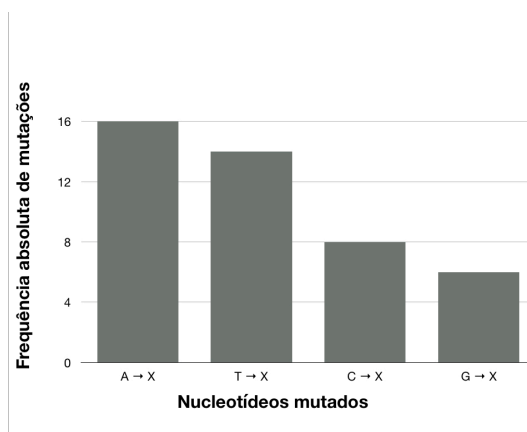
Amostra	Mutações	% mutações	Nucleotídeos na sequência nativa			
			A	T	C	G
2	2	0,28	G	C	-	-
3	6	0,83	T, T, T	A, A, A	-	-
4	2	0,28	G	-	-	T
5	6	0,83	G, T	A, A	A, T	-
6	6	0,83	T	A, A, A	A, T	-
7	4	0,55	G	C	A	A
8	1	0,14	C	-	-	-
9	4	0,55	G	C	T, Gap	-
10	3	0,41	T	-	T	T
11	6	0,83	G, G, G	G, C	-	T
12	5	0,69	G	A	A	A, A

Fonte: Elaborado pelo autor. A amostra 1 foi excluída da análise devido a baixa qualidade do sequenciamento, totalizando 11 amostras analisadas. O alinhamento foi feito em *software* Bioedit e a sequência

nativa foi obtida através de banco de dados (ID: 2OSL), correspondendo a porção scFv do Rituximabe. As colunas indicam por quais nucleotídeos os nucleotídeos A, T, C e G foram substituídos.

Os números de transição e transversão foram de 20 e 24, respectivamente, em um total de 45 mutações. Uma das mutações levou a formação de um *gap* na janela de leitura. Conforme mostrado (FIGURA 22), o nucleotídeo mais mutado foi a adenina e o menos mutado, guanina.

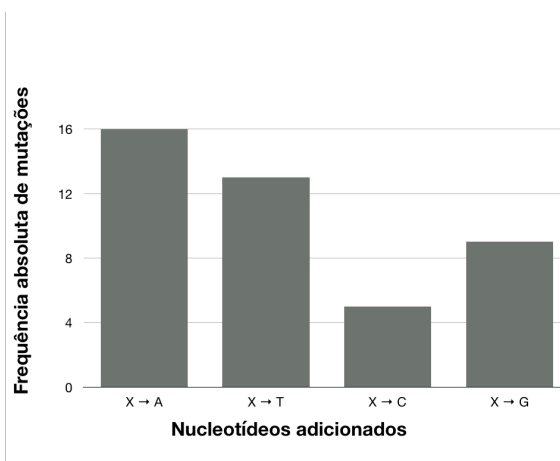
Figura 22 – Frequência, em números absolutos, de substituições.



Fonte: elaborado pelo autor. O nucleotídeo adenina sofreu o maior número de mutações, enquanto guaninas foram mutadas em menor proporção. Porém, o número de transversões e transições foi similar.

A maioria das mutações induziu a troca para adeninas e apenas uma pequena quantidade para citosinas (FIGURA 23).

Figura 23 – Frequência, em números absolutos de nucleotídeos substituídos



Fonte: Elaborado pelo autor. Apesar de adeninas e timinas terem sido mutadas em maior quantidade, a maioria das mutações gerou a substituição em adeninas e timinas.

As frequências de mutações encontradas na condição proposta se assemelham às obtidas em estudos de otimização, sugerindo ser suficiente para propósitos de randomização e geração de diversidade para maturação da afinidade de peptídeos (CADWELL; JOYCE, 1992)

Também utilizando o *software* Bioedit, a análise das sequências traduzidas (a nível de proteínas) foi feita, afim de verificar se houve indução de mutação em regiões específicas da estrutura primária do scFv. Conforme mostrado (FIGURA 24), basicamente toda a estrutura primária do scFv sofreu pelo menos uma mutação, incluindo as regiões CDR, que apresentam a maior variabilidade nos anticorpos e são as principais responsáveis pela interação, afinidade e especificidade ao antígeno. Espera-se que mutações nessa região produzam maior variabilidade em relação a valores de afinidade, e mutações em outras regiões, chamadas *framework*, tenham contribuição secundária na afinidade.

Figura 24 – Análise das mutações na estrutura primária do scFv



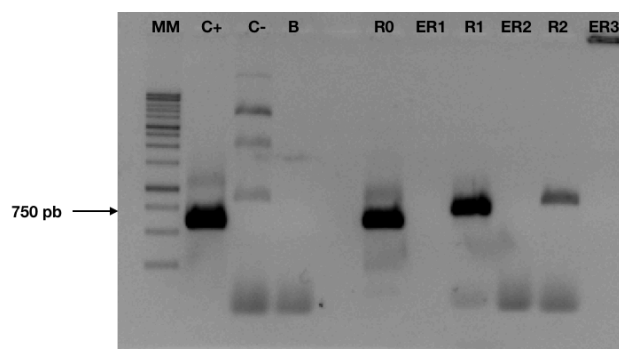
Fonte: Elaborado pelo autor. As sequências analisadas foram aleatoriamente selecionadas da biblioteca construída e não correspondem necessariamente a scFv funcionais. Observa-se que, dos vinte aminoácidos possíveis, apenas glutamato, leucina, arginina, serina, triptofano e tirosina não foram inseridos. A glicina substituiu o maior número de aminoácidos (quatro). Asparagina substituiu três. Alanina, cisteína e metionina substituíram dois. Outros aminoácidos substituíram apenas um. Possivelmente, outras sequências podem ter outros aminoácidos substituídos, já que o total de mutações analisadas não foi alto (vinte e quatro). Algumas mutações foram silenciosas e apenas uma resultou em *stop codon*.

Trabalhos mostram que, para moléculas scFv, o número médio de mutações no DNA que mais gera sequências funcionais é 3 em 726pb (DRUMMOND *et al.*, 2005), esperando-se gerar >34.000 sequências únicas e funcionais em uma única biblioteca, que serão selecionadas por *biopanning*. Taxas mais altas, mesmo que gerem maior variabilidade, podem gerar mutantes não funcionais ou de baixa estabilidade, e taxas muito baixas geram pouca diversidade. A taxa de mutação determinada neste trabalho se assemelha a outros em que moléculas scFv tiveram a afinidade maturada em até cem vezes (JUÁREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2012).

4.6 Sequenciamento de DNA das variantes scFv após rodadas de seleção

Após três etapas de seleção, dez bactérias resultantes de cada etapa de seleção tiveram seu DNA plasmidial submetido a sequenciamento. Inicialmente, nenhuma sequência scFv foi detectada e todas as bactérias selecionadas possuíam vetor pHEN2 vazio. Assim, para verificar se as etapas de seleção estavam gerando fagos-scFv funcionais, fagos de cada uma das etapas foram utilizados como molde para *PCR*, afim de detectar o gene scFv. Conforme a figura 25, pode-se observar que os fagos referentes a *inputs* amplificaram para o gene scFv, enquanto os eluídos, não. Os fagos eluídos (*output*) estão em baixíssima quantidade comparado aos fagos precipitados (*input*), o que pode explicar a ausência de amplificação de sinal quando aqueles são usados como molde para *PCR*.

Figura 25 – Gel de eletroforese da *PCR* com fagos-scFv



Fonte: elaborado pelo autor. C+: pHEN2-scFv; C-: pHEN2; R0, R1 e R2: fagos precipitados das rodadas 0, 1 e 2; ER1, ER2 e ER3: fagos eluídos das rodadas 1, 2 e 3.

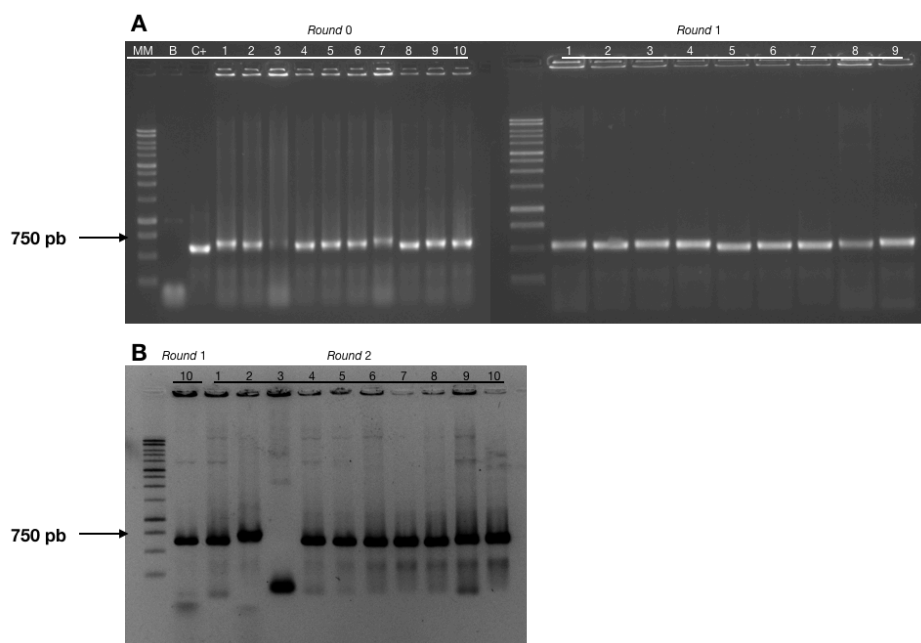
A fraca banda scFv após a rodada 2 sugere uma menor quantidade de fagos-scFv sendo selecionados, o que poderia explicar a ausência de vetores contendo gene scFv após a terceira etapa de seleção. Além da diminuição de sequências scFv devido à seleção (o que é esperado), o número de fagos contendo pHEN2 vazio pode ser amplificado, o que explicaria haver uma baixa quantidade de vetores vazios na biblioteca, mas um aumento considerável destes após três etapas de seleção.

Esses fagos inespecíficos (vazios) podem ser diminuídos de duas formas. Uma delas, pelo uso de uma quantidade maior de fagos auxiliares durante as etapas de amplificação. Um número baixo de fagos auxiliares subutiliza a biblioteca, fazendo com que apenas uma parcela das bactérias contendo mutantes scFv os respectivos fagos produzidos. Uma outra estratégia seria a execução das etapas de seleção de forma ininterrupta. Neste trabalho, cada etapa de seleção foi pausada após a infecção de bactérias com os fagos eluídos, estocando-se as bactérias referentes a estes fagos selecionados, para que então, posteriormente, fossem produzidos fagos para a próxima etapa. Segundo Barbas (BARBAS III *et al*, 2001), moléculas de scFv expressas na superfície de fagos têm pouca estabilidade estrutural, sugerindo-se executar as etapas de seleção (*biopanning*) de forma ininterrupta, afim de evitar quaisquer perdas de fagos-scFv ligantes, que podem se desestabilizar antes de serem selecionados.

Até o momento desta dissertação, apenas dois dos três rodadas de seleção executados tiveram seus fagos precipitados. Portanto, com o objetivo de determinar as sequências que foram submetidas às rodadas 1 e 2, as bandas foram excisadas com ajuda de lâmina e clonadas em vetor pGEM para posterior sequenciamento, bem como a banda referente a R0 (fagos precipitados da biblioteca, sem nenhuma seleção). Uma comparação de sequências scFv entre as primeiras e últimas etapas pode ajudar na interpretação da contribuição de mutações pontuais para aumento de afinidade entre fagos-scFv e o peptídeo sintético.

Após clonagem em vetor pGEM T-Easy®, também foi feita *PCR* para confirmação da presença do gene scFv, utilizando *primers* scFv (FIGURA 26).

Figura 26 – Géis de *PCR* de colônias pGEM-scFv



Fonte: elaborado pelo autor. A: colônias da rodada 0 e rodada 1; B: colônias da rodada 2.

4.7 Contribuição de mutações pontuais para a afinidade do scFv ao peptídeo loop-CD20

A análise do sequenciamento das duas etapas de seleção e da rodada 0 (biblioteca) sugere o enriquecimento de sequência com determinadas mutações pontuais. De todas as vinte e nove sequências analisadas (dez R0, dez R1 e nove R2), dezesseis dos vinte aminoácidos essenciais possíveis foram aleatoriamente inseridos nas sequências. Conforme pode-se observar na tabela 4, o número de sequências nativas foi maior após a rodada 1, o que pode ser explicado pois na rodada 0 muitas sequências podem ser deletérias e são diminuídas conforme acontece a seleção.

Tabela 4 – Frequência de mutações por sequência

Rodada 0 (variante)	Número de mutações	Rodada 1 (variante)	Número de mutações	Rodada 2 (variante)	Número de mutações
1	3	1	0	1	3
2	2	2	2	2	3
3	3	3	3	3	4
4	3	4	2	4	6
5	3	5	2	5	0
6	0	6	0	6	0
7	0	7	0	7	0
8	3	8	0	8	2
9	2	9	3	9	4
10	4	10	4	-	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Na análise acima foram desconsiderados *gaps* de sequências que acarretariam em uma mudança na janela de leitura. A opção de desconsiderar esses *gaps* foi determinada devido ao fato de que as sequências analisadas foram amplificadas a partir de fagos-scFv utilizando uma enzima propensa à adição destes *gaps* (GoTaq). Porém, a análise dessas sequências visou apenas a observação do gene scFv mutado, como forma de acompanhamento da seleção, e não serão consideradas para experimentos futuros de caracterização bioquímica. Das nove sequências analisadas da rodada 2, cinco apresentaram estes *gaps* e quatro não. Portanto, como as sequências a partir desta rodada tem potencial para posterior análise bioquímica, apenas aquelas sem *gaps* ou *stop* códon foram analisadas.

Das quatro sequências analisadas, duas são iguais, resultando em três sequências diferentes. A posição exata dos aminoácidos não será detalhada por questões de propriedade intelectual. Duas das quatro sequências (MUT1 e MUT2) apresentaram três mutações, uma delas (MUT3) quatro mutações e uma delas (MUT4) seis mutações.

Interessantemente, MUT4 apresentou duas das três mutações de MUT1/MUT2, três das quatro mutações de MUT3 e uma mutação exclusiva. Essa incorporação de mutações observada no MUT4 pode ser um indicativo de que essas mutações individualmente são benéficas e, juntas, também podem contribuir para o aumento da afinidade de interação entre o scFv e o peptídeo sintético.

Cinco mutações de MUT4 foram em regiões de *framework* e uma em CDR. A CDR é a região do scFv que mais possui aminoácidos que contribuem para a especificidade e afinidade da molécula. Portanto, essa mutação pode afetar diretamente a interação entre resíduos do paratopo e do epítipo. Das mutações observadas, uma levou à troca de uma metionina para isoleucina (ambos hidrofóbicos), uma de ácido glutâmico para glicina (um de cadeia lateral ácida para um aminoácido de cadeia lateral pequena, que pode conferir uma maior grau de liberdade), uma de serina para glicina (cadeia lateral nucleofílica para cadeia lateral pequena), uma de alanina para valina (cadeia pequena e flexível para aminoácido hidrofóbico), uma de isoleucina para asparagina (hidrofóbico para um polar não carregado com grupo amida), uma de tirosina para histidina (cadeia aromática, que ocupa grande espaço, para um básico) e uma treonina para prolina (aminoácido nucleofílico para um hidrofóbico).

As mutações em região de *framework* podem estar envolvidas na interface entre V_H e V_L (principalmente aminoácidos hidrofóbicos), com interações com o epítipo ou como suporte estrutural para que as CDR possam interagir com o antígeno (neste caso, uma maior flexibilidade pode favorecer esta conformação) (CULANG *et al.*, 2013). Portanto, melhoras na conformação e orientação das CDRs podem ser obtidos através de alterações nos resíduos dessas regiões. Apesar disso, outras análises estruturais detalhadas precisam ser feitas para confirmar essas interações, através de bioinformática estrutural.

Ainda que duas etapas de seleção tenham levado a identificação de mutações em maior frequência, o que é uma sugestão de aumento de afinidade entre o scFv e o peptídeo sintético, outras etapas de seleção serão feitas com o intuito de observar se alguma destas mutações serão mais enriquecidas ao longos da seleção.

Observou-se também a presença de duas mutações iguais das dezesseis mutações observadas na rodada 0 (que é a rodada que deveria conter o maior número de variabilidade), indicando que o número de fagos produzidos para seleção por *biopanning* não tenha representado toda a diversidade da biblioteca. Neste caso, pode-se repetir a seleção aumentando a quantidade de fagos auxiliares, aumentando, assim, o número de bactérias infectadas da biblioteca.

Das mutações observadas, apenas uma delas, presente em duas das quatro sequências elencadas como potenciais scFv de alta afinidade, foi em região CDR, e as outras em região *framework*. Para comprovar a contribuição dessas mutações para ganhos de afinidade, ainda são necessários testes para quantificação de afinidade. Para isso, o uso de técnicas quantitativas como Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) se faz necessário. Esta técnica se baseia na observação da interação entre proteínas e seus respectivos ligantes através

do desvio da luz entre os estados ligado e não-ligado. Assim, devido a capacidade de diferenciar entre moléculas ligadas e não ligadas, é possível determinar as constantes de associação (K_a) e dissociação (K_d) das moléculas alvo, sendo esta última útil para determinar o potencial da molécula como indutora de mecanismos efetores, como CDC e ADCC.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A biblioteca construída a partir da reação de *epPCR* possui tamanho adequado para seleção por *phage display* visando maturação da afinidade. Após análise de *input* e *output* de fagos utilizados no *biopanning*, pode-se observar uma diminuição na quantidade de fagos, referente a lavagem de moléculas não-ligantes ao antígeno loop-CD20. As mutações analisadas por sequenciamento possuem uma taxa condizente com aqueles reportados em outros trabalhos em que diferentes moléculas scFv foram desenvolvidas através da maturação da afinidade. Após duas etapas de seleção, três sequências de scFv distintas foram analisadas e observou-se um aumento na frequência de sete mutações, com um dos mutantes contendo seis destas. Análises estruturais por bioinformática e caracterização bioquímica e biológica por ELISA, citometria e ressonância plasmônica poderão confirmar a contribuição dessas mutações para um aumento da afinidade.

Moléculas scFv são bastante versáteis, podendo ser utilizadas para a construção de anticorpos completos ou outras moléculas visando aplicações terapêuticas. Para anticorpos completos, ganhos de afinidade podem ser benéficos do ponto de vista terapêutico. Para bispecíficos e CARs, o direcionamento de mecanismos efetores através de um scFv de alta afinidade pode potencializar a resposta ao alvo com relação ao scFv nativo do Rituximabe.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 7ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, *S.l., s.n.*, 2010.
- AHMADZADEH, V.; FARAJNIA, S.; HOSSEINPOUR FEIZI, M. A.; KHAVARINEJAD, R. A. **Design, expression and characterization of a single chain anti-CD20 antibody; A germline humanized antibody derived from Rituximab**. Protein Expression and Purification, *S.l., s.n.*, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada Nº 55, de 16 de dezembro de 2010, Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, dezembro 2010.
- BARBAS, C.F. III.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. **Phage display: a laboratory manual**, *S.l., s.n.*, 2001.
- BARTEL, M.; SCHAFFER, D.; BÜNING, H. **Enhancing the clinical potential of aav vectors by capsid engineering to evade pre-existing immunity**. Frontiers in Microbiology, *S.l., s.n.*, 2011.
- Bioprocess Technology Consultants. **Woburn (MA): Bioprocess Technology Consultants, Inc.** bioTRAK Database, setembro 2014. Disponível em: <http://www.bptc.com/pipelinedatabases.php>. Acesso em: 24 out. 2016.
- BREKKE, O. H.; SANDLIE, I. **Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century**. Nature Reviews Drug Discovery, *S.l., s.n.*, 2003.
- BUBIEN, J. K.; ZHOU, L. J.; BELL, P. D.; FRIZZELL, R. A.; TEDDER, T. F. **Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes**. Journal of Cell Biology, *S.l., s.n.*, 1993.
- BYRD, J. C.; PETERSON, B. L.; MORRISON, V. A.; et al. **Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: Results from cancer and leukemia group B 9712 (CALGB 9712)**. Blood, *S.l., s.n.*, 2003.
- CADWELL, R. C.; JOYCE, G. F. **Randomization of genes by PCR mutagenesis**, PCR Methods Appl. v. 2, p. 28–34, 1992.
- CAMBRICOLI, F. **Em cinco anos, gasto com tratamento contra câncer cresceu 66%**. Ago 2016. Disponível em: <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,em-cinco-anos-gastocom-tratamento-contracancer-cresceu-66,10000069529>. Acesso em: 27 out. 2016.
- CHAMES, P.; REGENMORTEL, M. VAN; WEISS, E.; BATY, D. **Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future**. British Journal of Pharmacology, v. 157, n. 2, p. 220–233, 2009.
- CRAGG, M.S. **CD20 Antibodies: doing the time wrap**. Blood, v. 118, n. 2, p. 219-220,

2011.

CRAGG, M.S.; GLENNIE, M.J. **Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents.** *Blood*, v. 103, n. 7, p. 2738-2743, 2004.

COIFFIER, B.; LEPAGE, E.; BRIERE, J.; et al. **CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma.** *The New England Journal of Medicine*, *S.l., s.n.*, 2002.

CULANG, I.S.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. **The structural basis of antibody-antigen recognition.** *Frontiers in Immunology*, v. 4, p. 1-13, 2013.

DIMASI, J. A.; FELDMAN, L.; SECKLER, A.; WILSON, A. **Trends in risks associated with new drug development: Success rates for investigational drugs.** *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *S.l., s.n.*, 2010.

DRUMMOND, D. A.; IVERSON, B. L.; GEORGIU, G.; ARNOLD, F. H. **Why high-error-rate random mutagenesis libraries are enriched in functional and improved proteins.** *Journal of Molecular Biology*, *S.l., s.n.*, 2005.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. **The therapeutic monoclonal antibody market.** *mAbs*, *S.l., s.n.*, 2015.

FOLTZ, I. N.; KAROW, M.; WASSERMAN, S. M. **Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies what cardiologists need to know.** *Circulation*, v. 127, n. 22, p. 2222–2230, 2013.

FONSECA, M. H. G.; FURTADO, G. P.; BEZERRA, M. R. L.; PONTES, L. Q.; FERNANDES, C. F. C. **Boosting half-life and effector functions of therapeutic antibodies by Fc-engineering: An interaction-function review.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 119, p. 306–311, 2018.

GHIELMINI, M.; SCHMITZ, S.-F. H.; COGLIATTI, S. B.; et al. **Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule.** *Blood*, *S.l., s.n.*, 2004.

GRAM, H.; MARCONI, L. A.; BARBAS, C. F.; et al. **In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *S.l., s.n.*, 1992.

GRIFFITHS, A. D.; WILLIAMS, S. C.; HARTLEY, O.; et al. **Isolation of High-Affinity Human-Antibodies Directly from Large Synthetic Repertoires.** *Embo Journal*, 1994.

HABERMANN, T. M.; WELLER, E. A.; MORRISON, V. A.; et al. **Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *Journal of Clinical Oncology*, *S.l., s.n.*, 2006.

HARRIS, L. J.; LARSON, S. B.; MCPHERSON, A. **Comparison of Intact Antibody Structures and the Implication for Effector Functions.** *Advances in Immunology*, v. 72, n.

066/30, p. 191–208, *S.l., s.n.*, 1999.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** *Nature biotechnology*, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 2005.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. **Development of anti-infectives using phage display: Biological agents against bacteria, viruses, and parasites.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, S.l., s.n.*, 2012.

HUHN, D.; SCHILLING, C. VON; WILHELM, M.; et al. **Rituximab therapy of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.** *Blood, S.l., s.n.*, 2001.

JAZIREHI, A. R.; VEGA, M. I.; CHATTERJEE, D.; GOODGLICK, L.; BONAVIDA, B. **Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, BCL-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab.** *Cancer Research, S.l., s.n.*, 2004.

JUÁREZ-GONZÁLEZ, V. R.; RIAÑO-UMBARILA, L.; QUINTERO-HERNÁNDEZ, V.; et al. **Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: A strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2.** *Journal of Molecular Biology*, v. 346, n. 5, p. 1287–1297, *S.l., s.n.*, 2005.

KAYMAKCALAN, Z.; SAKORAFAS, P.; BOSE, S.; et al. **Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor.** *Clinical Immunology, S.l., s.n.*, 2009.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** *Nature, S.l., s.n.*, 1975.

LEVIN, A. M.; WEISS, G. A. **Optimizing the affinity and specificity of proteins with molecular display.** *Molecular BioSystems*, v. 2, n. 1, p. 49–57, 2006.

LEVISSON, M. et al. **Phage display of engineering binding proteins.** *Methods Mol Biol*, v. 29, *S.l., s.n.*, 2014.

LIU, J. L.; HU, Z. Q.; XING, S.; et al. **Attainment of 15-fold higher affinity of a fusarium-specific single-chain antibody by directed molecular evolution coupled to phage display.** *Molecular Biotechnology*, v. 52, n. 2, p. 111–122, 2012.

LORENZ, H.M. **Technology evaluation: adalimumab, Abbott laboratories.** *Current opinion in molecular therapeutics*, v. 4, p. 185-190, 2002.

MALONEY, B. D. G.; GRILLO-LO, A. J.; WHITE, C. A.; et al. **IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma.** *Blood*, v. 8, p. 2188–2195, 1997.

MARCUS, R.; IMRIE, K.; BELCH, A.; et al. **CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma.** *Blood*,

S.l., s.n., 2005.

MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G.; CHISWELL, D. J. **Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains**. *Nature*, *S.l., s.n.*, 1990.

MCLAUGHLIN, P.; GRILLO-LÓPEZ, A. J.; LINK, B. K.; et al. **Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: Half of patients respond to a four-dose treatment program**. *Journal of Clinical Oncology*, *S.l., s.n.*, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil. Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional do Câncer, *S.l., s.n.*, 2017.

MOTTA, G.; CEA, M.; MORAN, E.; et al. **Monoclonal antibodies for non-Hodgkin's lymphoma: state of the art and perspectives**. *Clinical & developmental immunology*, v. 2010, p. 428253, 2010.

MÜLLER, T.; UHEREK, C.; MAKI, G.; et al. **Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells**. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 57, n. 3, p. 411–423, 2007.

NEW ENGLAND BIOLABS. Ph.D. **Phage Display Libraries: Instruction Manual**. Protein Tools. *S.l., s.n.*

REFF, M. E.; CARNER, K.; CHAMBERS, K. S.; et al. **Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20**. *Blood*, *S.l., s.n.*, 1994.

SCHIRRMANN, T.; MEYER, T.; SCHÜTTE, M.; FRENZEL, A.; HUST, M. **Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy**. *Molecules*, v. 16, n. 1, p. 412–426, 2011.

SMITH, M. R. **Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): Mechanisms of action and resistance**. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7359–7368, 2003.

SPASEVSKA, I. **An outlook on bispecific antibodies : Methods of production and therapeutic benefits**. *BioSciences Master Reviews*, p. 1–7, *S.l., s.n.*, 2014.

STASHENKO, P.; NADLER, L. M.; HARDY, R.; SCHLOSSMAN, S. F. **Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen**. *Journal of immunology*, *S.l., s.n.*, 1980.

STEVEN, M.C. **Transition versus Transversion mutations**. Memorial University (2014). Disponível em: https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html. Acesso em: 12 out. 2018.

STROHL, W. R. **Current progress in innovative engineered antibodies**. *Protein and Cell*, v. 9, n. 1, p. 86–120, 2018. Higher Education Press.

THIE, H.; VOEDISCH, B.; DÜBEL, S.; HUST, M.; SCHIRRMANN, T. **Affinity maturation by phage display**. *Methods in Molecular Biology*, *S.l., s.n.*, 2009.

WALSHE, C. A; BEERS, S. A; FRENCH, R. R.; et al. **Induction of cytosolic calcium flux**

by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. The Journal of biological chemistry, *S.l., s.n.*, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, Country and Region.** World Bank List of Economies (2017). Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 02 set. 2018.

APÊNDICE A – REAÇÕES ENZIMÁTICAS

1. DIGESTÃO DE pET28a E PUC-scFv

10U de *NheI*

10U de *BamHI*

2µL de Tampão Multicore 10X

2µL de solução albumina 10X

~1µg de amostra de DNA (pUC-scFv ou pET28a)

2. REAÇÃO COM T4 LIGASE

a. Para ligação pET28a e scFv foi utilizada a fórmula:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ vetor \times tamanho\ do\ inserto\ (kb) \times razão\ (inserto:vetor)}{tamanho\ do\ vetor\ (kb)}$$

Foram utilizados 100ng de vetor em proporção 5:1 (inserto:vetor). Portanto, a reação (20µL) foi composta de:

Vetor pET28a digerido = ~100ng

Inserto scFv digerido = ~110ng

Tampão *T4 ligase* 10X = 2µL

T4 ligase = 1µL

b. Para a ligação pHEN2 e epPCR, foi utilizado, para uma reação de 20µL:

Vetor pHEN2 digerido = 50ng

Inserto epPCR digerido = 150ng

Tampão *T4 Ligase* 10X = 2µL

T4 ligase = 1µL

APÊNDICE B – PROTOCOLO MODIFICADO DE PURIFICAÇÃO DE DNA UTILIZANDO KIT

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Start-Up – Promega

1. Recortar as bandas referentes ao vetor linearizado e adiciona-las em tubos de 1,5mL. Em caso de soluções, utilizar pelo menos 100µL de solução (adicionar água ultrapura caso tenha menos de 100µL)
2. Adicionar 2µL de Solução de Ligação para cada 1mg de fragmento de gel ou para cada 1µL de solução de produto de PCR. Misturar em vórtex e incubar a 50-65°C até o gel dissolver completamente
3. Inserir a minicoluna SV em um tubo de coleta
4. Transferir a mistura do gel dissolvido para o arranjo da minicoluna. Incubar em temperatura ambiente por 1min
5. Centrifugar a 8.000 xg por 1min
6. Adicionar o líquido eluído novamente na coluna e centrifugar novamente conforme passo 5
7. Descartar o eluído
8. Adicionar 700µL da Solução de Lavagem. Centrifugar a 9.000 xg por 1min. Descartar o eluído e reinserir a coluna no tubo de coleta
9. Repetir o passo anterior, porém utilizando 500µL da Solução de Lavagem
10. Centrifugar por 9.000 xg por 5min
11. Centrifugar novamente a 9.000 xg por 1 minuto com a tampa da microcentrífuga aberta. Deixar o arranjo de coluna em temperatura ambiente para evaporação de etanol residual
12. Cuidadosamente, transferir a minicoluna para um microtubo estéril de 1,5mL
13. Realizar duas eluições de 25µL de água ultrapura cada, centrifugando a 16.000 xg por 1min em cada eluição. OBS: utilizar água pré-aquecida a 65°C e, na primeira eluição, deixar a água incubando com a coluna em temperatura ambiente por 1min antes de centrifugar.
14. Quantificar o DNA e armazenar em -20°C