



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

IGOR CABRAL STUDART

**ETAPAS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO CONJUGADO
A DROGA: SELEÇÃO DE DOMÍNIOS VARIÁVEIS ANTI-CD19 E MANIPULAÇÃO
DOS DOMÍNIOS CONSTANTES PARA CONJUGAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA**

FORTALEZA

2022

IGOR CABRAL STUDART

ETAPAS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO CONJUGADO A
DROGA: SELEÇÃO DE DOMÍNIOS VARIÁVEIS ANTI-CD19 E MANIPULAÇÃO DOS
DOMÍNIOS CONSTANTES PARA CONJUGAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA

Dissertação de mestrado apresentada 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: Engenharia de Anticorpos.

Orientador: Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

FORTALEZA

2022

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)

S922e Studart, Igor Cabral.
Etapas iniciais do desenvolvimento de um anticorpo conjugado a droga: seleção de domínios variáveis anti-CD19 e manipulação dos domínios constantes para conjugação sítio-específica / Igor Cabral Studart. – 2022. 81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. conjugados anticorpo-droga. 2. phage display. 3. CD19. 4. FvFc. I. Título.

CDD 660.6

IGOR CABRAL STUDART

ETAPAS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO DE UM ANTICORPO CONJUGADO A
DROGA: SELEÇÃO DE DOMÍNIOS VARIÁVEIS ANTI-CD19 E MANIPULAÇÃO DOS
DOMÍNIOS CONSTANTES PARA CONJUGAÇÃO SÍTIO-ESPECÍFICA

Dissertação de mestrado apresentada 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: Engenharia de Anticorpos.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lana Grasiela Alves Marques
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Natália, minha companheira de vida, e aos meus amigos e professores, Larissa Queiroz e Marcus Rafael.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela excelente orientação científica e apoio em todos os aspectos. Uma pessoa admirável, de cujo grupo tenho o privilégio de fazer parte e a quem sou grato por todas as oportunidades.

À Dra. Cláudia do Ó Pessoa e à Dra. Lana Grasiela Marques por aceitarem o convite para participarem da minha banca de defesa de dissertação.

À Dra. Andrea Maranhão, pela parceria e pelas fundamentais contribuições aos projetos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, além de ser uma pessoa incrível e inspiradora, um grande referencial para mim.

À Dra. Suelen de Medeiros pelas valorosas contribuições, por todo apoio, tendo se tornando, cada vez mais, para mim, uma grande amiga.

À Fiocruz pela infraestrutura, à Funcap pelo apoio financeiro, e a todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da UFC.

Ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas, por ter me proporcionado a primeira oportunidade como IC, e aos membros do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), pela parceria e pela infraestrutura compartilhada.

Aos incríveis amigos e parceiros do Grupo de Engenharia de Proteínas da Fiocruz, Bruna Lima, Larissa Queiroz, Larisse Cadeira, e Marcus Rafael, pelos ensinamentos e todo apoio prestado sempre.

A todos os queridos amigos da Fiocruz Ceará: Agnes, Angela, Beatriz, Bruni, Camila Silos, Camila Alves, Daniel, Eduarda, João Pedro, Lívia, Maísa, Marcelo, Maurício, Thália, Vanessa, Venúcia, Vívian, Virgínia e Yara.

Aos amigos que encontrei logo no início e que me acompanharam ao longo desse novo caminho, em especial, Diego Petrola, Guilherme Veloso e Marcella Torres, sem os quais teria sido muito menos iluminada e valorosa a caminhada.

À minha família, sobretudo à minha mãe, Marcilda, e aos meus sogros, Dona Graça e Sr. Ivan, sem os quais o mundo nem existiria.

À minha companheira, Natália, por dividir e construir comigo a vida, pela confiança e parceria a cada passo, sem a qual não haveria sol; e à Elis e Hannah, por me ensinarem a ser melhor e fazerem com que eu me sinta tão útil e insubstituível todos os dias.

Em outras palavras, a Deus!

“Somos feitos de pequenos fragmentos de sabedoria”. (Umberto Eco)

RESUMO

A baixa especificidade dos quimioterápicos oncológicos convencionais e a recalcitrância típica de células tumorais impõem frequentemente o uso de agentes citotóxicos potentes em dosagens próximas ao máximo tolerado, atingindo tecidos saudáveis e provocando efeitos colaterais intensos. Na corrida por estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras, os produtos biotecnológicos vêm ganhando cada vez mais protagonismo, com destaque para os anticorpos monoclonais (mAbs) e seus derivados. A plasticidade e a capacidade dessas proteínas de se ligarem com alta afinidade a alvos específicos determinam sua utilidade na proposição de novas terapias, não só no contexto oncológico, mas também contra doenças inflamatórias e infecciosas. Uma estratégia valiosa é o aproveitamento da especificidade do mAb para a entrega alvo-dirigida de drogas potentes e inespecíficas, de modo que sua liberação e atividade fiquem restritas às células ou aos microambientes almejados. Os conjugados anticorpo-droga (ADCs) são constituídos de unidades de pequenas moléculas citotóxicas ligadas covalentemente a um mAb por meio de um conector químico (*linker*). Os 3 elementos (mAb, *linker* e droga) cumprem papéis cruciais na eficácia e segurança de um ADC, sendo o método de conjugação utilizado um parâmetro determinante para sua reprodutibilidade. Diferentes técnicas de engenharia de proteínas permitem a obtenção de ADCs quimicamente homogêneos e de alta especificidade. Neste estudo, sequências do fragmento variável (Fv) de mAbs foram selecionadas via *phage display*, e sequências mutantes do fragmento cristalizável (Fc) foram gerados por mutagênese sítio-dirigida, objetivando-se a proposição de um FvFc anti-CD19 (alvo de malignidades de células B) contendo resíduos de cisteína engenheirados para a conjugação sítio-específica de agente citotóxico através de *linker* tiol-reativo. Uma biblioteca de fagos foi desafiada contra células que expressam a proteína CD19 em sua superfície, ao longo de múltiplas rodadas. As sequências mais enriquecidas foram obtidas por Sequenciamento de Nova Geração (NGS), sendo selecionadas para a proposição de 2 fragmentos anti-CD19 a serem produzidos e caracterizados. Paralelamente, pontos para substituição por cisteínas na porção Fc de IgG1 humano foram obtidos da literatura e utilizados para geração, por PCR mutagênica, de duas sequências gênicas de Fc mutantes independentes (N421C e S239C). As mutações foram confirmadas por sequenciamento de Sanger e serão utilizadas para produção e caracterização dos FvFcs quanto à adequabilidade para a conjugação e atividade biológica.

Palavras-chave: conjugados anticorpo-droga; *phage display*; CD19; FvFc.

ABSTRACT

The low specificity of conventional oncologic chemotherapy and the typical tumor cell recalcitrance often require the use of potent cytotoxic agents at dosages close to the maximum tolerated, reaching healthy tissues and causing intense side effects. In the search for more effective and safe therapeutic strategies, biotechnological products have become more and more important, especially monoclonal antibodies (mAbs) and their derivatives. Plasticity and the ability of these proteins to bind with high affinity to specific targets determine their usefulness in proposing new therapies, not only in the cancer context, but also against inflammatory and infectious diseases. A valuable strategy is to take advantage of the specificity of mAb for the targeted delivery of unspecific and potent drugs, so that its release and activity are restricted to the desired cells or microenvironments. Antibody-drug conjugates (ADCs) consist of small cytotoxic molecules covalently linked to a mAb by means of a chemical connector (*linker*). The 3 components (mAb, *linker* and drug) play crucial roles in the efficacy and safety of ADCs, with the conjugation method being a determining parameter for their reproducibility. Different protein engineering techniques allow for chemically homogeneous and highly specific ADCs. In this study, sequences of the variable regions of mAbs were selected via phage display as well as mutant sequences of the crystallizable fragment (Fc) were generated by site-directed mutagenesis, aiming to propose an anti-CD19 (target of B cell malignancies) FvFc containing cysteine residues engineered for site-specific conjugation of cytotoxic agent via thiol-reactive *linker*. A phage library was challenged against cells expressing CD19 protein on their surface, over multiple rounds of selection. The most enriched sequences were obtained by New Generation Sequencing (NGS), being selected for the proposition of 2 anti-CD19 fragments to be produced and characterized. In parallel, points for cysteine mutation in the human IgG1 Fc portion were obtained from the literature and used for generation, by mutagenic PCR, of two independent mutant Fc gene sequences (N421C and S239C). The mutations were confirmed by Sanger sequencing and will be used for the production and characterization of FvFcs regarding the suitability for conjugation and biological activity.

Keywords: antibody-drug conjugates; phage display; CD19; FvFc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução dos anticorpos monoclonais terapêuticos.....	19
Figura 2 – Elementos básicos dos ADCs	21
Figura 3 – Heterogeneidade do pool de ADCs decorrente do método de conjugação.....	23
Figura 4 – Representação esquemática da conjugação via maleimida.....	23
Figura 5 – Representação esquemática de anticorpo IgG1 (~150 KDa).....	25
Figura 6 – Recombinação V(D)J do gene da cadeia pesada de anticorpos	26
Figura 7 – Representação esquemática dos fragmentos Fab (~50 KDa) e scFv (~25 KDa)....	27
Figura 8 – Representação esquemática do fragmento FvFc (~100 kDa)	28
Figura 9 – Representação esquemática de diferentes sistemas de phage display.....	30
Figura 10 – Representação esquemática do processo de phage display.....	31
Figura 11 – Vetor pComb3XSS-Fab	37
Figura 12 – Representação esquemática da diluição seriada para titulação de input.....	40
Figura 13 – Representação esquemática da diluição seriada para titulação de output.....	41
Figura 14 – Representação esquemática do método BRASIL	43
Figura 15 – Vetores de trabalho	48
Figura 16 - Apresentação esquemática da técnica de MSD aplicada.....	51
Figura 17 – Análise da expressão de CD19 na membrana das células K562.....	55
Figura 18 – Estratégia de produção de fagos-Fab	57
Figura 19 – Gel de agarose 1% para a PCRs de amplificação das sequências V _H e V _L	61
Figura 20 – Gel de Agarose 2% para avaliação da purificação das bandas excisadas do gel ..	62
Figura 21 – Gel de agarose 0,8% para análise das PCRs mutagênicas	68
Figura 22 – Alinhamento global entre as sequências Fc mutantes e a sequência Fc nativa.....	69
Figura 23 – Trecho dos eletroferogramas dos sequenciamentos de Sanger.....	70
Figura 24 - Reação de adição de Michael e de hidrólise do anel de succinimida	73
Figura 25 – Mutações avaliados no trabalho envolvendo a N421C	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de ADCs aprovados pela FDA	24
Tabela 2 – <i>Primers</i> para amplificação das sequências V _H e V _L selecionadas	44
Tabela 3 – Tamanho aproximado amplicons.....	46
Tabela 4 – <i>Primers</i> mutagênicos	50
Tabela 5 – Títulos de fagos	58
Tabela 6 – Características das sequências selecionadas	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	<i>Antibody-drug Conjugate</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i>
BRASIL	<i>Biopanning and Rapid Analysis of Selective and Interactive Ligands</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR	<i>Complementarity-determining regions</i>
DAR	<i>Drug to antibody ratio</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
D.O.	Densidade Ótica
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment Antigen Binding</i>
Fc	Fragmento Cristalizável
FvFc	Fragmento variável fusionado ao fragmento cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
LB	Luria-Bertani
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimeraze Chain Reaction</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
scFv	<i>Single-chain Fragment variable</i>
SUS	Sistema Único de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

HCl	Ácido clorídrico
Å	Angstrom
cm	Centímetros
Da	Dalton
\$	Dólar
g	Gramma
°C	Grau Celsius
H	Hora
L	Litro
®	Marca Registrada
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mA	Miliampere
mL	Mililitro
min	Minuto
M	Molar
ng	Nanograma
pb	Pares de Base
pM	Pico molar
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundo
™	<i>Trade Mark</i>
V	Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Câncer.....	17
1.2	Imunoterapia oncológica.....	18
1.3	Anticorpos conjugados a droga (ADCs)	19
1.4	Prospecção e engenharia de anticorpos	25
1.5	<i>Phage display</i>	29
1.6	Importância, desafios e vantagens da imunoterapia de malignidades de célula B..	32
1.7	Hipóteses e estratégia	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.2	Objetivos específicos.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Transformação bacteriana com a biblioteca de fagos-Fab.....	37
3.1.1	<i>Obtenção de células de E. coli XL-1 Blue eletrocompetentes para transformaçã</i>	38
3.1.2	<i>Transformação das células de E. coli XL-1 Blue eletrocompetentes</i>	38
3.2	<i>Phage display</i>	39
3.2.1	<i>Produção dos fagos</i>	39
3.2.2	<i>Precipitação dos fagos e ciclos de infecção de células de E. coli XL-1 Blue</i>	39
3.2.3	<i>Titulação dos fagos para estimação de inputs e outputs</i>	40
3.3	<i>Biopanning</i>	41
3.3.1	<i>Citometria de fluxo das linhagens de células humanas k562</i>	41
3.3.2	<i>Desafio e seleção de fagos-Fab anti-CD19</i>	42
3.4	Obtenção das sequências V _H e V _L selecionadas	43
3.4.1	<i>PCRs de amplificação das sequências e inclusão dos adaptadores para o NGS</i>	43
3.4.2	<i>Eletroforese em gel de agarose</i>	44

3.4.3	<i>Purificação das bandas dos géis de agarose</i>	44
3.4.5	<i>Análise por sequenciamento de Sanger</i>	45
3.5	Sequenciamento de nova geração	45
3.6	Análise e seleção de sequências promissoras	47
3.7	Obtenção de sequências Fc mutantes	47
3.7.1	<i>Subclonagem da sequência gênica do Fc em vetor pGEM®-T Easy (Promega®)</i>	48
3.7.2	<i>Obtenção de células de E. coli TOP10 quimiocompetentes para transformação</i>	49
3.7.3	<i>Transformação das células de E. coli TOP10 quimiocompetentes</i>	49
3.7.4	<i>PCR de colônias</i>	50
3.7.5	<i>PCRs mutagênicas</i>	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	Avaliação da diversidade da biblioteca inicial após a transformação bacteriana ...	53
4.2	Avaliação da expressão do antígeno nas linhagens K562 por citometria de fluxo ..	54
4.3	Expressão dos fagos-Fab	56
4.4	Avaliação de títulos (<i>phage display</i>) e da eficiência de seleção (<i>BRASIL</i>)	57
4.5	Avaliação da amplificação das sequências de V_H e de V_L	60
4.6	Avaliação da qualidade do NGS	62
4.7	Análise dos dados do NGS	64
4.8	Produção das sequências Fc mutantes	67
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O termo câncer se refere a um amplo conjunto de doenças de fundo genético e/ou epigenético, que apresentam como característica em comum o crescimento desordenado de células com potencial de invadir outros tecidos. (FEINBERG *et al.*, 2006; RUZIK *et al.*, 2022). As alterações que levam uma célula sadia a transitar para a malignidade estão associadas à aquisição completa ou parcial de marcas características que envolvem a sustentação da sinalização proliferativa; a indução de angiogênese; a irresponsividade à sinalização de supressão de crescimento; a resistência à morte celular; o acionamento de mecanismos de perpetuação replicativa (imortalidade); a evasão ao sistema imune antitumoral; a promoção de um ambiente tumoral pró-inflamatório; a reprogramação do metabolismo energético; a ativação de mecanismos de invasão de outros tecidos e metástase; e a instabilidade genômica com aumento da frequência de mutações (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além delas, hoje se sabe cada vez mais que a reprogramação epigenética; o acionamento de mecanismos de plasticidade fenotípica; a senescência celular; e até o polimorfismo microbiótico estão associados aos eventos de transformação maligna (HANAHAN, 2022), o que evidencia a complexidade atrelada à sua patogênese e ao advento de formas eficientes de prevenção e de tratamento.

As alterações que levam à instabilidade genética das células cancerosas retroalimentam o acúmulo de mutações, permitindo a perda de sistemas de contenção que as levariam à apoptose e intensificando a chance de evasão de subpopulações celulares, em resposta à pressão seletiva exercida por um determinado agente terapêutico. O acionamento de vias de sinalização de sobrevivência alternativas a uma via inibida por uma droga, a despeito do dano acumulado, é um exemplo disso e está na base de grande parte dos eventos de refratariedade e recorrência de tumores. (GOTTESMAN, 2002). Assim, a recalcitrância característica de células que adquirem malignidade impôs historicamente a busca por drogas cada vez mais potentes, voltadas a alvos insubstituíveis e que fossem capazes de limitar ostensivamente o avanço descontrolado de um inimigo interno irresponsivo aos mecanismos fundamentais de controle (CHARI; WIDDISON, 2014).

Apesar das marcas características – que inclusive nos levam a reunir seus diversos tipos em um termo genérico único – as células cancerosas, sendo originadas do próprio tecido,

guardam mais semelhanças do que diferenças com as células saudáveis, de modo que, encontrar meios de eliminar aquelas sem, contudo, atingir estas, se estabelece como um grande desafio da busca por terapias seguras.

1.2 Imunoterapia oncológica

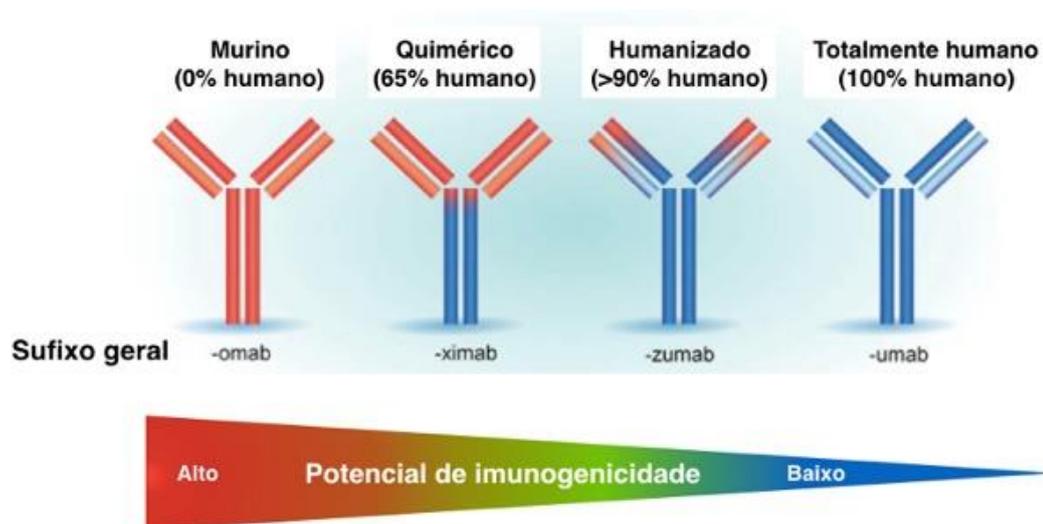
Aos agentes quimioterápicos convencionais – associados ou não às outras intervenções clássicas disponíveis do tratamento oncológico (cirurgia e radioterapia) – vêm se somando, cada vez mais, as abordagens biológicas. Nesse contexto, as imunoterapias têm ganhado protagonismo, em grande parte, por representarem um caminho para a busca por seletividade, estimulando a ativação de mecanismos de combate próprios do paciente (FALZONE; LIBRA, 2018). Na liderança dessa tendência, estão os anticorpos monoclonais (mAbs – do inglês *monoclonal antibodies*). Os mAbs são moléculas de imunoglobulina provenientes de um único clone de linfócito B; apresentam, portanto, afinidade específica por uma sequência única (epítipo) de um determinado alvo molecular (antígeno).

A produção de mAbs foi originalmente realizada a partir da metodologia de hibridoma, desenvolvida em 1975 por Köhler e Milstein, a qual se vale da capacidade natural do sistema imune de mamíferos de produzir diferentes linhagens clonais de linfócitos B expressando, portanto, anticorpos capazes de se ligar a diferentes epítopos de um mesmo antígeno (anticorpos policlonais), aliando isso à possibilidade de isolamento de linhagens específicas dessas células e sua fusão com células de mieloma imortalizadas, para a produção de um determinado anticorpo selecionado (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). O método foi essencial para a produção de mAbs em larga escala; no entanto, como os clones de células B são obtidos a partir de murinos, a posterior aplicação terapêutica desses mAbs em humanos gerou, em muitos casos, efeitos indesejados associados tanto ao seu não reconhecimento por parte da maquinaria efetora do sistema imune do paciente – atrapalhando assim a eficácia do tratamento (CHAMES *et al.*, 2009) – como também associados à imunogenicidade das porções murinas desses biofármacos, podendo gerar respostas graves em alguns indivíduos.

Nesse contexto, visando à atenuação desses problemas, métodos moleculares de engenharia genética passaram a integrar as técnicas de produção de mAbs, que, atualmente, além de quiméricos – ou seja, portadores de partes humanas (porção constante) e murinas (porção variável) – podem ser modificados para apresentarem características mais próximas das dos anticorpos humanos (os anticorpos humanizados) ou, ainda, ser produzidos como

totalmente humanos, a partir de animais geneticamente modificados (transformados com os genes de imunoglobulinas humanas) ou por seleção *in vitro* de sequências a partir de bibliotecas de repertório de anticorpos humanos apresentados na superfície de bacteriófagos (*phage display*), o que vem proporcionando grandes avanços para o uso terapêutico dessas moléculas (figura 1). (FOLTZ *et al.*, 2013).

Figura 1 – Evolução dos anticorpos monoclonais terapêuticos



Fonte: FOLTZ (2013). A partir de novas estratégias baseadas em engenharia genética, novos anticorpos terapêuticos com propriedades melhoradas puderam ser desenvolvidos (quiméricas, humanizadas ou humanas, reduzindo o seu potencial de imunogenicidade).

Atualmente, já são mais de 100 mAbs aprovados pelo FDA com indicação para diversos tipos de câncer, doenças inflamatórias e infecciosas (ANTIBODY SOCIETY, 2022). Além de seu uso único, abordagens que vêm se desenvolvendo intensamente nos últimos anos se utilizam de construções baseadas em mAbs ou em seus fragmentos, como os biespecíficos (SHIM, 2020), os receptores quiméricos de células T e NK (células CAR-T e CAR-NK) (POSNER *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2020), e os imunoconjugados, os quais envolvem diferentes estratégias de entrega alvo-dirigida de drogas, moléculas biológicas e sistemas nanoencapsulados (KENNEDY; OLIVEIRA; SARMENTO, 2017).

1.3 Anticorpos conjugados a droga (ADCs)

Apesar dos grandes avanços já conquistados e do futuro promissor das imunoterapias e biofármacos em geral, as pequenas moléculas sintéticas, classicamente usadas

na quimioterapia oncológica, continuam indispensáveis em muitos casos, dado o seu incomparável poder citotóxico. Embora preservem certa especificidade – pelo fato de atuarem sobretudo em alvos moleculares cuja atividade está associada à intensa proliferação celular (microtúbulos, DNA e maquinaria de replicação) – essas drogas atuam de maneira sistêmica e, sendo comumente lipofílicas, difundem-se facilmente por todo o corpo, atingindo células malignas e sadias proliferativas, como as células hematopoiéticas e as células epiteliais de pele e mucosas, e, eventualmente, prejudicando outros tecidos mesmo de proliferação lenta. Os graves efeitos colaterais típicos dessas drogas representam a grande desvantagem das quimioterapias convencionais, sendo frequentemente muito estreita a diferença entre sua dose máxima tolerada e sua dose mínima efetiva (janela terapêutica). (TSUCHIKAMA; AN, 2018).

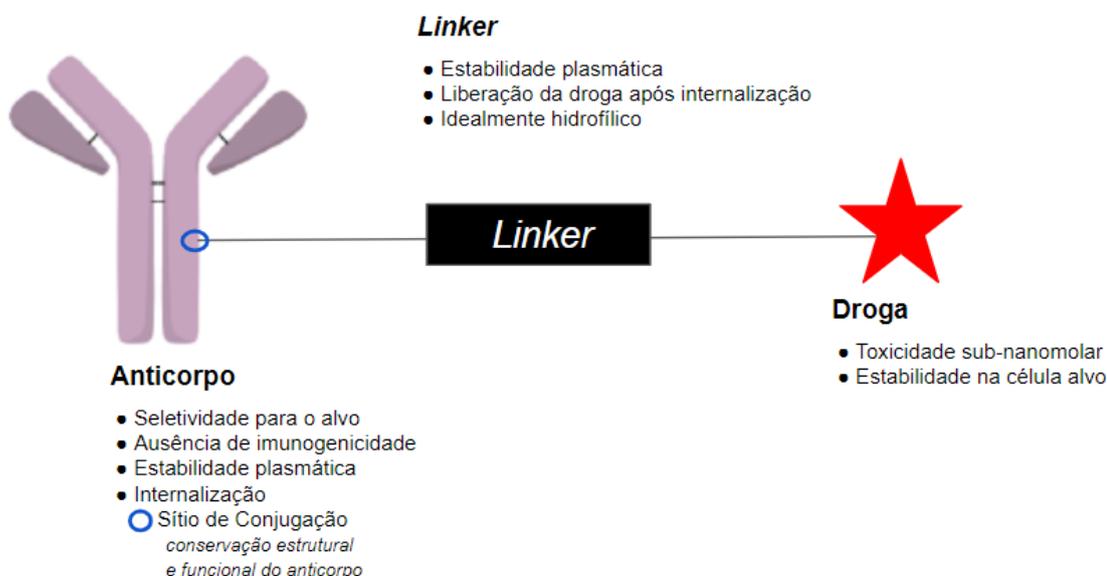
Com a finalidade de somar as vantagens e limitar as desvantagens das duas abordagens, a estratégia de unir a especificidade dos mAbs ao poder citotóxico das pequenas moléculas fez surgir uma nova categoria terapêutica: os conjugados anticorpo-droga (ADCs, do inglês *antibody-drug conjugates*). Os ADCs representam um tipo de quimioterapia alvo-dirigida guiada por anticorpos, que visa à entrega seletiva de um agente citotóxico a um tecido ou subgrupo de células-alvo que expressem diferencialmente em sua superfície o antígeno reconhecido pelo anticorpo utilizado. Terapias alvo-dirigidas têm, em geral, como finalidade o equilíbrio ótimo entre a máxima atividade de um agente citotóxico e a mínima ocorrência de efeitos colaterais; ou seja, a ampliação da janela terapêutica (ou do índice terapêutica que é a razão entre dose máxima tolerada e sua dose mínima efetiva) (KATZUNG, 2012). Além da maior segurança proporcionada, a associação da droga a uma proteína engloba ainda o potencial de aumentar o tempo de circulação da pequena molécula que, na forma livre, ficaria disponível apenas por algumas horas. (TSUCHIKAMA; AN, 2018; JOUBERT *et al.* 2020).

A baixa eficácia e problemas de segurança dos primeiros ADCs levantaram questionamentos acerca da viabilidade dessas construções, o que deu início a uma busca aprofundada pela compreensão dos múltiplos fatores que influenciam em seu desempenho – uma área ainda em pleno desenvolvimento. Um dos primeiros aprendizados foi o de que as diversas barreiras que o sistema conjugado precisa superar (distribuição, ligação ao antígeno, internalização por via endossomal, liberação da droga e ligação ao alvo molecular final) limitam muito a quantidade de droga que chega ao alvo intracelular final. Por conta disso, desde cedo, a utilização de drogas extremamente potentes (de IC₅₀ na ordem picomolar) se tornou um pré-requisito para aplicação em um ADC (TSUCHIKAMA; AN, 2018). Embora esse seja uma regra hoje reavaliada à luz da otimização de múltiplos aspectos, grande parte dos ADCs propostos

utilizam praticamente as mesmas classes de drogas. Os principais exemplos são os inibidores de microtúbulos do grupo das auristatinas (monometilauristatinas E e F) ou do grupo dos maytansinoides (emtansina DM1 e DM4), os alquilantes de DNA (caliqueamicinas e pirrolobenzodiazepinas – PBDs), e os inibidores de topoisomerase I (derivados de camptotecinas). (JOUBERT *et al.*, 2020).

Um dos três componentes básicos de qualquer ADC é o conector químico que une covalentemente a droga ao anticorpo (*linker*). O *linker* tem a importante missão de manter o conjugado intacto ao longo da circulação e de permitir a liberação da droga dentro da célula. A segurança e as propriedades farmacocinéticas do ADC são extremamente influenciadas pelo *linker* (TSUCHIKAMA; AN, 2018). Além de grupos específicos para a conjugação, tanto à droga como ao mAb, os *linkers* apresentam geralmente grupos otimizados de solubilidade e, no caso dos chamados *linkers* cliváveis, precisam dispor de algum mecanismo de liberação da droga em resposta a uma condição intracelular diferencial (ação enzimática, potencial redutor, pH lisossomal etc). Existem ainda os *linkers* não-cliváveis; considerados mais seguros, eles permitem a liberação da droga apenas após a degradação proteica do complexo no lisossomo. (JOUBERT *et al.*, 2020).

Figura 2 – Elementos básicos dos ADCs



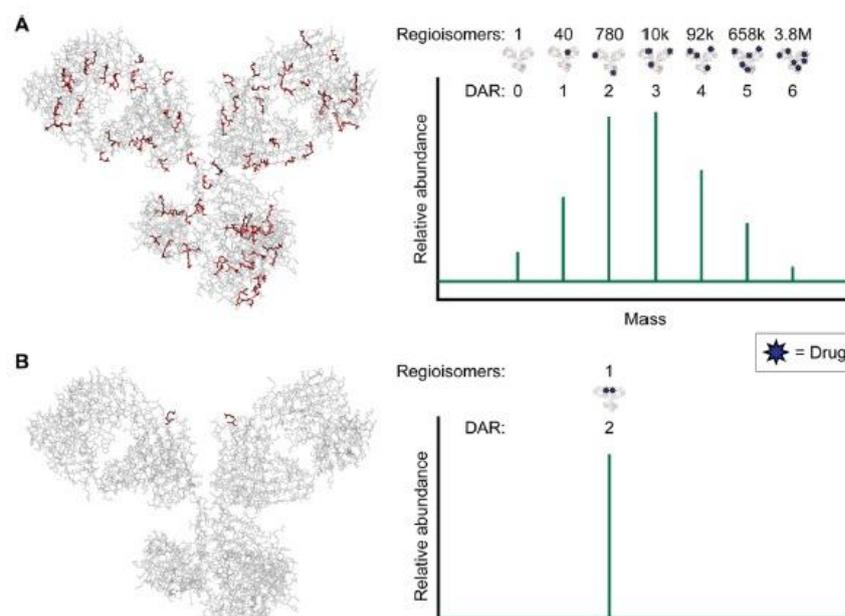
Fonte: adaptado de MATSUDA; MENDELSON (2021).

Decorrentes do método de conjugação aplicado, alguns parâmetros cruciais dos ADCs são 1) a quantidade de unidades de droga carregadas por molécula de mAb

(estequiometria); 2) os pontos de conjugação das moléculas de *linker*-droga no anticorpo; e 3) o grau de heterogeneidade da população de ADCs produzidas a partir de um determinado método. A estequiometria ou razão droga/anticorpo (DAR) é determinante para estabilidade e para a eficácia do conjugado. Se, por um lado, razões altas têm o potencial de levar mais drogas para o alvo; em contrapartida, esses conjugados tendem a perder parte do carregamento precocemente na circulação e a formarem agregados, associados à hepatotoxicidade (TSUCHIKAMA; AN, 2018). A posição e os resíduos de aminoácidos da região de conjugação no mAb podem influenciar na estabilidade dos componentes e nas propriedades farmacocinéticas do conjugado, de modo que duas moléculas de mesma estequiometria podem ter características muito distintas entre si, a depender de seus pontos de conjugação (TUMEY *et al.*, 2017).

A aleatoriedade do método utilizado para a conjugação pode determinar a heterogeneidade de uma população de conjugados, comprometendo a reprodutibilidade de cada produção (AGARWAL; BERTOZZI, 2015). Convencionalmente são utilizados métodos de conjugação aleatória envolvendo resíduos de lisina ou de cisteína nativos da proteína e acessíveis ao solvente. Existem, no entanto, em torno de 40 lisinas com essa característica em uma IgG1 humana – o que pode resultar em milhões de conjugados distintos (WANG *et al.*, 2005) – e 8 cisteínas que estão envolvidas nas pontes dissulfeto intercadeias – o que pode gerar centenas de produtos diferentes e prejudicar a estabilidade estrutural do anticorpo (SUN *et al.*, 2005). Embora todos os ADCs atualmente aprovados sejam baseados em algum desses métodos, as novas gerações de ADCs já incorporaram a necessidade da aplicação de métodos que garantam a sítio-especificidade de conjugação, gerando produtos homogêneos e de estequiometria definida (DEAN *et al.*, 2021).

Figura 3 – Heterogeneidade do *pool* de ADCs decorrente do método de conjugação



Fonte: AGARWAL; BERTOZZI (2015). Distribuição teórica das diferentes espécies de ADCs obtidos a partir da conjugação a IgG1 por diferentes métodos. A: aleatoriamente em lisinas nativas da molécula de anticorpo (resíduos de lisina expostos ao solvente estão representados em vermelho); B): sítio-especificamente em resíduos engenheirados. DAR: razão droga/anticorpo. Regioisômeros são espécies que apresentam mesma DAR mas em combinações de sítios distintos.

Um dos principais métodos utilizados envolve a substituição de resíduos nativos do mAb por cisteínas destinadas especificamente para a conjugação, preservando-se, assim, as cistinas que conectam as cadeias dos anticorpos (AGARWAL; BERTOZZI, 2015). Uma das vantagens da utilização de resíduos de cisteína é a disponibilidade de grupos tiol-reativos em pequenas moléculas que reagem rápida e seletivamente com sulfidrilas acessíveis ao solvente e em condições compatíveis com a manutenção da integridade do anticorpo. Muitos *linkers* já bem caracterizados são construídos com base nesses grupos, sendo os de maleimida um dos mais utilizados. (JOUBERT *et al.*, 2020).

Figura 4 – Representação esquemática da conjugação via maleimida



Fonte: YAO *et al.* (2016).

A seleção de antígenos adequados – presentes diferencialmente na superfície das células-alvo, no ambiente tumoral ou em células que possam ser completamente depletadas, e que sofram internalização a partir da ligação do anticorpo – também é parte fundamental da concepção de um ADC, definida pelo tipo de câncer enfrentado. As características do mAb também são cruciais para o sucesso do sistema alvo-dirigido, de modo que a sua escolha e seus pontos de otimização compreendem aspectos essenciais para a sua adequabilidade. Afinidade, imunogenicidade e estabilidade são alguns desses aspectos determinados pelo tipo, formato, origem e modificações específicas do mAb aplicado (JOUBERT *et al.*, 2020).

Atualmente existem mais de 80 ADCs sendo testados em diferentes fases clínicas e 11 já aprovados pelo FDA, tendo sido 7 deles aprovados entre o final de 2019 e 2021. Dos aprovados, 6 são voltados para cânceres hematológicos e 5 para cânceres de tumor sólido. A maior parte é baseada em IgG1 ou IgG4 humanos ou humanizados, com especificidade para 10 diferentes antígenos. (ANTIBODY SOCIETY, 2022).

Tabela 1 – Lista de ADCs aprovados pela FDA

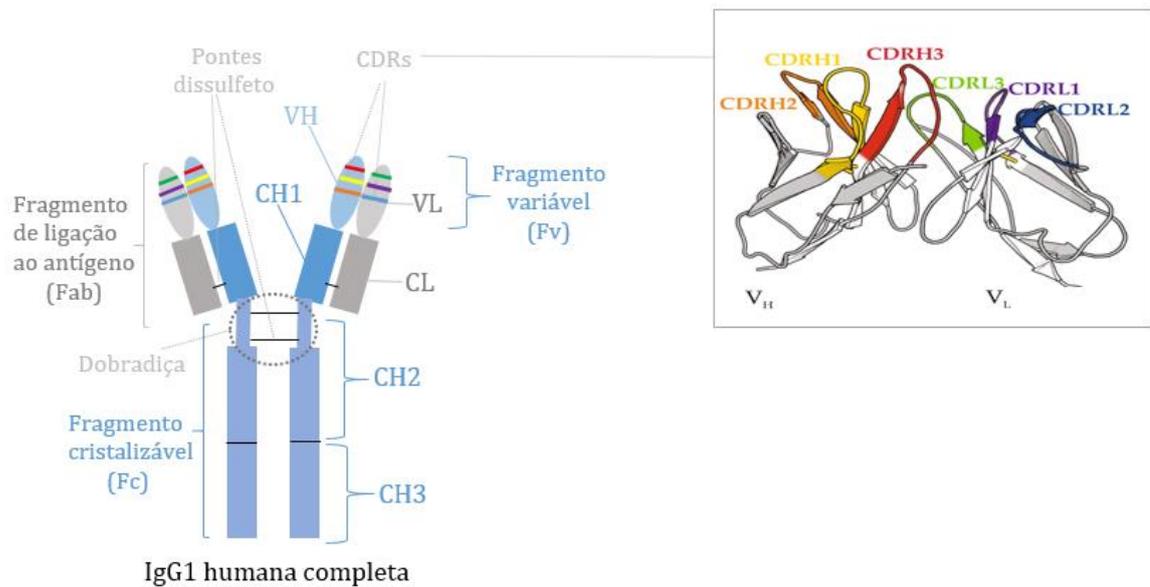
ADC	ALVO	ANTICORPO	LINKER	DROGA	FABRICANTE	APROVADO EM
Adcetris®	CD30	IgG1 Quimérico	Val-Cit	MMAE	Seattle Genetics (Seagen)	2011
Kadcyla®	Her2	IgG1 Humanizado	SMCC	DM1	Genentech	2013
Besponsa®	CD22	IgG4 Humanizado	AcBut	Caliqueamicina	Pfizer	2017
Mylotarg®	CD33	IgG4 Humanizado	AcBut	Caliqueamicina	Pfizer	2000; 2017
Polivy®	CD79b	IgG1 Humanizado	Val-Cit	MMAE	Genentech	2019
Padcev®	Nectin4	IgG1 Humano	Val-Cit	MMAE	Astellas Pharma	2019
Enhertu®	Her2	IgG1 Humanizado	Tetrapept	DXd Topo I Inibidor	Daiichi Sankyo	2019
Trodelyv®	Trop-2	IgG1 Humanizado	CL2A Hidrolisável	SN-38 Topo I Inibidor	Immunomedics	2020
Blenrep®	BCMA	IgG1 Humanizado	Maleimido caproil	MMAE	Glaxosmithkline	2020
Zynlonta™	CD19	IgG1 Humanizado	Val-Ala	SG3249 PBD	Therapeutics	2021
Tivdak®	CD142	IgG1 Humano	Val-Cit	MMAE	Genmab/Seagen	2021

Fonte: adaptado de DEAN *et al.* (2021). Todos os ADCs listados foram aprovados para indicações oncológicas no cenário clínico. AcBut: ácido 4-(4'-acetilfenoxi) butanoico; BCMA: antígeno de maturação de células B; DM1: mertansine; DXd: deruxtecan (derivado de exatecano); Her2: receptor de fator de crescimento epidérmico humano de tipo 2; MMAE: monometilauristatina E; MMAF: monometilauristatina F; PBD: pirrolobenzodiazepina; SMCC: succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato; SN-38: 7-etil-10-hidroxicamptotecina; Tetrapept: tetrapeptídeo; Trop-2: antígeno de superfície de células trofoblásticas; Val-Cit: peptídeo de valina e citrulina; Val-Ala: peptídeo de valina e alanina.

1.4 Prospecção e engenharia de anticorpos

Todos os anticorpos compartilham componentes estruturais básicos. As quatro subunidades das imunoglobulinas – duas cadeias leves e duas cadeias pesadas – são conectadas entre si por quatro pontes dissulfeto. A combinação entre resíduos de aminoácidos contidos nos domínios variáveis das cadeias leve e pesada (fragmento variável), presentes em cada extremidade da porção Fab gera a região de especificidade de ligação ao antígeno, na qual estão contidas as regiões de determinação de complementaridade (CDRs).

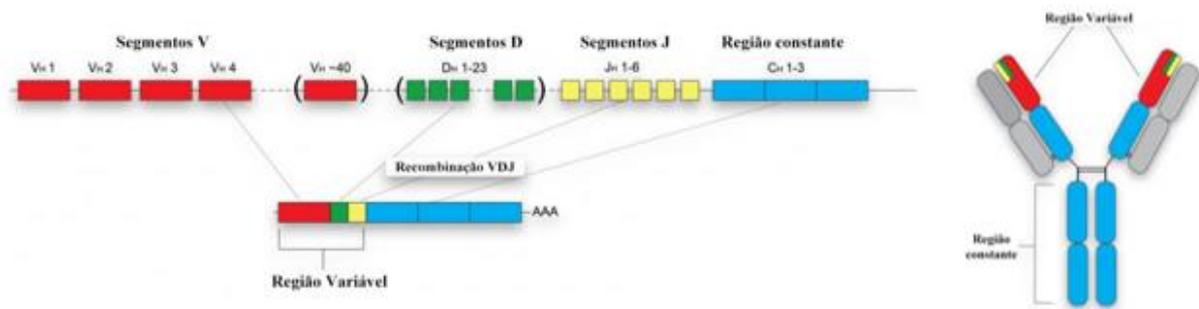
Figura 5 – Representação esquemática de anticorpo IgG1 (~150 KDa)



Fonte: elaborado pelo autor (2022). C_H1-3: domínios constantes 1, 2 e 3 da cadeia pesada; C_L: domínio constante da cadeia leve; V_H: domínio variável da cadeia pesada; V_L: domínio variável da cadeia leve; e CDRs: regiões de determinação de complementaridade.

Também chamadas de regiões hipervariáveis, as sequências gênicas das CDRs nas respectivas células B são determinadas pelos processos de recombinação dos segmentos V(D)J, variabilidade dos repertórios de segmentos V, alterações de junção e hipermutação somática – mecanismos responsáveis pela geração da enorme variabilidade do repertório de anticorpos que cada indivíduo pode produzir. Cada cadeia variável apresenta 3 CDRs, sendo, portanto, o paratopo (região do anticorpo que interage com epítipo) constituído pela combinação das 6 CDRs.

Figura 6 – Recombinação V(D)J do gene da cadeia pesada de anticorpos



Fonte: adaptado de RIGO (2018). Configuração germinativa do locus gênico para a cadeia pesada. Segmentos do DNA são removidos (excisão) permitindo a aproximação com outros segmentos mais distantes (junção), gerando um novo segmento gênico. A excisão-junção de éxons permite a geração de anticorpos com elevada variabilidade.

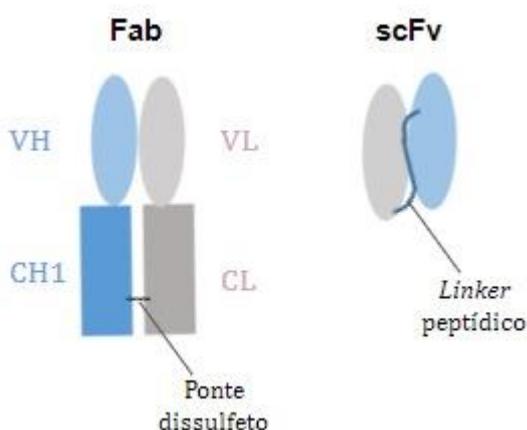
Os segmentos gênicos dos domínios constantes não sofrem recombinação, mas determinam as diferentes classes e subclasses de anticorpos, as quais apresentam características distintas, sendo definidas – em relação à cadeia pesada – por *splicing* alternativo de seu RNA mensageiro com base no estágio de desenvolvimento, função e localização do clone de célula B que a produzirá. Além de 4 subclasses de IgG – o tipo de imunoglobulina mais abundante no sangue e envolvido nas respostas adaptativas secundárias – existem outras 4 classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE e IgM), cada uma associada a um tipo diferente de cadeia pesada constante da molécula. As IgMs estão envolvidas nas respostas primárias contra patógenos, sendo, juntamente com as IgDs, receptores de linfócitos B, IgAs são responsáveis pela defesa em mucosas, e IgEs estão envolvidas em respostas antiparasitárias e alergias. As cadeias leves constantes humanas podem ser de 2 tipos (κ e λ), estando os seus respectivos genes localizados em cromossomos diferentes aos da cadeia pesada. (ABBAS *et al.*, 2015).

A modularidade estrutural proporcionada pela relativa independência funcional das respectivas porções dos anticorpos facilita a aplicação de diferentes técnicas que permitem o desenvolvimento de moléculas de alta performance e com características customizadas para aplicações diversas. A engenharia de anticorpos, por meio de ferramentas computacionais e experimentais, pode ser utilizada para uma miríade de finalidades, tais como melhora do perfil de imunogenicidade; otimização de características farmacocinéticas, de solubilidade e de estabilidade em formulações de armazenamento ou de aplicações industriais; redução da propensão de agregação; aumento dos níveis de expressão em um determinado tipo de célula; modulação da capacidade de respostas efetoras ou da capacidade de interação com outras

células e mediadores imunológicos; inclusão de sítios de conjugação; modulação da especificidade e da afinidade a um ou mais alvos determinados; entre outras.

Nesse contexto, fragmentos independentes, derivados ou modificados de anticorpos naturais de arcabouços diversos, costumam ser aplicados para as etapas de desenvolvimento, seleção e *screening* de variantes, podendo, em seguida, ser utilizados diretamente ou para montagem de mAbs completos ou em formatos diversos. Para a obtenção e seleção de anticorpos com afinidade melhorada ou especificidade para um dado antígeno, aplicam-se, frequentemente, bibliotecas de Fab ou de fragmento variável de cadeia única (scFv, do inglês *Single-chain Fragment variable*).

Figura 7 – Representação esquemática dos fragmentos Fab (~50 KDa) e scFv (~25 KDa)

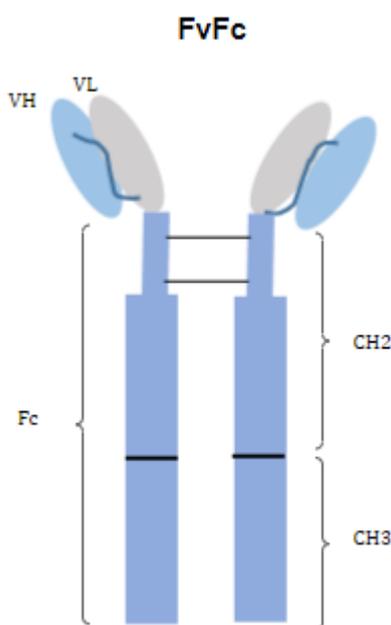


Fonte: elaborado pelo autor (2022). CL: domínio constante da cadeia leve; V_H: domínio variável da cadeia pesada; V_L: domínio variável da cadeia leve; scFv: fragmento variável de cadeia única.

Há diversas vantagens associadas ao uso do formato scFv, visto que se trata de uma proteína que, além de conservar os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do anticorpo ao seu antígeno (MAYNARD; GEORGIU, 2000), é menor e menos complexa do que a molécula completa do anticorpo, já que se constitui apenas dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada conectadas por um pequeno *linker* peptídico flexível, podendo, assim, servir tanto a interesses estratégicos de âmbito farmacocinético, quanto à simplificação na obtenção heteróloga ou em técnicas de *display* em plataformas procariontas. O fragmento scFv pode ser ainda combinado ao fragmento Fc, gerando o formato FvFc (fragmento variável fusionado ao fragmento cristalizável), no qual se conservam os domínios que determinam a capacidade de ligação ao antígeno, assim como as regiões responsáveis pelas funções efetoras e

farmacocinéticas associadas à porção constante do anticorpo. O fragmento recombinante FvFc apresenta a vantagem de conter os domínios variáveis das cadeias leve e pesada fusionadas aos domínios C_{H2} e C_{H3} estruturados como uma cadeia única (SHIRRMANN *et al.*, 2008; HOLLIGER; HUDSON, 2005), com a mesma avidéz e perfil farmacocinético similar em relação à molécula completa (SILVA *et al.*, 2009).

Figura 8 – Representação esquemática do fragmento FvFc (~100 kDa)



Fonte: elaborado pelo autor (2022). FvFc: fragmento variável fusionado ao fragmento cristalizável C_{H1-2}; domínios constantes 1 e 2 da cadeia pesada; V_H: domínio variável da cadeia pesada; V_L: domínio variável da cadeia leve.

Uma das principais ferramentas da engenharia de anticorpos é a mutagênese sítio-dirigida combinada ao desenho racional ou a estudos estruturais diversos. Essas abordagens envolvem modificações de nucleotídeos na sequência original do gene alvo, a partir de informações de análises *in silico*, baseadas em simulações das condições *in vivo* e em estruturas depositadas em bancos de dados, visando à obtenção de proteínas com propriedades diferenciadas (BANTA *et al.*, 2013; KARPLUS; MCCAMMON, 2002). A prospecção de sítios e domínios adequadas no anticorpo para a substituição de resíduos visando à conjugação sítio-específica de drogas é um campo de aplicação importante dessas ferramentas no contexto dos ADCs. (AGARWAL; BERTOZZI, 2015).

1.5 Phage display

Outro conjunto de estratégias fundamentais da área de engenharia de anticorpos são as técnicas de evolução *in vitro* (PACKER; LIU, 2005). Essa abordagem se baseia na geração de diversidade genética e na construção de bibliotecas de mutantes ou variantes clonais, que são, em seguida, submetidas a um método de triagem e seleção contra alvos ou condições determinadas. As bibliotecas podem ser geradas a partir da indução de mutações aleatórias ou a partir da combinação de sequências gênicas de repertórios naturais ou sintéticos de anticorpos, fragmentos de anticorpos ou antígenos.

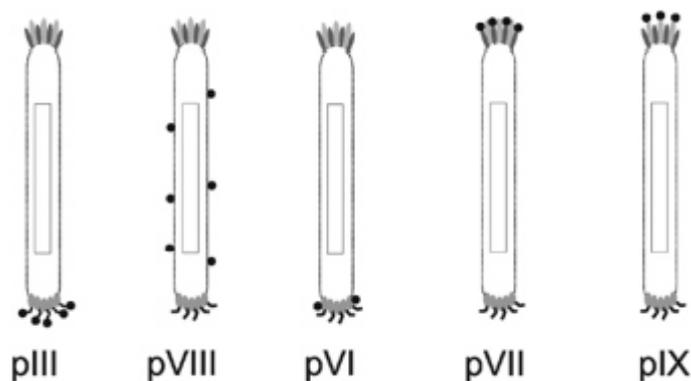
As unidades constituintes das bibliotecas são as sequências gênicas e, dependendo do tipo, essas bibliotecas podem atingir tamanhos da ordem de 10^{12} (ALMAGRO *et al.*, 2019). Diante disso, um grande desafio se estabelece em selecionar e recuperar unidades promissoras com base em uma propriedade desejada que se manifesta na proteína (em nível de fenótipo) – e não na sequência gênica (genótipo) que a codifica. Oferecendo uma solução para esse desafio, uma poderosa ferramenta se estabeleceu como uma das principais estratégias de descoberta e desenvolvimento de mAbs e de mapeamento de epítomos: a técnica de *phage display* (BARBAS *et al.*, 2001).

Desenvolvida em 1985 por George Smith e colaboradores, *phage display* é uma técnica de amplificação e seleção de bibliotecas gênicas, que permite a manutenção da conexão física entre genótipo e fenótipo ao longo do processo, por meio da conjugação entre a sequência gênica da versão da proteína que se deseja testar e o gene de uma das proteínas que constituem o capsídeo de um vírus filamentosos que infecta cepas de *Escherichia coli* (SMITH, 2019). Para isso, atualmente, as respectivas bibliotecas contendo sequências gênicas de diferentes variantes da mesma proteína são clonadas em um vetor fagomidial que contém – em fase com sua região de inserção – o gene de uma das proteínas de revestimento do bacteriófago (ou fago).

M13, f1 e fd são os tipos de fagos comumente utilizados na técnica de *phage display*. Eles não são líticos nem integram seu material genético no genoma da bactéria hospedeira, formam vírions constituídos de uma molécula de DNA circular de fita única envolvida por um capsídeo que contém aproximadamente 3000 cópias de uma proteína maior de revestimento (pVIII) e 3 a 5 cópias de cada uma de 4 diferentes proteínas menores (pIII, pVI, pVII e pIX) presentes nas extremidades das partículas virais. Embora existam exemplos de aplicação das proteínas pVI (GARBE; THIEL; MOOTZ, 2010), pVII, pIV (LØSET *et. al*,

2011) e pVIII (FAGERLUND; MYRSET; KULSETH, 2008) para o *display* de peptídeos específicos; a mais utilizada é a pIII.

Figura 9 – Representação esquemática de diferentes sistemas de *phage display*



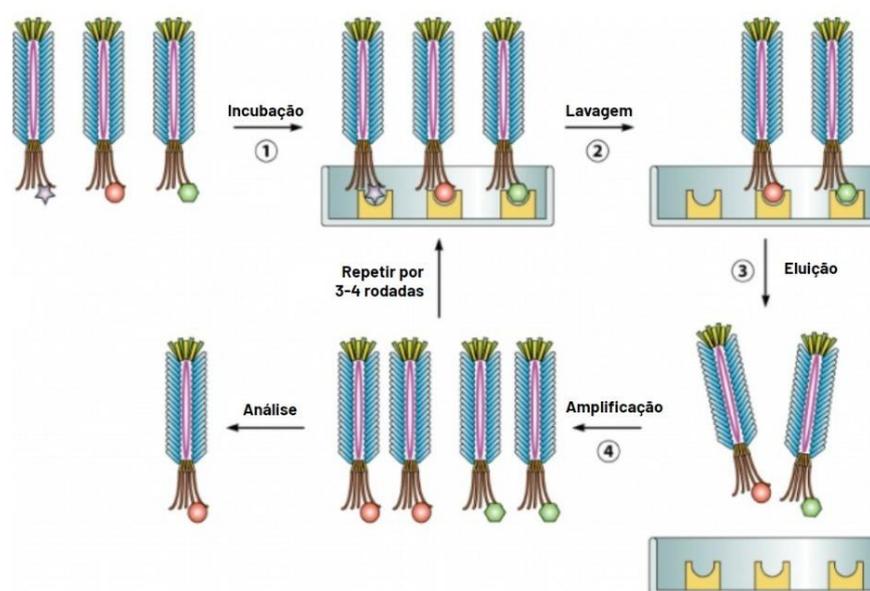
Fonte: Adaptado de Bazan, Calkosiński, Gamian (2012).

A proteína pIII é constituída de 406 resíduos de aminoácidos e está envolvida na capacidade de infecção de novas bactérias pelo fago. Para que possa introduzir sua fita de DNA na célula hospedeira, o fago precisa interagir com o pilus de conjugação bacteriano por meio dessa proteína. Como isso, torna-se importante a manutenção de uma proporção da expressão de pIII em relação à expressão da proteína de fusão (pIII-proteína), de modo que as partículas virais possam ser amplificadas ao longo de novos ciclos de infecção. Assim, são utilizados fagos auxiliares, os quais contêm todas as informações necessárias para a montagem de novas partículas virais pela maquinaria da bactéria. Desse modo, à medida que novos fagos vão sendo produzidos dentro da bactéria infectada pelo fago auxiliar, a disponibilidade do fagomídeo e da respectiva proteína de fusão no citoplasma da mesma bactéria – transformada previamente com uma das variantes da biblioteca – permite que o capsídeo desses fagos seja montado contendo tanto pIII-proteína (gene presente no fagomídeo) como pIII (gene presente no fago auxiliar juntamente com os outros genes para montagem de novas partículas virais completas). M13KO7 e VCSM13 são exemplos de fagos auxiliares utilizados em *phage display*.

Os fagos montados apresentando as respectivas proteínas da biblioteca (e contendo seu gene) são liberados da bactéria por extrusão e, assim, coletados do meio de cultura, quantificados e submetidos a algum método de seleção. Os métodos de seleção ou *biopanning* (“bio-garimpo”) variam conforme os objetivos almejados, sendo um campo de constante surgimento de novas estratégias e adaptações. Conforme esquematizado na figura 10, a ideia

geral do *biopanning* é permitir que a diversidade de proteínas presentes na biblioteca e expostas na superfície dos fagos possa ser submetida a um determinado alvo e/ou a uma determinada condição, de modo que, após uma etapa de lavagem, idealmente apenas os fagos-proteína positivos para a propriedade buscada permaneçam ligados, podendo, em seguida, ser recuperados (eluídos) e amplificados (através da infecção de novas bactérias), iniciando, assim, um novo ciclo. O número de rodadas de seleção ideal a que uma biblioteca de fagos deve ser submetida para o enriquecimento de sequências com a característica almejada varia conforme o tipo de biblioteca, o método e as condições das etapas de seleção aplicadas. O nível de estringência ao longo da seleção pode ser constante ou progressivo, o que envolve desde o número de lavagens, a intensidade de um parâmetro do sistema de separação ou eluição aplicado, até a densidade de ligantes disponíveis.

Figura 10 – Representação esquemática do processo de *phage display*



Fonte: HUANG, BISHOP-HURLEY COOPER (2012).

No contexto da prospecção de anticorpos, a aplicação de *phage display* envolve sobretudo a busca por sequências com especificidade – e afinidade adequada – para um antígeno determinado. Assim, bibliotecas de fragmentos de anticorpos (geralmente Fab ou scFv) são desafiadas contra um antígeno alvo, o qual, tradicionalmente, é representado pelo peptídeo de um de seus domínios expostos e imobilizado em uma superfície (placa, matriz ou *bead*), podendo ainda ser aplicadas células, partículas virais, metabólitos, toxinas, entre outros. Um método de *biopanning* chamado BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective and Interactive Ligands*), desenvolvido por Giordano *et al* (2001), baseia-se no desafio de

bibliotecas de fagos apresentando peptídeos contra células tumorais para a descoberta de alvos expressos diferencialmente na superfície dessas células em relação a células não tumorais. Além de ser uma ferramenta de varredura para a busca de novos alvos exclusivos de subpopulações de células tumorais específicas (GIORDANO *et al.*, 2001), o método BRASIL pode ser aplicado para seleção de anticorpos (DANTAS-BARBOSA *et al* 2009).

A aplicação das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) vem se tornando cada vez mais indispensável para complementação das abordagens de *phage display*. Enquanto a técnica de expressão de bibliotecas em fagos trouxe uma solução para o desafio da conexão física entre genótipo e fenótipo – permitindo a preservação da sequência de nucleotídeos atrelada à manifestação da característica biológica no mesmo sistema – os desafios de acessar, identificar e processar, de maneira eficiente, a enorme quantidade de dados contida nessas bibliotecas e *pools* selecionados vêm sendo, por sua vez, enfrentados através do uso de NGS, associado a plataformas computacionais de análise.

Embora o tradicional sequenciamento por método de Sanger ainda seja fundamental em muitas etapas do trabalho e útil para avaliações específicas, ele requer a extração de fagomídeos de colônias isoladas de cada rodada, o que limita bastante o número de sequências que podem ser analisadas e torna o trabalho muito mais laborioso. A robustez do NGS torna possível o acesso integral às sequências obtidas, permitindo o aproveitamento e a processamento dos dados de forma rápida e otimizada, o que os torna disponíveis para análises *in silico* diversas, potencializando, assim, a sua conversão em informação biológica útil para tomadas de decisões.

1.6 Importância, desafios e vantagens da imunoterapia de malignidades de célula B

Leucemias e linfomas são malignidades hematológicas que atingem as células hematopoiéticas e estão entre as principais causas de mortes por doenças no mundo, abrangendo os tipos de câncer mais frequentes em crianças (SILVA *et al.*, 2019). Dentre os diferentes tipos, as leucemias e linfomas de células B estão entre os mais predominantes (INCA, 2021), sendo, não por acaso, um dos grupos para os quais diversos medicamentos biológicos já estão disponíveis (BATLEVI *et al.*, 2016).

Além dos mAbs já bem consolidados na prática clínica (rituximabe, ofatumumabe e obinutuzumab), as mais recentes aprovações de opções terapêuticas inovadoras, tais como o biespecífico blinatumomab, os ADCs inotuzumab ozogamicina e loncastuximab tesirine e as

terapias com células T engenheiradas com receptor antigênico quimérico (CAR) vêm revolucionando o campo de combate às malignidades de células B, aumentando drasticamente as chances de cura dos pacientes (GREVE *et al.*, 2021; HORVAT *et al.*, 2018).

Encontrar alvos exclusivos de células tumorais contra os quais seja possível direcionar agentes citotóxicos potentes com segurança para as células saudáveis não é um processo simples. As chances de ocorrência simultânea desses antígenos, mesmo em baixos níveis, em tecidos cruciais podem determinar rapidamente a morte de pacientes submetidos ao tratamento. No caso dos cânceres de células B, frequentemente existe a possibilidade vantajosa de depleção temporária dos *pools* completos tanto de células tumorais quanto de células saudáveis, contanto que sejam preservadas as células tronco hematopoiéticas que as originam na medula óssea. Por conta disso, marcadores específicos de células B, tais como CD20 e CD19, são utilizados como alvo na maior parte dessas terapias, embora sejam expressos, na maioria das vezes, tanto nas células tumorais e, sempre, nas células saudáveis de diferentes estágios de desenvolvimento desses linfócitos (MARTYNISZYN *et al.* 2017).

A proteína CD19 é um marcador exclusivo de células B envolvido na modulação do limiar de ativação dessas células. Ela é expressa em muitos tipos de linfomas e leucemias, tendo um perfil de expressão mais amplo do que o de outros marcadores de células B, como a proteína CD20, e, assim como essa, não ocorrendo nas células tronco hematopoiéticas (WANG; WEI; LIU, 2012). A maioria dos cânceres de células B expressam CD19 em níveis iguais ou superiores ao de células B saudáveis. 80% das leucemias linfoides agudas, 88% dos linfomas de células B e 100% das leucemias desse tipo de célula apresentam altos níveis de expressão da proteína, sendo, para além do contexto oncológico, um alvo relevante para depleção de células B envolvidas na patogênese de doenças autoimunes (TEDDER, 2009).

Apesar do intenso avanço da área de imunoterápicos nos últimos anos, a disponibilidade pública dessas terapias, assim como a de outros biofármacos, é dificultada no Brasil em virtude da ampla dependência da importação desses produtos, o que é agravado pelo seu alto custo. Anualmente, de forma recorrente, apesar de representarem, em termos de quantidade, um pequeno percentual do total de medicamentos comprados pelo Governo Brasileiro para o SUS, os biofármacos são responsáveis por uma grande parcela dos gastos totais com medicamentos (RODRIGUES, 2020; CAMBRICOLI, 2016).

Recentemente pesquisas na área de terapias com células CAR T têm avançado no Brasil (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2020; LANGHI JUNIOR *et al.*, 2021), mas poucos estudos de grupos nacionais voltados para o desenvolvimento da área de ADCs podem ser encontrados

na literatura. Em um estudo de mapeamento tecnológico envolvendo a busca de registros de patentes em diferentes bases de dados associadas ao termo anticorpos conjugados verificou-se que, até 2019, no INPI, 11 patentes relacionadas ao tema foram depositadas no Brasil, sendo, no entanto, apenas 1 de titularidade de uma entidade nacional, depositada em 2010 e associada a um método diagnóstico para detecção precoce de anticorpos em pacientes com Dengue (MARQUES *et al.*, 2020). De acordo com o *MarketStudyReport*, o mercado mundial de ADCs foi avaliado em US\$ 4,3 bilhões em 2020 com estimativa de valer US\$ 18,3 bilhões até 2027 (GLOBE NEWSWIRE, 2021). O Brasil é visto como um potencial grande mercado consumidor para algumas das principais empresa e indústrias atuantes no setor de desenvolvimento de ADCs, sendo 10 dos 11 registros do INPI de titularidade de empresas internacionais, incluindo 4 norte-americanas, além de 1 suíça, 1 alemã, 1 inglesa e 1 coreana (MARQUES *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a escassez de estudos e iniciativas de desenvolvimento de ADCs no Brasil, não obstante o potencial dessa abordagem terapêutica e as recentes aprovações impulsionando essa área de pesquisa, corrobora a relevância de uma investigação que vise à concepção de um formato eficiente e reproduzível de conjugado.

Diante desses desafios, alinhado com a urgente necessidade de desenvolvimento de medicamentos biológicos nacionais, o grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas da Fiocruz Ceará vem abordando diferentes estratégias baseadas em engenharia de anticorpos e seus fragmentos para a caracterização e proposição de biossimilares e novas moléculas com propriedades melhoradas.

A bem caracterizada aplicabilidade da proteína CD19 como alvo terapêutico de leucemias e linfomas de células B em diferentes abordagens biológicas – incluindo um dos mais recentes ADCs aprovados pelo FDA (loncastuximab tesirine) (ANTIBODY SOCIETY, 2022) – fortalece a plausibilidade de uma proposta de construção de um ADC anti-CD19 e homogêneo que possa ser produzido nacionalmente.

1.7 Hipóteses e estratégia

O caminho para a concepção de um ADC eficiente envolve a otimização de múltiplos aspectos, sendo cada um dos 3 constituintes do sistema (anticorpo, *linker* e droga) – assim como a complementaridade entre eles – determinante para o seu sucesso. Neste trabalho, foram dados os passos iniciais desse caminho, particularmente associados à preparação do

constituente responsável por guiar e proporcionar especificidade e homogeneidade ao sistema – o anticorpo.

Desse modo, a partir de uma biblioteca de Fab (*naïve* para o alvo CD19), construída e cedida pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005), visou-se, via *phage display*, à seleção de sequências anti-CD19 promissoras. Partiu-se da hipótese de que a exposição serial da biblioteca de fagos-Fab a células expressando o antígeno CD19 (método BRASIL) enriqueceria sequências nucleotídicas específicas com potencial de gerar scFvs de perfil cinético e afinidade ao ligante adequados para serem aplicados em diferentes abordagens direcionadas a esse alvo, especialmente para a construção de um ADC no formato FvFc anti-CD19.

Paralelamente, a partir da sequência gênica nativa da porção Fc integrada na região transcrita do vetor pCOMIRES Δ 600, desenvolvido e cedido pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (QUILICI *et al.*, 2013), visou-se, via mutagênese sítio dirigida, à geração de duas sequências Fc mutantes – respectivamente, N421C e S239C. Partiu-se da hipótese de que tais mutações de cisteína obtidas a partir de estudos estruturais descritos na literatura (TUMEY *et al.*, 2017; SUSSMAN *et al.*, 2018) poderiam ser geradas através de *primers* mutagênicos via PCR e teriam o potencial de serem adequadas para a conjugação sítio-específica de drogas via *linker* tiol-reativo, de modo a serem aplicadas na construção de um ADC no formato FvFc tiol-engenheirado, homogêneo, de estequiometria 2:1 (Droga:FvFc).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter sequências gênicas de fragmentos de anticorpo humano com potencial para serem aplicadas na construção de um FvFc anti-CD19 conjugado de forma sítio-específica a droga.

2.2 Objetivos específicos

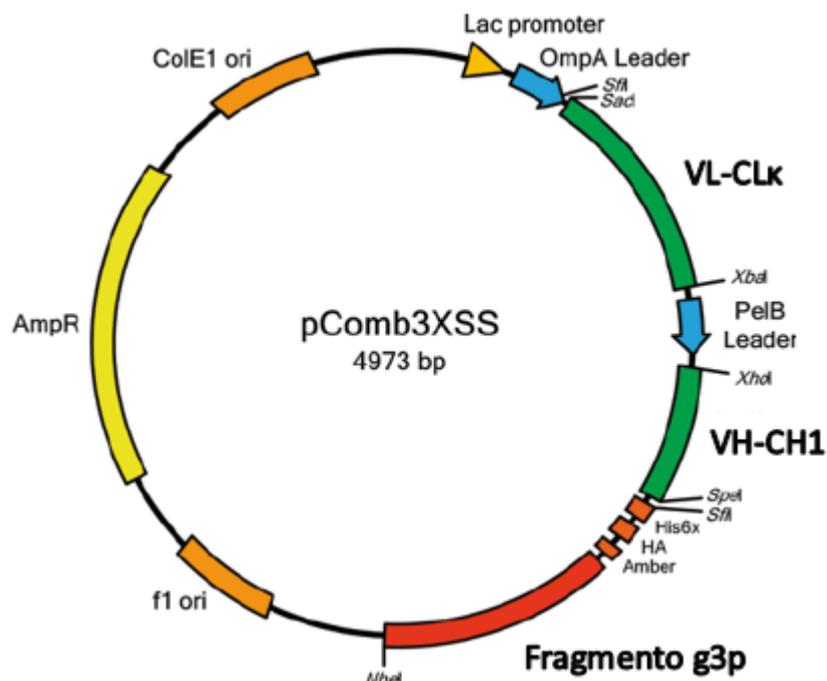
- Transformar células bacterianas com biblioteca gênica de Fab clonada em fagomídeo;
- Desafiar fagos (pIII-Fab) contra o antígeno CD19 em etapas sequenciais de seleção;
- Determinar as sequências V_H e V_L selecionadas por NGS;
- Filtrar sequências enriquecidas candidatas para a proposição de scFvs;
- Substituir a sequência gênica de 2 resíduos nativos em Fc pela sequência gênica de cisteína em pontos específicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Transformação bacteriana com a biblioteca de fagos-Fab

Uma biblioteca recombinante de variantes da porção Fab humana foi cedida pelo grupo de pesquisa de Imunologia Molecular da UnB para ser utilizada, neste estudo, como base para a seleção de sequências com especificidade e, potencialmente, alta afinidade ao antígeno CD19. A biblioteca havia sido construída a partir do RNA total de linfócitos do sangue periférico de 11 pacientes de osteosarcoma, sendo representadas as cadeias μ , γ e κ do repertório de anticorpos desses indivíduos (DANTAS-BARBOSA *et al.*, 2005). As diferentes sequências gênicas obtidas das regiões com a capacidade de ligação ao antígeno – domínios variáveis das cadeias pesada e leve (V_H e V_L) – junto às sequências gênicas dos respectivos domínios constantes, C_{H1} e C_{κ} , foram então clonados no vetor pComb3XSS em fase com a sequência gênica da proteína pIII (g3p), que compõe o capsídeo do fago M13, conforme a construção representada na Figura 11.

Figura 11 – Vetor pComb3XSS-Fab



Fonte: adaptado de LEVISSON *et al.* (2014). Regiões de inserto em verde contendo as sequências gênicas de VL-C κ e VH-CH1. Em vermelho, gene da proteína pIII (g3p) do capsídeo do vírus M13 em fase com a sequência de CH1 para expressão de proteína de fusão.

Neste trabalho, células de *E. coli XL-1 Blue* foram previamente submetidas a um protocolo para aquisição de eletrocompetência e, em seguida, transformadas com a biblioteca de Fab-pIII (clonada no vetor pComb3XSS).

3.1.1 Obtenção de células de E. coli XL-1 Blue eletrocompetentes para transformação

A partir da inoculação de colônia isolada, previamente obtida em placa de Petri por esgotamento, cultivaram-se células de *E. coli XL-1 Blue* em 5 mL de meio SB suplementado com 10 µL de tetraciclina (5 mg/mL). Após crescimento por 16 h a 37 °C, os 5 mL de cultura foram inoculados em 500 mL do mesmo meio SB suplementado com 5 mL de glicose 20%, incubado a 37 °C sob agitação de 220 RPM. Atingida a D.O.₆₀₀ de 0,4, a cultura foi incubada em gelo por 20 min e, em seguida, centrifugada a 4000 *x g* por 15 min a 4 °C (em tubos previamente incubados em gelo). Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 50 mL de glicerol 10% gelado e centrifugados sob as mesmas condições. O processo de lavagem com glicerol 10% foi repetido 4x. O *pellet* obtido na última centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% gelado. Após confirmação de D.O.₆₀₀ entre 200 e 250, a suspensão de células foi alíquotada em tubos de 1,5 mL (100 µL de células cada), em gelo; e as alíquotas foram imediatamente armazenadas a -80 °C.

3.1.2 Transformação das células de E. coli XL-1 Blue eletrocompetentes

Para a transformação das células de *E. coli XL-1 Blue*, foram utilizados 10 tubos de 0,5 mL, aos quais foram individualmente adicionados 1 µL (50 ng) de DNA (biblioteca) e 100 µL de cultura de células eletrocompetentes. Em gelo, o conteúdo de cada tubo foi passado para 10 cubetas de 0,1 mL e submetido à eletroporação, utilizando eletroporador Lonza® (programa para 4 de transformação de bactérias). Imediatamente após o choque, para a etapa de regeneração, o conteúdo de cada cubeta foi recuperado com 3 x 1 mL de meio SOC, e o total de 30 mL foi transferido para um frasco de 250 mL e incubado por 1,5 h, a 37 °C sob rotação de 200 RPM. Após a etapa de regeneração, uma alíquota de 200 µL foi retirada para titulação, e 20 mL de meio SB pré-aquecido e suplementado com 10 µL de carbenicilina (100 mg/mL), 100 µL de tetraciclina (5 mg/mL) e glicose 2% foram adicionados à cultura regenerada. Após incubação por 1 h, a 37 °C e sob rotação de 200 RPM, a cultura foi suplementada com 15 µL adicionais de carbenicilina (100 mg/mL) e novamente incubada por 1 h sob as mesmas

condições anteriores. Nesse ponto, a cultura está pronta para a adição do fago auxiliar VCSM13 correspondente ao genoma do fago M13, que possibilita o início da etapa de expressão da biblioteca de Fab apresentada no capsídeo dos fagos (metodologia de *phage display*).

3.2 Phage display

3.2.1 Produção dos fagos

Aos 50 mL de cultura previamente transformada com a biblioteca de Fab foram adicionados 2 mL (10^{12} UFP/mL) de suspensão de fago auxiliar VCMS13 e 148 mL de meio SB suplementado com 75 μ L de carbenicilina, 300 μ L de tetraciclina e glicose 2%. Os 200 mL foram transferidos para um frasco de 1 L, ao qual, após incubação por 1,5 h a 37 °C sob agitação de 300 RPM, foram adicionados 140 μ L de canamicina (50 mg/mL). Após incubação por 1 h, mais 140 μ L de canamicina foram adicionados e a cultura foi, então, incubada por 16 h sob as mesmas condições anteriores para a obtenção da rodada inicial de fagos (R0).

3.2.2 Precipitação dos fagos e ciclos de infecção de células de *E. coli* XL-1 Blue

Ao término da incubação de 16 h, 4 mL da cultura foram coletados para serem submetidos a protocolo de extração de DNA plasmidial por *kit* comercial (*Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System* Promega®), cujo produto foi armazenado como DNA da rodada 0 (R0). O restante da cultura foi centrifugado a $3000 \times g$ por 15 min a 4°C; sendo, em seguida, o sobrenadante transferido para uma garrafa de 500 mL e a ela adicionados 8 g de PEG-8000 e 6 g de NaCl. Após dissolução dos reagentes adicionados (300 RPM por 5 min a 37°C), a suspensão foi incubada em gelo por 30 min e, na sequência, centrifugada a $15000 \times g$ por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 2 mL de TBS-BSA 1% e novamente centrifugado ($18000 \times g$ por 5 min a 4°C). Da última centrifugação, o novo sobrenadante contendo os fagos produzidos na rodada inicial (R0) foi, então, armazenado a 4°C e, na sequência, titulado (*input* de R1) e submetido à primeira etapa de seleção contra a proteína CD19 (metodologia de *biopanning*).

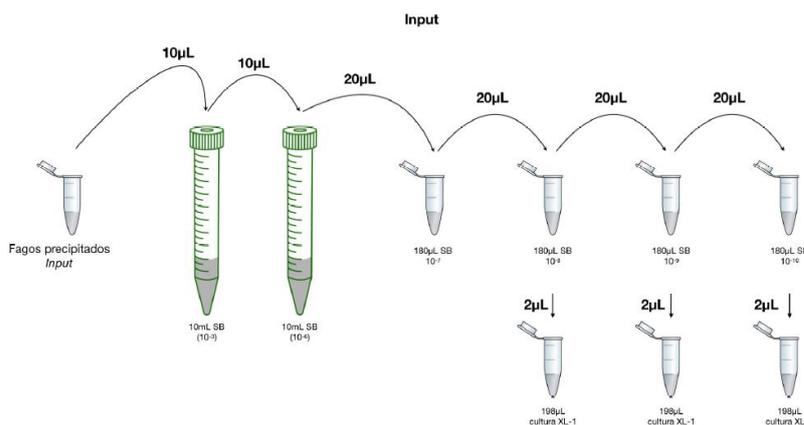
A cada nova rodada de produção de fagos, o mesmo protocolo se repetiu. O *pool* de fagos de entrada (*input*) para infectar uma nova cultura de *E. coli* era proveniente do *pool* de

fagos de saída (*output*) obtido da rodada prévia, de modo que o *input* de R1 foi o *output* coletado de R0.

3.2.3 Titulação dos fagos para estimação de inputs e outputs

A quantidade de fagos que entram e saem de cada etapa de seleção foi estimada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) que cresciam em placas inoculadas com diluições seriadas de culturas bacterianas infectadas com alíquotas dos fagos obtidas em cada rodada. Conforme esquematizado na figura 12, para titulação de *input* de uma rodada qualquer, 10 μL dos fagos precipitados na etapa prévia eram transferidos para 10 mL de meio SB (gerando-se uma diluição inicial de 10^{-3}). Do tubo contendo a primeira diluição, 10 μL eram transferidos para um novo tubo contendo 10 mL de meio SB (diluição de 10^{-6}) e, a partir deste, 20 μL de cada tubo eram transferidos de forma seriada para um novo tubo contendo 180 μL de meio SB; gerando-se, assim, diluições de 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} . 2 μL das maiores diluições de fagos (10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10}) eram então utilizadas para infectar 198 μL de cultura de *E. coli XL-1 Blue* em fase log de crescimento, dos quais 100 μL eram plaqueados em meio SB-ágar e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 16 h.

Figura 12 – Representação esquemática da diluição seriada para titulação de *input*

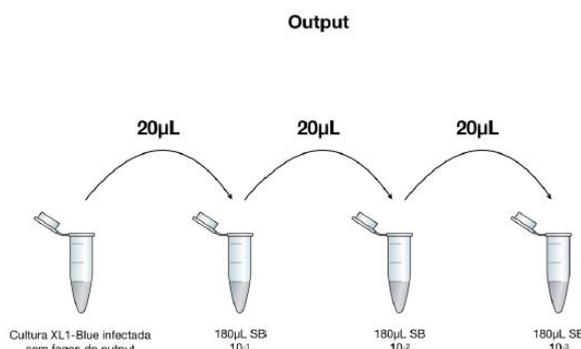


Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Para titulação de *output* de uma rodada qualquer, 20 μL dos fagos coletados – de R0 ou após uma etapa de seleção (a partir de R1) – eram transferidos para 180 μL de meio SB (gerando-se uma diluição inicial de 10^{-1}), a partir da qual eram produzidas, de forma seriada,

mais 2 diluições (10^{-2} e 10^{-3}). 2 μL de cada diluição eram utilizados para infectar 198 μL de cultura de *E. coli* XL-1 Blue em fase log de crescimento, dos quais 100 μL eram plaqueados em meio SB-ágar e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 16 h.

Figura 13 – Representação esquemática da diluição seriada para titulação de *output*



Fonte: elaborada pelo autor (2022).

As médias de UFCs contadas das placas foram corrigidas pelos respectivos fatores de diluição e pelos volumes reais de fagos aplicados ou coletados de cada etapa e, em seguida, utilizadas para estabelecer a razão *input/output* de cada rodada de seleção.

3.3 Biopanning

A biblioteca de fagos-Fab foi submetida ao método de seleção adaptado descrito por Giordano *et al.* (2001), denominado “bio-garimpo” e análise rápida de ligantes interativos e seletivos (BRASIL, do inglês *biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands*), que se baseia na incubação da biblioteca com uma suspensão de células que expressam em sua superfície o antígeno-alvo e na centrifugação diferencial desse sistema na presença de um solvente orgânico (Giordano *et al.*, 2021).

3.3.1 Citometria de fluxo das linhagens de células humanas k562

As células humanas utilizadas – K562WT (linhagem selvagem – obtida a partir de células de leucemia mieloide humana) e K562CD19⁺ (linhagem K562WT modificada geneticamente para expressar a proteína CD19 em sua superfície) – foram doadas pelo INCA.

Essas células crescem em suspensão e foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 0,45% de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 0,15% de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina.

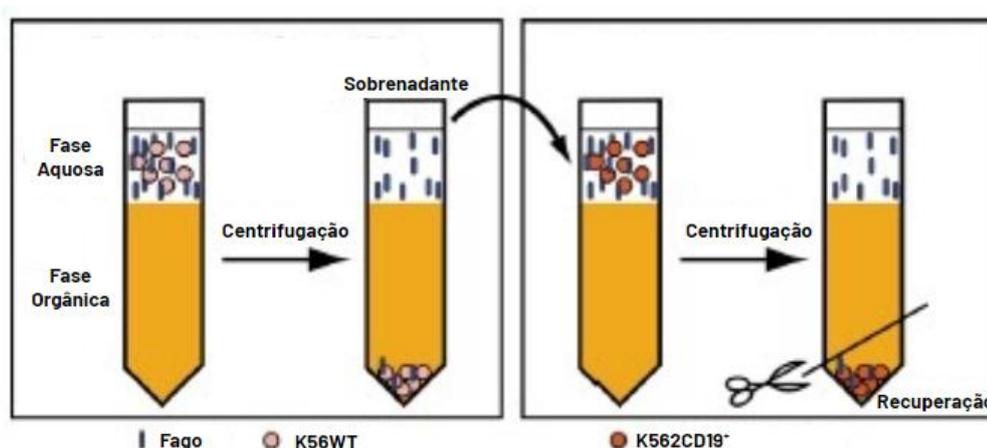
Como etapa prévia importante para validação da estratégia de *biopanning* aplicada neste estudo, as linhagens K562 foram avaliadas através de citometria de fluxo, com o intuito de se atestar a presença da molécula de CD19 na membrana das células utilizadas como portadoras do antígeno-alvo, bem como de se evidenciar a ausência de tal alvo nas células da linhagem selvagem, utilizada como controle de ligação inespecífica. Após estimativa da concentração de células em cultivo através do método de contagem por amostragem em câmara de Neubauer, estabeleceu-se a quantidade de aproximadamente 1×10^6 células K562 (linhagem WT, e linhagem CD19⁺) para serem, após lavagem com PBS para remoção do meio, incubadas com um anticorpo comercial anti-CD19 marcado com o fluorocromo ficoeritrina (PE), o qual emite fluorescência a 578 nm, ao ser excitado pelo laser a 488 nm. Em seguida, os *pellets* foram lavados com PBS para remoção das proteínas que não se ligaram, ressuspensos em tampão FACS e aplicados no citômetro BD FACSVERSE™. Todos os resultados foram analisados através do *software FlowJo*.

3.3.2 Desafio e seleção de fagos-Fab anti-CD19

Em cada rodada de seleção pelo método BRASIL, inicialmente, uma cultura de aproximadamente 1×10^6 células K562WT era lavada 1x com meio RPMI, centrifugada e ressuspensa em 1 mL do mesmo meio suplementado com BSA 1%. A essa cultura, em duplicatas, eram então adicionados 100 µL da suspensão de fagos coletados de uma rodada prévia. Após incubação por 1 h em gelo, o sistema era então transferido para um tubo contendo 200 µL de uma mistura de dibutilftalato e cicloexano (9:1), em duplicatas, e centrifugado a $10000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa (superior) do sistema era então coletada e adicionada a um novo tubo contendo 1 mL de aproximadamente 1×10^6 células K562CD19⁺ em meio RPMI suplementado de BSA 1% (células também submetidas à lavagem prévia com o mesmo meio não suplementado). Após incubação em gelo por 1,5 h, o sistema era então transferido para um tubo contendo 200 µL da mistura de dibutilftalato e cicloexano (9:1), em duplicatas, e centrifugado a $10000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. Dessa vez, a fase orgânica presente na parte inferior do tubo era então coletada. Para isso, os tubos eram mergulhados em nitrogênio

líquido e, em seguida, cortados com lâmina abaixo do limite da fase orgânica. As bases dos tubos cortados eram então incubadas por 15 min com 2 mL de cultura de *E. coli XL-1 Blue* em fase log de crescimento. Após a incubação, uma alíquota de 200 μ L da cultura era removida para titulação de *output* e o restante da cultura era transferido para um tubo de 50 mL contendo 6 mL de meio SB suplementado com 1,6 μ L de carbenicilina (100 mg/mL), 18 μ L de tetraciclina (5mg/mL) e glicose 2%, e incubada por 1 h a 37°C sob agitação de 300 RPM para seguir para um novo ciclo de produção de fagos e seleção.

Figura 14 – Representação esquemática do método BRASIL



Fonte: adaptado de Giordano *et al.* (2021).

A cultura era reforçada com mais 2,4 μ L de carbenicilina e incubada sob as mesmas condições. Após 1 h de incubação, 1 mL de fago auxiliar e 91 mL de SB pré-aquecido e suplementado (46 μ L de carbenicilina, 184 μ L de tetraciclina e glicose 2%) eram adicionados, e a cultura era incubada por 1,5 h sob as mesmas condições. 140 μ L de canamicina (50 mg/mL) eram então adicionados, e a cultura era incubada por 16 h. No dia seguinte, 4 mL da cultura eram coletados para serem submetidos a protocolo de extração de DNA plasmidial por *kit* comercial, e o produto purificado era armazenado como DNA da respectiva rodada prévia. 4 rodadas de seleção foram realizadas (R1, R2, R3 e R4).

3.4 Obtenção das sequências V_H e V_L selecionadas

3.4.1 PCRs de amplificação das sequências e inclusão dos adaptadores para o NGS

Os produtos de purificação de DNA plasmidial obtidos das etapas R0, R1, R2 e R3 foram submetidos a uma série de PCRs para padronização da amplificação das sequências dos domínios V_H e V_L dos Fabs selecionados e para inclusão dos adaptadores necessários para a etapa seguinte de sequenciamento de nova geração. Nesse contexto, diferentes condições de termociclagem e diferentes enzimas foram testadas. Os melhores desempenhos foram obtidos pela aplicação de poucos ciclos e com uso da enzima de alta fidelidade *Transstart® FastPfu DNA polimerase* (Transgen Biotech). Reações de 25 µl foram preparadas com 0,5 µL de cada *primer* (10 µM); 5 µL de tampão (5x) da enzima; 2 µL de dNTPs (10 mM); 5 µL de solução estimulante; 0,5 µL de enzima (2,5 U/µL); 4,5 µL de água; e 7 µL de DNA. Com termociclagem de 2 min iniciais a 98 °C, seguidos de 30 ciclos (1 min a 98 °C; 30 s a 52 °C; 1 min a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C. Abaixo são mostradas as sequências (com os adaptadores) dos *primers* utilizados.

Tabela 2 – *Primers* para amplificação das sequências V_H e V_L selecionadas

VH (F)	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGCCCAACCAGCCATGGCC
VH (R)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGATGGGCCCTTGGTGGAGGC
VL (F)	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAGAGACAGGGGCCAGGCCGCCGAGCTC
VL (R)	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT

Fonte: elaborado pelo autor (2022). F: *primer forward*; R: *primer reverse*.

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Para as corridas eletroforéticas de separação e avaliação de DNA, prepararam-se géis de agarose de 0,8%, 1% e 2% em tampão TAE (tris-acetato-EDTA pH 8). As corridas foram realizadas com tensão de 50 V. Conforme o volume final desejado, as amostras eram preparadas pela adição de tampão de amostra 5x (*Loading Dye + GelRed™*) aos produtos de PCR e de purificação de DNA. Em cada corrida, utilizaram-se 7 µl de solução de marcadores de pesos moleculares de 0,1 e 1 Kb (*DNA ladder* Promega®).

3.4.3 Purificação das bandas dos géis de agarose

A purificação dos produtos de PCR foi realizada a partir da excisão das bandas correspondentes aos tamanhos de fragmentos esperados nos géis de agarose. Após testagem de diferentes condições, o protocolo de purificação foi padronizado. As bandas excisadas eram protegidas em envelope de filme de parafina e imediatamente armazenadas a -80 °C por pelo

menos 3 h. As bandas congeladas eram então esmagadas dentro do envelope e transferidas para um sistema de filtração por centrifugação (15000 $x g$ por 10 min a 4 °C). Ao conteúdo filtrado eram então adicionados 10% (volume) de acetato de sódio 3 M (pH 5,6), 2 volumes de etanol absoluto e solução de glicogênio (para uma concentração final de 150 $\mu g/mL$). As amostras eram incubadas a 4 °C por 2 h e, em seguida, centrifugadas a 20000 $x g$ por 30 min a 4°C. O sobrenadante era cuidadosamente removido e descartado, e o tubo era novamente submetido à centrifugação para remoção do sobrenadante residual. Após secagem, o DNA era precipitado pela adição de 500 μL de etanol 70%, seguido de centrifugação a 12000 $x g$ por 2 min a 4 °C. Após remoção cuidadosa e descarte do sobrenadante, o *pellet* era ressuspensionado em água, e a solução quantificada e armazenada a -20 °C.

3.4.4 Quantificação de DNA

Os produtos de PCR e de purificação de DNA foram quantificados por espectrofotometria a 260 nm em aparelho *NanoDrop 2000* (Thermo Fischer Scientific®) e/ou por fluorimetria através de *kit* comercial em sistema *Qubit* (Thermo Fischer Scientific®), conforme especificações do fabricante.

3.4.5 Análise por sequenciamento de Sanger

Antes de submeter as amostras ao NGS, 10 μL do DNA plasmidial (na concentração final de 60 $ng/\mu L$) extraído de cada etapa (R0, R1, R2 e R3) foram preparados e enviadas para a unidade da Fiocruz de Pernambuco, onde, por método de Sanger e pelo uso de *primers* que anelavam ou nas porções constantes ou no vetor pComb3XSS, foram sequenciadas. A qualidade do sequenciamento e os resultados foram analisados através do *software Bioedit*, em que alinhamentos globais entre as sequências selecionadas e o arcabouço característico da porção Fab foram realizados pela ferramenta *Clustal W*.

3.5 Sequenciamento de nova geração

As sequências V_H e V_L amplificadas das rodadas R0, R1, R2 e R3 – purificadas e já contendo em suas extremidades os adaptadores (p5 e p7) necessários para o sequenciamento por síntese, após a amplificação em ponte (plataforma MiSeq Illumina®) – foram então

submetidas à etapa de inclusão dos *indexes* duplos que permitem o rastreamento das amostras para análise do sequenciamento a partir das duas extremidades de cada fragmento (*paired-end sequencing*).

As amostras foram novamente quantificadas por fluorimetria e indexadas (*kit Nextera XT Index* Illumina®), seguindo-se as recomendações adaptadas do protocolo de sequenciamento dos genes do RNA ribossomal 16S (*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). Para cada amostra, uma mistura reacional de 50 µL foi preparada com 5 µL de produto de PCR purificado, 5 µL de cada *primer* (1 e 2), 25 µL de *mix* da DNA polimerase KAPA Hifi e 10 µL de água. A termociclagem foi iniciada com 3 min a 95 °C, seguidos de 25 ciclos (20 s a 95°C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72°C. Após reação de indexação, as amostras foram purificadas através de *kit* comercial AMPure XP (Thermo Fischer Scientific®), conforme as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados por fluorimetria e avaliados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 3 – Tamanho aproximado amplicons

Fragmento	Tamanho	+ adaptadores	+ indexes
V_H	420 pb	488 pb	504 pb
V_L	354 pb	422 pb	438 pb

Fonte: elaborado pelo autor (2022). pb: pares de bases.

Em consonância com o protocolo *16S* e utilizando-se o *kit MiSeq v3 reagent* (Illumina®), a biblioteca de sequenciamento foi preparada e normalizada. 5 µL de cada amostra indexada foram diluídos para 40 nM em tampão tris (10 mM pH 8,5). Em seguida, após uma nova diluição, para 4 nM, as amostras referentes a V_H de todas as rodadas foram reunidas em único tubo, e as amostras referentes a V_L, reunidas em outro tubo. O conteúdo dos 2 tubos foi quantificado por fluorimetria em duplicatas e, considerando-se o fato de os 2 tipos de fragmentos terem tamanhos diferentes (tabela), buscou-se uma proporção equimolar entre os *pools* de V_H e V_L. Os dois *pools* foram reunidos e o volume necessário para a obtenção de uma concentração final de 8 pM (do *pool* de V_H e V_L na biblioteca de sequenciamento) foi coletado e incubado com solução de hidróxido de sódio 0,2 M (por 5 min a temperatura ambiente) para desnaturação. Em seguida, o volume adequado de produto de desnaturação foi ajustado com tampão de hibridização (HT1) para a concentração e volume finais almejados, considerando-se, ainda, o volume da biblioteca de controle de sequenciamento (phiX) fornecida no *kit*. O phiX foi desnaturado de forma semelhante às amostras e ajustada com tampão HT1 para uma

concentração final também de 8 pM. Optou-se pela aplicação de 15% do volume total da biblioteca de sequenciamento com o controle phiX. Antes de ser transferida para o cartucho de reagentes (*kit v3*) e colocada no aparelho (MiSeq), a biblioteca (volume final de 600 µL) foi incubada por 2 min, a 96 °C e, em seguida, por 5 min, em gelo.

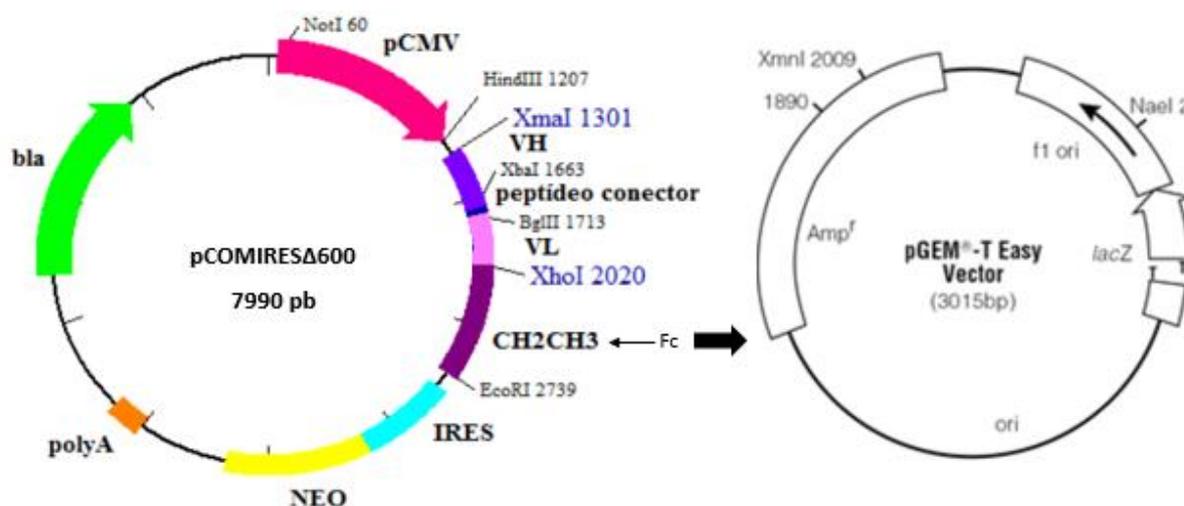
3.6 Análise e seleção de sequências promissoras

Para análise e direcionamento dos dados gerados do NGS, os arquivos em formato FASTQ obtidos a partir do *BaseSpace Sequence Hub* (Illumina®) foram submetidos à plataforma *Automated Tool for Immunoglobulin Analysis* (ATTILA), desenvolvida pelo Laboratório de Informática da UnB (Silva, 2016). Pela plataforma ATTILA, é possível avaliar e filtrar *in silico* sequências das regiões variáveis de anticorpos produzidas por *phage display* e, assim, inferir sequências e combinações promissoras para a geração de novos anticorpos. Inicialmente o algoritmo une cada par de *reads* obtido da mesma sequência (*paired-end*); elimina ruídos e sequências de baixa qualidade; traduz as sequências nucleotídicas para as sequências aminoacídicas; busca marcas canônicas do arcabouço das regiões variáveis dos anticorpos; compara conjuntos de dados (rodadas de seleção *versus* a biblioteca de partida) para avaliação do enriquecimento de sequências; e classifica as linhagens germinativas das sequências com base no banco de dados *IgBlast*. A plataforma fornece, portanto, as sequências V_H e V_L de alto enriquecimento e de linhagem germinativa definida, ordenadas pela razão entre sua frequência relativa, na rodada final, e sua frequência relativa na biblioteca inicial (*fold change*).

3.7 Obtenção de sequências Fc mutantes

A sequência gênica nativa da porção Fc utilizada é proveniente do cDNA do gene de IgG1 humano e encontrava-se integrada na região transcrita do vetor pCOMIRESΔ600, desenvolvido pelo grupo de Imunologia Molecular da UnB (QUILICI *et al* 2013). A sequência da porção Fc (domínios C_{H2} e C_{H3}) nesse vetor é flanqueada pelos sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *EcoRI*; assim, a sequência foi subclonada em vetor pGEM®-T *Easy* (Promega®), que foi, por sua vez, em seguida, usado como molde nas respectivas PCRs mutagênicas.

Figura 15 – Vetores de trabalho



Fonte: adaptado de QUILICI *et al.* (2013).

3.7.1 Subclonagem da sequência gênica do Fc em vetor pGEM®-T Easy (Promega®)

Para a subclonagem, inicialmente 24 ng de plasmídeo pCOMIRESΔ600 foram usados como molde em uma PCR para amplificação da sequência gênica do Fc, usando *primers* específicos para a sequência e contendo os sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *EcoRI*, de modo a gerar produtos flanqueados por esses sítios. A PCR foi realizada com a DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion*[™] (Thermo Fischer Scientific®) em reação de 50 µL (1 µL de cada *primer* 10 µM; 25 µL de *mix* com 1 µL de enzima 2 U/µL; 1,5 µL de DMSO; 20,5 µL de água; e 1 µL de DNA 24 ng/µL) e aplicando-se, na termociclagem, 3 min iniciais a 98 °C, seguidos de 35 ciclos (30 s a 98 °C; 30 s a 60 °C; 1 min a 72°C) e extensão final de 5 min. O produto de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose, purificado com *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega®), conforme instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria. Em seguida, 200 ng do produto de PCR purificado foram submetidos a uma reação de adenilação para gerar complementaridade do produto com o *overhang* 3'-T do pGEM®-T *Easy* e, assim, permitir a inserção da sequência no vetor. Para a adenilação, foi utilizada a DNA polimerase *GoTaq®* (Promega®) em uma reação de 10 µL (5 µL de DNA 40 ng/µL; 2 µL do tampão 5x da enzima; 2 µL de dATP 1mM; 0,25 µL da enzima 5 U/µL; e 0,75 µL de água), a mistura foi incubada por 20 min a 72 °C.

Conforme calculado para uma reação de ligação de 10 µL e proporção molar de 7:1 (inserto:vetor) – utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Promega®) – foi incubado por 16 h a 4 °C o seguinte sistema reacional: 2 µL (82 ng) do produto adenilado (inserto); 1 µL (50 ng) de

pGEM®-T Easy (vetor); 5 µL de tampão (2x) da enzima, 1 µL de enzima (1 U) e 1 µL de água. No dia seguinte, a enzima foi inativada a 65°C por 15 min, e 5 µL do produto de ligação foram utilizados para transformar por choque térmico células de *E. coli TOP10* quimiocompetentes.

3.7.2 Obtenção de células de *E. coli TOP10* quimiocompetentes para transformação

Para aquisição de células quimiocompetentes: a partir da inoculação de colônia isolada previamente obtida em placa de Petri por esgotamento, cultivaram-se as células de *E. coli TOP10* em 5 mL de meio LB na ausência de antibióticos. Após crescimento por 16 h a 37 °C, 1 mL de cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB, incubado a 37 °C sob agitação de 200 RPM, até atingir-se a densidade ótica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,4 - 0,6. Após atingir a D.O. pretendida, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 5000 *x g*, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se as células cuidadosamente em 40 mL de MgCl₂ (0,1 M). Em seguida, realizou-se nova centrifugação a 3000 *x g* por 10 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o *pellet* em 2 mL de CaCl₂ (0,1 M). As células foram então incubadas por 20 minutos em gelo, e, na sequência, foi adicionado a elas 1 mL de glicerol 50%. As amostras foram divididas em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL previamente mantidos em gelo, seguindo para armazenamento a -80 °C.

3.7.3 Transformação das células de *E. coli TOP10* quimiocompetentes

Para a transformação das células por choque térmico, uma alíquota de *E. coli TOP10* quimiocompetente foi descongelada em banho de gelo, e a 50 µL de cultura foi adicionado um *mix* preparado com 5 µL do produto de ligação, 5 µL de CaCl₂ (0,1 M), 10 µL de MgCl₂ (0,1 M) e 30 µL de água. O sistema permaneceu por 30 minutos em gelo, seguidos de 1 minuto em banho seco a 42 °C e 2 minutos em gelo, novamente, para que o choque térmico fosse efetuado. Na sequência, adicionaram-se às células 900 µL de meio SOC para etapa de regeneração, na qual a cultura foi submetida à agitação de 200 RPM, a 37 °C por 1 h. Após o período de incubação, a cultura foi centrifugada a 10000 *x g* por 3 minutos, 950 µL do sobrenadante foram descartados, e o *pellet* obtido foi ressuspendido nos 50 µL de meio restantes, sendo, em seguida, inoculados em placa de Petri – preparada com 10 mL de meio LB-ágar seletivo (ampicilina 100 µg/mL) suplementado com IPTG (75 µM) e X-Gal (300 µM) – posteriormente incubada por 16 h a 37 °C em estufa bacteriológica.

3.7.4 PCR de colônias

Das colônias isoladas de coloração branca crescidas na placa – indicativo parcial de efetividade da clonagem, dada a ausência de produto azulado resultante da reação catalisada pela enzima β -galactosidase, cujo gene é interrompido pela entrada do inserto – 10 foram selecionadas e submetidas a PCR de colônias para a obtenção de mais indícios de confirmação da clonagem. O procedimento foi feito a partir da coleta por raspagem, através da ponta de uma ponteira estéril, de parte de cada colônia selecionada, a qual foi, em seguida, submersa em tubo de 0,2 mL contendo 1 μ L de cada *primer* específico para o inserto e 24 μ L de *mix* de PCR (Genscript *Taq* DNA polimerase, tampão da enzima, dNTP's e água livre de DNase). A termociclagem foi realizada com 2 min iniciais a 98 °C, seguidos de 30 ciclos (30 s a 95 °C; 30 s a 58 °C; 1 min a 72°C) e extensão final de 5 min. O produto de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose, e a parte que restou na placa de 3 colônias selecionadas, dentre as positivas pela PCR, foi, separadamente, inoculada em 5 mL de meio LB adicionado de ampicilina (100 μ g/mL) e incubada por 16 h, a 37 °C, sob agitação de 200 RPM. Na sequência, as 3 culturas bacterianas obtidas foram submetidas ao protocolo de extração e purificação de seu DNA plasmidial (pGEM-Fc) através do *Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega®), conforme estabelecido pelo fabricante.

3.7.5 PCRs mutagênicas

As duas sequências de Fc mutantes produzidas em nível gênico neste trabalho – respectivamente, N421C e S239C – foram geradas por mutagênese sítio-dirigida (MSD) a partir de PCR com uso de *primers* mutagênicos especificados na Tabela 4.

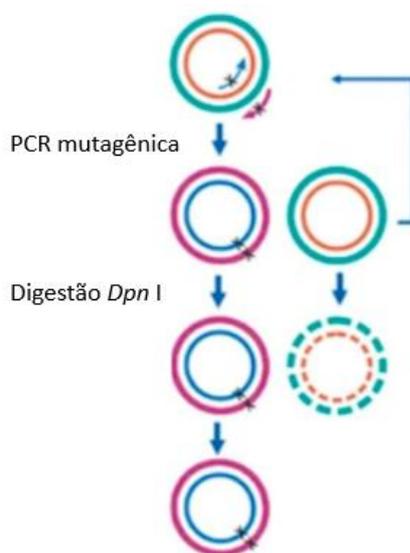
Tabela 4 – *Primers* mutagênicos

	Fc_N421C	Fc_S239C
F	AGGGGTGCGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCA	GGACCGTGCGTCTTCCTCTTCCCCCAA ACCAA
R	AGACGCACCCCTGCTGCCACCTGCTC TTG	GAAGACGCACGGTCCCCCAGGAGTTCA GGTGC

Fonte: elaborado pelo autor (2022). F: *primer forward*; R: *primer reverse*. Região de complementaridade entre os *primers* F e R (destacada em amarelo); códon de cisteína mutante (em vermelho).

Para permitir a substituição de códons pontuais na sequência gênica do Fc, os *primers* foram desenhados contendo duas regiões fundamentais: uma região que permite a complementaridade entre o par de *primers* correspondente a cada mutante (região destacada em amarelo na tabela) e outra região não complementar capaz de se anelar ao DNA usado como molde na PCR. A região de anelamento ao molde (sem destaque na tabela), sendo maior que a região de complementaridade entre os *primers*, apresenta temperatura de *melting* (T_m) superior em aproximadamente 10 graus, o que permite que os *primers* se anelem primeiro ao molde e não entre si (LIU; NAISMITH, 2008). A trinca de nucleotídeos mutante deve estar necessariamente presente na região de complementaridade entre os dois *primers* mutagênicos, o que garante a substituição desse códon pontual em todas as moléculas de vetor amplificado (produto da PCR). Para eliminar as moléculas de vetor (obtido por extração plasmidial) usado como molde – não contendo, portanto, a substituição almejada – o produto foi submetido à reação de digestão com a enzima de restrição *DpnI* (NEB). Essa enzima catalisa a clivagem de sítios contendo adeninas metiladas, uma marca pós-replicativa do DNA bacteriano.

Figura 16 – Apresentação esquemática da técnica de MSD aplicada



Fonte: adaptada de GONZÁLEZ; FILLAT (2018).

As duas PCRs mutagênicas foram realizadas com a enzima de alta fidelidade *Transstart® FastPfu DNA polimerase* (Transgen Biotech) em reações de 50 μL (1 μL de pGEM-Fc 25 ng/ μL ; 2,5 μL de cada *primer* 10 μM ; 10 μL de tampão 5x da enzima; 4 μL de dNTPs 10 mM; 5 μL de solução estimulante; 1 μL de enzima 2,5 U/ μL ; e 24 μL de água) e aplicando-se, na termociclagem: 2 min iniciais a 98 $^{\circ}\text{C}$, seguidos de 15 ciclos (20 s a 98 $^{\circ}\text{C}$; 30

s a 55 °C; 2,5 min a 72 °C) e extensão final de 5 min a 72 °C. Os produtos das PCRs mutagênicas foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (para constatação de banda correspondente a um amplicon de ~ 3,7 kb) e purificados através de *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega®). Os produtos purificados foram concentrados para 10 µL e, em seguida, incubados por 30 min a 37 °C com a enzima *DpnI* (NEB) em duas reações de 20 µL (10 µL de DNA; 2 µL de tampão *cutsmart* 10 x; 1 µL de enzima 20 U/µL; e 7 µL de água). A enzima foi inativada a 80 °C por 20 min, e os produtos digeridos foram quantificados por espectrofotometria.

10 ng de cada produto de PCR mutagênica, purificado e digerido, foram utilizados para transformar por choque térmico células de *E. coli TOP10* quimiocompetentes, conforme protocolo já descrito. 3 colônias referentes a cada um dos dois mutantes (N421C e S239C) foram cultivadas em 5 mL de meio LB seletivo e submetidas à extração de DNA plasmidial por *kit* comercial. Os 6 produtos purificados (N1, N2, N3, S1, S2 e S3) foram quantificados por espectrofotometria e armazenados a -20 °C. Alíquotas de 600 ng de cada produto foram enviadas para sequenciamento (método de Sanger) na unidade da Fiocruz-Pe.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da diversidade da biblioteca inicial após a transformação bacteriana

A biblioteca recombinante de variantes gênicas da porção Fab de imunoglobulina humana utilizada – construída por grupo de pesquisa colaborador – tem diversidade estimada de $1,45 \times 10^8$ (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005). Após ser utilizada, neste estudo, para transformação das células *XL-1 Blue*, a quantidade de colônias obtidas foi titulada e estimada em $2,48 \times 10^8$, indicando uma boa cobertura da biblioteca utilizada.

O tamanho da biblioteca inicial é um fator fundamental para a seleção exitosa de variantes específicas e de alta afinidade a um epítopo aleatório (BARBAS *et al.*, 2001); afinal, quanto maior é o *pool* de variantes, maior é a chance de que entre elas haja sequências capazes de se ligar ao alvo abordado. O tamanho estimado pelo método de titulação – a partir da contagem de UFCs – não indica necessariamente a quantidade de variantes efetivas que serão expressas em níveis adequadas e/ou que serão estruturalmente funcionais, o que corrobora a importância da busca pela máxima diversidade possível da biblioteca de partida. (ALMAGRO *et al.*, 2019).

Dado que a interação com o epítopo é determinada por 6 CDRs, tendo cada uma delas, em média, a extensão de 10 resíduos de aminoácidos – os quais podem variar em 20 tipos – o tamanho teórico máximo de diversidade de uma biblioteca de variantes de anticorpos humanos seria de 20^{60} (ALMAGRO *et al.*, 2019). Apesar de os mecanismos naturais de geração de diversidade (recombinação dos segmentos gênicos *V(D)J*; alterações de junção e hipermutação somática) terem uma base absolutamente estocástica, a otimização da produção de anticorpos mais efetivos contra antígenos mais frequentes, ao longo da evolução do sistema imune, foi, em parte, possibilitada pelo surgimento de mecanismos enviesados de geração de diversidade, provavelmente, em prol de epítopos mais prováveis ou mais representativos de ameaça. Isso é evidenciado pela maior frequência relativa de determinados tipos de mutações e em pontos específicos dos paratopos (*hot spots*) (SCHRAMM; DOUEK, 2018).

Obviamente, além do fato de a diversidade nas 6 diferentes CDRs não impactar igualmente para a qualidade da interação – sendo a diversidade na CDRH3 substancialmente mais importante do que a diversidade em outras CDRs – fatores práticos restringem o tamanho máximo das bibliotecas de *phage display* para em torno de 10^{10} - 10^{11} . A eficiência de transformação bacteriana é um desses fatores. Mesmo utilizando-se a estratégia de realizar

eletroporações múltiplas, ainda assim, o volume viável de cultura para se expandir ao máximo a biblioteca é um outro fator limitante (ALMAGRO *et al.*, 2019).

Tendo sido mantida a ordem de grandeza da biblioteca original, inferiu-se, através do número de clones, uma boa representatividade das variantes da biblioteca de Fabs utilizada. Dado que, em um ser humano, a quantidade média de diferentes clones de linfócitos B circulantes que expressam um anticorpo único é de aproximadamente 10^9 (SCHRAMM; DOUEK, 2018), estimou-se que a diversidade da biblioteca utilizada é adequada para a seleção de anticorpos contra virtualmente qualquer antígeno.

4.2 Avaliação da expressão do antígeno nas linhagens K562 por citometria de fluxo

A confirmação da ausência da molécula de CD19 na membrana das células K562WT bem como a constatação de sua expressão na membrana das células transformadas para essa finalidade (linhagem geneticamente modificada K562CD19⁺) foram obtidas através de citometria de fluxo, estabelecendo-se como um importante requisito de validação da estratégia de seleção de sequências com especificidade para o alvo CD19.

Na citometria de fluxo, células em suspensão em tampão salino são individualmente canalizadas através de uma corrente fluida que é interceptada por um feixe de luz, geralmente proveniente de um laser. Quando o feixe atinge uma célula, ele se dispersa em várias direções, o que é determinado por diversas características intrínsecas de cada célula (tamanho, estrutura interna, morfologia e densidade ótica), podendo também ser detectada a fluorescência emitida por marcadores aplicados em tratamentos prévios, classificando-se, assim, cada célula como um evento (BROWN; WITTEW, 2000). As células individuais são então agrupadas diferencialmente dentro das populações analisadas. Uma população não portadora do antígeno é utilizada como referencial (controle negativo) a partir do qual as outras populações são comparadas por análise gráfica da dispersão entre elas. A detecção do desvio frontal do feixe que atinge a célula está relacionada ao tamanho da partícula, o que se dá por dispersão linear (FSC, *forward scatter*), enquanto a detecção de desvios ortogonais está associada à granulosidade da célula, o que é influenciado por sua complexidade, sendo determinada pela dispersão lateral (SSC, *side scatter*) (SHAPIRO, 1995).

Pela figura 17-A, verifica-se que as células K562WT tratadas com um anticorpo anti-CD19 marcado com o fluorocromo PE não apresentaram a fluorescência correspondente para além do limite estabelecido previamente a partir de células não tratadas (referencial demarcado pela barra vertical do gráfico, representativo do sinal máximo emitido por essas

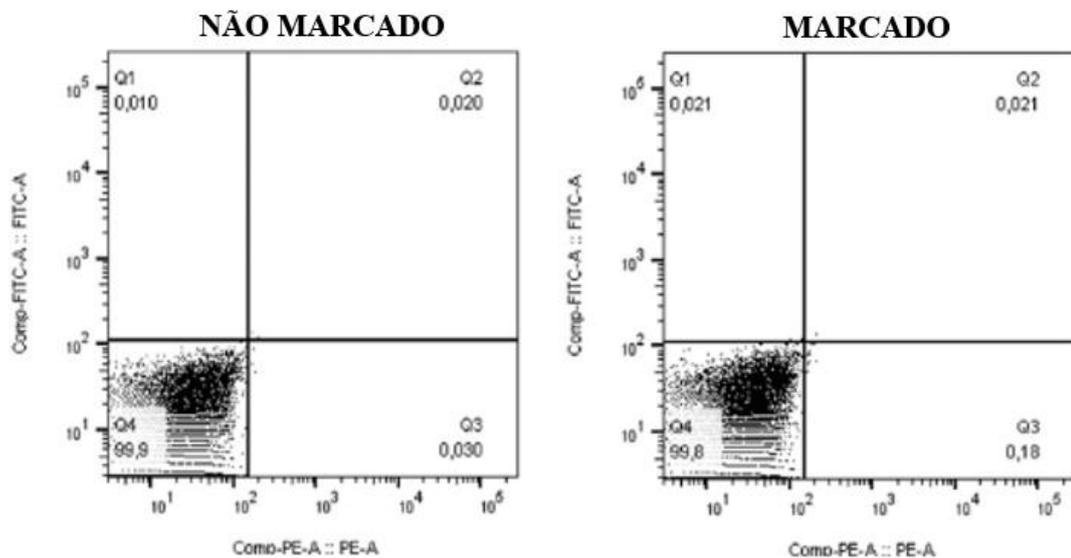
células sem a presença do fluorocromo PE), o que indica que não houve ligação do anticorpo na membrana das células analisadas.

Na figura 17-B, verifica-se a detecção de fluorescência de 31,6% das células K562CD19⁺ analisadas (total de 10000 eventos), o que indica a expressão da proteína CD19 na membrana dessas células. O fato de haver uma parte da população não emitindo sinal da ligação do anticorpo marcado na molécula de CD19 (eventos contidos no quarto quadrante) pode representar uma perda ou uma redução da expressão da proteína por parte dessas células recombinantes ao longo dos subcultivos. Essas células foram transformadas por vetor lentiviral, sendo possível o silenciamento de transgenes por modificações epigenéticas em parte da população transformada (GUTIERREZ-GUERRERO; COSSET; VERHOEYEN, 2020). É possível especular ainda a chance de internalização do anticorpo quando este se liga ao seu alvo na superfície da célula em parte dos eventos (LIM *et al.*, 2011).

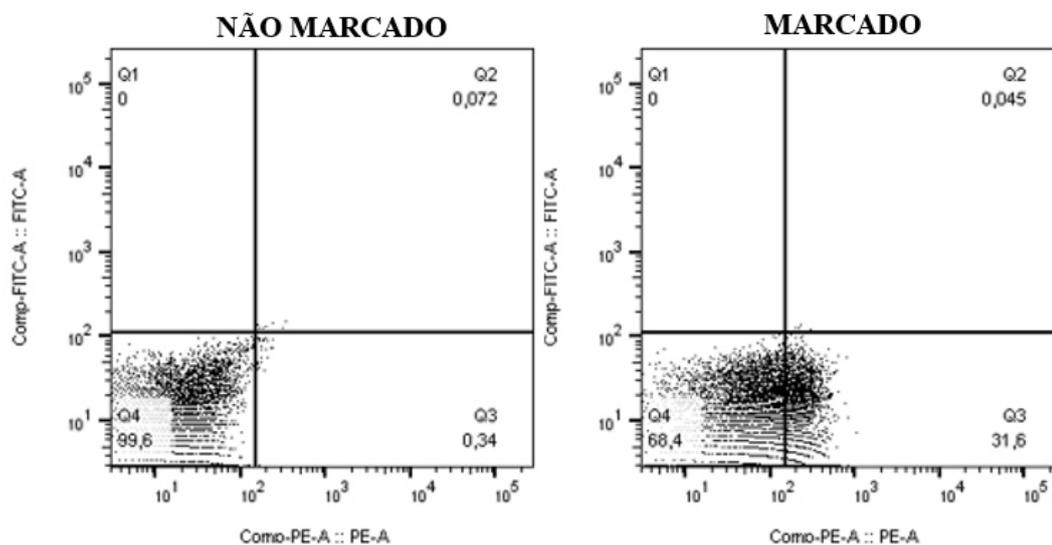
Figura 17 – Análise da expressão de CD19 na membrana das células K562

A

K562WT



B

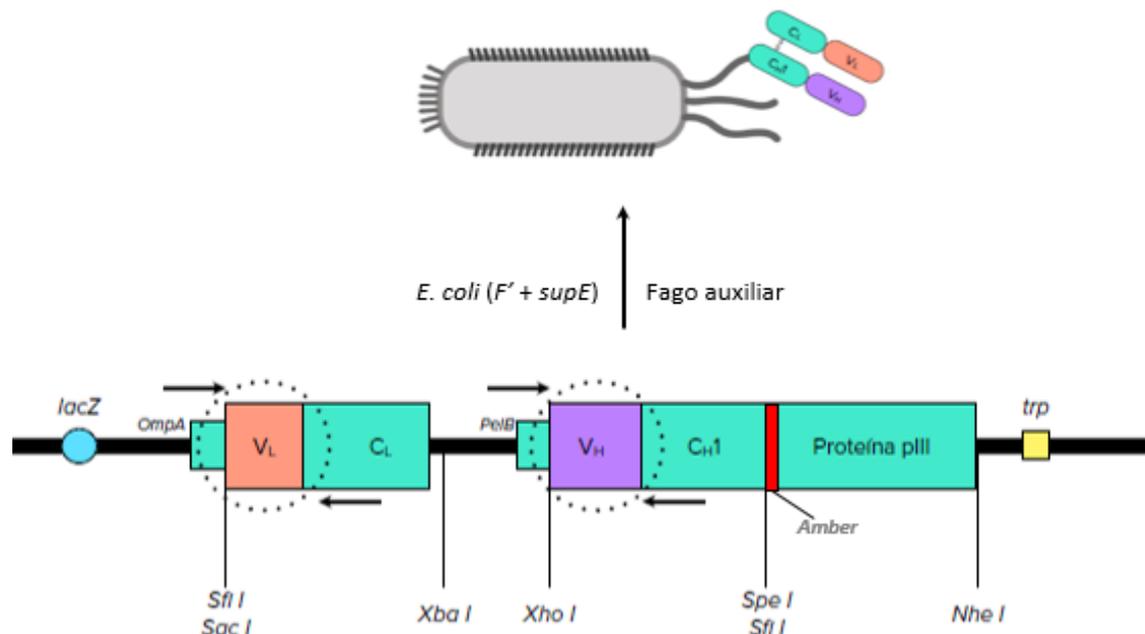
K562CD19⁺

Fonte: elaborado pelo autor através do *software FlowJo* (2022). (A) K562WT marcado: tratada com anti-CD19 marcado com PE; K562WT não marcado: não tratada com nenhum anticorpo. (B) K562CD19⁺ marcado: tratada com anti-CD19 marcado com PE; K562CD19⁺ não marcado: não tratada com nenhum anticorpo.

4.3 Expressão dos fagos-Fab

Conforme a construção do cassete de expressão da biblioteca – clonada previamente no vetor pComb3XSS (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005) – a região transcrita conduz à tradução da proteína pIII do capsídeo do vírus M13 fusionada aos domínios V_HC_{H1}, enquanto os domínios V_LC_κ são expressos fora da proteína de fusão, tendendo a se unir por meio de ponte dissulfeto (formada entre as cadeias C_{H1} e C_κ) no ambiente periplasmático, gerando, assim, o fragmento Fab do lado N-terminal da proteína de fusão (pIII-Fab). A utilização de uma cepa de *E. coli* portadora do plasmídeo de conjugação F⁺ e da mutação *supE44* (tal como a cepa *XL-1 Blue*), permite a infecção dessas células com partículas virais derivadas do fago M13 (fago auxiliar VCSM13) e concomitante expressão da proteína de fusão.

Figura 18 – Estratégia de produção de fagos-Fab



Fonte: elaborado pelo autor (2022). *F'*: plasmídeo conjugativo para expressão de pilus sexual; *SupE44*: mutação que suprime o códon âmbar (*Amber*) de parada. Sequências de peptídeos sinais *OmpA* e *PelB*, associados ao envio da proteína de fusão e de $V_L C_K$ para o periplasma.

Embora a região transcrita esteja sob o controle do promotor *lacZ* (induzível por IPTG), (conforme esquematizado na figura 18), a expressão basal (não induzida) da proteína de fusão (pIII-Fab) é suficiente para os ciclos de produção de fagos e infecção de novas bactérias. A supressão do códon âmbar de parada na cepa *XL-1 Blue* (mutação *supE44*) permite a expressão da proteína de fusão, já que a bactéria expressa um RNAt de glutamina com anticódon âmbar. A presença de plasmídeo conjugativo na cepa também é essencial para a produção de fagos e para a continuidade do processo de *phage display*, uma vez que o fago M13 precisa se ligar ao pilus sexual (codificado no plasmídeo *F'*) da bactéria para infectá-la. Nesse contexto, a proporção adequada de pIII e pIII-Fab no capsídeo dos fagos produzidos também é um parâmetro importante para permitir novos ciclos de infecção, já que a interação das partículas virais com o pilus se dá por meio da proteína pIII, que precisa, portanto, apresentar seus pontos de interação disponíveis.

4.4 Avaliação de títulos (*phage display*) e da eficiência de seleção (*BRASIL*)

Por meio de diluições seriadas em meio seletivo (conforme descrito no item 3.2.3), a produção de fagos de cada rodada foi evidenciada e quantificada pelo crescimento de colônias de bactérias infectadas com as respectivas suspensões de saída obtidas de cada etapa. Da mesma

forma, foram obtidas as titulações das suspensões que entraram em cada nova rodada, de modo que a razão entre os títulos de entrada e de saída (E/S) foram utilizados para o acompanhamento da ocorrência de seleção ao longo das rodadas de *biopanning*. A tabela 5 traz os títulos e razões E/S referentes às 4 rodadas de BRASIL realizadas.

Tabela 5 – Títulos de fagos

Rodada	Entrada (<i>input</i>)	Saída (<i>output</i>)	Razão E/S (I/O)
R1	9,40 x 10 ¹¹	8,90 x 10 ⁵	1,05 x 10 ⁶
R2	1,36 x 10 ¹³	7,96 x 10 ⁶	1,70 x 10 ⁶
R3	2,32 x 10 ¹²	2,91 x 10 ⁹	1,10 x 10 ³
R4	1,06 x 10 ¹²	6,64 x 10 ⁵	3,40 x 10 ⁶

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Conforme esperado, os *pools* de fagos que saiam de cada rodada foram sempre inferiores aos *pools* de fagos de entrada, o que pode ser atribuído tanto à saturação de sítios de ligação disponíveis nas células para interação, como à remoção das variantes não específicas pelo processo de seleção. Em conformidade com a literatura, o número de fagos de saída tende a ficar entre valores de 10⁵ a 10⁸ enquanto o número de fagos de entrada, em torno de 10¹² (BARBAS *et al.*, 2001).

A razão E/S representa o número de fagos excluídos em relação a cada fago selecionado em cada rodada. Através dela, monitora-se a continuidade ou arrefecimento da ocorrência de seleção, servindo como um parâmetro para determinação da quantidade adequada de rodadas de *biopanning*. A razão E/S tende a não sofrer alterações nos primeiros ciclos, já que neles a diversidade da biblioteca ainda é muito ampla, permitindo que entre os fagos-Fab inicialmente selecionados haja uma considerável quantidade de variantes inespecíficas. À medida que novas rodadas ocorrem, o número de variantes inespecíficas tende a reduzir, o que é acompanhado pela redução da diversidade da biblioteca. Dessa forma, proporcionalmente, cada vez menos fagos são excluídos para cada um que é selecionado, o que faz a razão cair em comparação à rodada prévia. Dada a complexidade antigênica da superfície das células, essa queda pode estar associada a variações da quantidade de fagos-Fab que interagem de maneira inespecífica em cada rodada, mas pode também ser devida à seleção de variantes específicas contra o alvo. Se a razão E/S se estabiliza ou volta a crescer, infere-se que pouco está sendo selecionado, de modo que a continuidade das rodadas de seleção pode implicar ou num pequeno incremento de sequências enriquecidas ou até na perda de sequências promissoras. Como pode

ser observado na tabela 5, a razão E/S de R3 cai em 3 ordens de grandeza em relação a R2, e a razão da rodada seguinte (R4) aumenta em relação a R3. Diante desses valores, assumiu-se que a máxima seleção ocorreu em R3, deixando de ser significativa em R4. Assim, foram levadas para as etapas de amplificação e sequenciamento os *pools* de saída obtidos nas rodadas R0, R1, R2 e R3.

O método BRASIL para varredura, separação e seleção de variantes da biblioteca de fagos-Fab apresenta como característica diferencial – em relação à maioria dos outros métodos de *biopanning* – o fato de ser baseado no desafio da biblioteca contra células expressando em sua superfície o antígeno alvo. A utilização de células em vez de peptídeos sintéticos ou proteínas purificadas – os quais podem não representar a estrutura nativa ou as regiões epitópicas mais adequadas para reproduzirem a interação *in vivo* de anticorpos com antígenos de membrana – pode representar uma vantagem do método. No entanto, a complexidade e heterogeneidade das células são fatores que precisam ser cuidadosamente considerados para a condução dos experimentos e para a inferência do sucesso de seleção específica contra o alvo almejado. Para minimizar as chances de seleção de sequências com especificidade para antígenos não-alvo presentes na superfície das células, é fundamental a incubação prévia da biblioteca de cada rodada com células que não expressam o alvo, de modo a remover tais fagos-Fab do *pool* a ser desafiado contra as células que apresentam o alvo.

As duas linhagens K562 utilizadas trouxeram a vantagem de se distinguirem apenas em relação à presença do alvo CD19, já que a linhagem K562CD19⁺ foi gerada a partir da transformação da linhagem K562WT com o gene desse antígeno. Na avaliação por citometria de fluxo (item 4.2), embora tenha-se detectado a presença do antígeno-alvo apenas em uma fração das células K562CD19⁺ testadas, a confirmação da ausência do antígeno na linhagem K562WT embasou a atribuição de adequabilidade da aplicação dessas linhagens para as rodadas de seleção, uma vez constatada a expressão diferencial entre elas.

Baseado na sedimentação diferencial entre células e partículas livres hidrossolúveis (como os fagos-Fab não interativos) através da centrifugação de um sistema contendo uma fase de solvente orgânico hidrofóbico (dibutilftalato e cicloexano), o método BRASIL tem, provavelmente, como principal vantagem sua simplicidade operacional. Assume-se que do *pool* de cada rodada incubado inicialmente com as células K562WT os fagos-Fab ligados à diversidade de antígenos presentes nessas células ficaram, após a centrifugação do sistema, retidos na fase orgânica inferior, enquanto na fase aquosa permaneceram as variantes que não interagiram, incluindo-se, portanto, as sequências buscadas. Dessa forma, apenas o *pool* da fase

aquosa foi então recuperado, incubado com as células K562CD19⁺ e submetido ao mesmo processo de centrifugação em sistema bifásico. Desse sistema, após congelamento imediato com nitrogênio líquido e recuperação apenas da fase orgânica, os fagos-Fab interativos com essas células apresentam um grande potencial de serem seletivos para o alvo CD19, uma vez que, assume-se, a maior parte das variantes específicas para outros antígenos presentes nessas células foi removida na centrifugação prévia, assim como as variantes não específicas para o alvo CD19 ou para qualquer outro antígeno presente ficaram retidas na fase aquosa.

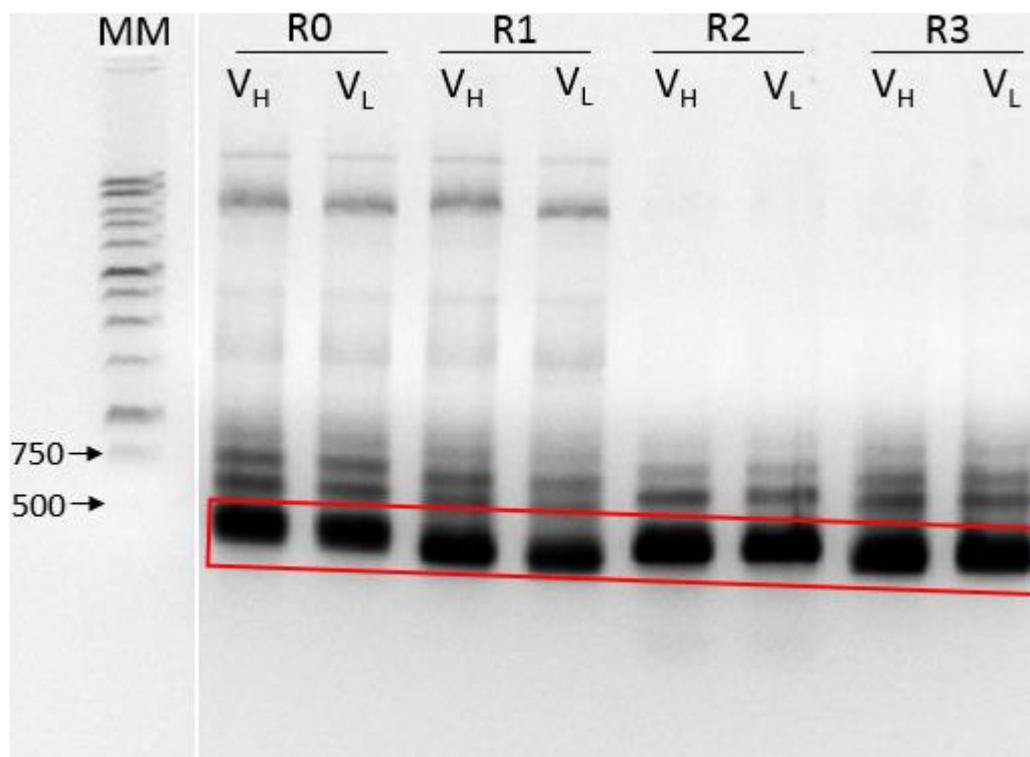
Apesar dos indícios de seleção na rodada 3 e da hipótese da ocorrência de enriquecimento de sequências específicas contra o alvo CD19 através do método de seleção aplicado, é importante mencionar que a confirmação de tais correlações poderá ser plenamente obtida apenas após a caracterização biológica das moléculas a serem construídas a partir das sequências prospectadas neste trabalho.

4.5 Avaliação da amplificação das sequências de V_H e de V_L

Conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.4.1, o DNA plasmidial extraído das culturas de bactérias infectadas com os *outputs* das etapas R0, R1, R2 e R3 foram utilizados como molde para amplificação das respectivas sequências dos domínios V_H e V_L contidas nesses 4 *pools* de fagos-Fab. Além do resgate dessas sequências, essa etapa também envolveu a introdução dos adaptadores necessários para o sequenciamento ao qual elas seriam submetidas em seguida.

A partir do gel de avaliação eletroforética das PCRs (Figura 19), assumiu-se a ocorrência da amplificação das sequências de ambos os domínios do fragmento de anticorpo em todas as rodadas analisadas. As sequências nucleotídicas de V_H e V_L com os adaptadores têm, respectivamente, aproximadamente 488 pb e 422 pb. As bandas destacadas pelo retângulo em vermelho apresentaram peso aparente aproximado aos dos amplicons esperados, sendo, em seguida, excisadas do gel e purificadas.

Figura 19 – Gel de agarose 1% para a PCRs de amplificação das sequências V_H e V_L



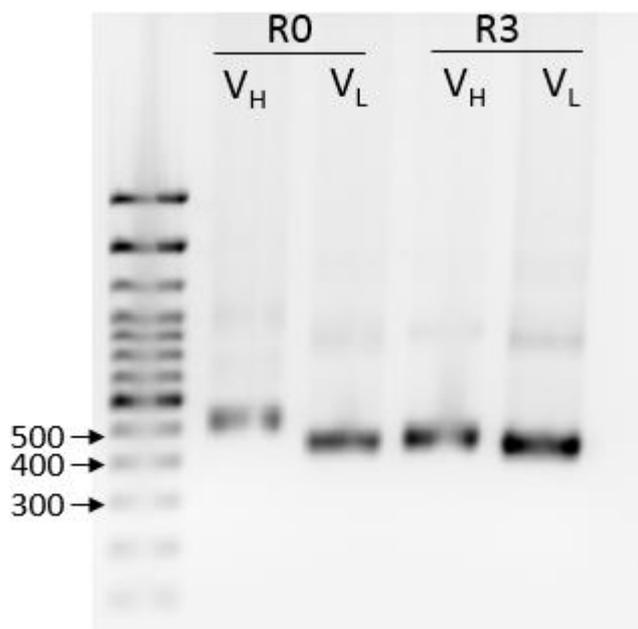
Fonte: elaborado pelo autor (2022). Gel de agarose 1%. MM: marcadores de peso molecular (*1Kb DNA Ladder* Promega®); R0 a R3: DNA extraído das rodadas R0, R1, R2 e R3. Bandas correspondentes aos amplicons das respectivas sequências V_H e V_L destacadas em vermelho.

Embora não tenha sido possível visualizar uma das bandas referenciais da solução de marcadores de peso molecular utilizada (banda de 250 pb), inferiram-se as amplificações com base nas outras bandas e também em suas intensidades. Variações na altura entre as bandas são atribuídas a possíveis irregularidades durante a eletroforese e provavelmente ao fato de a solução do intercalante – utilizado para corar as moléculas de DNA – ter sido aplicada diretamente nas amostras, o que pode contribuir com incrementos na massa de amplicons contendo maior concentração de DNA. Adicionalmente, antes de serem submetidas ao NGS, todas as amostras utilizadas como molde dessas PCRs foram sequenciadas por método de Sanger e confirmadas quanto à presença de regiões canônicas do arcabouço da porção Fab de anticorpos humanos.

As reações de amplificação dessas sequências são dificultadas pelo fato de a diversidade de moléculas de DNA presentes nos *pools* de cada rodada representar um sistema complexo de substratos, que pode comprometer ou desviar o trabalho enzimático, gerar amplicons inespecíficos e enviesar o anelamento dos *primers* em prol/detrimento de sequências determinadas. Baixos níveis de amplificação, por sua vez, limitam ainda mais os rendimentos

de DNA obtidos pela purificação das bandas excisadas de gel. Diante desses desafios, diferentes parâmetros de PCR e de purificação de DNA a partir de bandas excisadas foram testados para a obtenção dos melhores resultados. A utilização de uma enzima de alta fidelidade e a aplicação de poucos ciclos de reação, sobretudo para reduzir a introdução de viés atrelado à PCR na subsequente análise de NGS, são alguns requisitos importantes. Dentre os ajustes no protocolo de purificação de DNA a partir de gel, observou-se melhora nos rendimentos após a introdução da etapa prévia de incubação das bandas excisadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pela adição de glicogênio na solução de precipitação, dada a sua função carreadora das moléculas de DNA. Na figura 20, demonstra-se, como exemplo, a análise eletroforética da purificação a partir das bandas excisadas do gel (Figura 19 anterior) correspondentes às amostras das rodadas R0 e R3.

Figura 20 – Gel de Agarose 2% para avaliação da purificação das bandas excisadas do gel



Fonte: elaborado pelo autor (2022). Gel de agarose 2%. MM: marcadores de peso molecular (100pb *DNA Ladder* Invitrogen™); R0 e R3: DNA purificado das bandas excisadas de gel correspondentes às rodadas R0 e R3.

4.6 Avaliação da qualidade do NGS

As 8 amostras de DNA correspondentes ao *pool* de sequências dos domínios V_H e V_L das rodadas R0, R1, R2 e R3 – já contendo os adaptadores p5 e p7 – foram então indexadas, preparadas e sequenciadas em plataforma MiSeq Illumina® (conforme descrito no item 3.5).

Apesar de a aplicação do sequenciamento de nova geração já ter se tornado, atualmente, quase indispensável em complementação às abordagens de prospecção de anticorpos via *phage display* (BARRETO *et al.*, 2019), as plataformas de NGS ainda não oferecem protocolos específicos customizados para essa aplicação. Desse modo, os parâmetros para preparação das bibliotecas de sequenciamento aplicados acabam sendo adaptados, em cada caso, com base em similaridades com protocolos disponíveis e a partir de ajustes empíricos, conforme as características das amostras e os objetivos de cada investigação. Neste estudo, baseou-se no protocolo utilizado para o sequenciamento do gene do RNA ribossomal de procariotos 16S (*16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*). O gene 16S é estruturado em 9 regiões variáveis (V1-V9), de diferentes extensões, intercaladas por regiões constantes. Através da plataforma MiSeq, o protocolo 16S se baseia no sequenciamento das regiões V3 e V4, de modo que, na adaptação deste protocolo, os amplicons das regiões V_H e V_L dos *pools* de fagomídeos correspondem a essas regiões do gene 16S.

A utilização de indexes duplos assegura a rastreabilidade das duas *reads* de cada sequência pertencente a cada amostra presente na biblioteca multiplex e minimiza a chance de equívocos de análise decorrentes do fenômeno de salto de index (*index hopping*), em que o index de uma determinada amostra acaba sendo atribuído a uma amostra de origem distinta ou a um adaptador livre (contaminante na biblioteca). Pela combinação única entre indexes duplos, tais erros são eliminados como ruído nos dados finais (FAROUNI *et al.*, 2020).

O *kit* utilizado para o sequenciamento (MiSeq v3) tem capacidade de gerar 25 milhões de *reads*, através de 600 ciclos – ou seja, 300 ciclos de reação de síntese a partir de cada extremidade de cada sequência (*paired-end sequencing*) – sendo a utilização ótima de seu potencial dependente da qualidade e da concentração final da biblioteca de sequenciamento. O equilíbrio entre o aproveitamento máximo e a qualidade do sequenciamento é bastante influenciado pela densidade de *cluster*, o que, por sua vez, é determinado pela pureza e pela concentração da biblioteca. Cada *cluster* é o resultado da amplificação em ponte a partir de cada sequência (molde) que cai em uma determinada região da *flow cell* (plataforma reacional). Dessa forma, para uma distribuição adequada dos fragmentos e de modo a minimizar a ocorrência de sobreposições, é necessário evitar concentrações excessivas e/ou contaminações por *primers*, adaptadores e indexes. A densidade de *cluster* impacta na acurácia de captação dos sinais ao longo da síntese, sendo, por isso, um parâmetro fundamental de monitoramento da qualidade do sequenciamento.

Com base no protocolo 16S, optou-se por uma concentração final da biblioteca (proporção equimolar de V_H e V_L) de 8 pM, contendo 15% do volume final de controle (PhiX 8 pM). A densidade de cluster obtida foi de 670 K/mm², embora abaixo da faixa recomendada para o aproveitamento ótimo do *kit* v3 (1200 a 1400 K/mm²), todas as métricas de qualidade do sequenciamento foram bem avaliadas. O parâmetro indicativo de pureza de sinal de cada *cluster* (*Clusters passing filter*) foi de 95,9% e o parâmetro de acurácia de sinal captado por base adicionada (Q score) foi maior do que Q30, o qual representa uma acurácia de 99,9%.

4.7 Análise dos dados do NGS

Diante da robustez de dados que o sequenciamento de nova geração é capaz de fornecer, torna-se inevitável a necessidade de utilização de ferramentas computacionais para o processamento e a extração das informações relevantes que concernem ao escopo biológico sob investigação. No contexto da prospecção de sequências potencialmente adequadas para gerarem anticorpos funcionais contra um alvo determinado, muitas das informações presentes no conjunto obtido a partir do método de evolução *in vitro* são potencialmente correlacionáveis com padrões já estabelecidos das respectivas proteínas em sistema biológico. Através da plataforma ATTILA (conforme descrito no item 3.6), interrogaram-se os fatores fundamentais do conjunto de dados, de modo a extrair as sequências mais promissoras para seguirem para as etapas subsequentes de avaliações complementares, construção e expressão de scFvs e caracterização biológica.

Com base na análise comparativa entre as rodadas R3 e R0 (biblioteca inicial), foram selecionadas 2 V_{HS} e 1 V_L , dentre as 10 sequências com maior enriquecimento (*fold change*) fornecidas pelo programa. Na tabela 6, são demonstrados os respectivos valores de *foldchange* bem como linhagem germinativa com porcentagem de identidade de cada uma. As sequências foram omitidas dado que serão objeto de registro de patente pelo grupo de pesquisa.

Tabela 6 – Características das sequências selecionadas

Sequência selecionada	<i>Foldchange</i>	Linhagem germinativa	Identidade
V_H-1	92.8806	IGHV3-74*01	84,48%
V_H-2	49.020	IGHV4-34*01	95,65%
V_L	183.5717	IGKV3-20*01	90,74%

Fonte: elaborada pelo autor (2022).

A correlação positiva entre o valor de *foldchange* e a seleção de sequências com especificidade para o alvo contra o qual elas foram desafiadas via *phage display* é amplamente descrita na literatura (HU *et al.*, 2015) e se estabelece como o critério mais relevante para inferir a eficiência do processo de seleção e, conseqüentemente, para a escolha das sequências mais promissoras. De maneira similar ao que ocorre no processo de seleção natural de anticorpos específicos contra um alvo determinado, os fagos-Fab com especificidade para os epítomos a elas apresentados irão se ligar e, em sendo segregados daqueles que não puderam se ligar de maneira efetiva, vão adquirindo a oportunidade de se multiplicarem e de permanecerem a cada novo ciclo, aumentando, assim, sua frequência em relação ao início. Se eles persistem ao longo dos ciclos, a despeito do fato de a população de fagos remanescentes ser, potencialmente, cada vez mais constituída de variantes com capacidade de se ligarem com maior afinidade aos epítomos disponíveis, isso indica que os selecionados por esse critério têm maior probabilidade de chegarem com maior frequência na rodada final.

Por outro lado, Fagos-Fab de grande frequência final podem ter esse desfecho influenciado pelo fato de já partirem de uma grande frequência inicial, o que pode não necessariamente estar associado a um processo de seleção eficiente, dado que, em não havendo sucesso no sistema de *biopanning* aplicado, sequências de maior frequência podem ser favorecidas e gerar resultados elusivos. Assim, a análise proporcional de enriquecimento de sequências fornecida pelo valor de *foldchange* tende a ser um parâmetro confiável para a tomada de decisões.

Ainda assim, peculiaridades do método BRASIL precisam ser ponderadas. O fato de se utilizar de células com complexidade epitópica – e que podem apresentar variabilidade populacional quanto à densidade de expressão de suas proteínas de membrana – pode suscitar questionamentos quanto à eficiência de seleção específica contra o alvo almejado. Apesar de as respostas mais conclusivas acerca dos questionamentos e das hipóteses levantadas se estabelecerem, sobretudo, como perspectivas de análises futuras através da caracterização biológica das moléculas a serem produzidas a partir das sequências selecionadas, algumas características dessas sequências podem trazer informações significativas e indicativas de sua provável adequabilidade.

A escolha de duas sequências de V_H e apenas uma de V_L para a geração de dois scFvs a serem construídos a partir da combinação entre esses domínios (V_{H1} -*linker*- V_L e V_{H2} -*linker*- V_L) é baseada no conhecimento já bem consolidado de que o domínio mais determinante

para a interação do anticorpo com antígeno é o domínio variável da cadeia pesada e, mais especificamente, sendo os resíduos de aminoácidos da CDR3 desta cadeia os principais envolvidos nessas interações (MAHON *et al.*, 2013). Às demais CDRs de V_H – assim como às CDRs de V_L – são atribuídas, principalmente, funções auxiliares para a interação, contribuindo com ajustes de ligação e aproximação entre o paratopo e epítipo, mas com menores consequências para afinidade entre eles. Algumas características dessas regiões parecem estar diretamente associadas a essa separação de papéis, o que envolve tanto o perfil de resíduos de aminoácidos mais comuns em cada uma delas, bem como suas extensões típicas. Uma tendência comum também verificada nas sequências deste trabalho (dados não mostrados) e de outros trabalhos se refere à baixa variabilidade entre as diferentes sequências VL selecionadas. Isso corrobora a hipótese de que essas sequências contribuem de forma menos decisiva para a interação específica com o antígeno, assim como com a viabilidade potencial da escolha de uma única sequência VL (a de maior *foldchange*) para as duas construções de scFvs a serem testadas.

Dada a importância da CDRH3 no estabelecimento dos pontos de contato mais diretos com os antígenos – contendo, assim, os principais resíduos que formam o paratopo no anticorpo (MAHON *et al.*, 2013) – uma análise interessante que pode revelar indícios acerca de características de interação com epítipos distintos acessíveis do antígeno é a avaliação comparativa do perfil de aminoácidos e da extensão das CDRH3 das sequências mais enriquecidas contra esse alvo. Embora a complementaridade entre as características dos resíduos de aminoácidos entre cada par epítipo/paratopo varie em cada caso, uma tendência para uma composição de caráter mais hidrofóbico vem sendo relatada em relação aos resíduos dessa interface. Resíduos de triptofano e tirosina costumam ser recorrentes em CDRH3 de diferentes anticorpos, sendo intercalados por resíduos menores como de glicina e de serina (DONDELINGER *et al.*, 2018). Essa tendência foi verificada em pelo menos uma das sequências selecionadas neste trabalho. Por outro lado, RAMARAJ *et al* (2012) sugerem que perfis menos comuns podem também estar relacionados a interações mais específicas entre os pares ligantes.

A biblioteca original, embora gerada a partir do repertório de pacientes de osteosarcoma (DANTAS-BARBOSA; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2005), é *naïve* para o alvo CD19. O fato de as 3 sequências de maior *foldchange* selecionadas terem alta identidade com as sequências de linhagens germinativas de linfócitos B (Tabela 6) – ou seja, sendo provenientes de células que não haviam sido expostas a um antígeno – está provavelmente associado ao fato de a proteína CD19 ser um antígeno próprio, expresso nas células normais, e o amadurecimento

de antígenos dessa natureza é impedido pelos mecanismos de seleção negativa do sistema imune humano. Sendo de linhagens germinativas e, portanto, não tendo seus anticorpos amadurecidos, implica em CDRs mais curtas, o que não necessariamente significa baixo potencial de desempenho biológico, a exemplo de um dos mAbs mais bem-sucedidos do mercado: o adalimumab (WEINBLATT, M. E. *et al.* 2003).

Outras análises a partir da plataforma ATTILA poderão fornecer *insights* importantes acerca do desempenho do método de evolução *in vitro* aplicado. A avaliação comparativa dos números de *reads* após cada etapa de filtragem do algoritmo em cada uma das rodadas, bem como o número de sequências únicas resultantes de cada uma delas, permitirão avaliar a ocorrência de variação na diversidade, no contexto em que a esperada redução do número de sequências ao longo das rodadas significaria um indício de seleção de sequências específicas para o alvo utilizado.

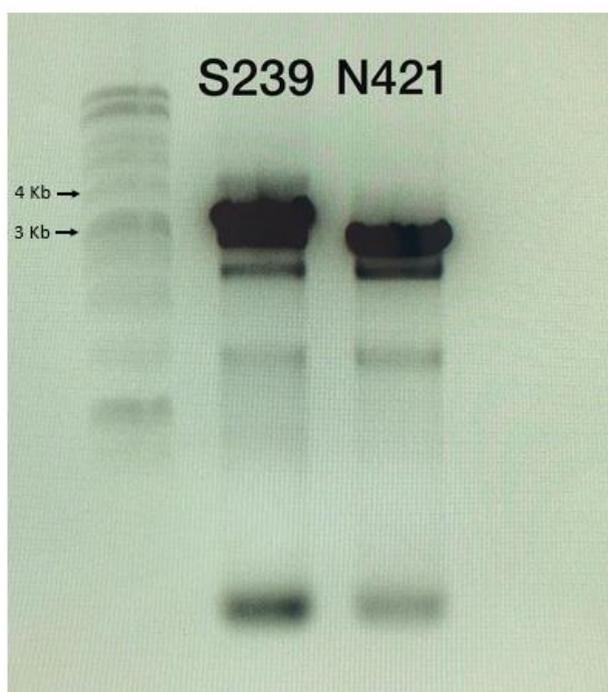
Além disso, outras sequências promissoras, apesar de não listadas entre as de maior *foldchange*, por apresentarem um perfil de enriquecimento não elencado entre os requisitos de seleção dos algoritmos utilizados pela plataforma, podem ainda ser prospectadas dos dados através da avaliação de aspectos variados e, assim, levadas adiante para serem mais profundamente investigadas. Por exemplo, uma sequência com frequência inicial muito baixa, mas intensamente enriquecida na rodada final, embora não apareça na lista, tem grande potencial de se tratar de uma sequência com grande afinidade para o alvo. Essas e outras avaliações complementares estão em fase de planejamento dado que as análises apresentadas neste trabalho são etapas de um amplo projeto que envolve a seleção de sequências – por diferentes estratégias – para a geração de um conjunto de scFvs anti-CD19 a serem avaliados e aplicados em diferentes abordagens pelo nosso grupo de pesquisa. Além da proposição de um FvFc anti-CD19 conjugado a droga, o projeto abrange a construção de um receptor quimérico de antígeno para terapia celular com células T (*CAR-T Cells*) e um anticorpo biespecífico anti-CD19/anti-CD3.

4.8 Produção das sequências Fc mutantes

Após as PCRs mutagênicas da sequência nucleotídica do fragmento Fc, seus produtos foram checados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 21). Na imagem, verifica-se a ocorrência da amplificação pela presença das bandas mais intensas atribuídas ao plasmídeo pGEM-Fc (~ 3,8 kb). Embora os produtos de PCR esperados sejam do mesmo

tamanho dos moldes utilizados, dado que o objetivo da PCR era de substituir resíduos pontuais da sequência Fc inserida no vetor, buscou-se, nessa etapa, verificar inicialmente a ocorrência de amplificação a partir das condições de PCR mutagênica aplicadas (25 ng de DNA molde, 15 ciclos com temperatura de anelamento dos *primers* mutagênicos de 55 °C por 30 s e tempo de extensão de 2,5 min) e seguir para as próximas etapas. Atribui-se a variação de alturas entre as bandas aos mesmos motivos já discutidos no item 4.5.

Figura 21 – Gel de agarose 0,8% para análise das PCRs mutagênicas



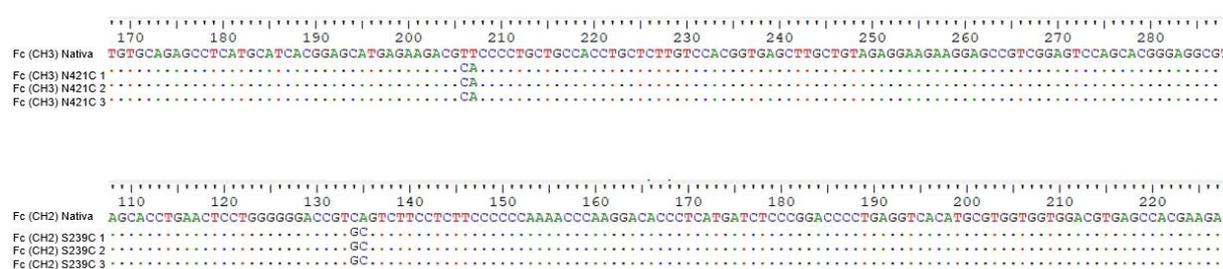
Fonte: elaborado pelo autor (2022). Gel de agarose 0,8%. MM: marcadores de peso molecular (1 kb *DNA Ladder* Invitrogen™); S239 e N421: amplificons do vetor pGEM-Fc (~3,7 kb) submetidos à PCR mutagênica.

A elaboração do par de *primers* de cada reação é uma etapa crucial para o sucesso do método de PCR mutagênica utilizado neste trabalho. A exigência de que eles apresentem região complementar entre si na extremidade 5' (a mesma onde os códons mutantes estão localizados) (conforme descrito no tópico 3.7.5) suscita o risco de que dímeros formados entre os *primers* possam ocorrer em maior frequência do que o anelamento de suas extremidades 3' ao DNA molde. Para que isso não ocorra, é fundamental que o tamanho da região contida na extremidade 3' (região dos *primers* em que eles não são complementares entre si) seja maior que a região complementar, de modo que o anelamento da região 3' ao DNA molde possa ocorrer a uma temperatura suficientemente mais alta do que a temperatura em que os *primers*

formam dímeros com maior frequência. No entanto, *primers* muito extensos apresentam maior chance de formarem estruturas secundárias prejudiciais para a eficiência da PCR. O uso de uma polimerase de alta fidelidade também é muito importante para evitar que outras mutações possam ser incluídas pela enzima ao longo da síntese de amplicons extensos. O DNA molde, diferenciando-se apenas pela mutação inserida em relação ao produto amplificado, poderia acabar sendo levado para as fases seguintes de transformação e clonagem. No entanto, pelo fato de ter sido obtido a partir de extração plasmidial após clonagem em bactéria, o pGEM-Fc molde diferencia-se dos pGEM-Fc produzidos também pela ocorrência de metil-adeninas nas sequências GATC encontradas no DNA replicado em bactéria. Assim, a utilização da enzima DpnI, capaz de clivar o DNA contendo tais modificações, permite a eliminação do DNA molde.

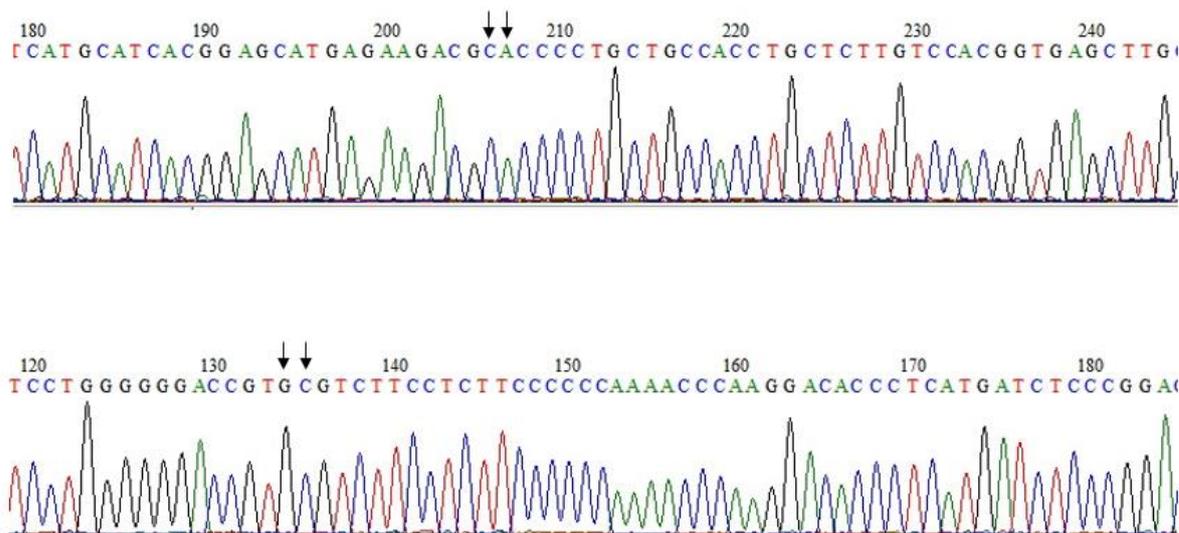
Os respectivos produtos das PCRs mutagênicas foram tratados com *DpnI* e usados para transformar células de *E. coli Top10*. 3 colônias de cada um dos 2 mutantes crescidas em meio seletivo tiveram seu DNA plasmidial extraído, purificado e enviado para sequenciamento. As duas sequências Fc mutantes simples (uma contendo a mutação N421C e a outra contendo a mutação S239C) foram confirmadas nas 6 amostras enviadas para o sequenciamento de DNA por método de Sanger. Trechos do alinhamento entre as sequências gênicas mutantes e a sequência nativa, assim como do eletroferograma, são mostrados nas figuras 22 e 23.

Figura 22 – Alinhamento global entre as sequências Fc mutantes e a sequência Fc nativa



Fonte: elaborado pelo autor (2022). Alinhamento realizado através do software Bioedit via *Clustal W*.

Figura 23 – Trecho dos eletroferogramas dos sequenciamentos de Sanger



Fonte: elaborado pelo autor (2022). Setas apontam os nucleotídeos mutantes. Gráficos gerados pelo software Bioedit.

Usando o *primer* reverso como referência no exemplo apresentado, a substituição do códon (GTT) referente à asparagina 421 – situada no domínio CH3 do fragmento Fc – pelo códon (GCA) de cisteína foi confirmada nas 3 amostras pelo alinhamento das respectivas sequências com a sequência de nucleotídeos do domínio CH3 nativo. Igualmente, confirmou-se a substituição do códon (TCA) referente à serina 239 – situada no domínio CH2 do mesmo fragmento – pelo códon de cisteína (TGC), usando dessa vez o *primer* forward como referência no exemplo apresentado. Os trechos dos eletroferogramas de uma amostra de cada mutante exemplificam a qualidade do sequenciamento.

A determinação e caracterização de resíduos para a substituição por cisteínas na proteína é um importante campo de investigação associado à busca por ADCs homogêneos e reprodutíveis (TUMEY *et al.*, 2017; SUSSMAN *et al.*, 2018). A sulfidrila da cadeia lateral desse aminoácido (na forma reduzida) é um poderoso nucleófilo capaz de reagir de forma seletiva com diversos grupos disponíveis utilizados em *linkers* comerciais e moléculas para marcação de proteínas, sendo haloacetamida, maleimida e espécies contendo sulfidrilas oxidadas os pares de eletrófilos mais utilizados para essas reações (SUN *et al.*, 2005; BERNARDES *et al.*, 2018).

Embora convencionalmente uma das estratégias mais aplicadas para a conjugação de drogas em anticorpos seja realizada a partir da redução seletiva das cisteínas nativas envolvidas nas pontes dissulfeto intercadeias, de modo a torná-las disponíveis para a reações de conjugação, o produto gerado desse processo é constituído de um *pool* heterogêneo de

espécies com diferentes razões droga/anticorpo (DAR), além de isômeros de posição (regioisômeros), ou seja, espécies que apresentam a mesma DAR entre si, mas com sítios de conjugação diferentes. Isso leva à variabilidade de propriedades entre essas espécies em relação a diversos parâmetros fundamentais, como perfil farmacocinético, toxicidade, tendência à agregação, liberação da droga, podendo interferir inclusive na qualidade de interação do anticorpo com o antígeno.

Além de nunca ocorrerem na forma reduzida quando acessíveis ao solvente, a frequência de resíduos de cisteína tende a ser menor do que a média de outros aminoácidos na maior parte das proteínas, inclusive nas imunoglobulinas. (AGARWAL; BERTOZZI, 2015). Assim, o engenheiramento de cisteínas acessíveis ao solvente introduzidas exclusivamente para essa função se tornou uma das principais estratégias para a geração de ADCs conjugados de forma sítio-específica e, portanto, homogêneos e de DAR definida (JUNUTULA *et al.*, 2008, JEFFREY *et al.*, 2013). Entretanto, diversas consequências decorrentes dos sítios específicos utilizados para substituição por cisteínas em anticorpos já vêm há tempos sendo relatadas na literatura. Em estudos ainda da década 1990, Shone (1993) obteve moléculas de IgG rígidas a partir da inclusão de cisteínas extras nos domínios CH1, as quais formaram ponte dissulfeto adicional entre as cadeias pesadas da molécula. No contexto dos ADC, sítios inadequados podem comprometer não só a capacidade de conjugação, mas o próprio controle estequiométrico almejado (LYONS, 1990), a estabilidade do *linker* e a eficácia do sistema conjugado (SHEN *et al.*, 2012).

A maior parte dos riscos da inclusão de novas cisteínas está associada ao fato de que esses resíduos na forma reduzida podem acabar interagindo entre si ou com sulfidrilas de outras moléculas (como cisteínas livres e glutatona), formando pontes dissulfeto intra e intermoleculares; ou seja, gerando oligômeros ou ficando indisponíveis para a reação de conjugação (STIMMEL *et al.*, 2000). Uma outra possibilidade ainda mais problemática é a de essas novas cisteínas formarem pontes dissulfeto cruzadas intramoleculares alternativas com resíduos de cisteína nativos da proteína, envolvidos, por exemplo, nas pontes dissulfeto intracadeia que caracterizam os domínios Ig, prejudicando, assim, sua estrutura. Em ambos os casos, a cisteína adicionada vai ficar indisponível para o seu propósito, podendo ainda inviabilizar o anticorpo por problemas estruturais. Portanto, a escolha racional do ponto para inclusão de cisteínas se torna um desafio, já que esta não deve interferir nas propriedades estruturais e funcionais do anticorpo, devendo, além disso, ser compatível com as características químicas do *linker* e da droga utilizados.

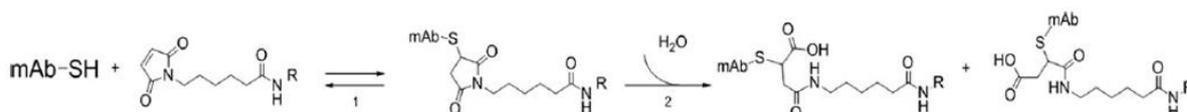
Apesar de iniciativas importantes para a proposição de métodos computacionais (VOYNOV, 2010) e experimentais, envolvendo inclusive *phage display* (JUNUTULA, 2008) para o *screening* de cisteínas engenheiradas promissoras, não existem critérios absolutos ou método específico e confiável de predição dos melhores pontos para a inclusão de cisteínas em um anticorpo para a conjugação, o que depende de muitos fatores. No entanto, algumas premissas podem ser elencadas: primeiramente é preciso que o resíduo seja, em certa medida, acessível ao solvente, ou seja, esteja exposto na superfície do anticorpo. A acessibilidade, ao passo que aumenta a probabilidade de ocorrência da reação, permitindo a conjugação, também pode levar a reações indesejadas, ocasionando agregação; por isso, níveis parciais de acessibilidade tendem a produzir melhores resultados (VOYNOV *et al.*, 2010).

Acessibilidade e a propensão à agregação podem ser determinados computacionalmente por diferentes métodos, como a FSA (acessibilidade fracional ao solvente) (JUNUTULA *et al.*, 2008) e SASA (área de superfície acessível ao solvente) (SPASSOV; YAN, 2008). O resíduo nativo que vai ser substituído deve ter propriedades relativamente similares à cisteína ou que sua substituição cause o mínimo impacto na região em que ele está localizado; então a tendência é substituir serinas, alaninas ou valinas (JUNUTULA, 2008). A proximidade em relação a outras cisteínas engenheiradas ou nativas também precisa ser ponderada. É fundamental escolher regiões que não comprometam sequências funcionalmente importantes, sobretudo, em relação aos resíduos envolvidos na ligação ao antígeno, mas também em outros pontos associados a atividades efectoras e que podem influenciar no perfil farmacocinético do anticorpo. É preciso pensar também, desde o início, na estratégia de purificação a ser aplicada após a expressão, sítios de ligação para as proteínas A e G estão contidos na porção Fc e, normalmente, precisam ser preservados. E por fim, pode ser de grande valia ancorar a decisão com base na influência das propriedades do microambiente da região de conjugação tanto em relação à propensão à agregação de conjugados, devido a interações hidrofóbicas, como também à perda precoce do *linker*-droga na circulação.

A alquilação de cisteínas com *linkers* de maleimida (reação de adição de Michael) (figura 24) é uma reação seletiva, rápida e que ocorre em condições brandas compatíveis com a manutenção da integridade da proteína. Não à toa, os *linkers* baseados nesse grupo estão entre os mais utilizados para a conjugação via cisteínas (AGARWAL; BERTOZZI, 2015). Apesar da estabilidade do produto gerado por essa reação, vários estudos já demonstraram a ocorrência de perda precoce de *linker*-droga na circulação, tanto causando toxicidade sistêmica como comprometendo a eficácia do ADC. Já bem descrita na literatura, atribui-se essa instabilidade

à ocorrência de uma reação de troca da ligação da maleimida com o anticorpo por outros grupos tiol de moléculas presentes na circulação, através de um processo denominado eliminação de retro-Michael (SHEN *et al.*, 2012).

Figura 24 - Reação de adição de Michael e de hidrólise do anel de succinimida



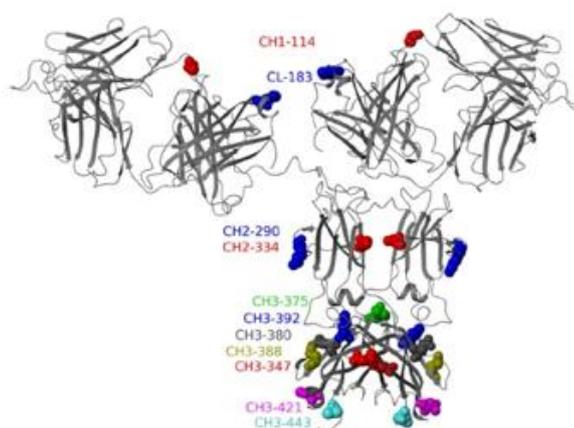
Fonte: SUSSMAN *et al.* (2018). Reação de adição de Michael que ocorre entre o grupo maleimida presente no *linker* e a sulfidrina da cadeia lateral do resíduo de cisteína do mAb. 1: reação inversa (eliminação de retro-Michael); 2: etapa não obrigatória de hidrólise do anel de succinimida presente no grupo maleimida.

Na reação de retro-Michael (reação 1 na figura 24), o *linker* se desconjuga do anticorpo liberando-se junto com a droga na circulação. Esse problema foi abordado por SHEN *et al.* (2012) e por TUMEY *et al.* (2014), demonstrando-se que as propriedades da região em que a cisteína é incluída influenciam na perda de *linker*-droga e fornecendo-se evidências experimentais de que a ocorrência da hidrólise do anel de succinimida (parte da estrutura da maleimida) (etapa 2 na figura 24), após o processo de conjugação seria capaz de bloquear a reação que levaria à perda precoce do *linker*-droga, melhorando o perfil farmacocinético e de segurança do ADC. Em estudo subsequente, a partir da obtenção de ADCs muito estáveis mesmo sem a ocorrência da hidrólise do anel de succinimida, sugeriu-se que a abertura do anel por si só provavelmente não seria a causa direta ou única para impedir a ocorrência da reação de desconjugação, mas sim as características do ambiente local em torno do sítio de alquilação da cisteína pela maleimida estariam, sobretudo, por trás do bloqueio da reação de retro-Michael (TUMEY *et al.*, 2017).

No mesmo estudo, Tumey *et al.* (2017) partiram de análises estruturais *in silico* para prospecção de sítios potencialmente adequados para a introdução de cisteínas na porção constante da molécula de IgG1 humana. A modelagem molecular da porção Fc foi realizada a partir de dados de cristalografia disponíveis publicamente (PDB código 3DO3, 10.2210/pdb3do3/pdb) e através da simulação da substituição individual de todos os resíduos nativos por cisteínas por meio de algoritmos pré-definidos das plataformas *Side Chain With Rotamer Library* (SCWRL) e *Discovery Studio* (BIOVIA) (Krivov; Shapovalov; Dunbrack, 2009), além da determinação da acessibilidade das cadeias laterais de todos os resíduos ao solvente (SPASSOV; YAN, 2008). Os mesmos protocolos foram aplicados a múltiplas estruturas públicas e não publicadas (de propriedade intelectual protegida) das cadeias

constantes do fragmento Fab (CH1 e Ck). As mutações resultantes com os melhores parâmetros foram ainda filtradas quanto à preservação de regiões funcionais cruciais presentes na porção constante da molécula de IgG1: regiões de reconhecimento para os receptores FcRn (importante para o perfil farmacocinético) e FcγR (importante para a citotoxicidade celular dependente de anticorpo – ADCC); sítios de interação da proteína A e G; e regiões potencialmente comprometedoras para o suporte das CDRs. 11 sítios de mutação individual foram selecionados e introduzidos, individualmente, na molécula de IgG1 do mAb comercial trastuzumab (anti-HER2) (figura 25). Os 11 mutantes simples foram expressos em células de mamífero, submetidos a protocolo padronizado de conjugação com o mesmo *linker*-droga (maleimidocaproil-valina-citrulina-PABC_PF-06380101) e caracterizados para diversos parâmetros (DAR; hidrofobicidade; citotoxicidade *in vitro* em duas linhagens HER2⁺ e uma linhagem de controle; estabilidade térmica; clivagem do *linker* por mecanismo enzimático específico; estabilidade no plasma; propensão à desconjugação por glutatona; perfil farmacocinético *in vivo*; e tempo de retenção ao receptor FcRn). (TUMEY, 2017).

Figura 25 – Mutações avaliadas no trabalho envolvendo a N421C



Fonte: TUMEY *et al.* (2017).

O N421C foi um dos mutantes que obtiveram resultados satisfatórios nos parâmetros avaliados previamente no trabalho, sobretudo quanto à estabilidade plasmática e na presença de glutatona, sendo ainda um entre os dois mutantes com maiores taxas de tendência à hidrólise do anel de succinimida, o que é vastamente relatado na literatura como um parâmetro proporcionador de estabilidade de ADCs conjugados por reação de maleimida (TUMEY *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2012). Por conta disso, a sequência do mutante N421C foi ainda uma das analisadas, no mesmo trabalho, quanto às características locais do ambiente em torno do sítio

de conjugação, através da modelagem molecular do anel de succinimida e uma cadeia alquila ligada à cisteína 421. Sugeriu-se que a proximidade de um resíduo de arginina (R416) ancorado por um resíduo de aspartato (D413) seria responsável por promover a ativação de uma molécula de água, que, por sua vez, hidrolisaria a ligação imida do anel. A hipótese foi corroborada pela ocorrência da mesma característica em outro mutante de perfil similar e pela subsequente geração e avaliação dos mesmos, contendo, dessa vez, a mutação adicional do resíduo básico de arginina por um resíduo neutro de glutamina (R416Q), o que levou à redução da taxa de hidrólise do anel de 88% para 27%. (TUMEY *et al.*, 2017).

Em outro estudo, com a mesma finalidade de prospectar pontos promissores para a substituição por cisteína e conjugação via reação de maleimida, Sussman *et al.* (2018) produziram e avaliaram uma série ADCs contendo cisteínas engenheiradas em diferentes pontos especificamente localizados nas proximidades da região da dobradiça (domínio CH2), com base em níveis variáveis de acessibilidade ao solvente e potencial eletrostático. As mutações foram inicialmente modeladas a partir da estrutura de um IgG completo e dos dados cristalográficos da porção Fc ligada a FcγR disponíveis em banco de dados (número de acesso 1HZH e 1E4K), cálculos de potencial eletrostático e de nível de acessibilidade ao solvente foram efetuados através das plataformas APBS e GETARREA. As mutações foram introduzidas na molécula de IgG humanizada h1F6 (anti-CD70), que foram submetidas à conjugação com 2 tipos de *linker*-droga: maleimido-caproil-MMAF (*linker* não clivável e droga inibidora de microtúbulo) e duas outras combinações de *linker* de maleimida clivável por enzima combinada com duas outras drogas altamente hidrofóbicas que alquilam o DNA. Os ADCs foram avaliados quanto a diversos parâmetros (DAR, sítio-especificidade de conjugação, nível de agregação, hidrofobicidade, estabilidade do *linker*-droga *ex vivo*, hidrólise da maleimida *ex vivo*, ligação ao antígeno, citotoxicidade *in vitro* e atividade biológica *in vivo*).

Os autores se concentraram na região de dobradiça baseados no fato de se tratar de uma região de alta disponibilidade ao solvente e na própria experiência bem-sucedida prévia de utilização das cisteínas nativas desse domínio para a conjugação de drogas, visando, dessa vez, no entanto, o não envolvimento das cisteínas responsáveis pela conexão entre as cadeias. Para reduzir os riscos inerentes aos mesmos aspectos que motivaram a escolha da região, os critérios estabelecidos para a seleção dos sítios de modificação envolveram estarem localizados dentro de uma distância mínima de 20 Å de cisteínas endógenas envolvidas em pontes dissulfeto intracadeias, estarem a pelo menos 10 Å de distância de uma cisteína nativa ou de seu par

simétrico presente na outra cadeia pesada mutante; não estarem envolvidos em estruturas secundárias de estabilização da proteína; e terem cadeias laterais orientadas para o solvente.

De 15 mutantes prospectados das análises *in silico* a partir dos critérios estabelecidos, apenas 4 resultaram em níveis adequados de expressão e tendência à agregação, sendo sítio-especificamente conjugados e gerando ADCs homogêneos e bem-sucedidos quanto a praticamente todos os parâmetros testados. No entanto, o mutante S239C se sobressaiu em relação aos outros, apresentando o maior poder de inibição de crescimento de tumor, de maneira similar ao ADC não mutante (usado como controle e conjugado através das cisteínas nativas da região de dobradiça) carregando, no entanto, o dobro de droga por anticorpo (DAR = 4) em relação ao ADC mutante (DAR = 2). Além disso, o mutante S239C apresentou as menores taxas de desconjugação (10% em 7 dias) de maleimida em relação aos outros mutantes e ao controle (40% em 7 dias) e menores perfis de agregação, mesmo quando conjugado às drogas mais hidrofóbicas – relatadas entre as mais promissoras para ADCs de nova geração. (SUSSMAN *et al.* 2018).

Com base nesses dados, como parte da proposta de geração de um ADC anti-CD19 no formato FvFc homogêneo e conjugado à droga comercial (MMAF) através de *linker* de maleimida (Mc), as mutações N421C e S239C foram selecionadas e serão aplicadas como prova de conceito para o formato FvFc em etapas futuras.

Em próximas etapas, as duas sequências mutantes serão subclonadas no mesmo vetor de origem, pCOMIRESΔ600, usando as enzimas *Xho*I, *Eco*RI e T4 DNA ligase. Os plasmídeos denominados respectivamente pCO-N421C e pCO-S239C, ambos ainda contendo a sequência scFv original do vetor pCOMIRESΔ600, receberão, após avaliação dos scFvs anti-CD19 a serem testados, a sequência do scFv selecionada – com *codon usage* para expressão em células de mamífero – de modo a gerar os FvFcs anti-CD19, os quais serão submetidos a testes de conjugação e caracterização biológica.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O caminho para a concepção de um ADC eficiente envolve a otimização de múltiplos aspectos, sendo cada um dos 3 constituintes do sistema (anticorpo, *linker* e droga) – assim como a complementaridade entre eles – determinante para o seu sucesso. Neste trabalho, foram dados os passos iniciais desse caminho, particularmente associados à preparação do constituinte responsável por guiar e proporcionar especificidade e homogeneidade ao sistema – o anticorpo. Desse modo, nesta etapa, através da metodologia proposta, obtiveram-se sequências gênicas de fragmentos de anticorpo humano com potencial para serem aplicadas na construção de um FvFc anti-CD19 conjugado de forma sítio-específica a droga. As sequências variáveis escolhidas com base no enriquecimento (avaliado por NGS) através de múltiplas rodadas de seleção via *phage display* contra o antígeno CD19 serão utilizadas para a construção de 2 scFvs, os quais serão avaliados quanto ao desempenho cinético e de afinidade à proteína CD19. Ao passo que as sequências gênicas Fc mutantes geradas serão utilizadas para a expressão no formato FvFc em células de mamíferos e caracterizadas quanto à capacidade de conjugação sítio-específica, como prova de conceito dos pontos de substituição de cisteínas para o formato FvFc.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a Edição. [S.L.]: Elsevier, 2015. 1195 p.
- AGARWAL, P.; BERTOZZI, C. R. Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. **Bioconjugate chemistry**, v. 26, n. 2, p. 176–192, 2015.
- ALFAROUC, K. O. *et al.* Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer cell international**. v. 15, n. 71, 2015.
- ALMAGRO, J. C. *et al.* Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. **Antibodies**. v. 8, n. 3, 44, 2019.
- ANTIBODY SOCIETY. **Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US**. 10 de jan. de 2022. Disponível em: <https://www.antibodysociety.org>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- BARBAS III, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. **Phage Display: A Laboratory Manual**. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- BARRETO, K. *et al.* Next-generation sequencing-guided identification and reconstruction of antibody CDR combinations from phage selection outputs. **Nucleic Acids Research**. v. 47, n. 9, 2019.
- BATLEVI, C. *et al.* Novel immunotherapies in lymphoid malignancies. **Nat Rev Clin Oncol** n. 13, p. 25–40, 2016.
- BAZAN, J.; CAŁKOSIŃSKI, I.; GAMIAN, A. Phage display - a powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. **Human vaccines & immunotherapeutics**. v. 8, n. 12, p. 1817–1828, 2012.
- BERNARDES, G. J. L. *et al.* A traceless vascular-targeting antibody–drug conjugate for cancer therapy. **Angew. Chem. Int. Ed.** v. 51, p. 941–944, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Oncologia: avanços e desafios para o SUS**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/11/Forum-Estadao-Oncologia.pdf>. Acesso em: 6 mai 2019.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221–1229. 2000.
- CAMBRICOLI, F. Em cinco anos, gasto com tratamento contra câncer cresceu 66%. **Estadão**. Agosto 2016. Disponível em: <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,em-cinco-anos-gastocomtratamento-contra-cancer-cresceu-66,10000069529>. Acesso em: 27 out. 2019.

CHARI, R. V.; MILLER, M. L.; WIDDISON, W. C. Antibody-drug conjugates: an emerging concept in cancer therapy. **Angewandte Chemie Int. Ed.**, n. 53, v. 15, p. 3796–3827, 2014.

DANTAS-BARBOSA, C., BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. **Genetics and molecular research**. v. 4, n. 2, p. 126–140. 2005. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2005/vol2-4/pdf/gmr0120.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2022

DANTAS-BARBOSA, C.; FARIA, F. P.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Isolation of osteosarcoma-associated human antibodies from a combinatorial Fab phage display library. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 2009, 157531. DOI: 10.1155/2009/157531

DEAN, A.Q.; SHEN, L.; TWOMEY, J. D.; ZHANG, B. Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges, **mAbs**, v.13, n.1, 2021.

DONDELINGER, M. *et al.* Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition. **Front immunol.** v.9, n. 2278, p. 1-15, 2018.

FAGERLUND, A.; MYRSET, A.H.; KULSETH, M.A. Construction and characterization of a 9-mer phage display pVIII library with regulated peptide density. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 80, p. 925-936, 2008.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, n. 1300, 2018.

FAROUNI, R. *et al.* Model-based analysis of sample index hopping reveals its widespread artifacts in multiplexed single-cell RNA-sequencing. **Nature communications**, v.11, n.1, p. 2704, 2020.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 1, p. 21–33, 2006.

GARBE, D.; THIEL, I.V.; MOOTZ, H.D. Protein trans-splicing on an M13 bacteriophage: towards directed evolution of a semisynthetic split intein by phage display. **J Pept Sci.** v. 16, p. 575-581, 2010.

Global antibody drug conjugate market size to surpass USD 18 billion by 2027. **Globe News Wire**. 2021. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/09/28/2304191/0/en/Global-antibody-drug-conjugate-market-size-to-surpass-USD-18-billion-by-2027.html>. Acesso em: 19 fev. 2022

GONZÁLEZ, A.; FILLAT, M. F. Overexpression, immunodetection, and site-directed mutagenesis of *Anabaena* sp. PCC 7120 flavodoxin: A comprehensive laboratory practice on molecular biology. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2018.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual review of medicine**. v. 53, p. 615–627, 2002.

GREVE, P. *et al.* Upcoming immunotherapeutic combinations for B-cell lymphoma, **Immunotherapy Advances**, n. 1, v. 1, 2021.

GUTIERREZ-GUERRERO, A.; COSSET, F. L.; VERHOEYEN, E. Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. **Viruses**, v. 12, n. 9, 1016, 2020.

HAMMER, O. CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. **mAbs**, n. 4, v. 5, p. 571–577, 2012.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer discovery**. v.12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAMBLETT, K.J. *et al* Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate. **Clin. Cancer Res.** v. 10, p. 7063–7070, 2004.

HERRMANN A.C. *et al.* A Novel T-Cell Engaging Bi-specific Antibody Targeting the Leukemia Antigen PR1/HLA-A2. **Front. Immunol.** v. 9, p. 3153, 2018.

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

HORVAT, T. Z. *et al.* The ABCs of Immunotherapy for Adult Patients With B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **The Annals of pharmacotherapy**, n. 52, v. 3, p. 268–276. 2018.

HU, D. *et al.* Effective optimization of antibody affinity by phage display integrated with high-throughput DNA synthesis and sequencing technologies. **PLoS One**. v. 10, n. 6, 2015, e0129125.

HUANG, J.X.; BISHOP-HURLEY, S.L.; COOPER, M.A. Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 56, n. 9, p. 4569-4582, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estatísticas do Câncer**. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 12 jan. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/en/node/2396>. Acesso em: 6 mai 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipos de câncer**. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_hodgkin. Acesso em: 6 mai. 2019.

JEFFREY, S. C. *et al.* A potent anti-CD70 antibody–drug conjugate combining a dimeric pyrrolbenzodiazepine drug with site-specific conjugation technology. **Bioconjugate Chem.** v. 24, p. 1256–1263, 2013.

JOUBERT, N.; BECK, A.; DUMONTET, C.; DENEVAULT-SABOURIN, C. Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. **Pharmaceuticals**. Basel, v. 13 n. 9, p. 245, 2020.

JUNUTULA, J. R. *et al.* Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. **Nature biotechnology**. v. 26, n. 8, p. 925–932, 2008.

JUNUTULA, J. R. *et al.* Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. **Nat. Biotechnol.** v. 26, n. 8, p. 925–932, 2008.

KATZUNG, B.; MASTERS, S.; TREVOR, A. **Basic and clinical pharmacology**. 12 ed. New York: Companies, Inc., 2012.

JUNUTULA, J. R. *et al.* Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. **Journal of immunological methods**. v. 332, n. 1-2, p. 41–52, 2008.

KAMAT, V.; RAFIQUE, A. Designing binding kinetic assay on the bio-layer interferometry (BLI) biosensor to characterize antibody-antigen interactions. **Analytical biochemistry**, v. 536, p. 16–31, 2017.

KENNEDY, P. J.; OLIVEIRA, C.; GRANJA, P. L.; SARMENTO, B. Antibodies and associates: Partners in targeted drug delivery. **Pharmacology & therapeutics**. v. 177, p. 129–145, 2017.

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

KRIVOV, G.G.; SHAPOVALOV, M.V.; DUNBRACK JR, R..L. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. **Proteins**. v. 77, p. 778–95, 2009.

LANGHI JUNIOR, D. M., *et al.* The Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular seeks the implementation of, and access to, the CAR-T cell treatment in Brazil. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 43, n. 2, 2021.

LEVISSON, M. *et al.* Phage display of engineered binding proteins. **Methods in molecular biology**, v. 1129, p. 211–229, 2014.

LIM, S.H. *et al.* Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. **Blood**; v. 118, p. 2530–2540, 2011.

LØSET, G.A.; ROOS, N.; BOGEN, B.; SANDLIE, I. Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage. **PLoS One**. v. 6, n. 2, e17433, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0017433

LU, R.M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **J Biomed Sci**, v. 27, n. 1, 2020.

LYON, R. P. *et al.* Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. **Nat Biotechnol**. v. 33, p. 733–735, 2015.

LYONS, A. *et al.* Site-specific attachment to recombinant antibodies via introduced surface cysteine residues. **Protein Eng.** v. 3, p. 703–708, 1990.

MAHON, C. M. *et al.* Comprehensive interrogation of a minimalist synthetic CDR-H3 library and its ability to generate antibodies with therapeutic potential. **Journal of molecular biology**, v. 425, n. 10, p. 1712–1730, 2013.

MARQUES, L. G. A. *et al.* Mapeamento Tecnológico dos Anticorpos Conjugados no Tratamento das Doenças Crônicas: Câncer. **Cadernos De Prospecção**, n. 13, v. 1, 120, 2020.

MARTYNISZYN, A. *et al.* CD20-CD19 Bispecific CAR T Cells for the Treatment of B-Cell Malignancies. **Human gene therapy**, v. 28, n. 12, p. 1147–1157, 2017.

MATSUDA, Y.; MENDELSON, B. A. Recent Advances in Drug-Antibody Ratio Determination of Antibody-Drug Conjugates. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 69, n. 10, p. 976–983, 2021.

MCDONAGH, C.F. *et al.* Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment. **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 19, p. 299–307, 2006.

NASCIMENTO, F. **Construção de uma biblioteca de anticorpos monoclonais apresentados em fagos para seleção e caracterização de scFv ligante a proteínas intestinais de *Diatraea saccharalis***. 2009. 97f. Dissertação (Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia. 2009.

PICANÇO-CASTRO, V., *et al.* Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion: from lentiviral production to *in vivo* studies. **Hematology, transfusion and cell therapy**, n. 42, v. 2, p. 150–158, 2020.

POSNER, J.; BARRINGTON, P.; BRIER, T.; DATTA-MANNAN, A. Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 260, p. 81–141, 2019.

QUILICI, L. *et al.* A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 21-27, 2013.

RAMARAJ, T. *et al.* Antigen–antibody interface properties: composition, residue interactions, and features of 53 non-redundant structures. **(BBA)-Proteins and Proteomics**. v. 1824, n. 3, p. 520-532, 2012.

RIGO, M.M. **Recombinação somática e a doença de Alzheimer: uma conversa entre a imunologia e a neurologia**. 2018. Disponível em: <https://sbi.org.br/sblogi/recombinacao-somatica-e-a-doenca-de-alzheimer-uma-conversa-entre-a-imunologia-e-a-neurologia/>. Acesso: 19 fev. 2022

RODRIGUES FILHO, F.J. **Delineamento do perfil das tecnologias incorporadas no SUS e a análise dos gastos públicos com biofármacos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Gestão e Economia da Saúde). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.

RUZIC, D. *et al.* Targeting Histone Deacetylases: Opportunities for Cancer Treatment and Chemoprevention. **Pharmaceutics**. v. 14, n. 1, 209, 2022.

SAFDARI, Y. *et al.* Use of Single-Chain Antibody Derivatives for Targeted Drug Delivery. **Molecular Medicine**. Iran. 2016.

SCHMIDT, S.; BRAUNAGEL, M.; KÜRSHNER, T.; LITTLE, M. Selection of an Anti-CD20, Single-Chain Antibody by Phage ELISA on Fixed Cells. **BioTechniques**, v. 26, p. 697–702, 1999.

SCHIRRMANN, T. *et al.* Production systems for recombinant antibodies. **Front. Biosci.**, v. 13, n. 12, p. 4576–4594, 2008. DOI: <https://doi.org/10.2741/3024>

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York: Ed-Wiley-Liss, 1995.

SHEN, B. *et al.* Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody–drug conjugates. **Nat. Biotechnol.** v. 30, p. 184–189, 2012.

SHIM, H. Bispecific Antibodies and Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. **Biomolecules**. v. 10, n. 3, 360, 2020.

SHOPES, B. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. **J. Immunol.** v. 148, p. 2918–22, 1992.

SHOPES, B. A genetically engineered human IgG with limited flexibility fully initiates cytotoxicity via complement. **Mol. Immunol.** v. 30, p. 603–609, 1993.

SILVA, H. M. *et al.* Novel humanized anti-CD3 antibodies induce a predominantly immunoregulatory profile in human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology letters**, v. 125, n. 2, p. 129–136, 2009.

SILVA JUNIOR, A.L. *et al.* Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. **PLoS One**, v. 14, n. 8, 2019.

SMITH G. P. Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie**, n. 58, v. 41, p. 14428–14437, 2019.

SPASSOV, V. Z; YAN, L. A fast and accurate computational approach to protein ionization. **Protein Sci.** v. 17, p. 1955–70, 2008.

STIMMEL, J. B. *et al.* Site-specific conjugation on serine → cysteine variant monoclonal antibodies. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 30445–30450, 2000.

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

SUN, M. M. C. *et al.* Reduction–alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides. **Bioconjugate Chem.** v. 16, p. 1282–1290, 2005.

SUSSMAN, D. *et al.* Engineered cysteine antibodies: an improved antibody-drug conjugate platform with a novel mechanism of drug-linker stability. *Protein engineering, design & selection: PEDS*, v. 31, n. 2, p. 47–54, 2018.

TEDDER, T. F. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.*, n.5, v. 10, p. 572–577, 2009.

TSUCHIKAMA, K.; AN, Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein & cell*, v. 9, n. 1, p. 33–46, 2018.

TUMEY, L. N. *et al.* Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy. *Bioconjug Chem.* v. 25, p. 1871–80, 2014.

TUMEY, L. N. *et al.* Site Selection: a Case Study in the Identification of Optimal Cysteine Engineered Antibody Drug Conjugates. *The AAPS journal*, v. 19, n. 4, p. 1123–1135, 2017.

VIDAL, T. J.; FIGUEIREDO, T. A.; PEPE, V. A. E. O mercado brasileiro de anticorpos monoclonais utilizados para o tratamento de câncer. *Cad. Saúde Pública*. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v34n12/1678-4464-csp-34-12-e00010918.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2019.

VOYNOV, V. *et al.* Design and application of antibody cysteine variants. *Bioconjugate chemistry*, v. 21, n. 2, p. 385–392, 2010.

WANG, L. *et al.* Structural characterization of the maytansinoid–monoclonal antibody immunoconjugate, huN901–DM1, by mass spectrometry. *Protein Sci.* v. 14, p. 2436–2446, 2005.

WANG, K.; WEI, G.; LIU, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology & oncology*, n. 1, v. 1, 36. 2012.

WEINBLATT, M. E. *et al.* Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis and rheumatism*, n. 48, v. 1, p. 35–45. 2003.

WEISSER, N. E.; HALL, J. C. Applications of single-chain variable fragments antibodies in therapeutics. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 4, p. 502–520, 2009.

YAO, H. *et al.* Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 2, 194, 2016.

ZARRINEH, M.; MASHHADI, I. S.; FARHADPOUR, M.; GHASSEMPOUR, A. Mechanism of antibodies purification by protein A. *Analytical biochemistry*, v. 609, 113909, 2020.

ZHAO, A.; TOHIDKIA, M.R.; SIEGEL, D.L.; COUKOS, G.; OMID, Y. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit Rev Biotechnol*, v. 36, n. 2, p. 276–289, 2016.