



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

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

MATURAÇÃO DA AFINIDADE E SELEÇÃO DE NOVOS FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS VIA PHAGE DISPLAY: CONSIDERAÇÕES SOBRE USO DE
PEPTÍDEOS MIMÉTICOS OU CÉLULAS INTACTAS

FORTALEZA

2024

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

MATURAÇÃO DA AFINIDADE E SELEÇÃO DE NOVOS FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS VIA PHAGE DISPLAY: CONSIDERAÇÕES SOBRE USO DE PEPTÍDEOS
MIMÉTICOS OU CÉLULAS INTACTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Engenharia de anticorpos.

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

FORTALEZA

2024

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

B469m Bezerra, Marcus Rafael Lobo.

Maturação da afinidade e seleção de novos fragmentos de anticorpos via phage display : considerações sobre uso de peptídeos miméticos ou células intactas / Marcus Rafael Lobo Bezerra. – 2024.
123 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. Fragmentos de anticorpos. 2. Phage display. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Engenharia de proteínas. I. Título.

CDD 660.6

MARCUS RAFAEL LOBO BEZERRA

MATURAÇÃO DA AFINIDADE E SELEÇÃO DE NOVOS FRAGMENTOS DE
ANTICORPOS VIA PHAGE DISPLAY: CONSIDERAÇÕES SOBRE USO DE PEPTÍDEOS
MIMÉTICOS OU CÉLULAS INTACTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Engenharia de anticorpos.

Aprovada em: 26/01/2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Richard John Ward
Universidade de São Paulo

Dr. Josimar de Oliveira Eloy
Universidade Federal do Ceará

Dr. Vinícius Cotta de Almeida
Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Marcelo de Macedo Brígido
Universidade de Brasília

À sociedade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento e instituições que financiaram essa pesquisa: CAPES, CNPq e Fiocruz.

Agradeço aos laboratórios de colaboradores, professores, técnicos e colegas de trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, coordenado pelos pesquisadores Dr. Marcelo Brígido e Dra. Andrea Maranhão, que auxiliaram na geração dos resultados de sequenciamento de nova geração e análises de bioinformática utilizando a plataforma ATTILA.

Ao GEPeSS (Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde) da Fiocruz Ceará, coordenado pelos pesquisadores Dr. Marcos Lourenzoni e Dr. Gilvan Furtado, pelas discussões de planejamento experimental e estabelecimento de protocolos metodológicos.

To Lisa Westerberg's group at Karolinska Institutet, for contributing to several scientific discussions and the establishment of the flow cytometry-based assays of our recombinant proteins.

Agradeço os membros da banca examinadora desta defesa, pelo tempo investido na leitura e pelas críticas construtivas.

Agradeço a Gilvan Furtado, supervisor e orientador deste trabalho, pelas contribuições científicas, orientação e gerenciamento deste projeto.

“If everytime you do an experiment you get the expected result, you are probably doing engineering, but you are not really doing science, and frankly, science would be terribly boring if every time you did an experiment you got exactly the results you thought you were going to get.”

William Kaelin

RESUMO

Câncer é um conjunto de doenças caracterizado por comportamento maligno de células do corpo, gerando metástase. Leucemias e linfomas são tipos de câncer oriundos de alterações em células do sistema imune. Anticorpos são glicoproteínas produzidas por linfócitos B e desempenham papel importante na defesa contra patógenos. Essas moléculas têm sido exploradas como imunoterápicos contra diversos alvos associados a câncer. Dois receptores expressos exclusivamente em linfócitos B vêm sendo explorados ao longo dos anos como alvos para tratamento de malignidades: CD19 e CD20. O anti-CD20 rituximabe foi o primeiro anticorpo aprovado para imunoterapia do câncer. Apesar de seu sucesso terapêutico, alguns pacientes não respondem bem ao tratamento. Já o CD19 vem sendo explorado em outros tipos de imunoterapia, como células CAR-T e moléculas bispecíficas. A técnica de phage display foi utilizada para explorar metodologias para maturar a afinidade do anticorpo rituximabe contra o alvo e para desenvolver novos anticorpos anti-CD19, utilizando técnica de sequenciamento de nova geração para propor candidatos. Para o alvo CD20, foi utilizado peptídeo mimótopo do CD20 e foram propostas três moléculas candidatas. Apenas uma delas foi expressa com sucesso em sistema bacteriano e, apesar de ter alto enriquecimento na seleção por phage display utilizando o peptídeo como alvo, esta molécula perdeu a capacidade de ligação a células CD20+, sugerindo a complexa interação com rituximabe. Um mutante foi expresso em sistema eucarioto e sua interação com células CD20+ foi observada por citometria de fluxo, bem como a provável indução de atividade citotóxica. Já para o alvo CD19, apenas duas moléculas foram testadas, apresentando baixa marcação a células intactas. Como perspectiva, novas combinações de cadeia VH e VL já foram desenhadas e novos testes serão realizados visando a obtenção de moléculas funcionais. A estratégia utilizada gerou candidatos baseado apenas no enriquecimento de sequências através das etapas de seleção por phage display. As moléculas também podem ser estudadas no formato FvFc, contendo porção constante, para avaliar suas propriedades efectoras.

Palavras-chave: fragmentos de anticorpos; phage display; sequenciamento de nova geração; engenharia de proteínas.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases characterized by the malignant behavior of cells in the body, leading to metastasis. Leukemias and lymphomas are types of cancer originating from alterations in immune system cells. Antibodies are glycoproteins produced by B lymphocytes and play an important role in defense against pathogens. These molecules have been explored as immunotherapeutics against various cancer-associated targets. Two receptors exclusively expressed in B lymphocytes have been investigated over the years as targets for malignancy treatment: CD19 and CD20. The anti-CD20 rituximab was the first antibody approved for cancer immunotherapy. Despite its therapeutic success, some patients do not respond well to the treatment. CD19, on the other hand, has been explored in other immunotherapies, such as CAR-T cells and bispecific molecules. The phage display technique was used to explore methodologies to mature the affinity of rituximab antibody against the target and to develop new anti-CD19 antibodies, using next-generation sequencing techniques to propose candidates. For the CD20 target, a CD20 mimotope peptide was used, and three candidate molecules were proposed. Only one of them was successfully expressed in a bacterial system and, despite high enrichment in phage display selection, this molecule lost its binding capacity to CD20+ cells, suggesting a complex interaction with rituximab. One mutant was expressed in a eukaryotic system, and binding to CD20+ cells was observed by flow cytometry, as well as a likely cytotoxic activity against Raji cells. For the CD19 target, only two molecules were tested, showing low binding. In the future, new combinations of VH and VL chains and testing of other candidates will be conducted to obtain functional molecules. The strategy used generated candidates based solely on sequence enrichment through phage display selection steps. The molecules can also be studied in the FvFc format, containing a constant portion, to assess their effector properties.

Keywords: antibody fragments; phage display; new generation sequencing; protein engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo 1 (IgG1).....	18
Figura 2 –	Esquematização da estrutura gênica das famílias de imunoglobulinas.....	19
Figura 3 –	Esquematização da estrutura gênica das famílias de imunoglobulinas.....	20
Figura 4 –	Esquematização do papel da estrutura secundária na conformação de imunoglobulinas.....	21
Figura 5 –	Origem de malignidades linfoproliferativas.....	23
Figura 6 –	Esquematização da evolução da origem das moléculas de anticorpos monoclonais.....	25
Figura 7 –	Alguns formatos de anticorpos e seus fragmentos.....	27
Figura 8 –	Representação do ciclo de vida de um linfócito B.....	30
Figura 9 –	Esquematização da seleção por phage display.....	32
Figura 10 –	Exemplificação de duas estratégias que podem ser exploradas por phage display.....	34
Figura 11 –	Esquematização da estratégia metodológica utilizada nos dois capítulos.....	38
Figura 12 –	Esquematização explicando o funcionamento da técnica de interferometria de biocamada.....	49
Figura 13 –	Mapa do vetor de expressão utilizado para FvFc.....	53
Figura 14 –	Fluxograma do experimento de phage display da biblioteca de variantes do scFv do Rituximabe produzida por epPCR.....	57
Figura 15 –	Imagens dos géis de eletroforese de DNA após amplificação de fragmentos VH e VL.....	59
Figura 16 –	Gel de eletroforese após etapa de indexação.....	62
Figura 17 –	Avaliação do número de sequências após cada etapa de filtragem do ATTILA.....	63
Figura 18 –	Porção Fab do rituximabe e CD20.....	68
Figura 19 –	Regiões de interação da sequência Top1 com região ANPSEK do CD20.....	69
Figura 20 –	Regiões de interação da sequência Top7 com região ANPSEK do CD20.....	70

Figura 21 –	Análise da expressão e purificação da sequência scFv do rituximabe.....	71
Figura 22 –	Análise de expressão e purificação de mutantes scFv.....	72
Figura 23 –	Análise de expressão e purificação de mutantes scFv.....	73
Figura 24 –	Análise da caracterização de células Raji e Jurkat.....	74
Figura 25 –	Populações Raji (CD20+) e Jurkat (CD20-) selecionadas durante citometria.....	75
Figura 26 –	Curva de titulação do fragmento NatHA em células Raji e Jurkat.....	77
Figura 27 –	Curva de saturação do fragmento scFv em células Raji.....	78
Figura 28 –	Análise da capacidade de ligação de fragmentos NatHA e Top3.....	80
Figura 29 –	Regiões de interação do CD20 com rituximabe.....	81
Figura 30 –	Curva de titulação para análise de cinética das moléculas NatHA e Top3.....	83
Figura 31 –	Cinética de interação do anticorpo comercial rituximabe com peptídeo CD20.....	84
Figura 32 –	Avaliação da interação entre peptídeo CD20 e anticorpo comercial rituximabe em sensor de proteína A.....	86
Figura 33 –	Alinhamento entre sequência nativa da porção scFv e um dos mutantes, em formato FvFc.....	87
Figura 34 –	Avaliação da purificação por SDS-PAGE e western blotting...	89
Figura 35 –	Confirmação da expressão do fragmento FvFc.....	90
Figura 36 –	Avaliação da interação das moléculas FvFc em células Raji (CD20+) e Jurkat (CD20) por citometria de fluxo.....	91
Figura 37 –	Avaliação da morte celular por marcador de viabilidade.....	94
Figura 38 –	Diferenciação de estágios de apoptose induzida pela molécula de rituximabe.....	95
Figura 39 –	Esquematização do vetor pComb-3XSS contendo o inserto no formato Fab.....	99
Figura 40 –	Esquematização das duas seleções para anticorpos anti-CD19	104
Figura 41 –	Fotos dos géis de eletroforese das amplificações de fragmentos VH e VL da seleção anti-CD19.....	109

Figura 42 –	Esquematização das sequências candidatas escolhidas para construção de sequências scFv a partir das duas seleções contra CD19.....	111
Figura 43 –	Fotos dos géis de eletroforese e membrana de PVDF dos fragmentos scFv selecionados.....	112
Figura 44 –	Fotos dos géis de eletroforese indicando otimização da expressão de T4P e T1B.....	113
Figura 45 –	Análise de citometria de fluxo das sequências candidatas.....	114
Figura 46 –	Regiões da porção extracelular do CD19 com FMC63.....	115
Figura 47 –	Esquema de ranqueamento de sequências obtidas pelo experimento de phage display.....	117
Figura 48 –	Esquematização de proposição de scFvs baseado em enriquecimento e frequência.....	118
Figura 49 –	Gráficos de correlação de frequência de VH e VL com alto enriquecimento.....	119
Figura 50 –	Gráfico de calor para pares VH e VL com alto enriquecimento.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Reação de indexação.....	42
Tabela 2 –	Informações do peptídeo CD20.....	44
Tabela 3 –	Condições de expressão testadas.....	46
Tabela 4 –	Mutações adicionadas no formato FvFc.....	51
Tabela 5 –	Condições reacionais para mutagênese sítio-dirigida.....	52
Tabela 6 –	Reação de digestão com enzima <i>DpnI</i>	52
Tabela 7 –	Condição reacional para digestão enzimática para clonagem em vetor AbVec1.1.....	53
Tabela 8 –	Condição reacional para ligação em vetor AbVec1.1.....	54
Tabela 9 –	Concentrações das amostras de DNA após-purificação.....	60
Tabela 10 –	Combinações de indexes utilizadas no NGS.....	60
Tabela 11 –	Código de amostras sequenciadas por NGS.....	61
Tabela 12 –	Resumo das informações cinéticas coletadas.....	85
Tabela 13 –	Mutações adicionadas no formato FvFc.....	88
Tabela 14 –	Condição reacional de amplificação dos fragmentos VH e VL.....	105
Tabela 15 –	Condições de expressão testadas para fragmentos anti-CD19.....	107
Tabela 16 –	Resumo da titulação de fagos para seleção com peptídeo.....	108
Tabela 17 –	Resumo da titulação de fagos para seleção com células.....	108
Tabela 18 –	Resumo dos enriquecimentos encontrados após análise em ATTILA.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Cluster de diferenciação
UFC	Unidade formadora de colônia
Ka	Constante de associação
Kdis	Constante de dissociação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ig	Imunoglobulina
Fc	Fragmento cristalizável
Fab	Fragment antigen binding
scFv	Single-chain fragmente variable
PCR	Polymerase Chain Reaction
IPTG	Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
CAR	Chimeric Antigen Receptor
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
DO	Densidade Ótica
VH	Variable (heavy chain)
VL	Variable (light chain)
CH	Constant (heavy chain)
CL	Constant (light chain)
FvFc	Fragment variable-Fragment crystalizabe
BRASIL	Biopanning and Rapid Analysis of Interactive Ligands
BiTE	Bispecific T-cell Engager
ADCC	Antibody-dependent cell toxicity
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
ADCP	Antibody-dependent cell phagocytosis
RPM	Rotações por minuto
LB	Luria Bertani
mF	microFaraday
kV	quilovolts
PBS	Phosphate Buffered Saline
MSD	Mutagênese sítio-dirigida

NGS

Next Generation Sequencing

VC

Volumes de Coluna

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Quilodáltons
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
®	Marca registrada
™	<i>Trade mark</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Sistema imune e linfócitos B: fonte de anticorpos.....	17
1.2	Estrutura e conformação de imunoglobulinas.....	18
1.3	Tumores hematológicos oriundos de linfócitos B.....	23
1.4	Modularidade dos anticorpos monoclonais terapêuticos.....	25
1.5	Receptores CD19 e CD20 como alvos terapêuticos.....	27
1.6	Maturação da afinidade de anticorpos.....	30
1.7	Justificativa.....	35
2	CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE MUTANTES DO FRAGMENTO SCFV DO RITUXIMABE.....	37
3	OBJETIVOS.....	37
3.2	Geral.....	37
3.2	Específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	Protocolos gerais.....	38
4.1.1	Preparo e transformação de células quimiocompetentes.....	38
4.1.2	Preparo e transformação de células eletrocompetentes.....	39
4.1.3	Expressão e purificação das proteínas em plataforma procariótica.....	40
4.1.4	Purificação de ácidos nucleicos.....	42
4.1.5	Sequenciamento de nova geração.....	42
4.2	Phage display e seleção de fagos utilizando sistema in vitro.....	43
4.3	Determinação de sequências candidatas por sequenciamento de nova geração.....	44
4.4	Expressão e purificação de fragmentos scFv.....	46
4.5	Avaliação da interação de sequências scFv a células CD20⁺ por citometria de fluxo.....	47
4.6	Análise da cinética de interação por interferometria de biocamada.....	48
4.7	Mutagênese, expressão e purificação de fragmentos em formato FvFc.....	50
4.8	Avaliação do potencial apoptótico de fragmentos FvFc por citometria.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	Amplificação das porções VH e VL para análise por sequenciamento de nova geração.....	56

5.2	Avaliação de sequências enriquecidas por pipeline de bioinformática	
	ATTILA.....	62
5.3	Expressão e purificação de sequências candidatas.....	70
5.4	Caracterização funcional por citometria de fluxo.....	73
5.5	Avaliação da interação por interferometria de biocamada.....	82
5.6	Padronização da expressão no formato FvFc.....	87
5.7	Avaliação capacidade de ligação em células CD20+.....	90
5.8	Avaliação da capacidade de indução a apoptose dos fragmentos FvFc.....	93
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	96
7	CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO D ANTICORPOS HUMANOS ANTI-CD19	98
8	OBJETIVOS.....	98
8.1	Objetivo geral.....	98
8.2	Objetivos específicos.....	98
9	MATERIAIS E MÉTODOS.....	98
9.1	Transformação da biblioteca em bactérias.....	98
9.2	Seleção contra peptídeo mimótopo do CD19.....	99
9.3	Seleção contra células CD19⁺.....	102
9.4	Determinação das sequências candidatas por sequenciamento de nova geração.....	104
9.5	Expressão e purificação dos fragmentos scFv.....	106
9.6	Avaliação da interação de sequências scFv a células CD19⁺ por citometria de fluxo.....	107
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
10.1	Amplificação de sequências VH e VL das seleções com peptídeo e célula CD19⁺.....	108
10.2	Expressão e purificação das sequências candidatas.....	111
10.3	Avaliação por citometria de fluxo.....	113
10.4	Proposição de novas sequências scFv.....	116
11	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	120
	REFERÊNCIAS.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1. Sistema imune e linfócitos B: fonte de anticorpos

O sistema imune é composto por diversas células e moléculas que auxiliam na manutenção da homeostase e proteção contra diversas doenças. Desde o século XIX já se estuda o papel de células brancas sanguíneas na destruição de patógenos (Fulton & Twine, 2019). Este trabalho, inicialmente descrito por Eli Metchnikoff, ajudou a identificar o papel importante da imunidade inata, o braço mais antigo do sistema imune, composto por barreiras (como a pele), moléculas pequenas (como moléculas do sistema complemento) e células (como macrófagos), que protegem o hospedeiro sem a necessidade de um condicionamento do ambiente. Também no final do mesmo século, foi demonstrado por Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato que componentes acelulares do sangue conferem imunidade ou proteção quando transferidos de um animal para outro, exemplificando como fluidos corpóreos poderiam conferir a chamada imunidade humoral. Desde o início do século XX já se sabe que esses componentes estão de certa forma conectados, de modo que a resposta humoral auxilia na resposta imune celular. De forma complementar, a imunidade adaptativa auxilia o sistema imune a produzir respostas altamente específicas, em um processo que permaneceu pouco claro até metade do século XX, quando Dyer e Bennet sugeriram que recombinação de genes do sistema imune poderiam conferir variabilidade aos receptores de células B, gerando a diversidade necessária para combater diferentes componentes malignos (“The molecular basis of antibody formation: a paradox”, [s.d.]). Através do rearranjo dos genes VDJ, uma biblioteca de linfócitos pode ser criada contendo genes únicos que codificam a uma diversidade ampla de anticorpos, o que explicaria os achados de Behring e Kitasato de que o soro de animais vacinados é capaz de proteger animais não vacinados contra desafio ao mesmo patógeno. Os anticorpos são, portanto, um produto da diferenciação de linfócitos B, em que cada clone de linfócito gera/expressa uma molécula diferente.

Os elementos genéticos V(D)J têm papel importante na geração da diversidade de receptores de linfócitos que, através de um embaralhamento randômico e hipermutação somática, geram diferentes versões do receptor capazes de se ligar a, virtualmente, qualquer antígeno. Os linfócitos têm um precursor em comum com outras células sanguíneas, sendo gerados a partir de células-tronco hematopoiéticas (“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010). Posteriormente, as células do sistema imune adaptativo têm seus receptores B e T recombinados nos órgãos imunes primários, medula óssea ou no timo, respectivamente. Tais linfócitos são então transportados pelo sangue ou linfa através do corpo até entrarem em órgãos imunes secundários, como baço, linfonodos e amídalas. Quando os

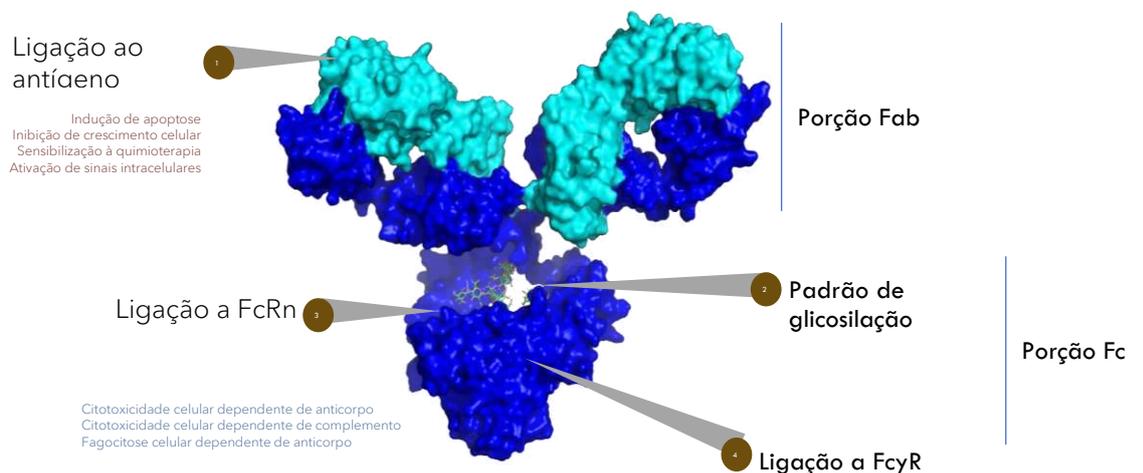
linfócitos B ou T encontram uma célula apresentadora de antígeno nestes órgãos linfoides, a resposta imune adaptativa se inicia.

Em resumo, as células do sistema imune podem ser classificadas entre dois grupos de imunidade, a inata e a adaptativa. Enquanto o sistema imune inato está apto a atuar após uma resposta direta ao antígeno, o sistema adaptativo necessita de uma cascata de respostas maior que pode levar até alguns dias para atuar, porém de forma mais prolongada através da formação da memória imunológica.

1.2. Estrutura e conformação de imunoglobulinas

Anticorpos são moléculas altamente especializadas em reconhecimento de proteínas. São glicoproteínas derivadas de linfócitos B ativados e secretados para proteção contra infecções. Estruturalmente, podem ser divididos em diferentes domínios, conforme visualizado na figura 1.

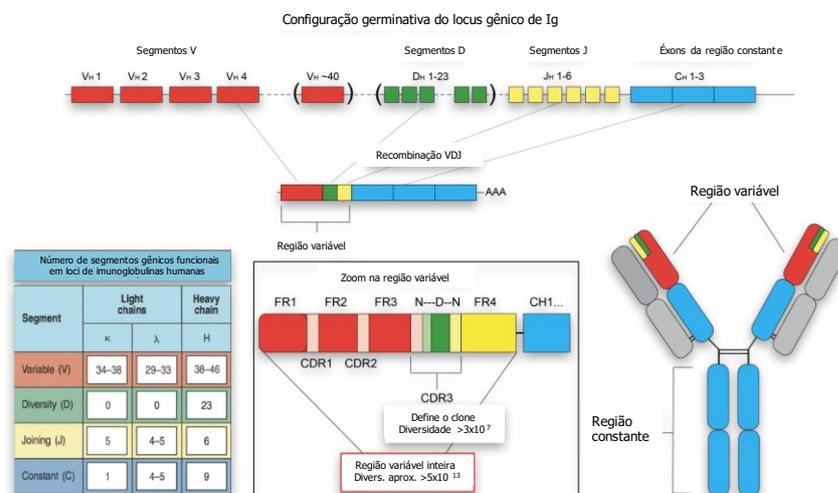
Figura 1. Estrutura básica de uma imunoglobulina do tipo 1 (IgG1)



Fonte: elaborado pelo autor. A porção Fab contém aminoácidos da região variável e constante em sua estrutura. A porção Fc está relacionada com o recrutamento de células e moléculas do sistema imune, gerando funções efetoras. Alguns efeitos terapêuticos estão associados a porção de ligação ao antígeno.

É uma proteína que forma estrutura quaternária composta por quatro cadeias, sendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Estes pares (cadeia leve + cadeia pesada) são idênticos entre si. A estrutura genética das imunoglobulinas (figura 2) é composta de uma região codificadora da porção constante (tanto para cadeia leve quanto para cadeia pesada) e região codificadora da porção variável (porção N-terminal das cadeias leve e pesada). Tanto a cadeia leve quanto a pesada possuem uma porção constante e uma porção variável.

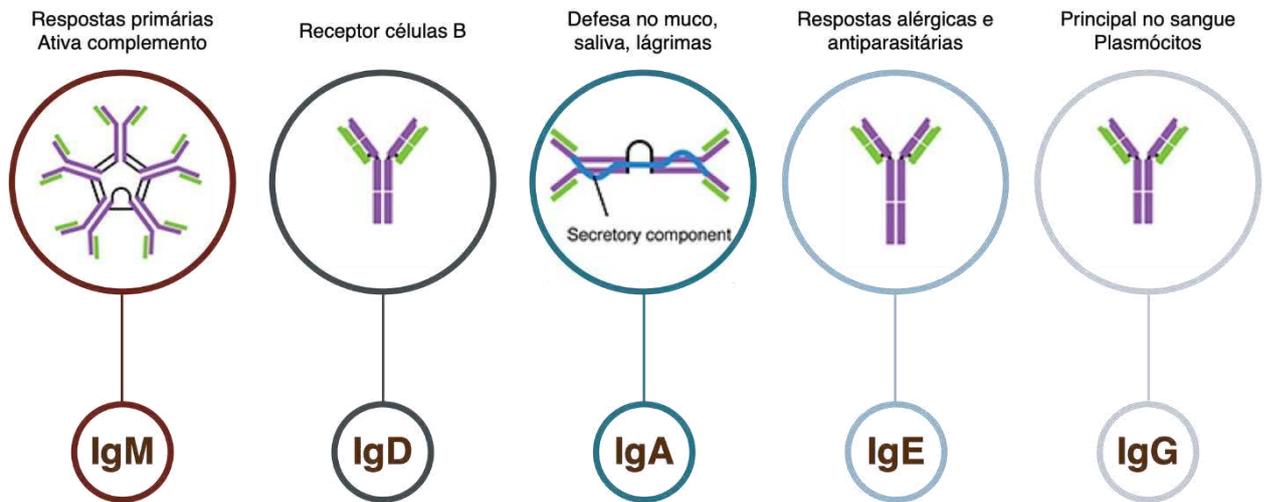
Figura 2. Esquematização da estrutura gênica das famílias de imunoglobulinas.



Fonte: (“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010). A porção variável possui um número elevado de genes comparado a porção constante, e o processo de recombinação para a montagem da molécula de imunoglobulina confere alta variabilidade e especificidade contra virtualmente qualquer antígeno. Durante o processo de junção, outras mutações também são adicionadas. O processo de hipermutação somática confere maior especificidade e afinidade do anticorpo em maturação ao alvo.

Cada anticorpo é codificado por um gene único, recombinado, maturado e selecionado durante o processo de desenvolvimento dos linfócitos B. Os anticorpos são inicialmente expressos no formato associado a membrana como receptor de célula B (*B-cell receptor*, BCR), até o momento em que estas células são ativadas e, devido a sua diferenciação, acabam secretando o seu receptor no formato de imunoglobulinas, sendo este o principal mecanismo efetor de células B (“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010). Além disso, os anticorpos podem ser convertidos a cinco diferentes isotipos (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), com funções ainda mais especializadas, como pode ser visualizado na figura 3.

Figura 3. Tipos de imunoglobulinas



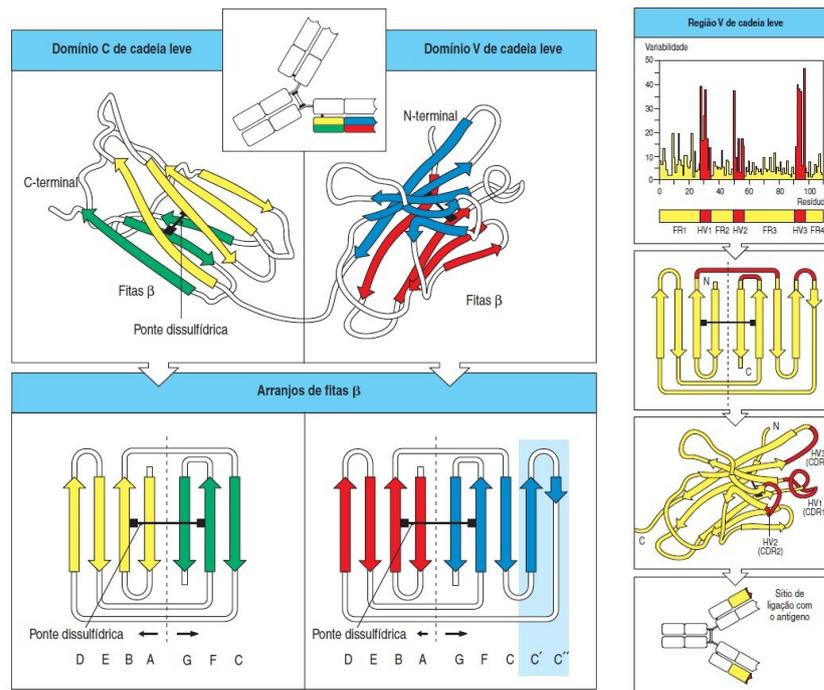
Fonte: elaborado pelo autor baseado em (“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010). A porção constante das imunoglobulinas contém a mesma sequência de aminoácido entre imunoglobulinas do mesmo subtipo. É esta região da molécula que difere entre os subtipos produzidos pelo sistema imune, que confere efeitos e funções especializadas.

O isotipo IgG é encontrado em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgA em duas subclasses. O que diferencia os diferentes isotipos é o gene que codifica a porção constante da cadeia pesada (CH). O formato BCR dos anticorpos tem a função de reconhecer um determinado antígeno, gerando sinal intracelular que leva a diferenciação deste linfócito. Diferentemente dos receptores de células B, os receptores de células T, permanecem ligados a membrana e estão relacionados a sinalização intracelular e ativação de funções exclusivas de células T. Um mesmo clone de linfócito B, é capaz de produzir o mesmo clone (sequência) de anticorpo, chamado de anticorpo de monoclonal. Durante uma resposta imunológica contra um determinado antígeno, uma coleção de anticorpos que não necessariamente se ligam ao mesmo epítipo deste antígeno é produzida por diversos linfócitos B. Neste caso, este grupo de anticorpos é denominado de anticorpos policlonais, oriundos de diversos clones diferentes de linfócitos B. Os anticorpos monoclonais, como citado, se ligam a um mesmo epítipo e são oriundos de um mesmo clone gerador da sequência desta molécula e são utilizados para diversas aplicações terapêuticas e de diagnóstico.

Estruturalmente, as cadeias variável e leve possuem semelhanças. Ambas possuem pontes dissulfeto e folhas β que estão envolvidos na estabilização conformacional da molécula

(“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010), conforme pode ser visto na esquematização da figura 4.

Figura 4. Esquematização do papel da estrutura secundária na conformação de imunoglobulinas



Fonte: (“The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology”, 2010). As alças (*loops*) formadas pelas CDRs funcionam como protusões que alcançam os epítomos para qual os anticorpos foram maturados. Tais regiões têm maior variabilidade na estrutura primária devido efeitos como hipermutação somática. A CDR3 da cadeia pesada, em geral, possui um número maior de resíduos de aminoácidos e maior variabilidade, sendo considerada, em geral, a região do anticorpo mais relevante para afinidade e especificidade.

O padrão estrutural da porção variável da cadeia leve (VL) e da porção constante da cadeia leve (CL) é formado por motivos estruturais que projetam as alças que compõem as CDRs. Tais alças, formadas entre as fitas β , são envolvidas na interação com epítomo da molécula e as folhas β formadas concedem a estabilidade conformacional necessária para direcionar essas regiões das porções variáveis para a interação com o epítomo.

A estabilidade conformacional gerada pelas folhas β são tão eficientes que até mesmo outras moléculas possuem domínios com estrutura similar, denominada

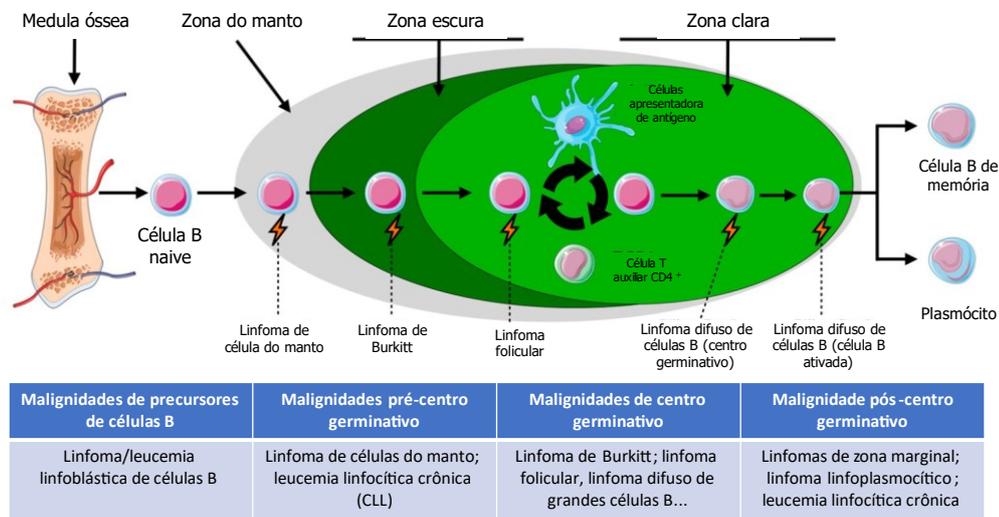
immunoglobulin-like domains. A dobradiça entre CH2 e CH1 confere um certo grau de flexibilidade para os braços da molécula de anticorpo, permitindo que diferentes ângulos sejam formados entre a porção variável e a porção constante. Tal flexibilidade pode inclusive estar associada ao mecanismo de alguns anticorpos terapêuticos, como o rituximabe. Em trabalho publicado por Rougé e colaboradores (ROUGÉ et al., 2020), foi visualizado que o rituximabe consegue interagir com dois epítomos diferentes, tomando uso de sua bivalência para recrutar moléculas de CD20. Essa topologia de interação promove a dimerização de moléculas de CD20. Tal dimerização, como observado por estudos (DEANS; LI; POLYAK, 2002; KLEIN et al., 2013; SINGH et al., 2014) sobre o papel do CD20 na fisiologia de células B, poderia explicar a cascata de ativação que leva a indução de apoptose, um dos mecanismos previstos deste anticorpo, como revisado anteriormente (SMITH, 2003).

Os 110 aminoácidos da porção N-terminal de cada cadeia (CH e CL) são altamente variados devido a recombinação dos genes VDJ, o que confere a especificidade da molécula de anticorpo a diversos alvos terapêuticos. Já a porção C-terminal confere as funções efetoras (HARRIS; LARSON; MCPHERSON, 1999). Dado que a porção variável funciona de maneira independente da porção constante, conferindo especificidade ao epítomo correspondente, estes aminoácidos são alvos de estratégias de engenharia de anticorpos para que a interação antígeno-alvo seja maturada, visando propriedades terapêuticas melhoradas. Por serem os resíduos diretamente envolvidos na interação, os resíduos da porção variável conferem especificidade e afinidade da molécula. Por conta destas duas características, os anticorpos monoclonais têm sido explorados como moléculas terapêuticas (anticorpos monoclonais terapêuticos).

1.3. Tumores hematológicos oriundos de linfócitos B

As células do sistema imune quando sofrem alterações genéticas podem gerar malignidades denominadas de linfoproliferativas. No caso de linfócitos B, por exemplo, diversos tipos de leucemia e linfomas são conhecidos e podem gerar cânceres hematológicos, fazendo com que estes linfócitos tenham suas funções normais de proteção contra patógenos alteradas, passando a comprometer a homeostase do organismo, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 5) (SOUSA-PIMENTA et al., 2023).

Figura 5 - Origem de malignidades linfoproliferativas



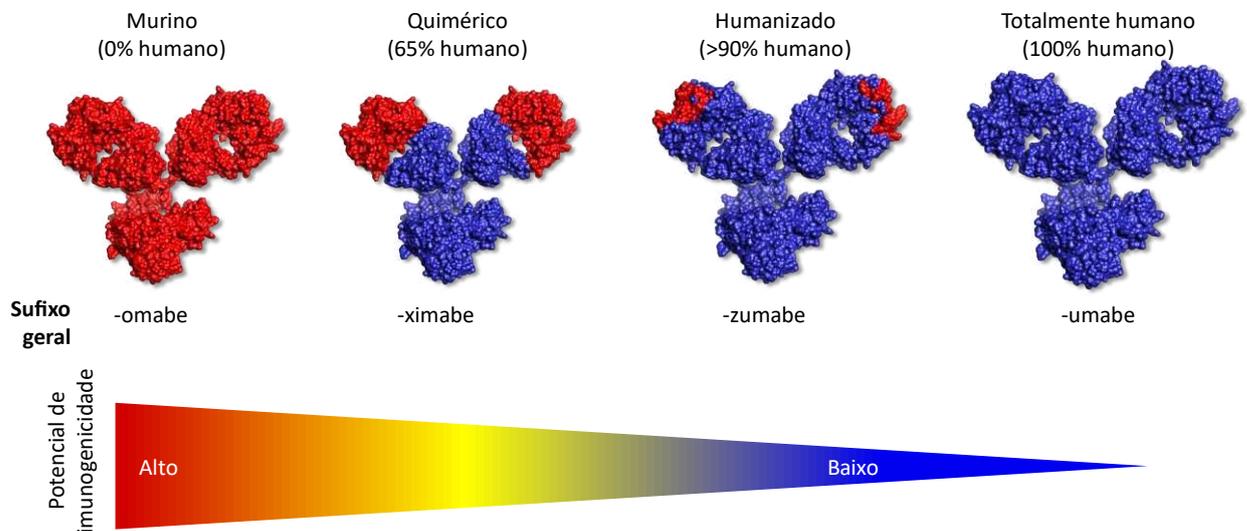
Fonte: PIMENTA, M.S. et al 2023. Células malignas oriundas de linfócitos B podem ter origem em diferentes estágios do ciclo de diferenciação desta célula. A depender de qual estágio a célula se torna cancerosa, diferentes marcadores celulares são associados ao perfil fenotípico da célula. A proteína de membrana CD19, por exemplo, é um antígeno associado a tumor presente em diferentes precursores dos plasmócitos.

Câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento desordenado de células com características definidas como evasão da apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais de supressão de crescimento, angiogênese sustentada, metástase, reprogramação metabólica, evasão do sistema imune, plasticidade fenotípica e epigenética, inflamação pró-tumoral e instabilidade genética (HANAHAN, 2022). No mais recente relatório publicado pelo INCA (“Instituto Nacional do Câncer - 2022 - Estimativa 2023. Incidência de câncer no Brasil.pdf”, [s.d.]), este grave problema de saúde pública se mostrou como uma das principais causas de morte no Brasil, com incidência e mortalidade aumentando no país e em todo o planeta, com uma estimativa de que houve 19,3 milhões de casos novos no mundo, com linfomas e leucemias figurando uma quantidade relevante de casos no país e também no mundo.

As imunoterapias surgiram como uma das principais terapias anti-câncer modernas, sendo classificadas, para fins didáticos, em inibidores de *checkpoint* imunológicos, terapias de transferência de células T, anticorpos monoclonais, vacinas e moduladores do sistema imune (RAFAEL, [s.d.]). Existem mais de 110 moléculas baseadas em anticorpos aprovadas para imunoterapia, sendo a grande maioria destas drogas aplicadas na terapia contra diversos tipos

de câncer (LIU et al., 2022) usando como alvos, principalmente, moléculas de PD-1, PD-L1, CD19, VEGF, CD52, CD22, CD20 dentre outras. Apesar do avanço tecnológico destas terapias ter permitido o sucesso terapêutico de doenças em estado avançado, agressivas e que não respondem a outros tratamentos, alguns problemas ainda são rotina na prática clínica, como efeitos adversos severos causados devido a reações imunológicas contra as moléculas, muitas vezes de origem murina. Como revisado por Foltz e colaboradores (FOLTZ; KAROW; WASSERMAN, 2013), o potencial imunogênico de moléculas com sequências murinas, não reconhecidas pelo sistema imunológico humano, leva a estes efeitos indesejados (figura 6).

Figura 6. Esquemática da evolução da origem das moléculas de anticorpos monoclonais



Fonte: Adaptado de Foltz e colaboradores. Os primeiros anticorpos monoclonais terapêuticos eram de origem exclusivamente murina, gerando muitos efeitos adversos relacionados a reações imunes contra a molécula. Anticorpos de nova geração têm potencial imunogênico menor, gerando menos efeitos colaterais relacionados a rejeição devido a sua estrutura ser de origem humana, possível graças ao desenvolvimento de técnicas modernas de geração de anticorpos via animais transgênicos e phage display.

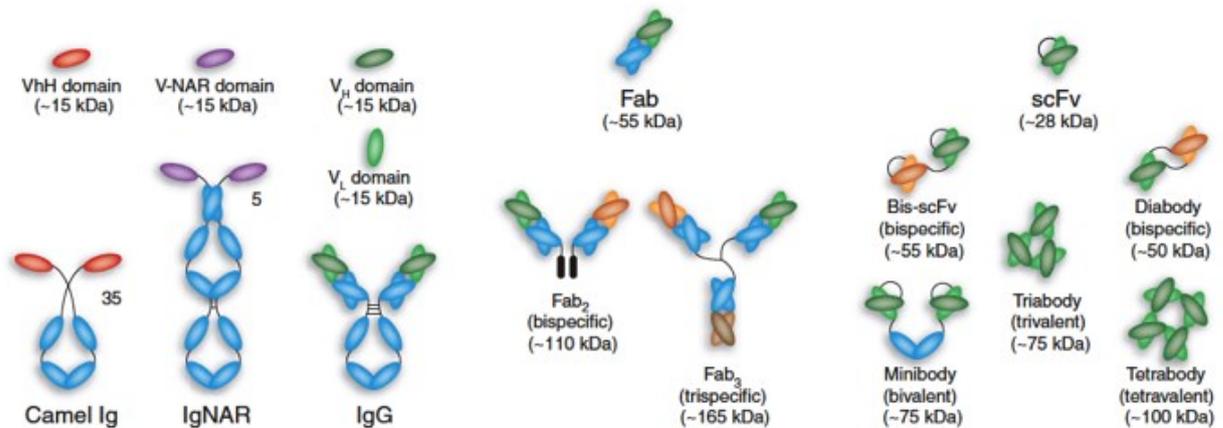
1.4. Modularidade dos anticorpos monoclonais terapêuticos

Os anticorpos monoclonais têm sido explorados terapêuticamente desde a década de 80, quando o primeiro anticorpo isolado de animais imunizados, batizado de OKT3, foi aprovado para controle de rejeição de órgãos, utilizando o alvo CD3 para controle do sistema imune. Desde então, até os dias de hoje, mais de cem anticorpos já foram aprovados para diversas aplicações. Em câncer, o primeiro anticorpo aprovado, em 1997, foi o rituximabe (Rituxan®, Mabthera®), tendo como alvo a proteína de membrana CD20. O rituximabe é um sucesso de mercado e terapêutico, sendo considerado padrão-ouro no combate de muitas imunodisfunções como artrite reumatoide, linfoma não-Hodgkin e Leucemia Linfocítica Crônica, mas não é eficaz para algumas malignidades de células B que não expressam CD20, como leucemia linfocítica aguda e mieloma múltiplo. Mais recentemente, o receptor CD19 também tem sido utilizado como alvo de anticorpos direcionados a linfócitos B no tratamento de cânceres hematológicos. Devido as estratégias de engenharia de proteínas a graças a possibilidade do uso de apenas alguns domínios da molécula de anticorpo, diversos formatos

têm sido propostos para o uso contra células CD19⁺, um alvo mais amplamente expresso do que CD20. Dentre estes formatos, pode-se citar bispecíficos como o blinatumomabe (formato BiTE anti-CD3/anti-CD19), SAR3419 (anticorpo conjugado a droga), anticorpos completos bispecíficos, anticorpos convencionais e células expressando receptores quiméricos de antígeno (Tisagenlecleucel, Axicabtagene Ciloleucel e Lisocabtagene Maraleucel) (HAMMER, 2012).

Por serem moléculas modulares, os anticorpos podem ser engenheirados e expressos em sistemas de expressão no formato de fragmentos. A porção variável pode ser individualmente melhorada para aumentar afinidade e induzir mais apoptose, por exemplo (AHMADZADEH et al., 2014). A figura 7 mostra alguns formatos utilizados nos trabalhos de engenharia de anticorpos (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

Figura 7. Alguns formatos de anticorpos e seus fragmentos



Fonte: (HOLLIGER; HUDSON, 2005). A versatilidade estrutural e independência funcional entre os domínios de anticorpos permite que esta molécula seja trabalhada no formato modular, combinando e removendo regiões conforme interesse. Moléculas menores, como scFv e scFv-Fc (ou FvFc) são mais simples estruturalmente, permitindo a expressão com altos rendimentos em sistema heterólogo.

O formato scFv é utilizado em diversas construções como scFv-Fc (scFv fusionado a porção constante CH2 e CH3 de imunoglobulinas) e receptores quiméricos de antígeno. Tal versatilidade permite não só que formatos sejam combinados, facilitando sua caracterização, expressão recombinante (como é o caso do formato scFv-Fc, molécula homodimérica bivalente) e uso terapêutico em contextos diversos (como é o caso de moléculas polis específicas).

1.5. Receptores CD19 e CD20 como alvos terapêuticos

O receptor CD20 é uma proteína de membrana não glicosilada presente em células B em certos estágios de diferenciação, sendo ausente em células tronco e em linfócitos B diferenciados. Esta proteína forma duas alças extracelulares que formam o epítipo de diversos anticorpos anti-CD20. Apesar de não ter sua função completamente compreendida, o CD20 está envolvido na ativação de linfócitos B. Vários anticorpos anti-CD20 estão aprovados no mercado e seus diferentes efeitos na célula-alvo permitem a classificação dos anticorpos em tipo I e II. O rituximabe é um anticorpo do tipo I, caracterizado pela sua habilidade de induzir forte CDC, efeito que parece estar diretamente relacionado a capacidade destes anticorpos de translocar as moléculas de CD20 para as balsas lipídicas. Já anticorpos do tipo II, como tositumomabe e obinutuzumabe, não são completamente dependentes do acúmulo de CD20 em

balsas lipídicas, se ligando a porções mais expostas da molécula e permitindo sua agregação e dimerização, sendo indutores mais fortes de apoptose diretamente ligada a ligação do anticorpo (SINGH et al., 2014). Ambos induzem ADCC e ADCP.

O CD20 é um alvo amplamente estudado e seu papel como alvo-terapêutico tem esclarecido diversos mecanismos de anticorpos e até mesmo estratégias utilizadas por células cancerosas para evadir o sistema imune. Como demonstrado por Singh e colaboradores (SINGH et al., 2014), os níveis de CD20 estão relacionados com a capacidade de anticorpos anti-CD20 mediarem morte celular, o que explicaria o porquê de, em certos casos, a diminuição da expressão de CD20 está associada a resistência a tratamento por estes anticorpos (SMITH, 2003).

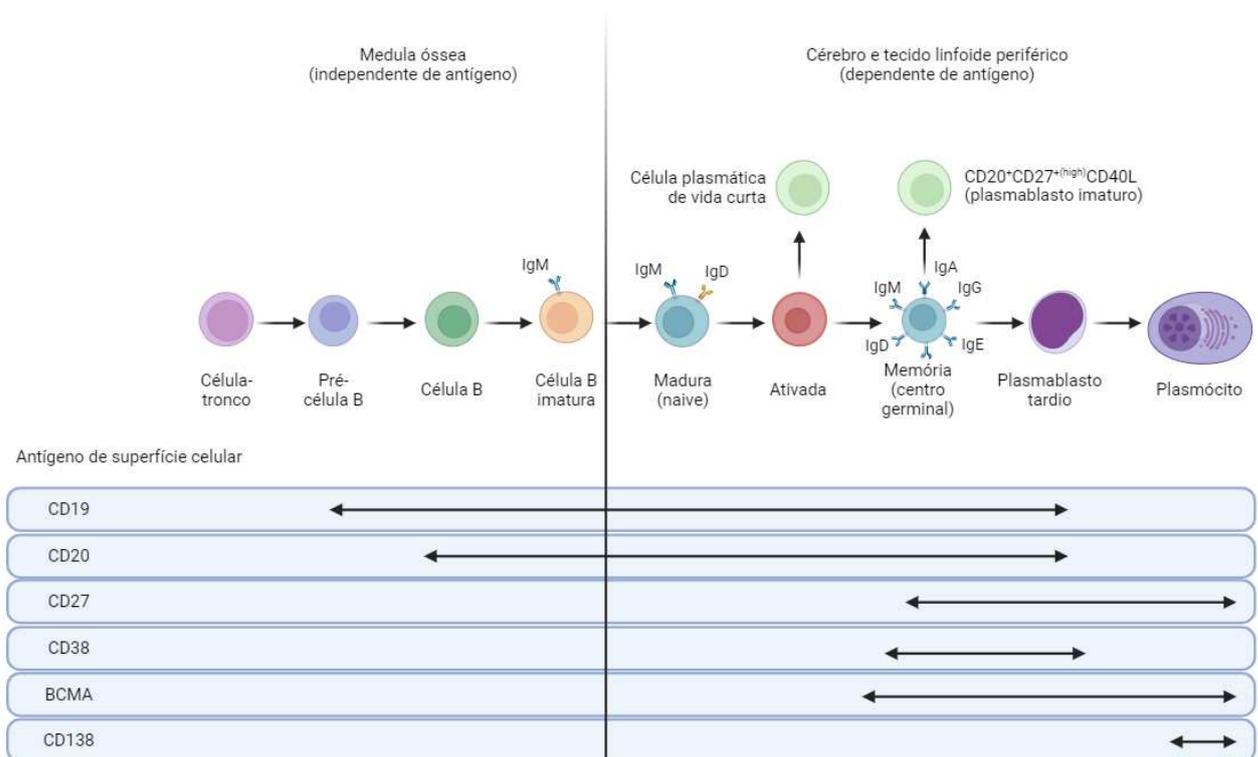
O receptor CD19 é um alvo muito bem estabelecido no tratamento de malignidades associadas a células B. É expresso exclusivamente em células B e progenitores linfoides e não é expresso em células tronco (DALAKAS, 2008). Está associado ao controle de ativação de células B, sendo um regulador positivo de sinalização em conjunto com CD21 e CD81 (HORTON et al., 2008) e é um alvo bastante utilizado em linfomas não-Hodgkin e muitas leucemias, como leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica e leucemia de células pilosas, dado a sua alta expressão nas células-alvo. É uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 95 kDa que possui dois domínios extracelulares IgG-like e uma longa cauda intracelular. Os primeiros anticorpos monoclonais aprovados para terapias anti-CD19 foram o tafasitamab e o loncastuximabe terisina. O tafasitamab é um anticorpo humanizado, com CDRs de origem murina. Ao ligar ao seu alvo, o tafasitamab induz apoptose de forma independente a citotoxicidade celular dependente de anticorpo além de mecanismos via ADCC e ADCP (SALLES et al., 2020), mecanismos comuns de anticorpos terapêuticos anti-CD19 e CD20.

Conforme revisado por Tedder e colaboradores (TEDDER; INAOKI; SATO, 1997), o engajamento do receptor por anticorpos monoclonais leva a fosforilação da tirosina presente na porção citoplasmática do receptor, induzindo a ativação de fosfolipase C, mobilização de cálcio intracelular, estimulação de proteínas quinases e ativação do fator nuclear kB. Apesar do mecanismo de indução de apoptose de anticorpos anti-CD19 não terem sido muito explorados na literatura científica, é intuitivo pensar que a ativação deste receptor, que está envolvido na diferenciação de linfócitos B, e a ausência de sinais coestimulatórios via CD40 ou IL-4R acaba levando a transdução de vias de ativação de caspase e expressão de genes proapoptóticos (DONJERKOVIĆ; SCOTT, 2000). Ou seja, a dimerização promovida pelo anticorpo monoclonal leva a ativação de cascatas de sinalização envolvidas na ativação, diferenciação e

sobrevivência de linfócitos B. Porém, a contínua ativação desta cascata acaba levando a apoptose e sem os sinais coestimulatórios de linfócitos T para manter a ativação do linfócito B acaba contrabalanceando sinais de sobrevivência, levando a morte celular por apoptose.

Conforme figura 8, ambos os receptores são moléculas expressas ao longo do ciclo de vida de linfócitos B. As duas moléculas apresentam funções correlatas no desenvolvimento e maturação de linfócitos B e moléculas de anticorpos monoclonais ativam mecanismos similares de indução de apoptose. Em outras construções de biofármacos, como bispecíficos e receptores quiméricos de antígeno, a indução de apoptose através da ligação direta ao antígeno acaba não sendo um dos principais mecanismos de ação. Nesse caso, os receptores atuam como antígenos associados a tumores e o recrutamento do sistema imune via células citotóxicas é o principal mecanismo utilizado na depleção de células malignas.

Figura 8. Representação do ciclo de vida de um linfócito B



Fonte: Adaptado de (DALAKAS, 2008). Os alvos CD19 e CD20 têm sido explorados na clínica por serem moléculas expressas exclusivamente em linfócitos B. O alvo CD19 tem ganhado bastante interesse por ser expresso em uma quantidade maior de células, em diferentes estágios do ciclo de vida do linfócito, sem comprometer precursores comuns de outras células saudáveis, no contexto de malignidade tumoral.

1.6. Maturação da afinidade de anticorpos

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, o uso da engenharia de proteínas permitiu que moléculas de anticorpos fossem engenheiradas visando melhorias em suas propriedades terapêuticas. É descrito na literatura que anticorpos contra o mesmo antígeno induzem mecanismos efetores, como ADCP, em diferentes níveis. No caso de anticorpos anti-CD20, moléculas consideradas de “nova geração”, como ofatumumabe, foram capazes de induzir fagocitose intervalos de tempo menores e com menores concentrações do que rituximabe, também um anti-CD20 (CHURCH et al., 2015). Ou seja, apesar do antígeno ser o mesmo, a posição do epítipo afeta como os anticorpos agem contra a célula-alvo.

A afinidade das moléculas de anticorpos, mesmo a um mesmo epítipo, também pode afetar sua atuação em uma determinada célula-alvo e deve ser levada em consideração durante o processo de maturação da afinidade. Conforme descrito por Yu e colaboradores (YU et al., 2023), alta afinidade não necessariamente leva a uma alta função agonista e de ativação de cascatas de sinalização intracelular. Ainda, para cada anticorpo, uma faixa de afinidade adequada induz clusterização de receptores, levando a sinalização mais potente. Essa premissa foi demonstrada para alguns alvos terapêuticos explorados por moléculas aprovadas no mercado, como CD40, 4-1BB e PD-1. Não apenas a constante de afinidade, mas as constantes de dissociação e associação também parecem ter um papel relevante na indução de cascatas de sinalização, um campo incipiente e pouco explorado na literatura científica.

As moléculas de anticorpos possuem faixas de afinidade que vão desde dezenas de micromolar (ESCOLANO et al., 2016) até picomolar (LI et al., 2018), uma faixa de quase 100.000.000 vezes de diferença. A constante de afinidade do rituximabe é de 8nM, podendo variar a depender da técnica e antígeno utilizado. Considerando que outros anticorpos monoclonais terapêuticos estão na faixa de $K_d = 10^{-11}$ M, como adalimumabe ($3,04 \times 10^{-11}$), infliximabe ($2,73 \times 10^{-11}$) e etanercept ($1,18 \times 10^{-11}$, molécula baseada em anticorpo), o potencial de aumento de afinidade do rituximabe permite que versões engenheiradas deste anticorpo sejam testadas.

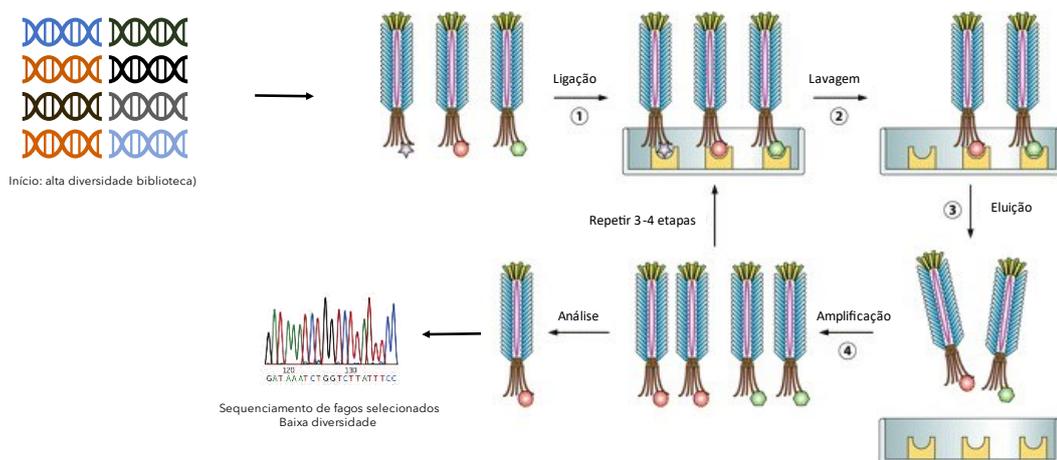
Através da engenharia de proteínas, alterações na estrutura primária de aminoácidos de uma determinada molécula podem ser induzidas, visando a modulação da interação e afinidade entre a proteína e seu ligante. Uma das metodologias utilizadas para essa finalidade é a técnica de phage display aplicada a evolução dirigida (GRAM et al., 1992), em que mutações aleatórias são inseridas ao longo da sequência codificante de um fragmento de anticorpo a fim de gerar variantes (mutantes) e esses mutantes são filtrados a partir de um determinado objetivo, seja maturação da afinidade, estabilidade estrutural ou outra característica intrinsecamente

relacionada a estrutura. Utilizando a reação em cadeia da polimerase, pode-se modular a inserção de mutações pontuais randômicas em genes clonados, em uma técnica chamada de error-prone PCR (epPCR). Quando acoplada a um poderoso método de seleção, como o phage display, é possível gerar bibliotecas com um número grande de variantes para que sejam selecionados aqueles com maior afinidade ao alvo, sem necessariamente conhecer qual posição deve ser alterada (CADWELL; JOYCE, 1992). O aumento da afinidade em alguns casos está associado a alterações na função efetora de anticorpos, como descrito em sequências humanizadas de anticorpos anti-CD20 (CHEN et al., 2015).

Uma das metodologias utilizadas para descobrir novos anticorpos a partir de bibliotecas diversas é a técnica de phage display Figura 9.

Figura 9. Esquematização da seleção por phage display

Método de seleção via *phage display*



Fonte: Adaptado de (HUANG; BISHOP-HURLEY; COOPER, 2012). A partir de uma biblioteca de alta diversidade, em formato de DNA, a sequência-alvo é expressa na superfície de fagos. Os fagos são então incubados com o antígeno de interesse e as moléculas não ligantes são removidas durante a lavagem. Ao final, pode-se repetir o ciclo ou sequenciar os fagos selecionados, já que estes possuem a sequência de DNA da molécula expressa em sua superfície dentro do capsídeo. Para a produção da partícula viral e consequente apresentação do antígeno na superfície de um vírus, é necessário a co-infecção com um fago auxiliar que expressa todas as proteínas virais.

Um dos propositores desta técnica, George Smith (SMITH, 1985) propôs que proteínas poderiam ser expressas na superfície de fagos, partículas virais com capacidade de se replicar

em bactérias. Alguns anos depois, diversas aplicações da metodologia começaram a ser propostas, incluindo a expressão de fragmentos de anticorpos visando a obtenção de sequências funcionais a partir de grandes bibliotecas sintéticas (BARBAS et al., 1991; GRIFFITHS et al., 1994; HOOGENBOOM et al., 1991). Os fragmentos de anticorpos são fusionados a uma das proteínas do capsídeo viral, como a proteína pIII, de forma a ainda permitir a formação e replicação do vírus em bactérias suscetíveis. A porção variável dos anticorpos é expressa em tandem com a proteína pIII em vetor para phage display chamado de fagomídeo. Um outro vetor, chamado de fago auxiliar, é também transformado na cepa bacteriana. Este vetor possui todas as proteínas do capsídeo viral, incluindo a própria pIII, de forma a permitir a montagem completa do vírus. A partícula viral é então produzida com a proteína de fusão anticorpo-pIII apresentada em sua superfície. Um repertório gênico de imunoglobulinas pode ser clonado e transformado em bactérias compatíveis a fim de apresentar todo este repertório na superfície de fagos, que são posteriormente selecionados por um processo chamado de biopanning.

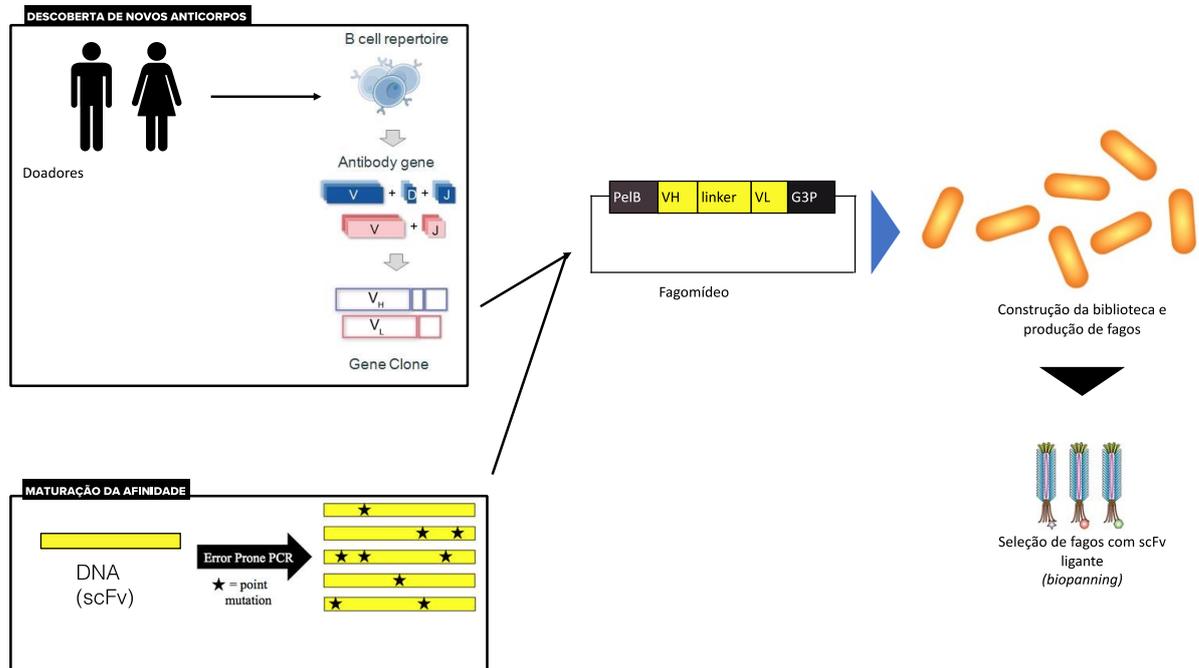
Além de uma biblioteca construída a partir de um repertório imunológico, também é possível construir uma biblioteca a partir de bibliotecas sintéticas visando a maturação de uma propriedade bioquímica da proteína-alvo. As principais bibliotecas utilizadas em phage display são, portanto:

- Biblioteca imune: após um determinado organismo ser exposto a um antígeno específico, o repertório imune é amplificado por isolamento e clonagem dos genes das porções variáveis dos anticorpos/receptores de célula B (Figura 9).

- Biblioteca naive: esta biblioteca é construída de forma similar a biblioteca imune, com a diferença de que não há necessariamente um processo de imunização prévio contra o alvo de estudo. Dado a ampla diversidade do repertório imunológico, a probabilidade de haver uma sequência funcional contra um determinado alvo permite que a técnica de phage display seja utilizada para isolar esta sequência (Figura 9).

- Bibliotecas sintéticas: aqui, as sequências de anticorpos são sinteticamente modificadas, engenheiradas, mutadas ou maturadas por processos in vitro de alteração na sequência de aminoácidos. No caso de bibliotecas de anticorpos, mutações aleatórias podem ser inseridas por epPCR, em que as condições reacionais de amplificação da sequência alvo propiciam o aparecimento de mutações aleatórias que, posteriormente, serão selecionadas por phage display (Figura 10).

Figura 10. Exemplificação de duas estratégias que podem ser exploradas por *phage display*



Fonte: elaborado pelo autor. A técnica de phage display pode ser utilizada para gerar novos anticorpos ou para maturar a afinidade de moléculas já existentes. Para isso, as bibliotecas podem ser geradas a partir de um repertório imunológico ou a partir de técnicas que promovem alterações aleatórias na sequência a ser selecionada.

Tanto as bibliotecas imune e naive são principalmente utilizadas para descobrir novas sequências de anticorpos, especialmente contra alvos ainda não explorados. No caso do receptor CD19, por exemplo, ainda não há, até o momento, nenhum anticorpo monoclonal humano aprovado para imunoterapia, sendo um exemplo de alvo em que a técnica de phage display pode ser aplicada para propor novas sequências. Dado que o número de genes de famílias de anticorpos é limitado, é possível amplificar o repertório imunológico de um determinado organismo, clonar em vetor para phage display e construir uma biblioteca que pode ser utilizada para seleção de imunoglobulinas específicas para determinados alvos. Já as bibliotecas sintéticas são geralmente utilizadas para ajustar, melhorar, maturar, alterar ou incrementar alguma propriedade bioquímica de moléculas existentes, visando, por exemplo, o aumento da afinidade contra um determinado epítipo.

1.7. Justificativa

Apesar do sucesso de diversas terapias no tratamento de imunodesregulações associadas a linfócitos B, alguns desafios existem nas terapias de cânceres, como a alta imunogenicidade, falta de anticorpos contra alvos tumores-específico (como é o caso do alemtuzumab, um anticorpo anti-CD52 que induz citotoxicidade a outras células como linfócitos T e NK) além de outros mecanismos associados a resistência e evasão do sistema imune das células tumorais (AWAN et al., 2010). Nesse sentido, o receptor CD19 tem sido um antígeno potencial de diversas imunoterapias, sendo um antígeno associado a câncer com bons resultados clínicos. Apesar do sucesso clínico de alguns imunobiológicos aprovados no mercado, ainda não existem anticorpos anti-CD19 humanos no mercado, o que pode estar associado ao fato de algumas dessas terapias induzirem alta imunogenicidade quando aplicadas em pacientes.

No que se refere ao alvo CD20, mesmo rituximabe sendo um sucesso terapêutico e alguns anticorpos humanos já estarem disponível no mercado, entre 30-50% dos pacientes respondem adequadamente a terapias anti-CD20 e até 60% dos que respondem deixam de responder em caso de reaparecimento do tumor (MÜLLER et al., 2008). Em certos tipos de linfoma, como linfoma linfocítico de pequenas células, o rituximabe é ativo nos casos de doenças recidivas ou refratárias em apenas 10-15% (SMITH, 2003). O grau de imunogenicidade deste anticorpo (PAUL; CARTRON, 2019) é comparável a de anticorpos humanos como ofatumumabe (HAUSER et al., 2022), além de ser um fármaco bastante conhecido na prática clínica, o que facilita a sua manipulação e controle de efeitos adversos. Dito isso, as estratégias de engenharia de anticorpos aplicadas ao rituximabe que visem melhorar o seu mecanismo terapêutico e exploração da capacidade de ligação ao antígeno CD20 são uma alternativa para tornar este anticorpo uma molécula com propriedades melhoradas, a fim de superar os mecanismos de evasão e resistência ao medicamento.

Considerando os pontos apresentados, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais pode ser aprimorado com o uso de engenharia de proteínas, em que moléculas com afinidades diversas podem ser propostas contra um mesmo epítipo a fim de avaliar qual a faixa de afinidade é a mais adequada para uma determinada construção e aplicação terapêutica. Além disso, é sabido que anticorpos contra diferentes epítopos de um mesmo antígeno podem exibir perfil de mecanismo de ação diferentes, o que justifica, também, o desenvolvimento de anticorpos contra diferentes epítopos de um mesmo alvo, a fim de avaliar qual clone induz melhor propriedade terapêutica. Mesmo o epítipo sendo o mesmo, já foi demonstrado na literatura que até a geometria de ligação afeta como células CD20⁺ respondem a diferentes anticorpos, como é o caso do rituximabe e obinutuzimabe (KLEIN et al., 2013). Tanto a

afinidade quanto o epítipo devem ser levados em consideração no desenvolvimento de anticorpos, assim como qual a construção a ser utilizada, seja no formato de imunoglobulina do tipo IgG1, receptor quimérico de antígeno, bispecífico ou em formato de fragmento (VANDER MAUSE et al., 2022).

Portanto, este trabalho busca utilizar técnicas estabelecidas de proposição, desenvolvimento e caracterização parcial de anticorpos monoclonais para gerar variantes de anticorpos com propriedades bioquímicas melhoradas (utilizando rituximabe, um anti-CD20, como modelo) e para propor novas moléculas de origem humana contra alvos associados a tumores (utilizando o receptor CD19 como alvo). As estratégias aplicadas para esses dois alvos aqui explorados estão divididas em dois capítulos, a fim de expor as diferentes metodologias utilizadas de forma mais didática.

2 CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE MUTANTES DO FRAGMENTO SCFV DO RITUXIMABE

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o uso de um peptídeo mimótopo como ferramenta de maturação de afinidade do anticorpo rituximabe.

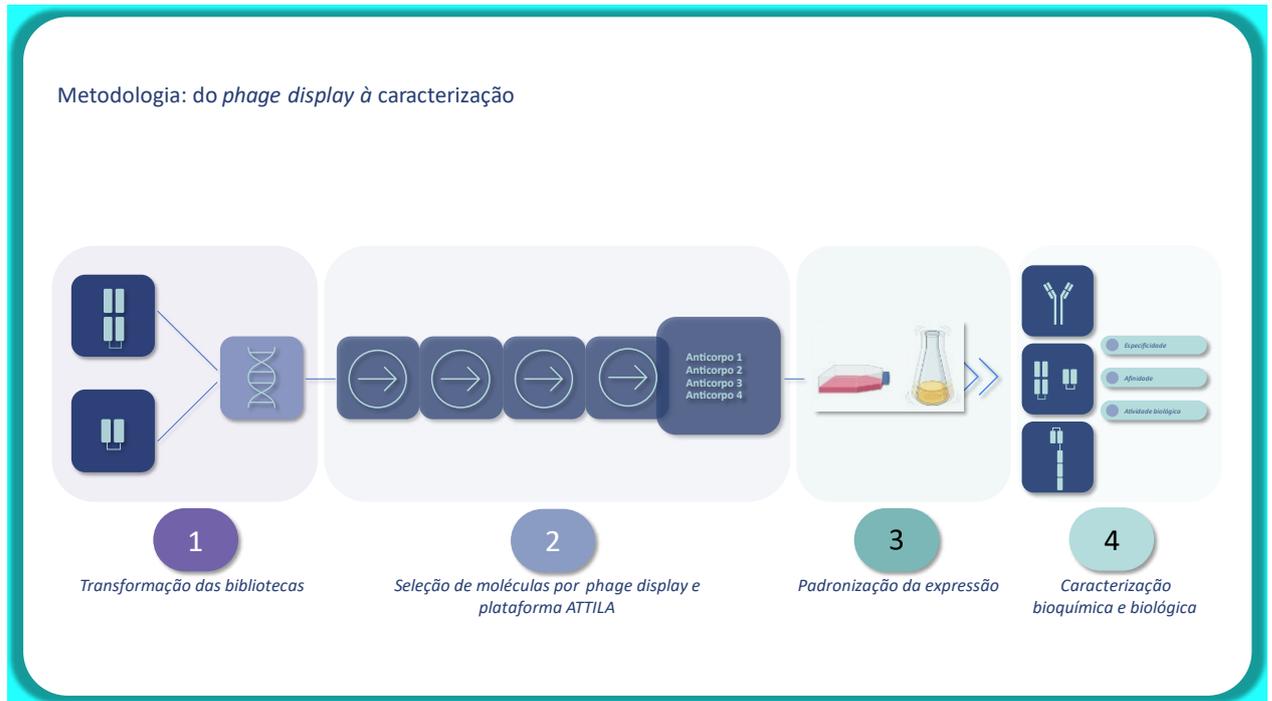
3.2. Específicos

- 3.2.1. Construir uma biblioteca, gerada por epPCR, de variantes do scFv do rituximabe.
- 3.2.2. Selecionar, via phage display, variantes scFvs do rituximabe baseado na interação com peptídeo mimético.
- 3.2.3. Construir, expressar e purificar os candidatos selecionados.
- 3.2.4. Avaliar a afinidade dos candidatos selecionados oriundos da seleção por phage display.
- 3.2.5. Construir, expressar e purificar candidatos scFv no formato quimérico contendo porções constantes CH2 e CH3 de imunoglobulina do tipo IgG1.
- 3.2.6. Avaliar diferenças bioquímicas e funcionais dos candidatos selecionados em relação a sequência nativa do rituximabe.
- 3.2.7. Avaliar a contribuição de mutações presentes em candidatos selecionados para a afinidade ao mimótopo do CD20.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Um resumo da metodologia utilizada nos dois capítulos desta tese foi esquematizado conforme figura 11.

Figura 11. Esquematização da estratégia metodológica utilizada nos dois capítulos



Fonte: elaborado pelo autor. Para os dois capítulos, foram utilizadas bibliotecas de anticorpos (1), de onde sequências foram propostas após seleção por phage display (2), os candidatos foram expressos de forma recombinante (3), e então caracterizados bioquímica e biologicamente (4).

4.1. Protocolos gerais

4.1.1. Preparo e transformação de células quimiocompetentes

Células bacterianas de *E. coli* (cepas TOP10 ou Shuffle T7 express®) armazenadas em estoque com glicerol a -80C foram estriadas em placas contendo LB ágar e incubadas overnight a 37C em estufa bacteriológica. No dia seguinte, uma colônia isolada foi inoculada em 5mL de meio de cultura líquido (LB) e incubadas overnight a 37C sob rotação de 220RPM em incubadora orbital. No terceiro dia, um inóculo de 1% do volume final de 100mL foi adicionado em frasco Erlenmeyer de 500mL e incubado a 37C/220RPM até atingir densidade óptica medida em espectrofotômetro (D.O. 600nm) em faixa de 0,4-0,6, correspondendo ao início da fase logarítmica de crescimento bacteriano. As células foram decantadas por centrifugação a 3.000g/10min/TA e o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 40mL de MgCl₂ (0,1M). Outra centrifugação e lavagem do precipitado bacteriano foi realizada com

20mL de CaCl₂ (0,1M), seguida de outra com 2mL de CaCl₂ (0,1M). As células foram então incubadas em gelo por 20 minutos, seguido de adição de 1mL de glicerol 50%. As células foram então aliqotadas em 100µL em tubos previamente gelados a -20C e estocadas em ultrafreezer -80C.

A transformação das células foi feita utilizando uma mistura reacional contendo:

- 10µL de MgCl₂ 0,1M
- 5µL de CaCl₂ 0,1M
- DNA (20ng para plasmídeo ou 10µL de reação de ligação, conforme necessário)
- Água q.s.p. 50µL

Esta mistura foi adicionada a 50µL de células quimiocompetentes em microtubo de 1,5mL e incubadas como segue:

- 20min em gelo
- 45seg a 42C
- 2min em gelo

Após o choque de temperatura, 1mL de meio SOC foi adicionado a bactéria transformada e o microtubo foi incubado a 37C por 1h sob 220RPM de agitação. Após esta etapa de regeneração, as células foram centrifugadas a 10.000g/30seg. Foram removidos 900µL de sobrenadante e os 100µL restantes foram utilizados para ressuspender as células e plaquear em placa de petri contendo meio LB ágar com respectivos antibióticos. As placas foram então incubadas a 37C *overnight* e colônias individuais foram analisadas ou inoculadas em meio LB.

4.1.2. Preparo e transformação de células eletrocompetentes

Conforme etapa 3.a.i., células bacterianas foram inoculadas em meio de cultura. Para preparo de eletrocompetentes, foi utilizado meio SB (peptona caseína 3% p/v, extrato de levedura 2% p/v, MOPS 1% p/v, pH 7,0). Uma alíquota de 1mL foi utilizada para inocular 500mL de meio SB suplementado com 2,5mL de glicose 2M e 2,5mL de solução de Mg 2M (MgCl₂ 1M, MgSO₄ 1M em proporção 1:1). Após atingir D.O.600nm entre 0,7 e 0,9, o frasco de 2L contendo 500mL de cultura foi resfriado em gelo por 15min. Após esse tempo, as células foram precipitadas por centrifugação a 3.000g/20min/4C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 100mL de glicerol 10% previamente resfriado. Outras duas etapas de centrifugação e ressuspensão em glicerol 10% foram realizadas. O precipitado final após três lavagens foi ressuspensado em glicerol 10% gelado (entre 1-2mL), de forma a obter uma D.O. 600nm entre 200-250. A leitura foi feita diluindo 100x uma pequena alíquota de células. As células foram então aliqotadas em microtubos de 1,5mL, congeladas em banho

seco embebido em etanol absoluto e armazenadas em -80C, conforme descrito por de-Souza e colaboradores (DE-SOUZA; MARCELO DE MACEDO BRÍGIDO; ANDREA QUEIROZ MARANHÃO, 2016).

Para transformar por eletroporação, foram utilizados 100µL de célula e 1µL de DNA (sob diferentes concentrações, conforme necessário) em cubeta de 0,2cm previamente incubada em gelo. Após secagem da parte exterior da cubeta com papel toalha, esta foi submetida a choque sob as seguintes condições: 2,5 kV, 200 Ω, 25 mF. O tempo de pulso foi anotado.

4.1.3. Expressão e purificação das proteínas em plataforma procariótica

Os plasmídeos de contendo os cassetes de expressão foram transformados em *E. coli* cepa Shuffle T7® Express (New England Biolabs™). Foram utilizados 20ng de plasmídeo para transformar a bactéria por choque térmico. Colônias individuais foram inoculadas em 5mL de meio de cultura conforme anteriormente descrito. Após incubação overnight sob agitação de 220RPM/37C, 1% do volume total de expressão (500mL) foi utilizado para inocular a cultura. Após crescimento 37C/220RPM até atingir D.O.600nm entre 0,7-0,9, IPTG foi adicionado em concentração final 0,5mM, além de antibiótico, e as culturas foram incubadas a 15C por 16h sob agitação de 200RPM. O meio de cultura utilizado para expressão foi o Terrific Broth (TB – extrato de levedura 24% p/v, triptona 20% p/v, glicerol 0,4% v/v, suplementado com 10% tampão 0,17M KH₂PO₄, 0,72M K₂HPO₄). Após o tempo de expressão, a cultura foi coletada por centrifugação a 8000g/10min/4C e o precipitado bacteriano foi utilizado para purificação ou armazenado em -20C.

Para as purificações o pellet bacteriano foi ressuscitado em de tampão de lise (20mL de tampão para cada pellet oriundo de 500mL de cultura), composto de tampão A (tris 50mM, NaCl 300mM, pH 8,0) ou A' (fosfato de sódio 20mM, NaCl 300mM, pH 8,0) suplementado com triton X-100 1% v/v, imidazol 5mM e fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMFS) 1mM como inibidor de proteases. As células foram então lisadas em sonicador (Ultrasonicador QSonica Q700) utilizando microsonda programada para pulsos de 5seg, descanso de 15seg e amplitude de 25% por 30min, em gelo. O sonicado foi centrifugado por 30min a 10000g/4C, o sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi filtrado em filtro de 0,22µm e então purificado em sistema cromatográfico Äkta Pure 25. Todos os tampões também foram filtrados em filtro de 0,22µm e sonicados em banho ultrassônico.

A cromatografia foi realizada contra uma coluna de níquel HisTrap HP 1mL (Cytiva®), dado que todas as construções expressas em bactéria utilizadas nesse trabalho possuem uma tag

de histidina (6x His), permitindo purificação por afinidade com metal imobilizado (IMAC). O método de cromatografia de afinidade foi programado com as seguintes etapas:

- Equilíbrio da coluna com 5 VC (volumes de coluna)
- Aplicação da amostra
- Lavagem com 15 VC
- Eluição em gradiente de imidazol 20 VC
- Lavagem com tampão B 5 VC

As etapas de equilíbrio, aplicação da amostra e lavagem foram realizadas com 5% de tampão B ou B' (mesma composição do tampão A ou A', suplementado com 500mM de imidazol). A etapa de eluição foi feita com início em 10% até 60% de B ou B'.

Para cromatografia de exclusão molecular, foi utilizada coluna S16/60 (Cytiva®). As frações de eluição da cromatografia de afinidade foram concentradas para aproximadamente 4mL e submetidas a cromatografia de exclusão molecular sob fluxo de 1mL/min em tampão A ou A'. As frações contendo picos em UV 280nm foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e aquelas contendo proteínas no tamanho esperado foram concentradas por dialofiltração em filtros com 10 kDa de cut-off (Amicon®).

Para remoção da cauda de solubilidade SUMO, foi preparada digestão com enzima SUMO ULP-1 protease em proporção 1:20 (proteína-alvo:ULP1) e incubadas overnight a 4C. Foi feita então cromatografia de afinidade reversa para separar a cauda digerida da proteína de interesse.

4.1.4. Purificação de ácidos nucleicos

Para ácidos nucleicos purificados a partir de cultura bacteriana, foram utilizados 5mL de cultura bacteriana e *kit* de extração plasmidial Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®), conforme recomendações do fabricante

Para ácidos nucleicos purificados a partir de gel de agarose, foi utilizado *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) ou *kit* QIAquick gel extraction *kit* (Qiagen), conforme informado e seguindo recomendações do fabricante.

4.1.5. Sequenciamento de nova geração

As sequências de VH e VL foram amplificadas contendo primers com adaptadores Illumina®. As bandas correspondentes foram excisadas e purificadas utilizando *kit* Qiagen. As bandas foram clonadas em vetor pGEM seguindo recomendações do fabricante e entre 5-10 colônias individuais foram avaliadas por sequenciamento de Sanger antes de prosseguir para a

análise em NGS, visando apenas confirmar a banda amplificada. Após confirmação, as bandas foram quantificadas em Qubit e submetidas ao protocolo de sequenciamento 16S (ILLUMINA, [s.d.]). Inicialmente as amostras foram indexadas utilizando a enzima Kappa HiFi, seguindo as orientações do protocolo 16S, da Illumina®, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Reação de indexação

Reação de indexação				
Item	Volume		Temperatura	Tempo
Produto de PCR	5µL		95C	3min
Primer 1	5µL		95C*	20seg
Primer 2	5µL		55C*	30seg
2x Kappa mix	25µL		72C*	30seg
Água	Qsp 50µL		73C	5min

*quantidade de ciclos

Após indexação, as amostras foram purificadas com *kit* AMPure, seguindo recomendações do fabricante. Algumas amostras foram submetidas a eletroforese para visualizar a indexação e todas foram requantificadas por Qubit.

As amostras indexadas foram diluídas para 40nM em tris 10mM (pH 8,5). Para essa diluição, pegou-se 5µL de cada amostra e o volume equivalente de tris foi adicionado, calculado a partir da diluição da amostra. A quantificação do estoque foi feita utilizando a fórmula:

concentração nanomolar

$$= \text{concentração em ng/}\mu\text{L} \times 1000000 \div 660 \times \text{tamanho médio em pb}$$

Após esta diluição, foram preparados dois pools de amostra um de VH e outro de VL, visando uma concentração final de 4nM para cada pool contendo todas as sequências VH e VL avaliadas. Os dois pools foram unidos em concentrações equimolares e deste pool final, foram coletados 5µL para desnaturação com 5µL de NaOH 0,2M. A solução de desnaturação foi homogeneizada 20x e incubada por 5min em temperatura ambiente. Foram adicionados 990µL do tampão HT1, formando 1mL total de pool a ~20pM. Deste pool a 20pM, foi feita uma diluição com HT1, formando um mix de 600µL a 8pM. De forma semelhante, o controle positivo, phiX, foi desnaturado utilizando-se 2µL de phiX, 3µL de tampão tris 10mM pH 8,5 e 5µL de NaOH 0,2M, seguido de incubação por 5min a temperatura ambiente. Foram

adicionados 990 μ L de HT1 ao phiX e este foi diluído para 8pM seguindo recomendações do fabricante. Para todos os sequenciamentos, foi utilizado uma proporção de 15% de phiX a 8pM como controle interno de acurácia e eficiência do sequenciamento (90 μ L de phiX e 510 μ L da biblioteca VH+VL). A solução final foi incubada por 96C/2min, seguido de incubação 5min em gelo até ser transferida para o cartucho e colocada no equipamento.

4.2. Phage display e seleção de fagos utilizando sistema in vitro

Para seleção de sequências mutadas do scFv do rituximabe, foi utilizada uma biblioteca produzida por epPCR previamente estabelecida pelo grupo. A biblioteca tem tamanho de $1,4 \times 10^5$ UFC, com taxa média de mutação de 0,55% ($\pm 0,24$), com uma média de 4 ($\pm 1,79$) mutações nos 726 pares de base que compõem a sequência scFv. A caracterização parcial da biblioteca foi apresentada em trabalho prévio (BEZERRA, 2019), onde também está descrito o processo de seleção por phage display. Em resumo, os fagos oriundos da biblioteca foram produzidos e selecionados contra um peptídeo biotilado mimético do CD20, obtido comercialmente pela empresa Biomatik conforme informações descritas na tabela 2.

Tabela 2. Informações do peptídeo CD20

Sequência	Biotina-NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ
Peso molecular	3.075,47 Da
Pureza	95,6%
Concentração	1mg/mL em PBS pH 7,4

Os fagos foram incubados com o peptídeo e os vírus não-ligantes foram lavados 3 vezes com PBS suplementado com tween-20 (0,1%) e 4 vezes com PBS, totalizando 7 lavagens, com auxílio de esferas magnéticas com estreptavidina. Os fagos foram reamplificados e submetidos a outras duas etapas de seleção, uma com treze lavagens (10 com PBS-T 0,1% e 3 com PBS) e outra com quinze lavagens (dez com PBS-0,1% e 5 com PBS). Os fagos eluídos foram utilizados para reinfectar bactérias e estas tiveram seu DNA plasmidial purificado por *kit* miniprep. Este DNA foi utilizado para amplificar as porções VH e VL, que foram analisadas por sequenciamento de nova geração.

4.3. Determinação de sequências candidatas por sequenciamento de nova geração

Após cada etapa de seleção, as bactérias infectadas com fagos amplificados da etapa anterior foram coletadas e tiveram seu DNA plasmidial purificado por *kit*. Este DNA corresponde, portanto, aos fagos que foram selecionados naquela etapa. Os fagos precipitados também tiveram seu DNA purificado. Para isso, 100µL de fagos (quantidade não quantificada) foram adicionados de 100µL de fenol, vortexizado e centrifugado 12000g/2min. A solução aquosa superior foi removida delicadamente e transferida para um novo microtubo. O restante da solução com fenol foi adicionado de 40µL de água ultrapura, novamente vortexizada e centrifugada. A solução aquosa na parte superior foi removida e unida ao mesmo tubo anterior. Foi adicionado volume igual de solução clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), vortexizado e centrifugado 12000rpm/2min. Adicionou-se mesmo volume de clorofórmio, vortex e centrifugação 12000rpm/2min. A solução aquosa foi transferida para um tubo novo e novamente foi adicionado solução clorofórmio:clorofil, vortexizado e centrifugado. A solução aquosa foi então precipitada com etanol.

Para precipitação com etanol, adicionou-se 10% de volume de acetato de sódio 3M (pH 5.2-6). Adicionou-se então 2 volumes de etanol absoluto e deixou-se 2h em 4°C. Pode-se adicionar ~5µg de glicogênio como carreador do DNA. Centrifugou-se velocidade máxima 4°C por 15-30min. O sobrenadante foi gentilmente removido e descartado, o tubo foi rapidamente centrifugado para remover o restante de líquido e deixado para secar. Foi adicionado etanol 70% (500µL). A solução foi centrifugada 12000rpm/2min e o sobrenadante removido gentilmente. O pellet foi então ressuscitado em água.

O DNA foi quantificado e utilizado para amplificação com primers que anelam no vetor pHEN2 e que possuem adaptadores Illumina®. As bandas correspondentes foram purificadas por *kit* e inicialmente clonadas em vetor pGEM para confirmação via sequenciamento de Sanger. Após confirmação as sequências foram analisadas por NGS em plataforma Illumina®.

Dado a limitação do sequenciamento na plataforma Illumina®, as sequências VH e VL foram amplificadas separadamente. Cada arquivo em formato fastq foi submetido ao pipeline de análise de enriquecimento de sequências no software ATTLA (AuTomated Tool for Immunoglobulin Analysis) (MARANHÃO et al., 2020). Esta ferramenta auxilia na identificação de sequências variáveis enriquecidas, sugerindo sequências candidatas com maior *fold-change* em comparação com a biblioteca original. Na análise são removidas sequências espúrias, com códons de parada e sem assinaturas próprias de anticorpo, como cisteínas flanqueando CDRs 1 e 3. Ao realizar a contagem de sequências e comparar contra

a biblioteca original, o relatório emitido pelo ATILLA contendo as 10 sequências candidatas mais enriquecidas foi utilizado para selecionar quais candidatos seriam sintetizados e testados.

4.4. Expressão e purificação de fragmentos scFv

As três sequências escolhidas e a sequência nativa do scFv do rituximabe foram expressas em sistema procarioto utilizando a cepa Shuffle T7 Express®, que contém chaperonas citoplasmáticas que auxiliam no dobramento correto de proteínas além da isomerase citoplasmática DsbC, que promove formação de pontes dissulfeto. Foram testadas as seguintes condições de expressão, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Condições de expressão testadas

Condição de expressão	Concentração do indutor (IPTG)	Temperatura	Tempo de expressão	Meio de cultura
1	1	15°C	16h	TB
2	0.5	15°C	16h	LB
3	0.5	15°C	16h	TB
4	0.5	25°C	16h	LB
5	0.5	25°C	16h	TB

A avaliação da expressão de proteína solúvel foi feita correndo-se gel de eletroforese em poliacrilamida 12,5% após etapa de purificação com resina de agarose Ni-NTA (Thermo Fisher®). Foi feita avaliação da purificação em tampão A/B e A'/B'. Após visualizar a melhor condição de expressão e purificação, a expressão foi repetida e purificada em sistema cromatográfico Äkta Pure 25.

As frações coletadas na etapa de eluição foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular, conforme descrito na etapa 3.b.iii visando remover contaminantes e o imidazol oriundo da cromatografia de afinidade. As frações correspondentes aos picos foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e os picos correspondentes a proteína de interesse foram concentrados em filtro de centrífuga Amicon® (10 kDa). Após concentração as proteínas foram quantificadas em Qubit e digeridas com protease ULP-1 para remover a cauda de solubilidade SUMO. A reação de digestão foi submetida a cromatografia de afinidade reversa

a fim de coletar a fração proteica correspondente a proteína digerida. A proteína digerida sem cauda SUMO foi então quantificada e caracterizada quanto às suas propriedades funcionais.

4.5. Avaliação da interação de seqüências scFv a células CD20⁺ por citometria de fluxo

A linhagem celular Raji foi utilizada como célula CD20⁺ e Jurkat foi utilizada como CD20⁻. Os fragmentos purificados conforme descrito na etapa 3.f. foram testados por citometria em quantidades de 0,2ng a 5000ng, a menos que descrito de outra forma. As seguintes etapas foram seguidas para a marcação por citometria:

1. Plaqueamento de $0,5 \times 10^6$ células por poço em placa de fundo redondo
2. Adição de 200µL de tampão FACS (PBS suplementado com 2mM de EDTA e 1% de soro fetal bovino, depletado de magnésio e cálcio)
3. Lavagem por centrifugação a 400g/5min/4C e descarte do sobrenadante
4. Ressuspensão das células em 50µL dos anticorpos comerciais ou fragmentos de anticorpos utilizados nas concentrações adequadas
5. Conforme mencionado, os fragmentos scFvs foram testados em quantidades finais no poço de 0,2ng a 5000ng
6. Foram testados anticorpos anti-CD19, anti-CD20 e anti-CD3 comerciais, conforme recomendações dos fabricantes
7. Incubação por 30min no gelo
8. A análise também foi realizada com e sem bloqueador de receptor Fc (BD Pharmingen® Human Fc Block) visando avaliar possível interação inespecífica entre a porção Fc de anticorpos secundários e o receptor de porção Fc presente em linfócitos B, FcγRIIB. Também foi testado a marcação com marcador de células mortas (eBioscience[™] Fixable Viability Dye eFluor[™] 780, Thermo Fisher®) visando avaliar possível autofluorescência oriundo de células mortas.
9. As incubações adicionais foram realizadas conforme etapas 2 a 5.
10. Repetição das etapas 2 e 3
11. Adição dos anticorpos secundários, quando necessário
12. Para marcação dos fragmentos de anticorpos, foi utilizado anticorpo comercial anti-HA marcado com FITC. Também foi testado anticorpo anti-HA biotilado, com inclusão de etapa extra de incubação por 20min em gelo de estreptavidina marcada com fluoróforo PE. Ambas as marcações tiveram resultados semelhantes, conforme descrito na sessão de resultados.
13. Repetição das etapas 2 e 3

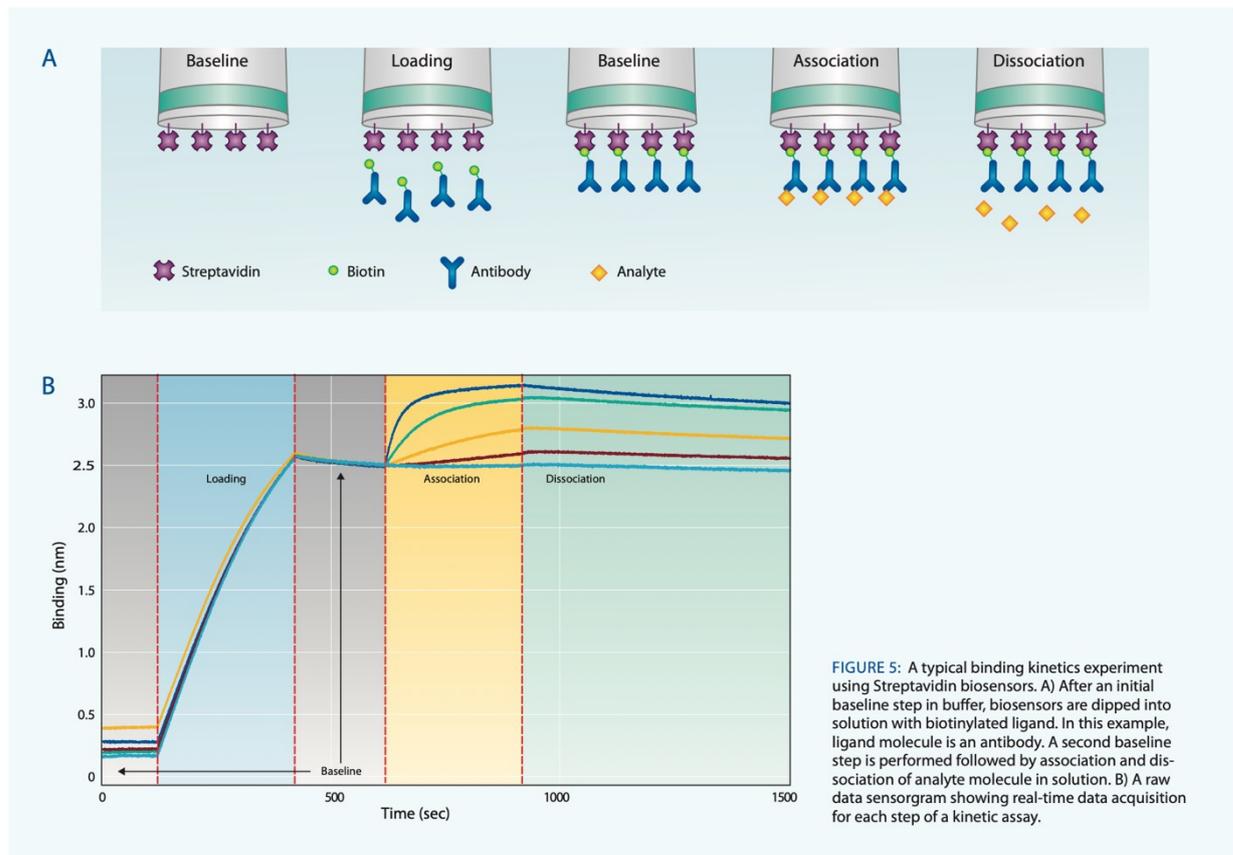
14. Foi realizada uma última centrifugação após a última incubação, totalizando 2 lavagens no total. As células foram ressuspensas em 300 μ L e analisadas em citômetro de fluxo.

Os 10.000 eventos registrados dentro da população selecionada foram analisados em software FlowJo®.

4.6. Análise da cinética de interação por interferometria de biocamada

Uma das metodologias utilizadas para aferição da interação entre duas proteínas é a interferometria de biocamada (do inglês, biolayer interferometry, ou BLI) (TOBIAS, [s.d.]). A técnica se baseia na diferença do comprimento de onda da luz refletida em um sensor. A luz é incidida através de uma fibra ótica, que é refletida ao iluminar uma superfície biocompatível. Na presença de biomoléculas associadas/interagindo na superfície do sensor, parte da energia é absorvida pela molécula e a luz é refletida em um comprimento de onda de menor intensidade. Quanto mais moléculas acopladas na superfície do sensor, maior é a quantidade de luz refletida em comprimento de onda de menor energia. O instrumento mede, portanto, a diferença, em nanômetros (nm), da luz refletida entre o um estado (sensor sem proteína) e outro (sensor com proteína). Ao funcionalizar a superfície do sensor com um ligante, é possível observar a mudança no comprimento de luz refletido (etapa de carregamento). Após estabilização desta etapa de funcionalização, um analito pode ser adicionado ao sistema e, caso este analito interaja com o ligante fixado no sensor, uma nova curva é formada, correspondendo à etapa de associação entre as duas moléculas, até que o equilíbrio seja atingido. Quando o sensor é transferido para uma solução sem o analito, a reação se desloca novamente para o estado inicial visando o equilíbrio, e a curva tende a voltar para o estado inicial sem analito tão rápido quanto a constante de dissociação do complexo seja elevada. Em resumo, são observadas três etapas na curva que é formada durante a análise de cinética de interação entre duas moléculas, conforme pode ser visualizado na figura 12.

Figura 12. Esquematização explicando o funcionamento da técnica de interferometria de biocamada



Fonte:(TOBIAS, [s.d.]). A interação ligante-analito na superfície do sensor gera acúmulo de moléculas que refletem a luz incidida em comprimento de onda diferente. Inicialmente, tem-se uma etapa de carregamento (*loading*), em que o ligante (peptídeo) é funcionalizado na superfície do sensor, e a diferença do comprimento de onda da luz refletida e detectada pelo sensor é proporcional a quantidade de moléculas na superfície. Durante a etapa de associação, moléculas acumulam na superfície do sensor até atingir o equilíbrio. Na dissociação, as moléculas formam uma curva ao retornarem ao estado inicial não-ligado. A: esquematização das etapas de interação durante experimento de interferometria. B: esquematização das etapas e curvas geradas.

Um sensor de estreptavidina é ilustrado na figura 10. Nela pode-se observar que durante a etapa de carregamento o ligante se liga à molécula de estreptavidina na superfície do sensor, fazendo com que a luz refletida pelo sistema (não ilustrado) tenha um comprimento de onda menor, que é utilizado para gerar o gráfico no eixo Y. O sistema é então estabilizado (etapa de *baseline*) e então transferido para uma solução contendo o analito. Conforme a interação ocorre, o analito se acumula na superfície do sensor, gerando, também, uma alteração no comprimento

da luz refletida, até atingir o equilíbrio; esta é a etapa de associação. O sensor é então transferido para uma solução sem analito, permitindo que o sistema se dissocie, esta é a etapa de dissociação. Quanto mais rápido a associação e mais lenta a dissociação, maior é a afinidade.

Foram utilizados para a aferição da afinidade entre as moléculas scFv e o seu epítopo sensores de estreptavidina, além da molécula de anticorpo comercial Mabthera®. Os sensores foram tratados e analisados em placas de 96 poços preenchidos com 200µL de cada solução, conforme descrito a seguir. Todo o ensaio foi executado a 30C sob agitação de 1000 rpm. Inicialmente os biossensores foram hidratados com tampão denominado *Kinetics buffer* (PBS, 0,02% Tween-20, 0,1% BSA, 0,05% azida sódica) por 10min, a fim de remover a camada de sacarose presente na superfície do sensor. Posteriormente, o sensor foi transferido para uma solução contendo o peptídeo a 0,2µg/mL por 180seg, seguido de incubação em solução *kinetics buffer* por mais 180seg. O sensor foi então transferido para uma solução contendo o analito (fragmento scFv ou Mabthera®). Foram testadas concentrações do analito de 4000 a 250nM para scFv e 10.000 a 612,5nM para Mabthera® diluído em *kinetics buffer*. Posteriormente, o sensor foi transferido para uma solução de *kinetics buffer* por 600seg a fim de visualizar sua dissociação. Os dados foram analisados em *software* Octet Analysis Studio 12.2.2 utilizando como curva modelo uma interação de proporção analito:ligante de 1:1.

Para o sensor de proteína A, foram utilizados 0,2µg/mL de anticorpo na superfície do sensor, e 10nM de peptídeo CD20 ou peptídeo CD19 (utilizado como peptídeo não relacionado, para controle de inespecificidade).

4.7. Mutagênese, expressão e purificação de fragmentos em formato FvFc

Visando avaliar o efeito de algumas mutações na interação e em funções efetoras da molécula contendo a porção constante, alguns mutantes scFv foram clonados em vetor contendo os domínios CH2 e CH3, domínios diretamente envolvidos em respostas de ADCC, CDC e ADCP. A construção, denominada de scFv-Fc, ou FvFc, diferente do formato de fragmento scFv, possui bivalência quanto a capacidade de ligação ao alvo. Inicialmente, foi utilizado o vetor cedido pelo grupo de Imunologia Molecular, coordenado pelos pesquisadores Andrea Maranhão e Marcelo Brígido, contendo a sequência nativa do scFv do rituximabe otimizado para expressão em sistema eucariótico (linhagem HEK-293), para inserir as mutações selecionadas por phage display, via mutagênese sítio-dirigida (LIU; NAISMITH, 2008). Dado a limitação da técnica, que permite inserir concomitantemente de forma eficaz um número limitado de mutações, foram inseridas as seguintes mutações, por etapas, conforme mostrado na tabela 4.

Tabela 4. Mutações adicionadas no formato FvFc

Mutante selecionado	Mutante parcial adicionado		
Top1	58/61	78/82	107
Top3	-	-	105
Top7	47	51/55	105

As mutações foram inseridas conforme Liu e colaboradores (LIU; NAISMITH, 2008), utilizando enzima Platinum® SuperFi® II (Invitrogen®) para amplificar o plasmídeo pCO-FvFc, em reação conforme recomendação do fabricante, descrita na tabela 5.

Tabela 5. Condições reacionais para mutagênese sítio-dirigida

Componente	Quantidade
Platinum SuperFi II (2U/ μ L)	1 μ L
5X SuperFi Buffer	10 μ L
10mM dNTP	1 μ L
DNA (20ng)	1 μ L
Água ultrapura	Qsp 50 μ L

Temperatura	Tempo
98C	30seg
98C	10seg
51C	10seg
72C	4min
72C	5min

As etapas em **negrito** foram repetidas em ciclo por 15 vezes.

Após confirmação da amplificação por gel eletroforético de agarose 1%, o restante da reação (45 μ L) foi purificado e tratado com enzima *DpnI* (New England Biolabs®) para degradar molde de reação (não mutado). A reação foi feita conforme recomendação do fabricante (tabela 6), utilizando 500ng de DNA purificado.

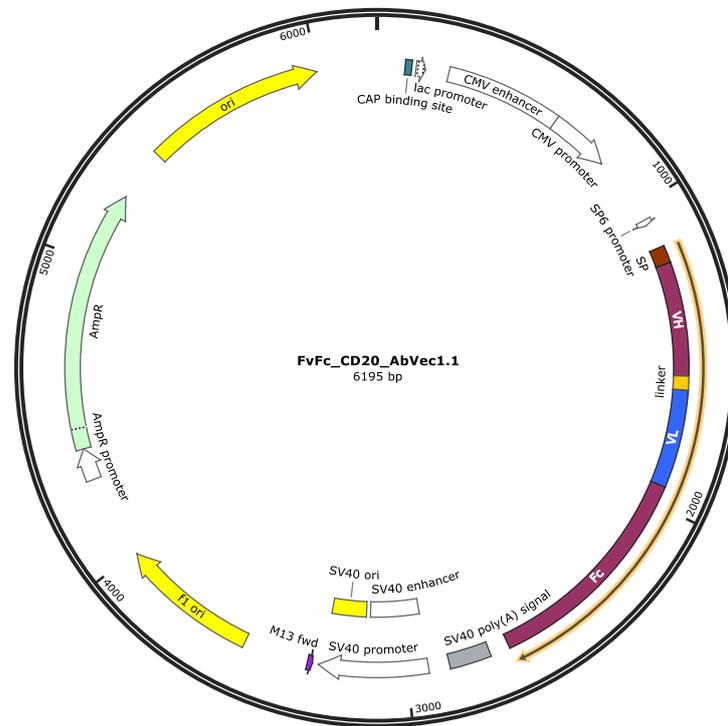
Tabela 6. Reação de digestão com enzima *DpnI*

Componente	Quantidade
10X CutSmart Buffer	1 μ L
<i>DpnI</i> (10U/ μ L)	0,5 μ L
DNA (500ng)	6 μ L
Água	Qsp 10 μ L

A reação foi incubada por 1h/37C e então transformada em bactérias TOP10 conforme descrito anteriormente. Colônias individuais tiveram DNA plasmidial purificado por *kit* miniprep e sequenciados utilizando primers comerciais CMV-F.

Após confirmação da inserção das mutações por sequenciamento de Sanger, as sequências foram amplificadas com primers para inserir sítios *AgeI* e *HindIII*, sítios utilizados para clonar no vetor de expressão AbVec1.1 (Figura 13).

Figura 13. Mapa do vetor de expressão utilizado para FvFc



Fonte: Addgene. A sequência FvFc foi clonada entre os sítios *AgeI* e *HindIII*.

As sequências dos primers para mutagênese sítio-dirigida não serão disponibilizadas a fim de preservar as mutações encontradas. A sequência dos primers para inserção dos sítios de *AgeI* e *HindIII* para subclonagem no vetor AbVec1.1 estão descritos abaixo.

Fw_ *AgeI*: CTGCA **ACCGGTGTACTCG** CAGGTGCAGCTGCAG
 Rv_ *HindIII*: GCG **AAGCTT** TCATTACCCGGAGACAGG

Em vermelho: sítio de restrição para *AgeI*

Em amarelo: sítio de restrição para *HindIII*

O vetor e o produto de PCR contendo os clones foram digeridos com as enzimas *AgeI* e *HindIII*, ambas da empresa New England Biolabs®, conforme recomendações do fabricante, descrito abaixo (tabela 7).

Tabela 7. Condição reacional para digestão enzimática para clonagem em vetor AbVec1.1

Componente	Quantidade
10x CutSmart Buffer	5µL
<i>AgeI</i> (20U/µL)	3µL
<i>HindIII</i> (20U/µL)	3µL
Vetor AbVec1.1 ou inserto (PCR)	3µg
Água ultrapura	Qsp 50µL

A digestão foi incubada por 30min a 37C.

A reação de digestão do vetor foi adicionada de 3µL de enzima *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (ThermoFisher®), 6µL de tampão 10X FastAP e 1µL de água ultrapura. Esta reação foi incubada por 37C/1h. Posteriormente, o vetor e o produto de PCR digeridos foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes ao vetor digerido (linear) e o produto de PCR foram purificados com *kit* de purificação *QIAquick Gel Extractin Kit* (QIAGEN®). Após quantificação, reações de ligação contendo o vetor AbVec1.1 digerido e os produtos de PCR correspondentes ao fragmento FvFc mutantes foram montadas conforme recomendação do fabricante (New England Biolabs®), descrito na tabela 8.

Tabela 8. Condição reacional para ligação em vetor AbVec1.1

Componente	Quantidade
10X Ligase Buffer	2µL
T4 DNA Ligase (400U/µL)	1µL
Vetor AbVec 1.1 digerido	150ng
Inserto (PCR)*	3µg
Água ultrapura	Qsp 50µL

A quantidade de inserto foi determinada pela fórmula abaixo. Foi utilizada uma proporção molar inserto:vetor de 5:1:

$$\text{ng inserto} = \text{ng vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \\ \div \text{tamanho do vetor (kb)} \times \text{proporção inserto:vetor}$$

A reação foi incubada overnight a 4°C em geladeira, seguida de inativação a 65C/10min. A ligação foi então transformada (10µL) em células quimiocompetentes, conforme descrito na

sessão 3.a. O DNA bacteriano de colônias crescidas foi purificado por *kit* miniprep e sequenciado por sequenciamento de Sanger na plataforma KI Gene do Instituto Karolinska, utilizando primers CMV-F e SV40pA-R.

Após confirmação da inserção da mutação, os plasmídeos foram reamplificados e purificados com *kit* Midiprep QIAGEN® conforme recomendação do fabricante. Os plasmídeos foram então transfectados (1µg de plasmídeo/mL de cultura) utilizando plataforma de expressão Expi293 da ThermoFisher, seguindo recomendações do fabricante. Resumidamente, o DNA foi diluído em meio Opti-MEM e, em seguida, adicionado do reagente ExpiFectamine293 diluído em meio Opti-Plex. O complexo foi incubado por 15min em temperatura ambiente e adicionado por gotejamento nas células. Foram utilizados 60mL de cultura com células em uma densidade de 3×10^6 /mL, conforme recomendado pelo fabricante, em frascos estéreis com tampa ventilada do tipo Erlenmeyer com volume de 250mL. Após 18h de transfecção, as células foram adicionadas de reagentes *Enhancer 1* e *Enhancer 2*, conforme recomendação do fabricante. As culturas foram então mantidas sob cultivo por 7 dias, onde tiveram seu sobrenadante clarificado por centrifugação 4000g/30min/4C e filtração (0,45µm). O sobrenadante então foi purificado em sistema Akta Pure25, com coluna de proteína A (HiTrap Protein A, 1mL, Cytiva).

Para acompanhamento da expressão, dot blotting foi feito utilizando 5µL do sobrenadante da cultura de Expi293 em membrana de nitrocelulose. Após o líquido secar, a membrana foi bloqueada com leite 6% em PBS-Tween 0,05% por 1h, sob agitação em temperatura ambiente. Após bloqueio, o anticorpo de detecção anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina foi adicionado (dilução 1:5000 em leite 3% em PBS-T 0,05%) e incubado por mais 1h em temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T 0,05% e mais uma vez com PBS apenas. Cada lavagem foi feita adicionando a solução e agitando a membrana em agitador do tipo gangorra, por 5 minutos. Após remoção do PBS na última lavagem, o substrato OneStep Promega foi adicionado na superfície da membrana para revelação de amostras reagentes.

A purificação se deu após aplicação do sobrenadante em coluna de proteína A, seguido de lavagem com PBS (15 VC) e eluição com 10 VC de frações de 1mL contendo tampão glicina 0,1µM pH 2,2. As frações foram coletadas em microtubos contendo 400µL de tampão tris pH 9,1. A avaliação da expressão durante o protocolo de cultura e pós-purificação foi feita por corrida eletroforética e por imunorreacção em membrana de nitrocelulose (imunoblotting e western blotting).

4.8. Avaliação do potencial apoptótico de fragmentos FvFc por citometria

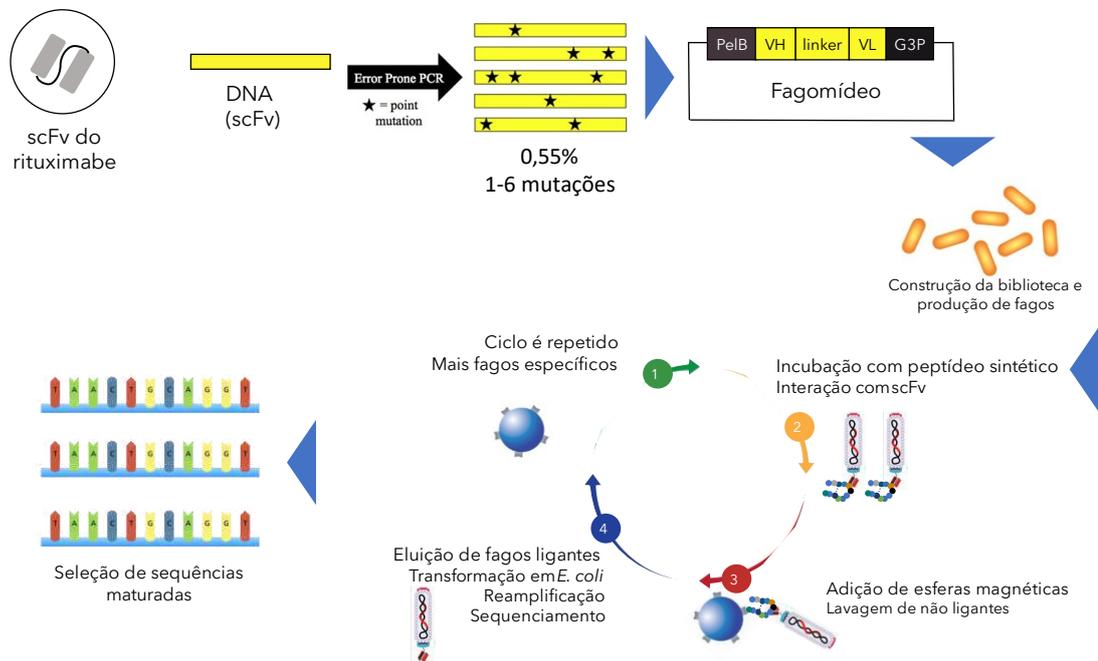
A fim de avaliar o efeito das mutações no potencial de indução a apoptose, as moléculas expressas em plataforma eucariótica foram incubadas com células Raji e Jurkat por 24h, utilizando a formulação comercial da molécula de rituximabe (MabThera®) como controle positivo, em concentrações de 7.5µg/mL para as moléculas FvFc e 10µg/mL para MabThera®. Para o ensaio, foram adicionados 100µL de células a 4×10^6 /mL, 50µL de cada anticorpo ou PBS (para condição não tratada), e 50µL de meio de cRPMI, em placa de 96 poços com fundo redondo. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas 1x com PBS, foram adicionados 60µL de 7-AAD a 525ng/mL (Miltenyi Biotec), conforme recomendação do fabricante. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente (abrigo de luz), as células foram adicionadas de 140µL de PBS e lidas em citômetro de fluxo (FACSCelesta™). Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade, seguido de teste ANOVA e Bonferroni (para comparação do potencial de indução de apoptose entre moléculas) ou teste T não-pareado (para comparação entre morte celular entre células Raji e Jurkat).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação das porções VH e VL para análise por sequenciamento de nova geração

O protocolo de seleção realizado na biblioteca construída por epPCR a partir do scFv do rituximabe foi previamente publicado em trabalho de dissertação (BEZERRA, 2019), e a esquematização que resume o processo é mostrado abaixo (figura 14).

Figura 14. Fluxograma do experimento de phage display da biblioteca de variantes do scFv do Rituximabe produzida por epPCR



Fonte: elaborado pelo autor. As sequências aleatoriamente mutadas foram clonadas em fagomídeo para expressão na superfície de fagos produzidos por bactérias. Os fagos-scFv foram submetidos a seleção contra peptídeo biotilado imobilizado em esferas magnéticas de estreptavidina. Após lavagem, os fagos foram reamplificados e submetidos a seleção por três rodadas. Ao final, as sequências dos fagos ligantes eluídos foram avaliadas por sequenciamento de nova geração.

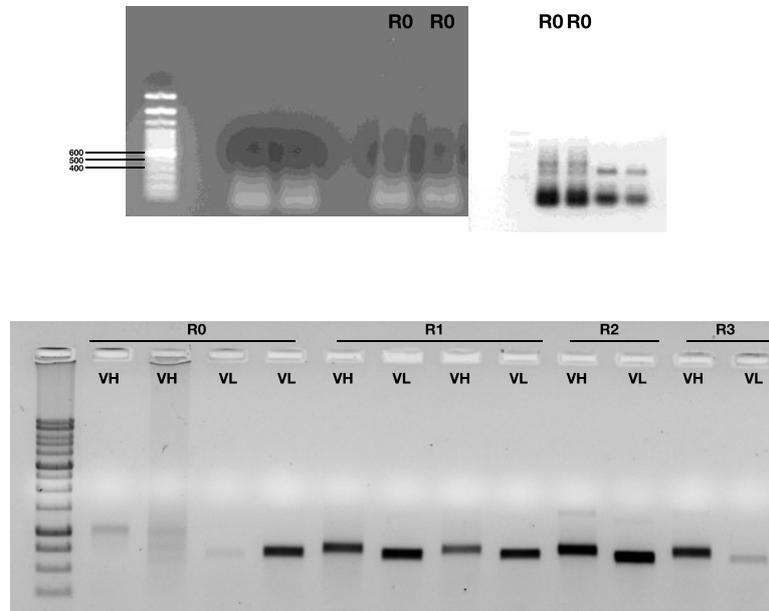
Como mencionado na metodologia na seção 4.b., mutações aleatórias foram adicionadas na sequência nativa do scFv do rituximabe, construindo-se uma biblioteca sintética de aproximadamente $1,4 \times 10^5$ UFC. Essa biblioteca foi submetida a seleção, por *phage display*, de sequências candidatas que resistiram ao processo de lavagem contra um peptídeo mimético do CD20, contendo o principal epítipo do anticorpo monoclonal rituximabe. Ainda que se possa avaliar por sequenciamento de Sanger quais sequências foram enriquecidas durante o processo de lavagem e seleção, técnicas como sequenciamento de nova geração são mais robustas quanto a profundidade de sequências analisadas (YANG et al., 2017). Enquanto técnicas padrões avaliam clones individuais ou um conjunto de clones funcionais por *phage ELISA*, a avaliação por NGS leva em consideração o padrão de enriquecimento das sequências selecionadas. Cada uma das abordagens possui vantagens e desvantagens. Na técnica de *phage ELISA* é possível obter diretamente os clones funcionais, quando são detectados, por sequenciamento direto da

colônia. Porém, muitas vezes, há clones funcionais que não estão presentes em frequência suficiente para serem detectados por ensaios funcionais. Nas análises baseadas em NGS, esses clones em baixa frequência são identificados: comparados a biblioteca original, eles podem ter altíssimo nível de seleção, com aumento expressivo da sua frequência nas últimas etapas de seleção; porém, dado sua frequência ser comparativamente menor do que outros clones, não são facilmente detectados, ainda que sejam funcionais. Assim, o uso de técnicas de alta profundidade, como as baseadas em sequenciamento de nova geração, é útil na identificação dessas sequências raras que, apesar de comparativamente enriquecidas, estão em baixa frequência.

Visando o *screening* de sequências enriquecidas na expectativa de encontrar ligantes funcionais, as sequências correspondentes às porções VH e VL contendo adaptadores Illumina® foram amplificadas e purificadas conforme ilustrado na figura 15, a partir das de DNA oriundas da seleção por phage display.

Figura 15. Imagens dos géis de eletroforese de DNA após amplificação de fragmentos VH e VL.

epPCR



Fonte: elaborado pelo autor. As sequências VH e VL foram amplificadas e purificadas antes de serem avaliadas por NGS. Mesmo sequências com pouca amplificação foram analisadas.

Alguns testes para amplificação da porção VH da biblioteca original (R0) foram executados, gerando bandas inespecíficas ou pouca amplificação. Porém, dado a alta sensibilidade da técnica de sequenciamento pela plataforma Illumina®, decidiu-se prosseguir com o sequenciamento mesmo com uma baixa intensidade da banda. Visando obter uma quantidade de partida suficiente para análise em NGS de pelo menos 25ng de DNA em um volume máximo de 15 μ L (visando adaptar ao protocolo utilizado), as reações foram repetidas para um volume de 50 μ L e concentradas por evaporação para aproximadamente 10 μ L. As amostras purificadas foram quantificadas por *kit* Qubit (1 μ L), conforme mostrado na tabela abaixo (tabela 9).

Tabela 9. Concentrações das amostras de DNA após-purificação

Nome da amostra	Concentração (ng/ μ L)	Código da amostra
R0 VH	0,74	1
R0 VL	3,99	2
R1 VH	2,01	3
R1 VL	6,1	4
R2 VH	6,72	5
R2 VL	9,07	6
R3 VH	4,22	7
R3 VL	0,705	8

Ainda que nem todas as amostras obtiveram uma quantidade ideal de DNA, todas as amostras foram indexadas conforme recomendação do fabricante no manual de sequenciamento metagenômico 16S (ILLUMINA, [s.d.]). A tabela de indexação (tabela 10) contendo a combinação de indexes pode ser vista abaixo.

Tabela 10. Combinações de indexes utilizadas no NGS

INDEX		729	718	719
INDEX		1	2	3
502	A	FC-1	FC-9	FC-17
503	B	FC-2	FC-10	FC-18
505	C	FC-3	FC-11	FC-19
506	D	FC-4	FC-12	FC-20
507	E	FC-5	FC-13	FC-21
508	F	FC-6	FC-14	FC-22
510	G	FC-7	FC-15	
511	H	FC-8	FC-16	

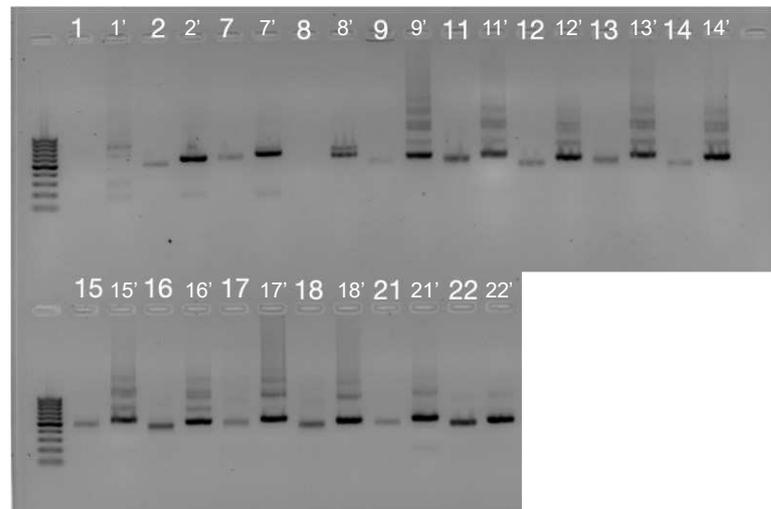
A tabela 11 lista as amostras que foram analisadas por NGS, tanto para seleção anti-CD19 quanto para anti-CD20.

Tabela 11. Código de amostras sequenciadas por NGS

Tipo de phage	Identificação da amostra	Código da amostra (FC-)
epPCR	R0 VH	1
	R0 VL	2
	R1 VH	3
	R1 VL	4
	R2 VH	5
	R2 VL	6
	R3 VH	7
	R3 VL	8
BRASIL	R0 VH	9
	R0 VL	10
	R1 VH	11
	R1 VL	12
	R2 VH	13
	R2 VL	14
	R3 VH	15
	R3 VL	16
Peptídeo CD19	R0 VH	17
	R0 VL	18
	R1 VH	19
	R1 VL	20
	R3 VH	21
	R3 VL	22

A indexação visa a posterior identificação das sequências por detecção, via bioinformática, de sequências nucleotídicas específicas para cada amostra. Uma vez identificando a combinação de indexes para cada amostra, pode-se atribuir a origem de cada sequência. Após a etapa de indexação, algumas sequências foram analisadas por eletroforese, incluindo aquelas que estavam em baixa concentração na etapa inicial, conforme figura 16 a seguir.

Figura 16. Gel de eletroforese após etapa de indexação



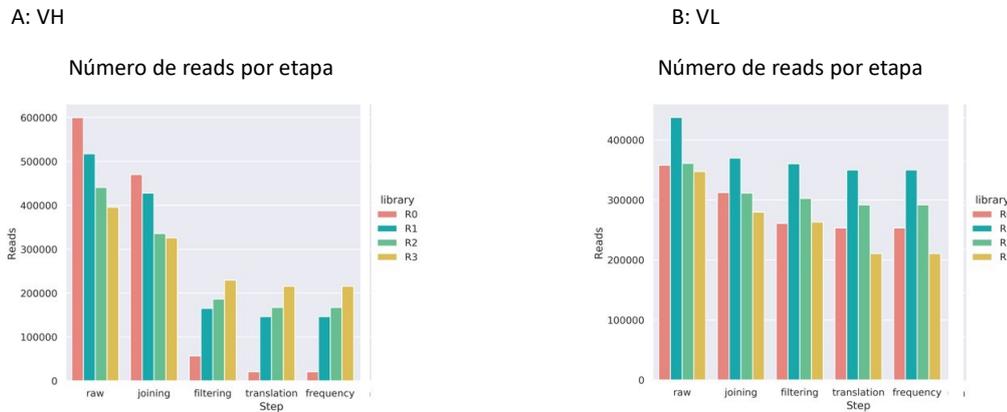
Fonte: elaborado pelo autor. Algumas sequências foram analisadas, por amostragem, em gel de agarose para confirmar a adição dos indexes (amostras 1, 2, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 e 22). Como pode ser observado, após a etapa de indexação, as sequências ficam maiores, correspondente à sequência de nucleotídeos que compõem os indexes de identificação (amostras 1', 2', 7', 8', 9', 11', 12', 13', 14', 15', 16', 17', 18', 21' e 22').

Após iniciar a leitura no equipamento MiSeq®, foi identificada uma densidade de clusterização de 624K/mm², bem abaixo do limite de 1500 recomendado pelo fabricante, indicando que a concentração final de 8pM foi abaixo do que poderia ter sido utilizado, ainda que a densidade de clusterização obtida tenha sido viável para as análises posteriores. Uma superclusterização do *kit* poderia inviabilizar completamente a análise, impossibilitando a identificação individual de cada amostra sequenciada. Portanto, apesar de indicar que o *kit* não foi utilizado completamente (até 25 milhões de *reads*), esta etapa foi considerada satisfatória no que diz respeito ao preparo da amostra e qualidade do sequenciamento.

5.2. Avaliação de sequências enriquecidas por pipeline de bioinformática ATTILA

Os arquivos em formato *fastq* gerados pelo sequenciamento foram submetidos a plataforma de análise de enriquecimento de imunoglobulinas, ATTILA (MARANHÃO et al., 2020). Uma análise da qualidade das sequências e quantas foram filtradas pela pipeline pode ser observada na figura 17.

Figura 17. Avaliação do número de sequências após cada etapa de filtragem do ATTILA.



Fonte: elaborado pelo autor. As sequências tiveram quase todas acima de 150mil reads após as etapas de filtragem do ATTILA, exceto amostra de VH da biblioteca (R0), com cerca de 20mil reads. A partir dos dados brutos de sequenciamento (*raw*), as sequências são unidas (fita forward e fita reverse, gerando os arquivos *joining*), filtradas com relação a parâmetros de qualidade definidos pelo ATTILA (*filtering*), traduzidas (*translation*) e então contadas (*frequency*). Após a etapa de contagem, cada sequência tem seu enriquecimento determinado pela razão entre a frequência na etapa final e na etapa inicial (biblioteca).

Pode-se observar pelo gráfico acima (fig 16A) que a maior parte das sequências de VH das amostras da biblioteca (R0) não tinha qualidade suficiente, sendo descartas na etapa de filtragem (*filtering*). Dado que a maior perda no número de *reads* viáveis foi entre a etapa de *joining* e *filtering*, pode-se atribuir este problema ao fato de que a amostra de VH do R0 (barra vermelha) não estava em concentração e qualidade tão adequadas para a análise, impossibilitando um sequenciamento mais acurado desta amostra. Tal problema não foi visto para a biblioteca de VL (fig.16B). Os dados das bibliotecas nos *rounds* subsequentes possuíram um número de *reads* satisfatório, todos acima de 150.000. Como sugerido na literatura (MARANHÃO et al., 2020), um número mínimo de 40.000 *reads* é desejável a fim de obter uma boa análise de enriquecimento de clones funcionais. Além disso, o ATTILA faz uma análise comparativa de frequência entre dois *rounds*, gerando um valor de *fold-change*. Caso determinada sequência esteja enriquecida na última etapa de seleção e não esteja presente na biblioteca original devido à baixa qualidade do sequenciamento, é atribuído um valor de 1 na sua frequência. Dado essas considerações, a lista de sequências candidatas para as sequências de VH está abaixo:

Enriquecimento	Mutação
1947.0514 (Top1)	T58; N61; T78; Q82; Y107
885.8158	P7; M20; S76
860.3200 (Top3)	D105
550.5205	H35
393.3327	S88
326.8693	K13; I51; Y60
321.8573 (Top7)	W47; I51; N55; D105

As sequências foram omitidas para não informar a mutação

Para comparação, abaixo segue a sequência em formato scFv do rituximabe. Para fins de identificação de resíduos, a numeração inicia do 1 ao 121 para cadeia pesada e 1 ao 107 para a cadeia leve, descontando a numeração no linker.

>scFv_rituximab

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQ
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGG
GSGGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYAT
SNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK

A construção expressa com a cauda SUMO na porção N terminal e a cauda de HA possui a seguinte sequência.

>scFv_SUMO_rituximab

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKI
 KKTTPLRRLMEAFKRQKEMDSLRFlyDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIEAHREQIGGSQV
 QLQQPGAELVKPGASVKMCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF
 KGKATLTADKSSSTAYMQLSSTLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAGGGGS
 GGGSGGGGSQIVLSQSPAILSPGEEKVTMTCRASSSVSYIHWYFQKPGSSPKPWIYATSN
 LASGVPVRFSGSGGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK**YPYDVPDY**
AS

Em **amarelo**: cauda SUMO removida após digestão com ULP-1

Em **vermelho**: cauda HA.

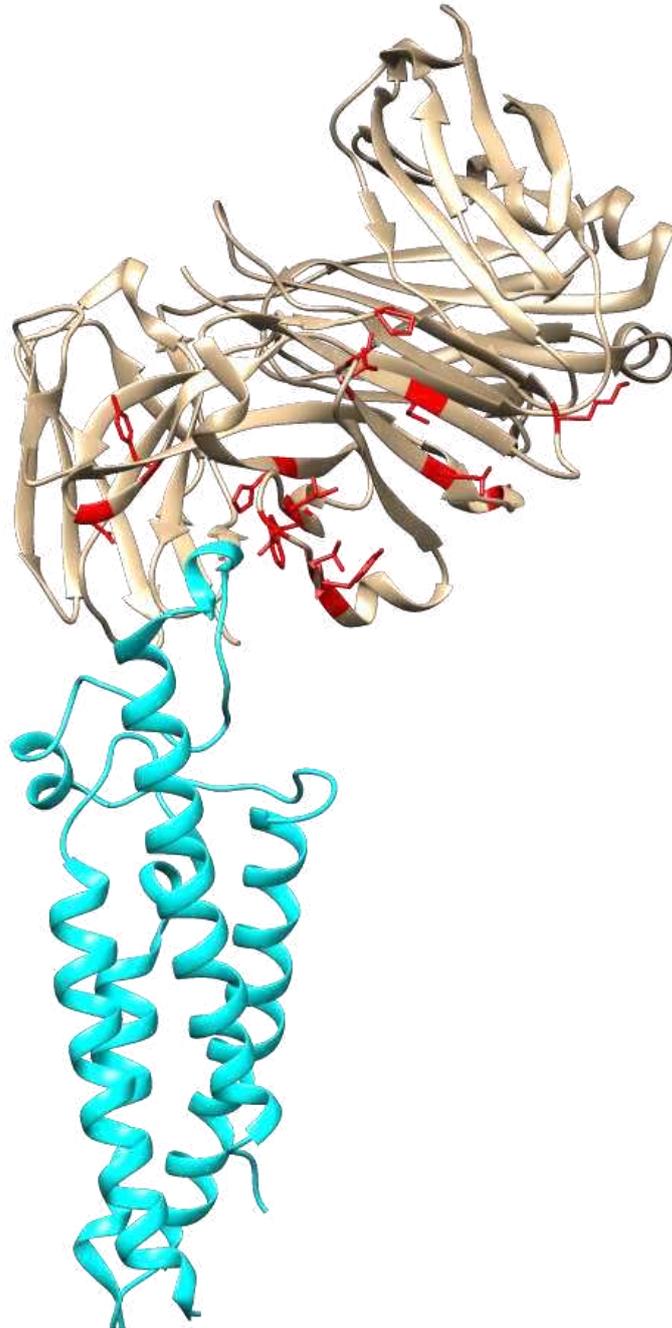
As sequências VL foram enriquecidas no máximo 18 vezes (candidato mais enriquecido). Portanto, decidiu-se por utilizar a sequência nativa da porção VL nas sequências candidatas testadas, combinando com três diferentes mutantes de VH, gerando três pares VH/VL no formato scFv. Dado que alguns trabalhos na literatura sugerem que a maioria dos aminoácidos que participam da interface de interação com o receptor CD20 estão na porção VH (DU et al., 2007; ROUGÉ et al., 2020) e que outros trabalhos conseguiram aumentar a afinidade de fragmentos do rituximabe gerando mutantes apenas na porção VH (LI et al., 2009), decidiu-se por testar apenas mutações nesta região VH. Foram selecionadas as sequências Top1, Top3 e Top7. A sequência Top3 e Top7 foram selecionadas para este *screening* inicial por apresentarem uma mutação na posição 105 que já tinha sido previamente predita por trabalho de desenho racional e simulação computacional entre o scFv nativo do rituximabe e o peptídeo mimético. Como esta mesma mutação foi selecionada por phage display, decidiu-se testar as sequências que continham tal mutação, além da sequência VH mais enriquecida, totalizando três mutantes do scfv nativo do rituximabe.

Como descrito por Rougé e colaboradores, os principais resíduos envolvidos na interação do fragmento no formato Fab com o receptor CD20 são HC.Ser58, HC.His35, HC.Asn33, HC.Tyr97 HC.Tyr52, HC.Trp100b, além de resíduos que interagem com epítopos diferentes do canônico ANPS, como LC.Ser28, LC.Ser29 e LC.Ser31. Por serem resíduos que aumentam a superfície de contato em quase 50%, tem-se que a porção VL também provavelmente contribui substantivamente com a afinidade ao alvo CD20. Além de interação Fab:CD20, há também interações relevantes de estabilização do complexo entre cadeias Fab, como o resíduo HC.Ser31 que interage com HC.Gly99, enquanto LC.Tyr49 interage com

HC.Tyr98, mostrando que, para a estabilização do complexo, há interações não só entre rituximabe e CD20, mas também entre cadeias do próprio rituximabe. Considerando que esses três pontos de interação do rituximabe (epítipo primário ANPSE, epítipo secundário consistindo regiões das duas alças extracelulares e interface homotípica entre dois Fab do rituximabe) são relevantes para a interação do fragmento no formato Fab com o receptor CD20 completo, isso poderia explicar o porquê de medidas de afinidade utilizando o peptídeo contendo apenas a região ANPSE são menores do que medições utilizando CD20 completo ou células CD20+. Nenhuma das mutações encontradas após as etapas de seleção consistiam em alterações nesses resíduos considerados críticos.

Baseando-se na estrutura depositada de crioeletromicroscopia do fragmento Fab e o receptor CD20 (PDB 6vja), as posições A170, P172 e K175, que correspondem ao epítipo principal e presente no mimótopo utilizado na seleção, estão em região de proximidade ($<5 \text{ \AA}$) com algumas das posições mutadas no scFv, conforme pode ser visualizado na figura 18.

Figura 18. Porção Fab do rituximabe e CD20



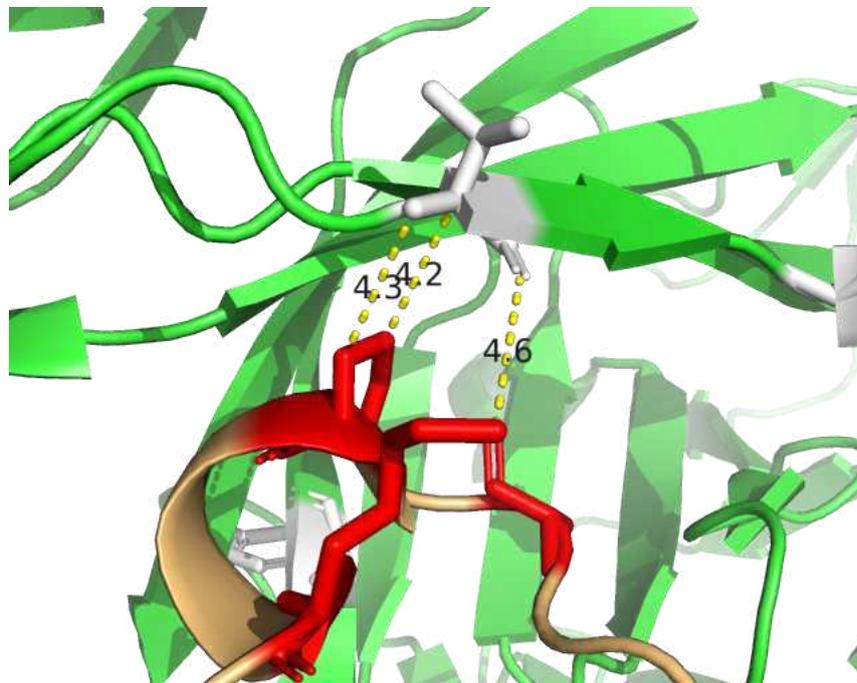
Fonte: Adaptado de (ROUGÉ et al., 2020). Em marrom claro, fragmento Fab do rituximabe (com posições mutadas em vermelho). Em ciano, CD20. Algumas das posições mutadas no scFv estão em região correspondentes no Fab com proximidade ao CD20.

O mutante Top1 tem posições com proximidade com resíduos P e K, além de estar na interface de interação com a cadeia leve, principalmente com resíduos H33, P45, Y48, 90W, P94, além de dois resíduos (58 e 61) com proximidade ao CD20 (fig 19).

A posição do Top3 não tem proximidade com nenhum resíduo da alça maior do CD20 ou do mimótopo sintetizado. Algumas posições do Top7 possuem proximidade com resíduos A170 e P172 do CD20.

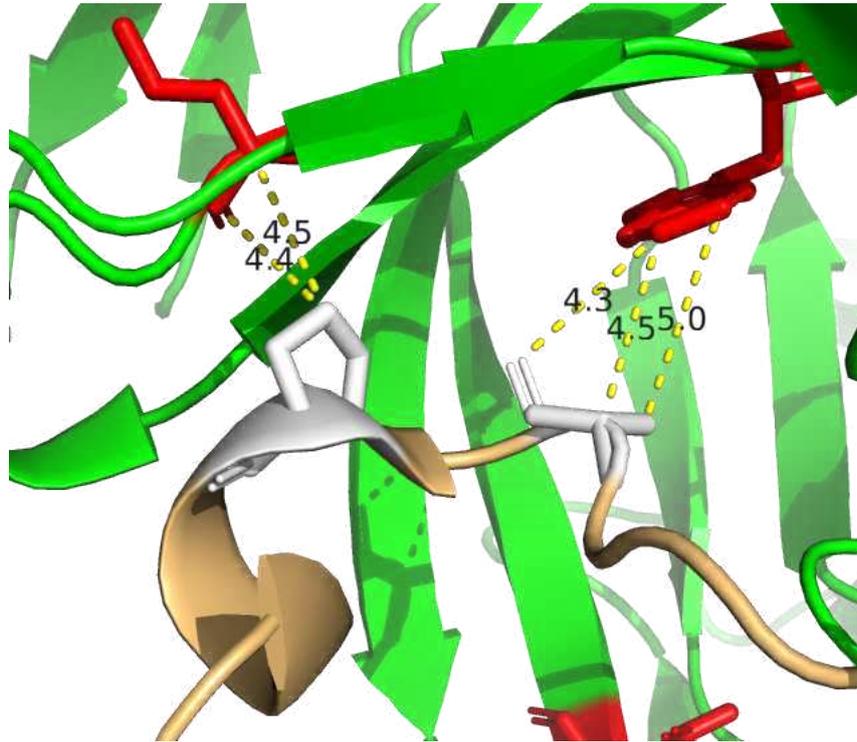
As posições afetadas dos três mutantes estão destacadas nas figuras 19 e 20.

Figura 19. Regiões de interação da sequência Top1 com região ANPSEK do CD20



Fonte: adaptado de (ROUGÉ et al., 2020). Em branco, posições dos aminoácidos mutados. Está sendo mostrado o resíduo da sequência original, oriunda da estrutura 6vja. Em vermelho, região do CD20 com proximidade (abaixo de 5Å) ao rituximabe. Em laranja, receptor CD20.

Figura 20. Regiões de interação da sequência Top7 com região ANPSEK do CD20



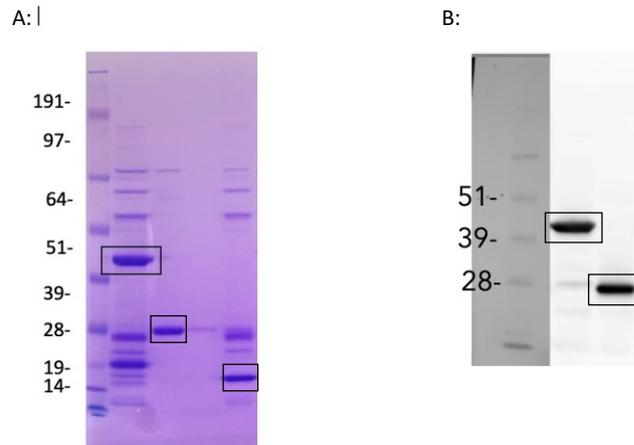
Fonte: adaptado de (ROUGÉ et al., 2020). Em vermelho, posições dos aminoácidos mutados. Está sendo mostrado o resíduo da sequência original, oriunda da estrutura 6vja. Em branco, aminoácidos correspondentes ao receptor do CD20. Em laranja, receptor CD20.

O mutante TOP1 possui uma mutação em região de CDR (posição Y107), em área de interface com VL (distância menor que 5Å). Esta mutação foi avaliada individualmente a fim de entender o efeito de alterações nesta porção do scFv. Para isso, o scFv foi expresso no formato FvFc em sistema eucarioto (Expi293) e sua capacidade de ligação bem como o efeito desta alteração nas funções efetoras da molécula foram avaliadas por citometria de fluxo.

5.3. Expressão e purificação de sequências candidatas

A sequência nativa do rituximabe foi expressa com sucesso de forma solúvel no formato scFv em sistema bacteriano. A imagem abaixo (figura 21) mostra o resultado da estratégia de purificação após remoção da tag SUMO da sequência nativa. Utilizando anticorpo anti-HA biotilado e estreptavidina conjugada com HRP, foi feito western blotting para confirmar a presença do scFv e possíveis inespecificidades de sequências contaminantes.

Figura 21. Análise da expressão e purificação da sequência scFv do rituximabe

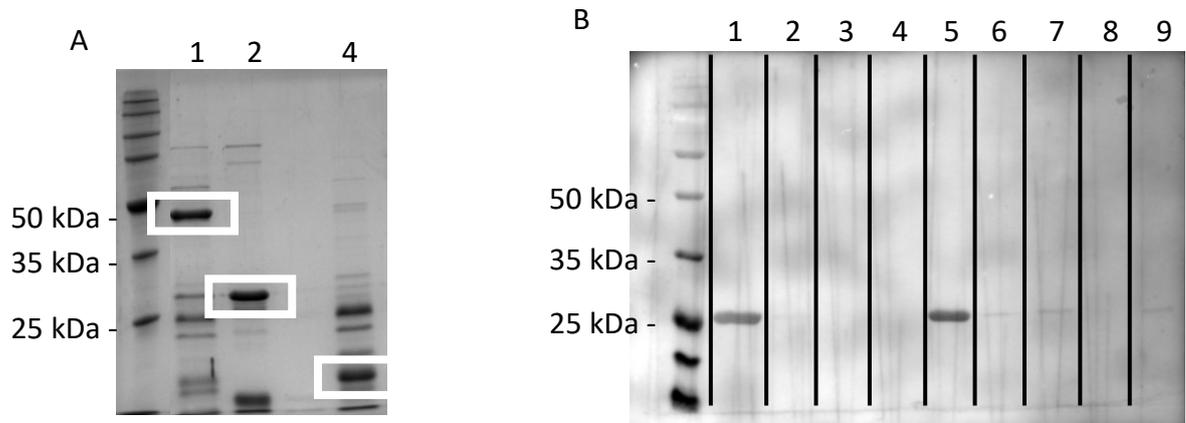


Fonte: elaborado pelo autor. A: gel de SDS-PAGE mostrando marcador molecular, scFv-SUMO em destaque, scFv digerido em destaque (primeira fração coletada), scFv digerido (segunda fração coletada) e a cauda SUMO em destaquena fração eluída. B: membrana PVDF contendo scFv antes (em destaque) e após (em destaque) remoção da cauda SUMO.

A purificação foi realizada com cromatografia de afinidade, gerando cerca de 2mL de proteína a 140 μ g/mL após expressão em 200mL de meio, com um rendimento aproximado de 1,4mg/L de cultura. O rendimento obtido testando tampões diferentes (fosfato de sódio ao invés de tris) foi similar. As quantidades obtidas foram suficientes para a realização dos primeiros testes de caracterização funcional propostos neste trabalho (citometria de fluxo e avaliação da cinética por interferometria de biocamada), o que fez com que não se buscasse otimizar ainda mais o protocolo de expressão e purificação para a sequência nativa.

O mutante Top3 também foi expresso de forma satisfatória. Apesar de conter uma banda contaminante na altura da cauda SUMO após a reação de digestão, esta banda contaminante não foi marcada no ensaio de western blotting com anticorpo anti-HA. Os mutantes Top1 e Top7 não foram satisfatoriamente expressos em quantidades viáveis para os testes funcionais. Um resumo das purificações e marcações por western blotting pode ser visto na figura 22.

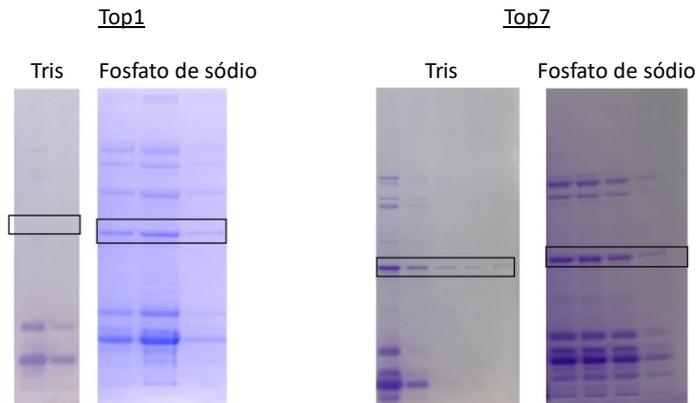
Figura 22. Análise de expressão e purificação de mutantes scFv



Fonte: elaborado pelo autor. Parte superior: géis de SDS mostrando resultado após cromatografia e digestão com ULP-1. A: purificação da proteína Top3. 1: reação de digestão antes da purificação, 2: fração coletada da cromatografia reversa, 4: eluição da cauda SUMO digerida e enzima ULP-1. B: Western blotting: raia 1 (NatHA), 2-4 (Top1), 5 (Top3), 6-9 (Top7). As alíquotas mostradas nas raias 1, 2, 5 e 9 foram avaliadas por citometria. Frações 2 (Top1) e 9 (Top7) não foram quantificadas e não apresentaram perfil de ligação em células Raji. O tamanho esperado para todas as proteínas com SUMO é de 42 kDa e sem SUMO, 26,6 kDa

Alguns testes de otimização da expressão e purificação foram feitos, conforme descrito na metodologia, utilizando resina de níquel em cromatografia de afinidade em bancada. Abaixo segue imagem (figura 23) contendo a pior e melhor condição de expressão para os mutantes Top1 e Top7.

Figura 23. Análise de expressão e purificação de mutantes scFv



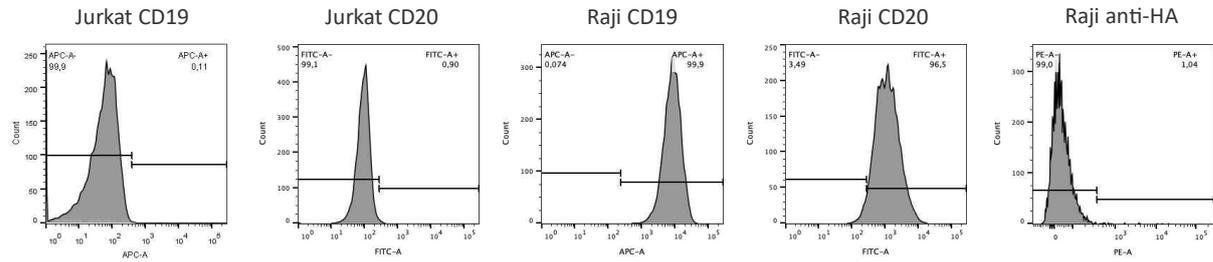
Fonte: elaborado pelo autor. As condições de expressão foram testadas e aquelas com maior quantidade de proteína solúvel pós-purificação com par de tampão tris (com e sem imidazol) foram também testadas com tampão fosfato de sódio.

Apesar de conter banda de tamanho esperado após a primeira etapa de purificação, após retirada de imidazol e digestão para remoção da cauda SUMO, a quantidade e pureza dos anticorpos foi considerada insuficiente para prosseguir com os testes de caracterização. Como perspectiva para este trabalho, mais etapas de padronização da expressão e expressão em escala de volume maior, visando obter quantidades viáveis de proteína pura, serão realizadas. Não está no escopo deste trabalho avaliar o efeito da composição do tampão de purificação na qualidade, conformação e atividade das proteínas purificadas. Porém, além dos ensaios funcionais serem realizados com amostras na mesma composição de tampão, as diluições subsequentes tornam a concentração dos componentes do tampão irrisória.

5.4. Caracterização funcional por citometria de fluxo

Os fragmentos do scFv nativo do rituximabe (NatHA) e o mutante Top3 foram caracterizados quanto a sua capacidade de ligação em células CD20+ (Raji), conforme descrito na metodologia. Inicialmente foi feita testagem apenas do fragmento NatHA, junto com uma caracterização inicial das linhagens utilizadas. A caracterização fenotípica das células Raji e Jurkat (CD19- e 20-) feita com anticorpos comerciais está demonstrada na figura 24.

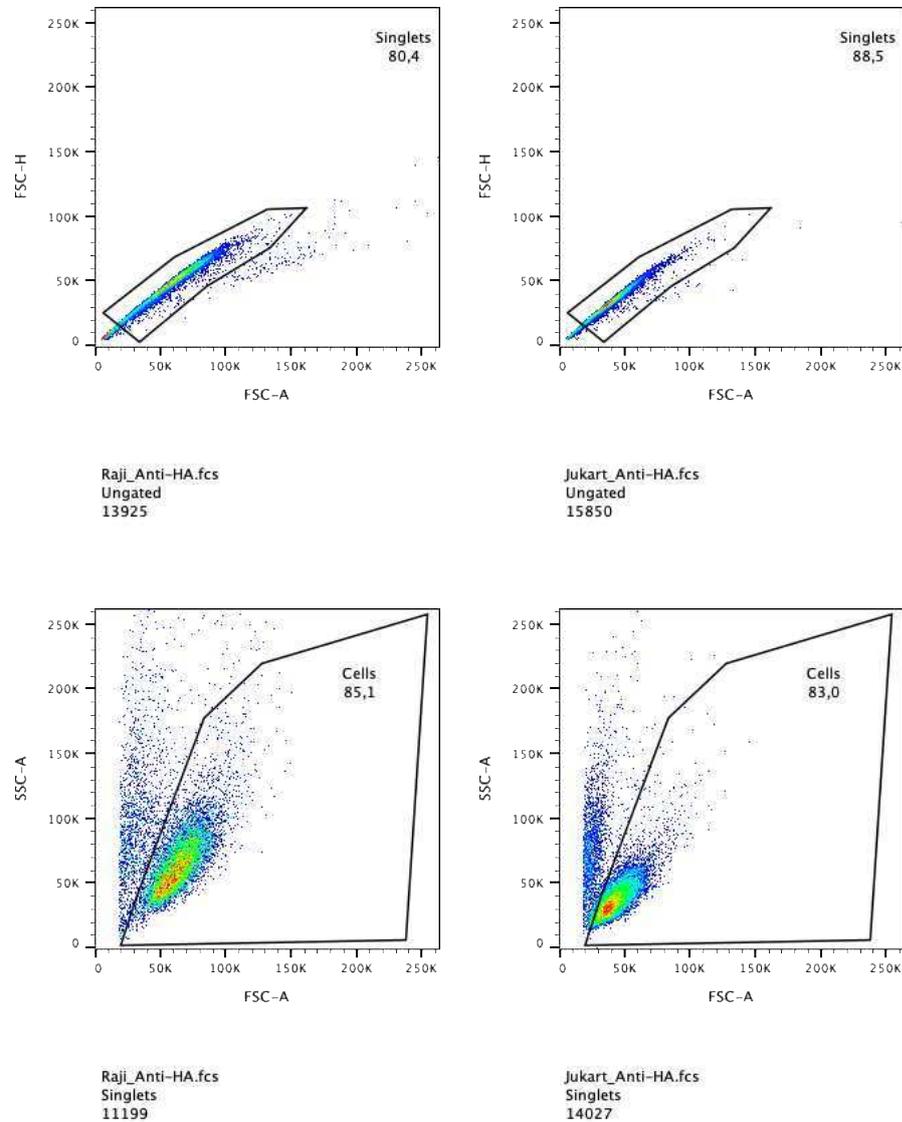
Figura 24. Análise da caracterização de células Raji e Jurkat



Fonte: elaborado pelo autor. As células Jurkat não expressam receptor CD19 e CD20, diferentemente de células Raji. As células Raji não apresentaram marcação inespecífica ao utilizar apenas anticorpo secundário anti-HA.

As voltagens dos canais FSC e SSC foram configuradas de forma a permitir a seleção das duas populações, de Raji e Jurkat, com a mesma voltagem durante todas as análises, como pode ser visto na esquematização abaixo (figura 25), evitando qualquer ajuste na intensidade dos canais que possam interferir na geração de sinal das populações marcadas.

Figura 25. Populações Raji (CD20+) e Jurkat (CD20-) selecionadas durante citometria



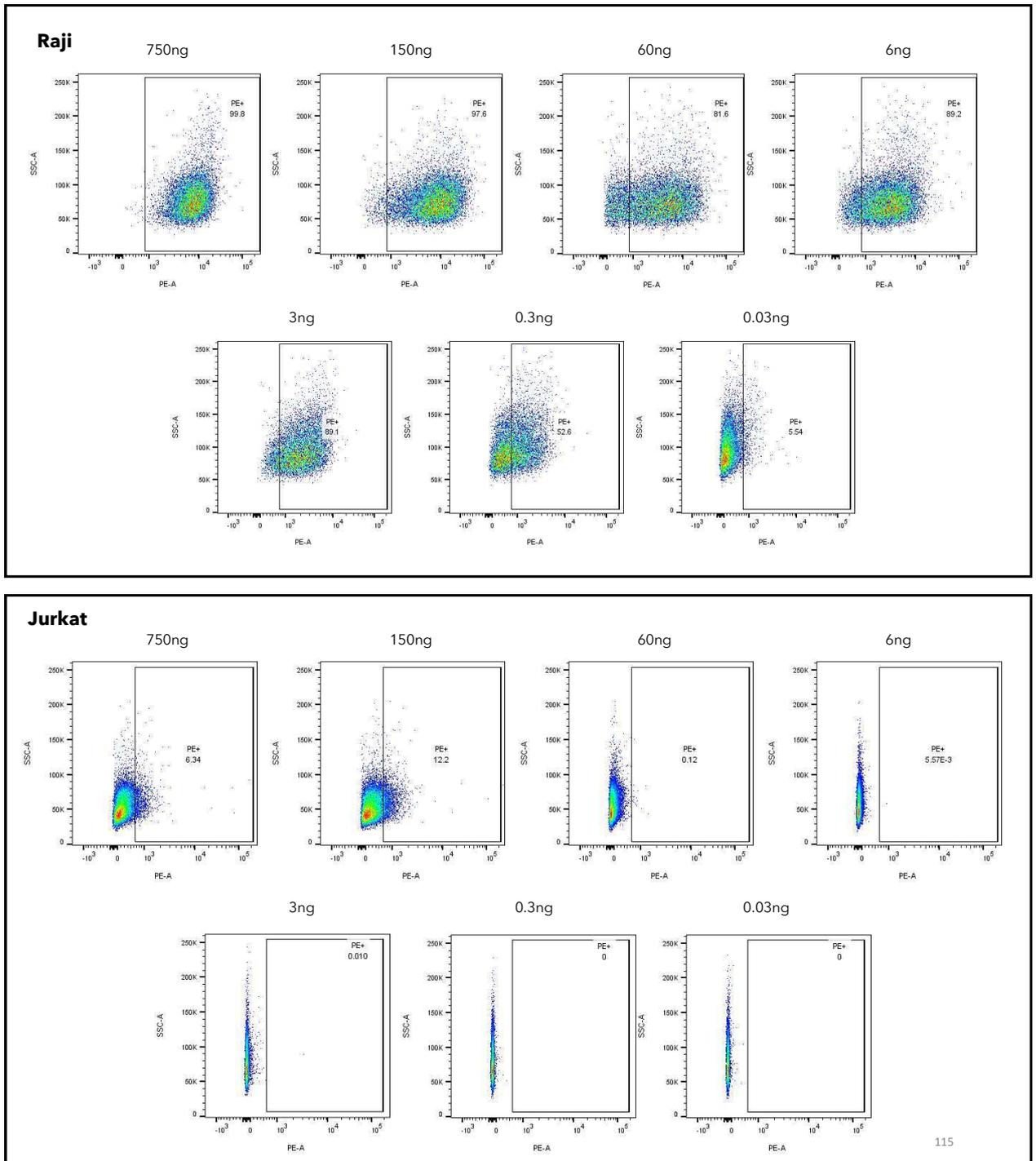
Fonte: elaborado pelo autor. As voltagens para FSC e SSC foram configuradas para permitir a análise simultânea das duas linhagens de célula no software de análise FlowJo®. As células Jurkat são ligeiramente menores do que as células Raji, o que poderia fazer com que a seleção de uma população excluísse a outra sob mesma voltagem.

A marcação com ou sem L/D® (marcador de viabilidade celular) e também com ou sem bloqueador de receptor Fc (BD Fc block®) não comprometeram as marcações nas linhagens testadas com os anticorpos comerciais testados, sendo possível distinguir possíveis ligações

inespecíficas pelos anticorpos secundários ou quaisquer autofluorescências oriundas de células mortas.

O fragmento NatHA foi titulado em diferentes concentrações nas duas linhagens, como mostra imagem abaixo (figura 26).

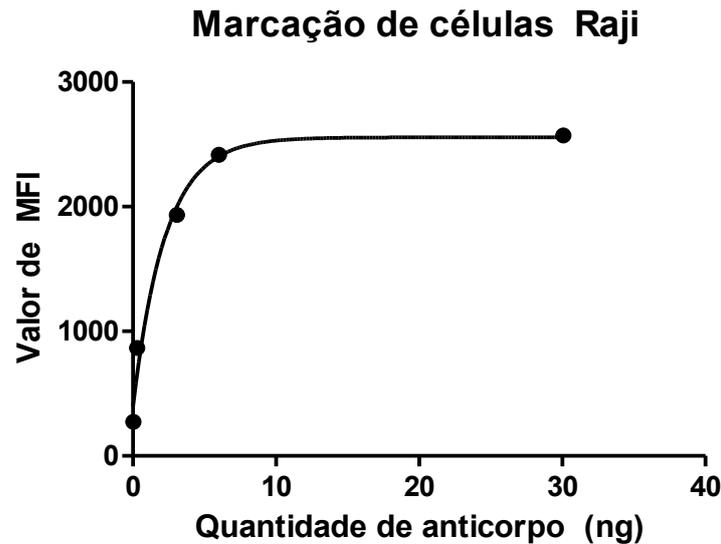
Figura 26. Curva de titulação do fragmento NatHA em células Raji e Jurkat



Fonte: elaborado pelo autor. Molécula NatHA marca células CD20+ (Raji) mas não marca células CD20- (Jurkat). Altas quantidades do fragmento começam a gerar sinal de ligação inespecífico em células Jurkat a partir de 100ng. Para construção do gráfico de MFI vs. Concentração, foram desprezadas as quantidades a partir de 100ng e foram descontados os valores de MFI das células Jurkat (sinal inespecífico).

A partir dos valores de MFI (média de intensidade de fluorescência), foi feita quantificação correspondente a cada quantidade de anticorpo utilizada, gerando o gráfico conforme Figura 27.

Figura 27. Curva de saturação do fragmento scFv em células Raji



Fonte: elaborado pelo autor. O gráfico acima foi gerado a partir dos valores de quantidade de anticorpo e MFI (marcação). O valor de saturação foi calculado em 2556 ($R^2=0,9838$).

A equação abaixo representa uma maneira de calcular a constante de afinidade em condição de equilíbrio (JARMOSKAITE et al., 2020):

$$K_D = [P][L]/[PL] \quad (1)$$

Supondo que K_D seja numericamente igual a $[L]$, ou seja, quando a concentração de ligante (scFv) é numericamente igual ao valor da afinidade, podemos substituir na equação, ficando:

$$[L] = [P][L]/[PL] \quad (2)$$

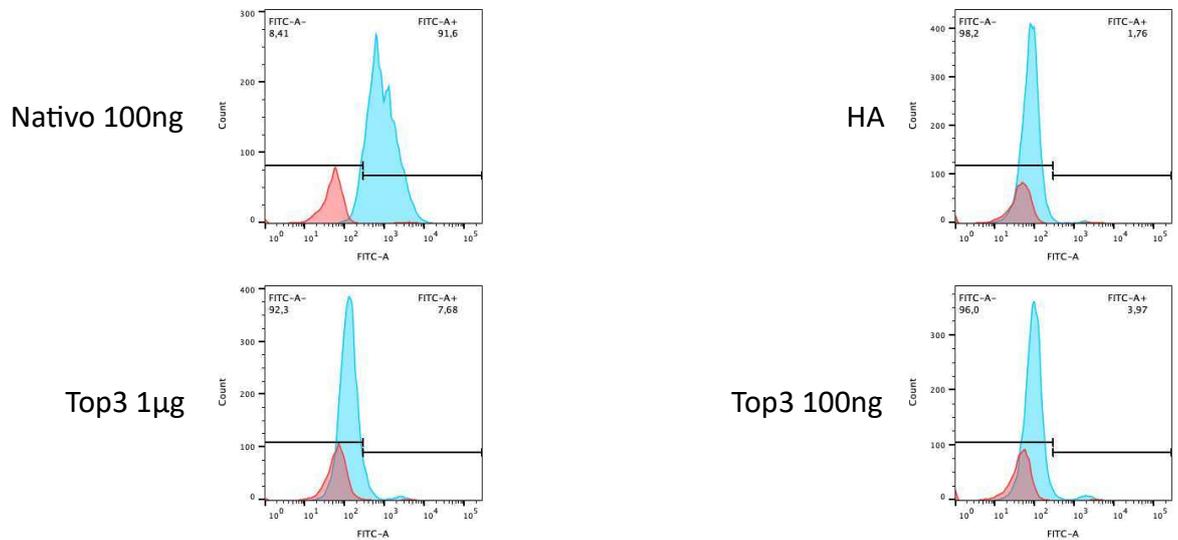
Portanto, considerando que a constante de afinidade seja numericamente igual ao valor da concentração de ligante, temos que, ao simplificar a equação 2, $[P] = [PL]$, ou seja, a concentração de proteína livre é igual a concentração da proteína complexada. Em outras palavras, metade das proteínas (neste caso, receptor CD20) estão em estado livre e metade estão em estado ligado a scFv, no equilíbrio. Como a curva de citometria foi realizada considerando excesso de ligante (scFv), podemos considerar que o valor de $MFI/2$ se refere a quantidade

quando metade das moléculas de CD20 estão ocupadas por scFv (ou seja, MFI/2 se refere ao valor numérico em que [P] é metade do total de P).

Utilizando os valores plotados na curva descrita na figura 25, foi feita regressão não linear (função exponencial) utilizando o software GraphPad Prism 5.1. Dessa forma, foi feita a extrapolação da quantidade de anticorpo equivalente valor de MFI/2 e, convertendo tal quantidade em ng de proteína para molaridade (mol/L), a concentração de scFv para MFI/2 é de aproximadamente 1nM. O valor é menor do que o valor de afinidade descrito na literatura para o anticorpo rituximabe, na faixa de 4-8nM. Há valores descritos na literatura de até 21nM (ROUGÉ et al., 2020). Tais diferenças podem ser explicadas por alguns fatores, como diferenças em métodos de quantificação da proteína testada, condições de incubação (temperatura, tempo, composição de tampão) e sensibilidade das técnicas utilizadas. Li e colaboradores utilizaram fragmentos F(ab')₂ em ensaio de marcação com iodo radioativo e calcularam a afinidade como 4,96nM, porém, apesar da alta sensibilidade da técnica, a marcação incompleta das moléculas de fragmento de anticorpo pode não refletir a realidade da concentração de moléculas em estado ligado.

Após essa caracterização inicial, o mutante expresso Top3 foi testado, não gerando marcação nas células CD20+, conforme mostrado abaixo (figura 28).

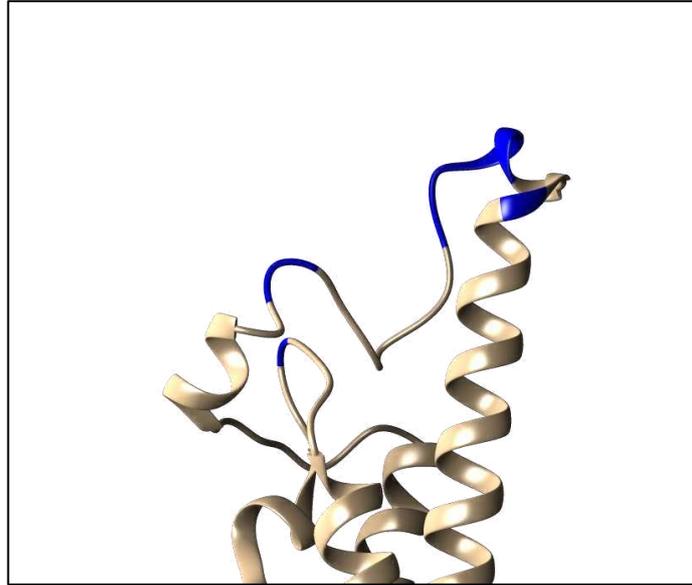
Figura 28. Análise da capacidade de ligação de fragmentos NatHA e Top3



Fonte: elaborado pelo autor. Tratamento com molécula Top3 mostrou baixa marcação em de células CD20+. Células CD20- também não foram marcadas (dados não mostrados).

Esta avaliação foi repetida duas vezes sob mesmas condições, em bateladas diferentes de expressão do clone. Uma provável explicação para isso se deve ao fato de que tanto a modelagem computacional quanto a estratégia de seleção por phage display foram feitas utilizando o peptídeo mimótopo do CD20. Como previamente discutido, a região da alça em que o mimótopo foi baseado é o principal epítipo do rituximabe, mas não o único ponto de interação, como pode ser visto na esquematização da figura 29.

Figura 29. Regiões de interação do CD20 com rituximabe



Fonte: elaborado pelo autor. Baseado na estrutura depositada do anticorpo completo interagindo com a porção Fab do rituximabe (6vja), pode-se observar que diversos pontos de interação (com distância de até 5Å) existem fora da sequência canônica ¹⁷⁰ANPSEK¹⁷⁵, que, em conjunto, podem contribuir para a afinidade entre as moléculas.

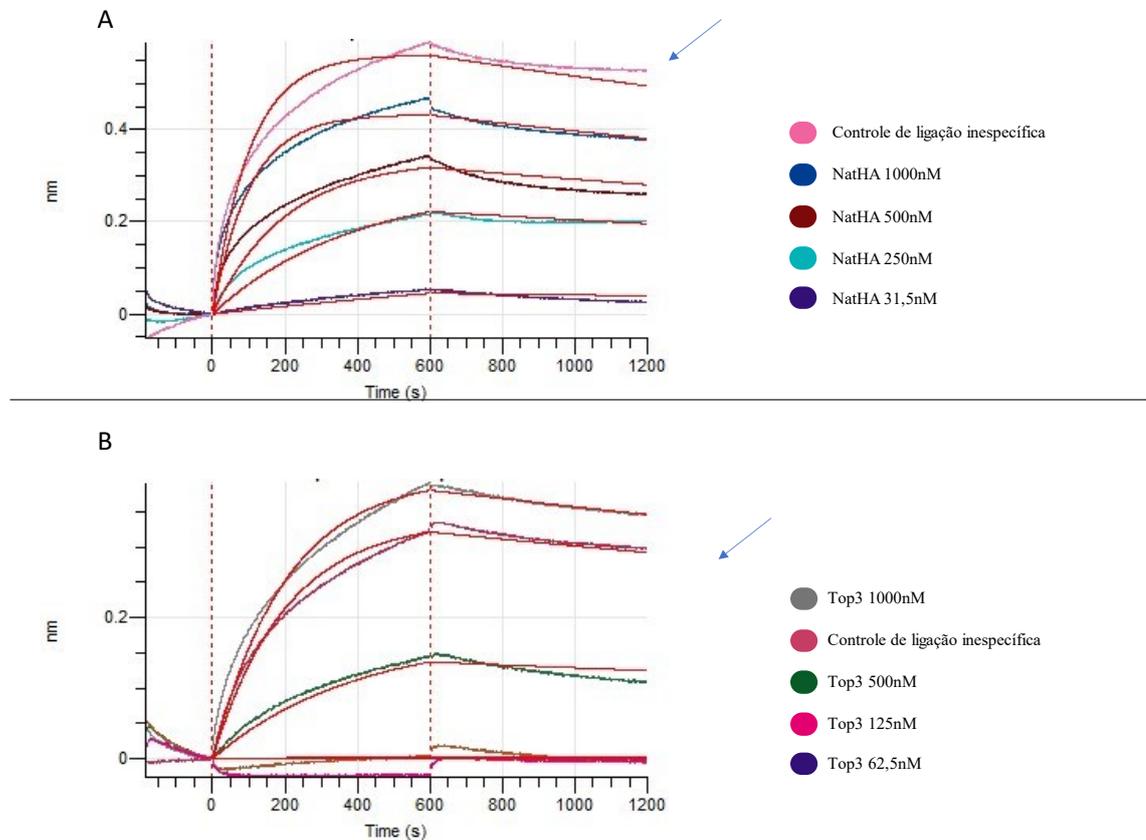
Assim, é possível que modificações na sequência e, conseqüentemente, na estrutura, possam ter favorecido o ponto de interação com os aminoácidos ¹⁷⁰ANPSEK¹⁷⁵, mas mesmo pequenas mudanças conformacionais podem ter comprometido interações secundárias com outras regiões, afetando a interação com a molécula de CD20 completa. Para comprovar essa hipótese, simulações computacionais mais robustas, considerando não só o peptídeo, mas todo o receptor, poderiam esclarecer melhor como os mutantes interagiriam. Ademais, técnicas como ELISA e interferometria de biocamada poderiam confirmar a capacidade de interação entre os mutantes e o peptídeo mimótopo. Alternativamente, visando obter clones funcionais, outros candidatos sugeridos pelo ATTILA podem ser testados, algo que está em andamento pelo grupo. Ainda que o rituximabe tenha diferentes sítios de interação, peptídeos correspondentes às alças do CD20, principalmente a alça maior, são explorados no desenvolvimento de novos anticorpos humanos, demonstrando que peptídeos sintéticos são viáveis para seleção de fragmentos scFv específicos para células CD20+ (SHAMS et al., 2022).

5.5. Avaliação da interação por interferometria de biocamada

Dado que apenas a sequência nativa e o mutante Top3 foram expressos de forma satisfatória em formato scFv, apenas estes, além do anticorpo Mabthera® comercial, foram

testados por interferometria de biocamada. Os gráficos mostrando a interação com o sensor do NatHA e Top3 podem ser vistos na figura 30.

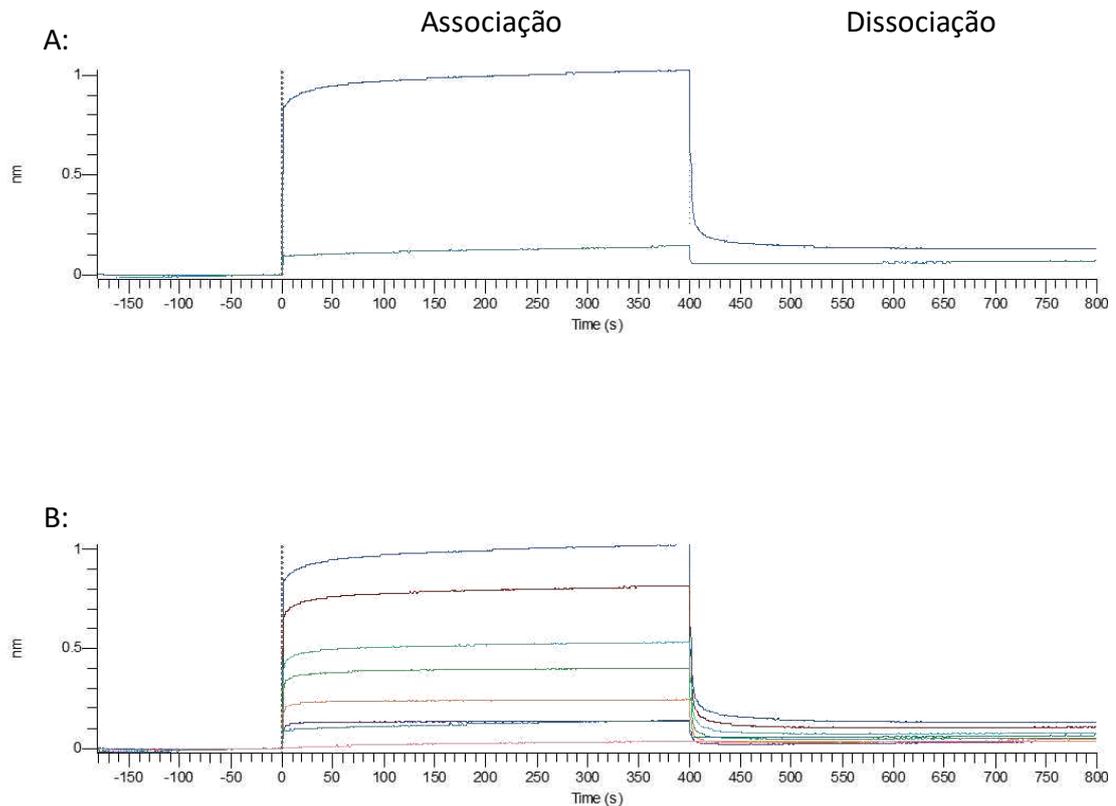
Figura 30. Curva de titulação para análise de cinética das moléculas NatHA e Top3



Fonte: Elaborado pelo autor. A: Curva de titulação do NatHA. B: Curva de titulação do Top3. As setas azuis indicam a curva referente ao controle de ligação inespecífica de cada proteína testada. Os dois scFvs testados interagem de forma inespecífica comparando-se os controles a 1000nM. O sinal inespecífico para Top3, apesar de ser menor do que o sensor contendo peptídeo, ainda ficou acima dos 15% tolerado pelo ensaio para se obter dados cinéticos confiáveis. A maior interação específica com peptídeo CD20 pode ser um indicativo de que a molécula TOP3 tenha uma maior afinidade contra aquela molécula.

A curva de interação do peptídeo CD20 com MabThera® pode ser vista na Figura 31.

Figura 31. Cinética de interação do anticorpo comercial rituximabe com peptídeo CD20



Fonte: elaborado pelo autor. A: Sensores com e sem ligante, mostrando que não há interação inespecífica relevante do MabThera® com sensor, diferente das moléculas scFv. B: Curva de titulação a partir de 10.000nM utilizada para o cálculo de cinética.

Conforme pode ser visto pelos gráficos, as amostras NatHA e Top3 tiveram alto sinal de inespecificidade no sensor sem peptídeo funcionalizado na superfície. Apesar do sinal ter sido maior do que o controle de ligação inespecífica para Top3, indicando possível interação com o peptídeo, o sinal inespecífico gerado ainda foi acima de 15% do tolerado comparado ao sensor com peptídeo para possibilitar a quantificação das constantes de associação e dissociação. A análise do controle de ligação inespecífica foi feita comparando-se a proteína analisada (scFv ou Mabthera®) com ou sem peptídeo, no sensor de maior concentração (primeiro ponto da curva). Os parâmetros cinéticos foram calculados apenas para a proteína

Mabthera®, dado que apenas esta teve baixo sinal inespecífico. Um resumo das informações obtidas está disposto na tabela 12 abaixo.

Tabela 12. Resumo das informações cinéticas coletadas

Molécula	R²	K_D (M)	K_a (1/Ms)	K_{dis} (1/s)
Mabthera®	0,9965	1,297x10 ⁻⁶	3,066x10 ⁵	3,97x10 ⁻¹

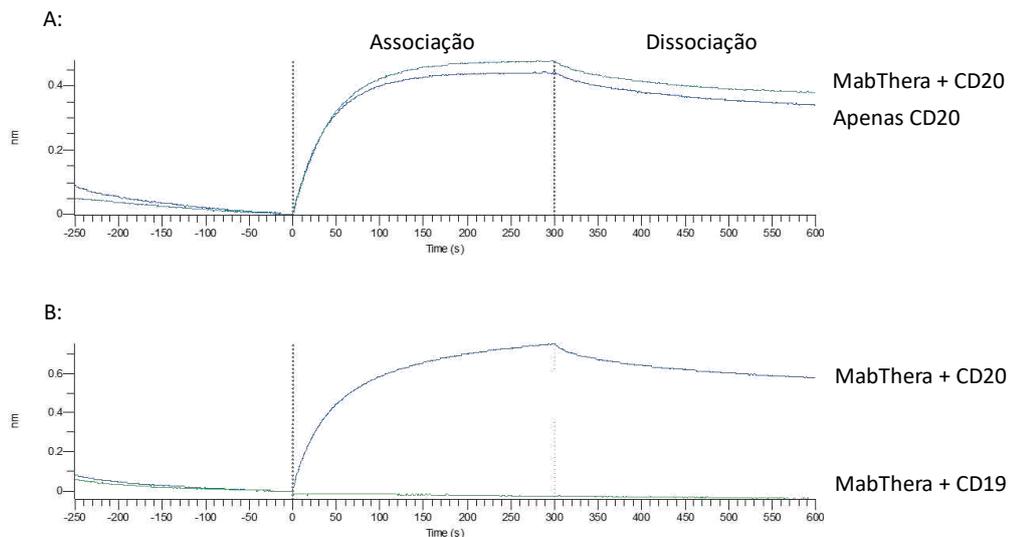
Há diversos trabalhos mostrando que diferentes constantes de afinidade do rituximabe em técnicas que consideram células ou receptores inteiros, com valores de 1,65nM (ROUGÉ et al., 2020), 4nM (LI et al., 2009), 8nM (M. R. Smith, 2003), enquanto há trabalhos que sugerem que a interação com o peptídeo tem uma afinidade menor, com valores de 642nM (ROUGÉ et al., 2020) a até 9000nM (BLASCO et al., 2007), o que respalda a hipótese de que há um contexto mais complexo de interação, como é o caso de células CD20⁺, contribuindo para valores de constante de afinidade mais baixos (maior afinidade) para o anticorpo monoclonal contra o CD20 completo, quando comparado ao mimótopo. A afinidade menor do MabThera® com o peptídeo comparado a células CD20⁺ poderia ser explicada pelo comportamento visualizado na curva de interação, em que a constante de dissociação (K_{off}) é muito elevada. Provavelmente, a falta dos outros pontos de interação do MabThera® com o CD20 (pelo fato de o peptídeo ser uma molécula menor), não promove uma interação estável o suficiente para manter o K_d baixo. A análise de interferometria de biocamada utilizando moléculas maiores, como o CD20 completo, poderia comprovar esta hipótese, e tal experimento está em andamento, em processo de padronização pelo grupo.

Ainda que alterações na afinidade sejam encontradas entre o rituximabe e o CD20, efeitos nas funções efetoras devem ser estudados no contexto da molécula de IgG completa, visto que, como já mencionado anteriormente, valores de afinidade diferentes para um mesmo epítipo podem acarretar diferentes mecanismos efetores sendo ativados, e em diferentes intensidades. O valor calculado para o scFv do rituximabe utilizando metodologia baseada em citometria de fluxo forneceu uma afinidade maior do que valores de afinidade medidos em sistema com peptídeo mimótopo, corroborando a hipótese de que este anticorpo possui diferentes pontos de ancoragem e interação que contribuem para o valor da constante de afinidade.

A fim de verificar se o sinal inespecífico poderia ser diminuído utilizando outra configuração, foi testado também sensor de proteína A, desta vez imobilizando o anticorpo

MabThera® como ligante e utilizando o peptídeo CD20 como analito, em solução. Nesta configuração, os fragmentos scFv poderiam ser avaliados em formato FvFc. Porém, em testes preliminares, foi verificado que o peptídeo CD20 em baixas concentrações gera alto sinal inespecífico, mesmo com anticorpo comercial, conforme pode ser visualizado na figura 32.

Figura 32. Avaliação da interação entre peptídeo CD20 e anticorpo comercial rituximabe em sensor de proteína A



Fonte: elaborado pelo autor. A: apesar de sinal ser observado no sensor com rituximabe (linha azul, MabThera®) como ligante, o peptídeo CD20 também gerou um alto sinal de interação no sensor **sem** anticorpo (linha verde). B: o sensor utilizado como controle foi testado contra outro peptídeo não relacionado, gerando sinal irrisório (linha verde). Apesar do sensor com MabThera® gerar sinal contra peptídeo CD20 (linha azul), este sinal provavelmente é um sinal inespecífico.

Uma provável explicação para o alto sinal inespecífico do peptídeo é a baixa solubilidade do peptídeo CD20 que, mesmo em baixas concentrações, pode induzir agregação na superfície do sensor, gerando diferença no comprimento de onda da luz refletida. Como solução, poderia se utilizar peptídeos com mais aminoácidos de tamanho, a fim de melhorar sua solubilidade. Condições de bloqueio também poderiam ser testadas, como maiores concentrações de albumina sérica bovina (presente no tampão de cinética). Alternativamente, há outras opções de formato do epítipo do rituximabe, como formulações do CD20 completo em membranas artificiais (formato Nanodisc), uma formulação de composição e estrutura

definidas que auxiliam na manutenção da correta conformação de proteínas de membrana. Todas essas estratégias estão em processo de padronização pelo grupo.

5.6. Padronização da expressão no formato FvFc

Considerando impedimentos na caracterização dos fragmentos de anticorpos expressos em sistema bacteriano, os mutantes selecionados foram clonados em vetor para expressão em células eucarióticas contendo porção FvFc. As mutações foram todas confirmadas por sequenciamento de Sanger, como exemplificado na figura 33.

Figura 33. Alinhamento entre sequência nativa da porção scFv e um dos mutantes, em formato FvFc

```

Mutant16      QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLERIGATYPGIGDTSY      60
NativeFvFc    QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY      60
*****

```

Fonte: elaborado pelo autor. As mutações foram confirmadas por sequenciamento de Sanger.

Como explicado na metodologia, mutantes parciais das sequências candidatas foram obtidos por mutagênese sítio-dirigida, gerando, ao todo, 11 sequências mutadas, todas confirmadas por sequenciamento de Sanger, conforme descrito na tabela 13:

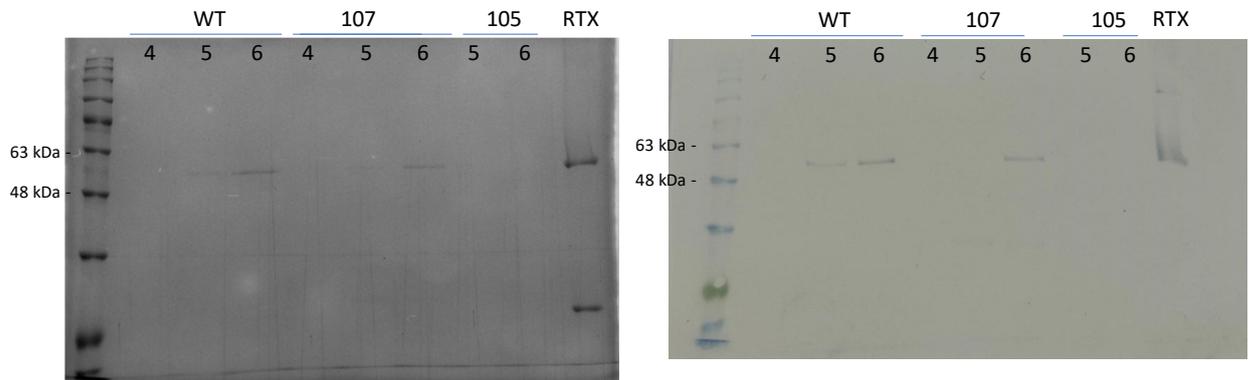
Tabela 13. Mutações adicionadas no formato FvFc

Sequência/Mutante	Mutações adicionadas
1	58/61
2	78/82
3	107
4	47
6	105*
7	58/61/78/82/107*
8	58/61/107
9	47/105
10	51/55/105
11	47/51/55/105*

*Sequências mutantes selecionadas por phage display

A expressão foi realizada em sistema eucariótico conforme descrito na metodologia. Inicialmente, foi feita expressão apenas com as sequências nativa e mutações nas posições 105 e 107. A confirmação da expressão foi feita por análise de dot blotting, western blotting e SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5%, conforme figura 32. Para o western blotting, 15uL de amostras foram corridas em gel SDS-PAGE 12,5%, mostrando perfil de bandas conforme figura 34.

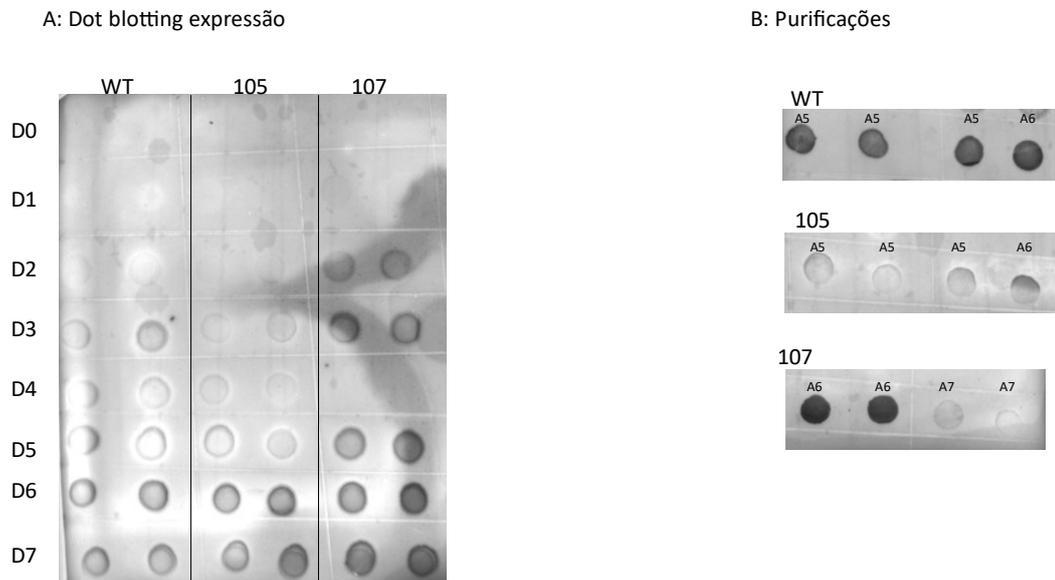
Figura 34. Avaliação da purificação por SDS-PAGE e western blotting



Fonte: elaborado pelo autor. À esquerda, gel de poliacrilamida contendo sequências nativa (WT), mutante 107, mutante 105 e rituximabe (MabThera®). Para a marcação, foi utilizado anticorpo anti-Fc humano conjugado com fosfatase alcalina. O tamanho esperado tanto para cada cadeia FvFc quanto para cadeia pesada do anticorpo MabThera® é de 55 kDa.

A avaliação por dot blotting (figura 35) confirmou a produção dos fragmentos FvFc testados. A purificação do fragmento 105 foi considerada insatisfatória, não prosseguindo para análises seguintes.

Figura 35. Confirmação da expressão do fragmento FvFc



Fonte: elaborado pelo autor. A: Dot blotting do sobrenadante de cultura Expi293 durante os 7 dias de expressão (em duplicata). B: Dot blotting das frações correspondentes a picos cromatográficos das moléculas WT, 105 e 107.

Após quantificação em Nanodrop® a 280nm utilizando o modo de leitura para IgG1 para WT, 105 e 107, foi confirmado uma concentração de 30, 37 e 34µg/mL em um volume aproximado de 1400µL. Apesar da maior quantificação do fragmento 105, esta proteína não foi visualizada em análise de western blotting. A presença de mais de uma banda no western blotting do Mabthera® pode ser justificado, conforme esquematizado na figura 27, pela redução incompleta nas amostras redutoras.

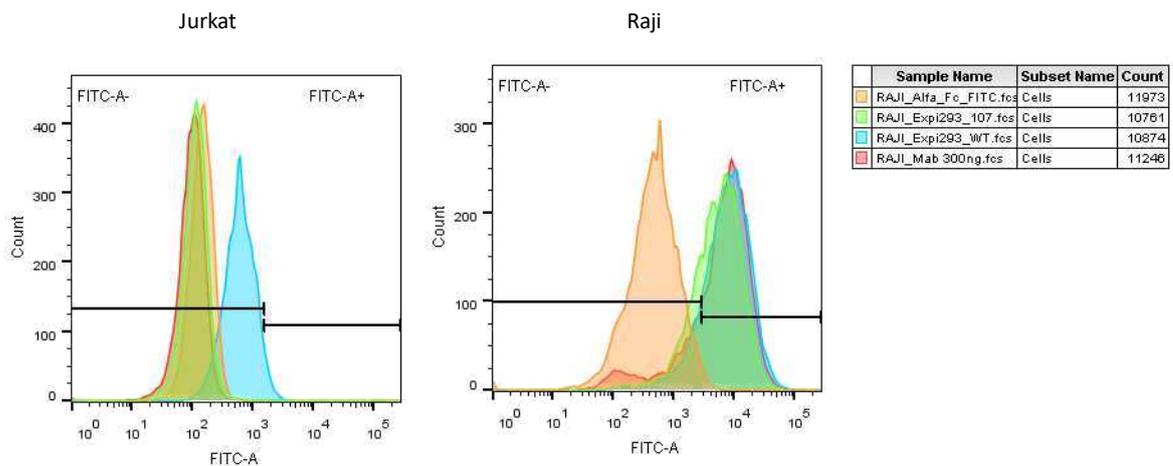
Apesar do baixo rendimento observado pós-purificação, as frações 6 dos fragmentos FvFc WT e do mutante 107 foram avaliados por citometria de fluxo. A concentração do 105 ficou muito baixa após o processo de purificação e por isso não houve quantidade suficiente para o ensaio.

5.7. Avaliação capacidade de ligação em células CD20+

As moléculas purificadas, WT e mutante 107, foram avaliadas por citometria de fluxo conforme previamente explicado. Foi adicionada uma etapa de bloqueio por 40min a temperatura ambiente com Human BD Fc Block, a fim de evitar interações da porção Fc com

receptores de Fc na superfície de linfócitos B. Como anticorpo secundário para marcação foi utilizado Anti-Human IgG (Fc-specific) da Sigma, em diluição 1:200, conforme recomendação do fabricante. A marcação das células Raji e Jurkat, conforme figura 36, mostra a capacidade de ligação dos fragmentos FvFc testados.

Figura 36. Avaliação da interação das moléculas FvFc em células Raji (CD20+) e Jurkat (CD20) por citometria de fluxo



Fonte: elaborado pelo autor. Os dois fragmentos FvFc testados (WT e 107) mostraram capacidade de ligação a células CD20⁺. O fragmento WT mostrou um sinal inespecífico em células Jurkat mais alto do que o mutante 107, o que pode ser devido presença de contaminantes nesta alíquota de proteína recombinante. A marcação foi feita utilizando anticorpo secundário anti-Fc humano (Sigma) conjugado com fluoróforo FITC. Laranja: controle de ligação inespecífica (apenas secundário), verde: fragmento mutante 107, azul: fragmento FvFc, vermelho: MabThera® 300ng.

Desconsiderando a ligação inespecífica, a capacidade de ligação dos fragmentos WT e 107 foram consideradas equivalentes. Outras análises utilizando proteína mais pura podem sugerir se o mutante 107 possui capacidade de ligação maior do que a sequência nativa. Ademais, a partir da análise de western blotting, é possível ver que, mesmo que a concentração de proteínas totais seja equivalente para WT e 107, a fração WT aparenta estar em maior quantidade do que o mutante 107. Ou seja, mesmo utilizando quantidades de proteínas totais equivalentes no ensaio de citometria (aproximadamente 3µg), o mutante 107 pode estar em menor quantidade do que WT. Junto com o fato de que WT gerou alto sinal inespecífico na citometria, este poderia ser um indicativo de que o mutante 107 possa ter uma afinidade maior do que seu equivalente WT. A posição 107 corresponde a uma área de interface com cadeia

leve, e ajustes conformacionais nessa região podem gerar um reposicionamento do paratopo, favorecendo a interação do anticorpo com seu alvo.

Conforme demonstrado em outros trabalhos (VANDER MAUSE et al., 2022; YU et al., 2023), a afinidade de anticorpos, a depender do alvo, afeta o mecanismo de ação destas moléculas. Para determinados alvos, uma menor afinidade pode representar maior função efetora. Ainda não há consenso sobre qual a faixa de afinidade de anticorpos anti-CD20 induz maior citotoxicidade em células-alvo tumorais, e a geração de mutantes com características de interação diferentes da sequência nativa do rituximabe pode representar uma alternativa mais eficaz para este anticorpo do ponto de vista terapêutico e de indução dos mecanismos principais de anticorpos anti-CD20 (apoptose direta, ADCC e CDC). Conforme já mencionado, para CD20, existem anticorpos do tipo I e tipo II que, a depender do epítipo e afinidade, induzem mais de um mecanismo do que de outro, e ainda assim são explorados na clínica.

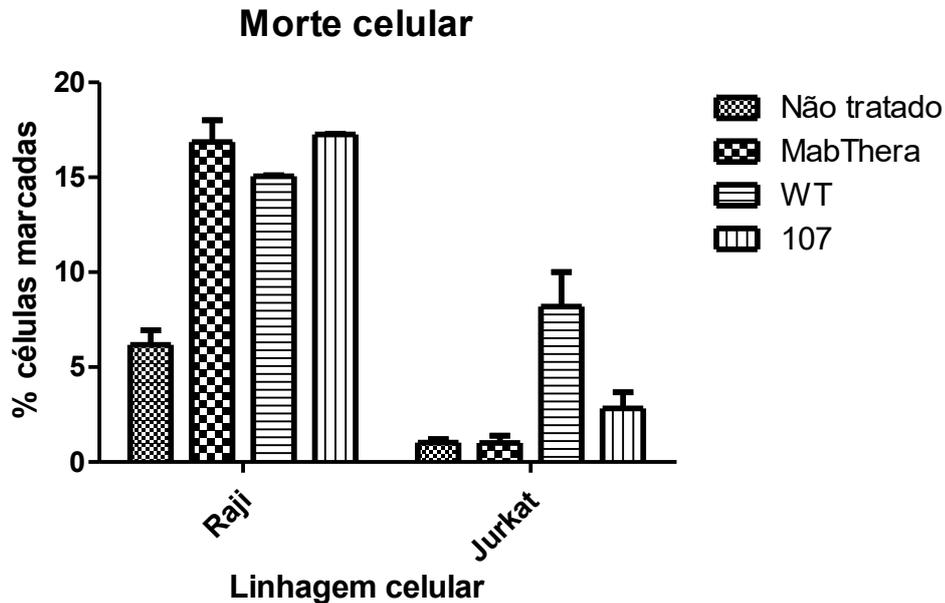
Além de aplicações no formato de anticorpo completo, a porção variável pode ser explorada em outras conformações, como em receptores quiméricos de antígeno de células CAR-T. Trabalhos com antígenos associados a tumor demonstraram que a inserção de mutações sem afetar especificidade ou capacidade de ligação, mas diminuem a afinidade, podem aumentar a eficiência de células CAR-T (VANDER MAUSE et al., 2023). Como antígenos associados a tumores também são expressos em células saudáveis, a diminuição da afinidade pode diminuir o efeito *on-target*, *off-tumor*, prolongando os efeitos terapêuticos da CAR-T. Outra aplicação de anticorpos com afinidade modulada é em moléculas conjugadas a drogas (ADC, *Antibody-drug Conjugates*). Para determinados alvos, especialmente aqueles superexpressos em células-alvo, uma alta afinidade significa alta entrega da carga (molécula citotóxica). Para isso, pode-se tanto ajustar a quantidade de droga conjugada ao anticorpo, como pode-se entregar a droga via moléculas com uma menor afinidade, a fim de gerar menor citotoxicidade, como proposto por Evans e Thurber (EVANS; THURBER, 2022). Outro provável aspecto que pode ser aprimorado com anticorpos de diferentes afinidades é a ocorrência de efeitos adversos, especialmente aqueles ligados à inflamação. Conforme mencionado na introdução deste trabalho, o engajamento de moléculas CD20 leva a ativação de sinais intracelulares que estão associados a liberação de citocinas inflamatórias, como IP-10, IL-6, IL-8 (ZENT et al., 2022) e linfotóxina beta (AGARWAL et al., 2004), que estão associadas a diversos efeitos colaterais pós-infusão. Outros anticorpos anti-CD20 de maior afinidade induzem ainda mais efeitos colaterais, como revisado por Luo e colaboradores (LUO et al., 2021), como é o caso do ofatumumabe, que apresentou maiores níveis de efeitos adversos sem ganhos em sobrevida global. Considerando esses dados, um balanço entre capacidade de ligação

e uma indução controlada de ativação da via CD20 pode ser essencial na descoberta e uso de anticorpos na clínica, parâmetros que podem ser modulados através de mutações na molécula de anticorpo.

5.8. Avaliação da capacidade de indução a apoptose dos fragmentos FvFc

Conforme revisado extensivamente, a molécula de rituximabe engaja a ativação da cascata de sinalização via dimerização da molécula de CD20. Tal ativação leva a indução de apoptose por diversas vias, com destaque para vias dependentes de efluxo de cálcio causado pela ativação do CD20 (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003) e para vias dependentes de caspase (SEYFIZADEH et al., 2016), que são intensificadas na presença de anticorpos (*crosslinkers*) que promovem a dimerização do rituximabe e, consequentemente, de moléculas de CD20. Visto que a dimerização é essencial para ativação de vias apoptóticas, o formato bivalente de fragmentos como FvFc é viável de ser utilizado como molécula pró-apoptótica. A incubação de células Raji (CD20⁺) com os FvFc WT e 107 parece promover a indução de morte celular destas células, conforme pode ser observado na figura 37.

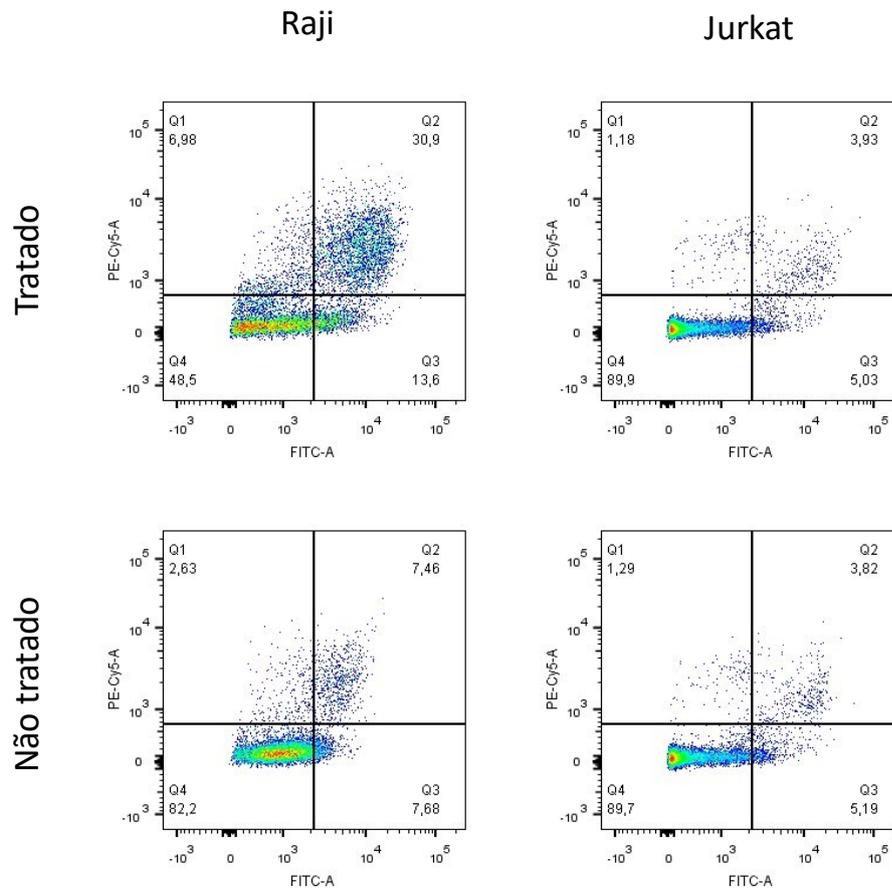
Figura 37. Avaliação da morte celular por marcador de viabilidade



Fonte: elaborado pelo autor. As moléculas testadas induziram marcação de célula por 7-AAD, marcador de viabilidade, de forma equivalente para as concentrações testadas (MabThera 10 μ g/mL, fragmentos 7.5 μ g/mL) no tempo de 24h. A concentração de MabThera e o tempo de incubação foram escolhidos para esse teste inicial a partir de dados da literatura, que mostram uma provável indução de apoptose em células CD20⁺. As moléculas testadas também parecem induzir morte celular em células Jurkat, comparado ao controle não tratado com molécula (apenas PBS). Ajustes na concentração celular, composição do tampão e grau de pureza das proteínas podem melhorar a especificidade das moléculas.

Este ensaio de apoptose precisa ser repetido para confirmar a tendência verificada no teste piloto, aumentando o número de replicatas a fim de possibilitar análise estatística. Apesar de terem potencial citotóxico equivalentes com relação ao controle não tratado (adicionado de PBS), outros ensaios são necessários a fim de avaliar melhor o perfil de indução apoptótico, testando-se outros tempos de incubação, concentrações de anticorpo e concentração de células. Uma outra possibilidade é a marcação dupla com molécula de anexina V, um marcador de apoptose inicial. Em ensaios preliminares com a molécula de rituximabe, é possível diferenciar eventos em estágio de apoptose inicial (marcação por anexina) de estágio de apoptose tardia (marcação por 7-AAD), conforme mostrado na figura 38.

Figura 38. Diferenciação de estágios de apoptose induzida pela molécula de rituximabe



Fonte: elaborado pelo autor. A molécula de rituximabe induz apoptose em células Raji, mas não em células Jurkat. A dupla marcação com anexina e 7-AAD possibilita a diferenciação de estágios de apoptose (apoptose inicial de apoptose tardia) em testes preliminares realizados pelo grupo. As moléculas FvFc podem ser avaliadas quanto ao seu potencial de indução a apoptose.

A molécula do scFv-Fc contendo a sequência WT induziu apoptose também em células Jurkat, provavelmente pela presença de contaminantes ou interação inespecífica, no entanto, pode-se observar uma tendência de citotoxicidade maior para células Raji. Esses experimentos estão sendo replicados e adicionados de novos mutantes.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Dentre os candidatos selecionados, apenas um foi avaliado quanto a sua capacidade funcional de ligar em células CD20+ no formato scFv. Este candidato não mostrou interação com células. Como descrito anteriormente, há outros pontos de interação entre o anticorpo

rituximabe e o receptor CD20, o que poderia indicar que mutações que favoreçam a interação com um certo ponto do receptor, como é o caso dos resíduos 170ANPSEK175, podem desfavorecer a interação com outras regiões, hipótese que poderia explicar o porquê de mutações que aumentem a afinidade contra o epítopo diminuam a interação com o alvo completo. O sequenciamento de nova geração associado a um *pipeline* de análise como o ATTILA sugere sequências com alto enriquecimento como candidatas. Neste trabalho, optou-se por avaliar apenas mutações na porção VH, escolhidas comparando-se a última etapa de seleção com a biblioteca original. Os dados gerados pelo NGS permitem analisar também mutações na porção VL, que também está envolvida na interação com o receptor CD20. Ao avaliar o enriquecimento *round a round*, pode-se determinar também outras mutações que possam ter sido selecionadas e que, por algum motivo, foram perdidas na última etapa de seleção. A avaliação das mutações com ferramentas mais robustas de bioinformática, que levem em consideração não apenas o mimótopo mas todo o receptor CD20 também podem auxiliar na proposição de outros candidatos.

A expressão dos fragmentos no formato FvFc confere não apenas a porção constante com os domínios CH2 e CH3, envolvidos no recrutamento de células e moléculas do sistema imune, mas também podem auxiliar na análise do efeito das mutações em um formato mais estável e utilizando uma plataforma de expressão mais robusta (eucariótica) comparado ao sistema procariótico. Um mutante parcial do candidato TOP1 (mutante 107, em região de CDR) foi avaliado no formato FvFc, mostrando capacidade de ligação equivalente a células CD20⁺ e provavelmente induzindo morte celular em quantidades pelo menos equivalentes ao WT. Quanto ao ensaio de morte celular, outras repetições precisam ser realizadas a fim de validar estatisticamente a tendência observada. A avaliação de outras mutações propostas pelo ATTILA pode demonstrar outras sequências que também sejam funcionais e serão avaliadas no escopo deste projeto.

Ainda que mutantes com diferentes valores de afinidade sejam gerados, é importante estudar o efeito dessas mutações na função efetora, que depende não só do epítopo, mas também da afinidade e da topologia de ligação, como discutido anteriormente. Na intenção de se utilizar mutantes do rituximabe como molécula IgG com propriedades funcionais melhoradas, é importante levar em consideração que diferentes valores de afinidade e seus componentes (constantes de associação e dissociação) podem afetar a eficácia de mecanismos de ação induzidos.

Finalmente, otimizações nas metodologias de expressão e purificação, além do aumento da escala, podem auxiliar na obtenção de fragmentos em quantidades suficientes para permitir sua caracterização.

7 CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE ANTICORPOS HUMANOS ANTI-CD19

8 OBJETIVOS

8.1. Objetivo geral

Propor candidatos de anticorpos monoclonais humanos específicos para o receptor CD19 humano.

8.2. Objetivos específicos

8.2.1. Selecionar, por phage display, fragmentos de anticorpos contra peptídeo mimótopo do CD19.

8.2.2. Selecionar, por phage display, fragmentos de anticorpos contra células CD19⁺.

8.2.3. Propor, a partir de análise por sequenciamento de nova geração, sequências candidatas enriquecidas em processo no processo de seleção por phage display.

8.2.4. Construir, expressar e purificar as sequências candidatas selecionadas no formato scFv.

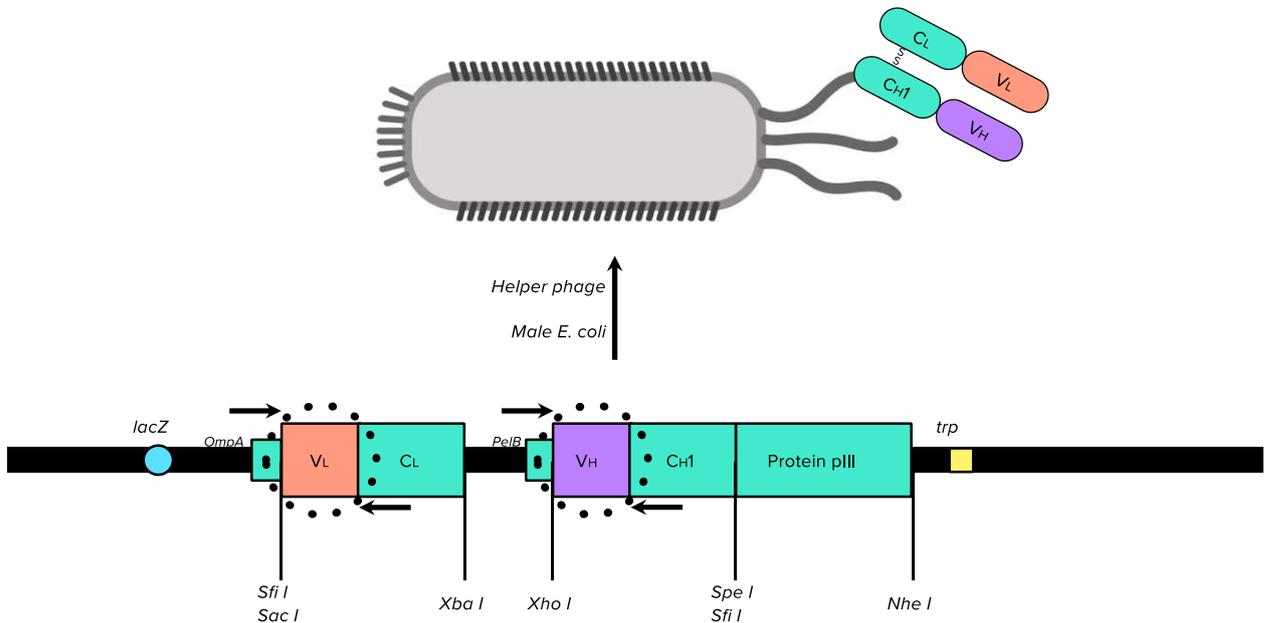
8.2.5. Avaliar o potencial de interação dos fragmentos scFv selecionados em células CD19⁺.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1. Transformação da biblioteca em bactérias

A biblioteca de tamanho calculado de $2,64 \times 10^8$ foi cedida pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília. A referida biblioteca possui anticorpos no formato Fab clonado em vetor de expressão para phage display, pComb-3XSS, conforme esquematizado na figura 39.

Figura 39. Esquematisação do vetor pComb-3XSS contendo o inserto no formato Fab



Fonte: elaborado pelo autor. Em destaque, porções VH e VL e local de alinhamento dos primers para sequenciamento NGS.

A biblioteca foi inicialmente transformada por eletroporação em células bacterianas da cepa XL-1 Blue.

9.2. Seleção contra peptídeo mimótopo do CD19

Foram feitas 10 transformações por eletroporação conforme o item 4.a. Os 30mL de SOC utilizados para recuperação das bactérias foram então transferidos para um erlenmeyer de 250mL e incubados por 1,5 h, 250 RPM, 37 °C. Após esse tempo, 200µL foram retirados para titulação da biblioteca transformada por diluição seriada, utilizando placas com carbenicilina 100µg/mL. Em todas as etapas foram utilizados meios de cultura suplementados com glicose 1% para suprimir qualquer expressão residual de Fab no citoplasma das bactérias. Meio SB pré-aquecido (37 °C) foi adicionado para completar volume final de 50mL, acrescido de 10 µL de carbenicilina 100mg/mL, 100µL de tetraciclina e então incubado por 1 h a 37°C, 300 RPM. Após incubação, reforço com 15µL de carbenicilina 100mg/mL foi feito, agitando por mais 1 h nas mesmas condições. Após esse tempo, 2mL de fago auxiliar vcsm13 (10^{12} a 10^{13} PFU/mL) foram adicionados, junto com 148mL de meio SB suplementado com 75µL de carbenicilina 100mg/mL, 300µL de tetraciclina 5mg/mL e glicose concentração final 1%. Os 200mL foram

transferidos para um frasco de 1L e agitados 300RPM por 1,5 h, 37 °C. Após este tempo, foram adicionados 280µL de canamicina 50mg/mL e incubado durante a noite a 300 RPM, 37 °C. Após a incubação, foram reservados 4mL tubos de 1,5mL (1mL de cultura em cada), para posterior purificação de DNA. Este DNA foi utilizado para obtenção das sequências VH e VL da etapa R0 (correspondente a biblioteca). A cultura foi então submetida a precipitação de fagos. A cultura foi centrifugada 3000g/15min/4C, utilizando uma garrafa de centrifuga 500mL. O sobrenadante foi transferido para uma garrafa de 250mL e adicionada de 8g PEG-8000 e 6g de cloreto de sódio. Os sólidos foram dissolvidos por agitação 300RPM/5min/37C. Posteriormente, esta solução foi incubada por 30min em gelo. Após incubação em gelo, a solução foi dividida em dois frascos de 250mL e centrifugada 15000g/15min/4C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa secada em papel toalha, secando a boca da garrafa com líquido remanescente. O precipitado foi ressuspendido com 1mL de BSA 1% em TBS por pipetagem (2mL no total, pois foram duas garrafas de centrífuga). O líquido foi transferido para um tubo de 2mL e centrifugado 5min/4C/18000g (ou velocidade máxima) para coletar apenas o sobrenadante. O sobrenadante, correspondendo aos fagos, foram armazenados a 4C. Uma placa de 96 poços foi preparada no dia anterior, adicionando-se estreptavidina (100µL a 5µg/mL em PBS) incubada durante a noite a 4C. Nos dias em que foi realizada seleção, a placa foi pré-incubada por 1h/37C. Logo após, a solução de estreptavidina foi removida e os poços foram lavados três vezes com 150µL de PBS. Foram adicionados 100µL de peptídeo biotinilado (4µg/mL em PBS, correspondendo a uma concentração final de 1,72µM) e a placa foi incubada por 37C/1h. Após a incubação com peptídeo, a solução foi removida e lavada com TBS-T 0,5% três vezes. Foram adicionados 150µL de solução de bloqueio, BSA 3% em TBS, e incubada durante 1h a 37C. Posteriormente, a solução de bloqueio foi removida e a placa foi lavada com BSA 3% em TBS três vezes. Foram adicionados 100µL de fagos frescos em cada poço e a placa foi incubada por 1h a 37C. Os fagos foram removidos e foi feita lavagem com TBS-T 0,5%, adicionando-se 150µL, pipetando vigorosamente up/down cinco vezes, incubando 5 min e removendo a solução. Esta lavagem com 150µL de TBS-T 0,5% foi repetida cinco vezes, correspondendo a primeira etapa de seleção. No segundo ciclo de seleção, foram feitas 10 lavagens e no terceiro em diante, 15 lavagens.

Depois do ciclo de lavagens, os fagos foram eluídos com 100µL de solução ácida (tampão glicina-HCl 100µM, pH 2,2). Incubada por 10min, pipetada vigorosamente dez vezes e transferida para um novo tubo de 1,5mL, unindo duas replicatas (200µL no total). Para o tubo que recebeu as duas eluições ácidas, foi adicionado previamente 12µL de solução neutralizante (tris-base 2M, pH 8,5). Foram utilizados 100µL dos fagos eluídos para infectar 2mL de *E. coli*

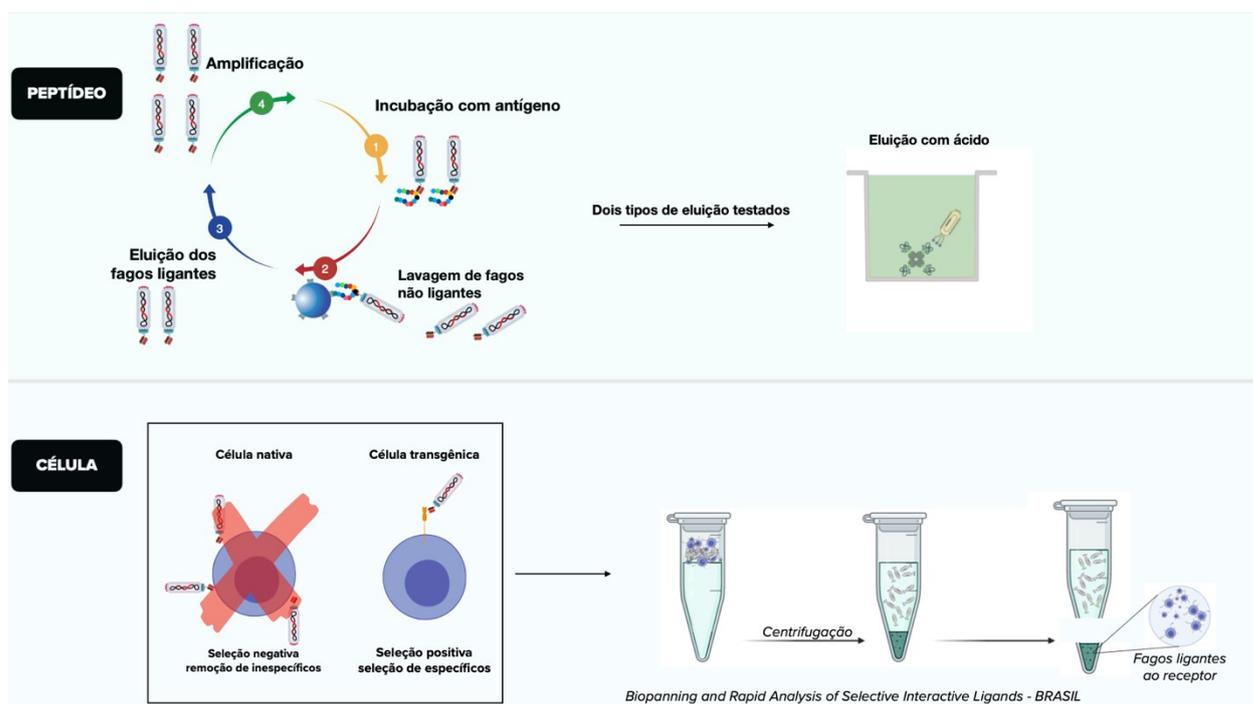
DO 1, incubando por 15min em temperatura ambiente. Após essa incubação, 200 μ L das células infectadas foram reservadas para titulação dos fagos eluídos. Após remover os 200 μ L para titulação, 6mL de meio SB pré-aquecido, suplementado com 1,6 μ L de carbenicilina 100mg/mL, 12 μ L de tetraciclina 5mg/mL e glicose para concentração final 1% (previamente preparado). Cada cultura foi transferida para um tubo de 50mL e agitado 300RPM/1h/37C. Após esta incubação, reforço com carbenicilina foi feito, adicionando mais 2,4 μ L e agitando novamente por 1h, sob mesmas condições. A cultura foi transferida para um frasco de 1L e foram adicionados 1mL de fago auxiliar aos 8mL de cada cultura (eluído ácido e peptídeo não-biotinilado), 91mL do meio SB previamente preparado e pré-aquecido. A cultura foi então incubada por 1,5 h. Posteriormente, foram adicionados 140 μ L de canamicina 50mg/mL e a cultura foi crescida continuamente durante a noite, a 300RPM/37C. No dia seguinte, foram coletados 4mL de cultura em quatro tubos de 1,5mL separados (1mL por tubo), para posterior purificação de DNA. A cultura foi centrifugada 3000g/15min/4C, em uma garrafa de 250mL. O sobrenadante foi recuperado e adicionado de 4g de PEG-8000 e 3g de cloreto de sódio. A solução foi dissolvida a 300RPM/5min/37C e incubada em gelo por 30min, seguida de centrifugação 15000g/15min/4C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 1mL de BSA 1% em TBS por pipetagem. O líquido foi transferido para um tubo de 2mL e centrifugado para remoção de partículas em suspensão. Os fagos precipitados foram submetidos ao protocolo de seleção por cinco vezes. A escolha do número de ciclos de seleção foi baseada na análise de títulos de entrada e saída, descrita na seção de resultados.

9.3. Seleção contra células CD19⁺

A seleção utilizando células CD19⁺ foi realizada baseada em trabalho de Giordano e colaboradores (GIORDANO et al., 2001). A transformação inicial e produção/precipitação dos fagos foram feitas conforme capítulo 1. Porém, as etapas de biopanning foram feitas com células ao invés de peptídeo mimético. Foram utilizadas duas linhagens de células durante a seleção: K562 nativa (CD19⁻) e K562 transgênica para receptor CD19 (CD19⁺). Inicialmente, os fagos precipitados da biblioteca, utilizados na primeira etapa de seleção, foram incubados com células CD19⁻ como forma de depletar fagos que não interagem com receptor CD19. Para isso, as células foram precipitadas por centrifugação a 400g/5min/21C e ressuspensas em meio de cultura suplementado com BSA 1% em um volume de 1mL em concentração de 10⁶ células/mL. Foram adicionados 100 μ L dos fagos precipitados e incubados por 1h em gelo. Dessa solução, 100 μ L foram transferidos para outro microtubo contendo 200 μ L de uma solução 9:1 (dibutilftalato:ciclohexano). O microtubo foi então centrifugado a 10000g/10min. Após a

centrifugação, a parte líquida superior, contendo solução aquosa com fagos não ligantes, foi transferida para outro microtubo de 1,5mL contendo células CD19+ em mesma proporção e quantidade. Este microtubo foi incubado por 1,5h em gelo e, novamente, 100µL dessa solução foi transferida para outro microtubo contendo 200µL de solução orgânica dibutilftalato:ciclohexano. O microtubo foi centrifugado a 10000g/10min e imediatamente transferido para nitrogênio líquido. A parte inferior do tubo, abaixo do colchão orgânico, foi recortada com uma lâmina e transferida para um tubo com 200µL de bactéria XL1-Blue previamente preparada, em D.O.600nm = 1. De acordo com a esquematização na figura 40, a solução orgânica utilizada é capaz de separar células de moléculas solúveis na porção aquosa. Dado a propriedade lipofílica da membrana celular, as partículas celulares são separadas na parte inferior a camada orgânica, enquanto os fagos não-ligantes, solúveis, são mantidos na porção aquosa superior. A depleção utilizando células CD19- visa coletar a parte aquosa com fagos não-ligantes, removendo fagos que interajam com outros receptores da célula (seleção negativa) e esta fração foi então utilizada na seleção positiva com células CD19+. A parte inferior recortada do tubo contendo células CD19+ e fagos ligantes foi então utilizada para infectar 200µL bactérias XL1-blue em fase log, sem a necessidade de eluir os fagos ligantes, já que as partículas virais mantêm as propriedades infectantes mesmo interagindo com alvos via porção scFv-pIII. A partir desta etapa, a precipitação de fagos foi realizada conforme descrito no capítulo 1. O procedimento de seleção com células utilizando o sistema dibutilftalato:ciclohexano foi repetido por 3 etapas de seleção, com a realização da etapa de depleção com células CD19- executada nas duas primeiras etapas. De maneira similar ao que foi descrito no capítulo 1, os fagos precipitados após cada etapa de seleção, correspondentes à biblioteca original, etapas 1, 2 e 3 foram coletados. Também foram coletados 1mL de bactérias após a incubação overnight para precipitação dos fagos para purificar o DNA plasmidial das bactérias, correspondente ao plasmídeo dos fagos que foram selecionados em cada etapa. O DNA plasmidial das bactérias e o fagomídeo purificados por *kit* miniprep e precipitação por fenol, respectivamente, e este DNA foi utilizado para amplificar as porções VH e VL para sequenciamento e definição de seqüências candidatas.

Figura 40. Esquemática das duas seleções para anticorpos anti-CD19



Fonte: elaborado pelo autor. Na seleção com peptídeo, os fagos foram incubados com peptídeo imobilizado em superfície tratada com estreptavidina e eluído com ácido. Na seleção com células, a separação entre os fagos ligantes e não ligantes foi feita utilizando solução orgânica, separando fagos ligantes (interagindo com a célula na porção inferior) de não ligantes (na porção aquosa).

9.4. Determinação das sequências candidatas por sequenciamento de nova geração

O DNA plasmidial dos fagos foi purificado conforme descrito na sessão 3.d. Foram feitas reações para amplificar as porções VH e VL do DNA plasmidial obtido. Os primers utilizados foram:

Porção VH

5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GCT GCC CAA
CCA GCC ATG GCC-3'

5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GCG ATG GGC
CCT TGG AGG C-3'

Porção VL

5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GGG CCC
AGG CGG CCG AGC TC-3'

5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GAA GAC
AGA TGG TGC AGC CAC AGT-3'

Em negrito está a sequência de adaptadores Illumina®.

A reação em cadeia da polimerase foi padronizada para cada VH e VL e a condição de amplificação que melhor funcionou foi utilizando a enzima de alta fidelidade TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase (TransgenBiotech®), conforme recomendações do fabricante, conforme descrito na tabela 14:

Tabela 14. Condição recional de amplificação dos fragmentos VH e VL

Componente	Quantidade
Buffer 5X FastPfu	10µL
dNTPs (10mM)	4µL
Primer F	1µL
Primer R	1µL
Stimulant	5µL
DNA (fago ou DNA plasmidial)	150ng
FastPfu Pfu Polymerase (1U/µL)	1µL
Água ultrapura	Q.s.p. 50µL

A reação foi incubada conforme a ciclagem abaixo:

Temperatura	Tempo de incubação
98C	2min
98C	1min*
52C	30seg*
72C	1min*
72C	5min

*30 ciclos

Os fragmentos correspondentes aos tamanhos VH e VL foram purificados e clonados em vetor pGEM conforme recomendação do fabricante, a fim de confirmar que o fragmento amplificado eram as porções VH e VL. Após confirmação, os fragmentos foram analisados por sequenciamento de nova geração em plataforma Illumina®, utilizando *kit MiSeq Reagent Kit v3*. Após sequenciamento, a plataforma de análise ATTILA foi utilizada conforme capítulo 1, gerando sequências candidatas baseado na taxa de enriquecimento de sequências comparando-se a última etapa de seleção contra a biblioteca original. Duas sequências de VH com alto

enriquecimento foram selecionadas e combinadas com a sequência VL mais enriquecida, gerando duas sequências no formato scFv oriundas da seleção utilizando peptídeo mimético do CD19 e duas vindas da seleção utilizando célula CD19+.

9.5. Expressão e purificação dos fragmentos scFv

As sequências dos fragmentos foram sintetizadas e subclonadas em vetor pET-SUMO, uma cauda de solubilidade, e transformadas em cepa de *E. coli* SHUFFLE T7 Express®. O protocolo de expressão das quatro sequências candidatas selecionadas foi seguido conforme o capítulo 1. Em resumo, após atingir densidade ótica a 600nm de 0,7-0,9, a cultura foi adicionada de IPTG 0,5mM e incubada a 15C. Para clones que não expressaram adequadamente no protocolo padrão de expressão, algumas outras condições foram testadas visando obter proteínas em quantidade suficiente e em grau de pureza adequado para os testes, especialmente no caso dos clones T4P (seleção com peptídeo) e T1B (seleção com célula CD19+). As condições testadas foram as descritas na tabela 15.

Tabela 15. Condições de expressão testadas para fragmentos anti-CD19

Condição de expressão	Concentração do indutor (IPTG)	Temperatura	Tempo de expressão	Meio de cultura
1	1	15C	16h	TB
2	1	25C	16h	TB
3	1	30C	16h	TB
4	0.5	15C	16h	TB
5	0.5	25C	16h	TB
6	0.5	30C	16h	TB
7	0.3	15C	16h	TB
8	0.3	25C	16h	TB
9	0.3	30C	16h	TB
10	0.5	30C	4h	TB
11	1	30C	4h	TB
12	0.5	15C	16h	LB
13	1	25C	16h	LB

As culturas foram sonicadas conforme descrito no capítulo 1 e submetidas a protocolo de purificação com resina de níquel. A avaliação da expressão foi feita observando-se a presença e intensidade de banda na altura esperada para o scFv em gel de acrilamida. A melhor condição de expressão e purificação também foi testada com protocolo de purificação utilizando tampões A'/B', de composição com fosfato de sódio 20mM, NaCl 300mM, pH 8,0. As sequências purificadas também foram digeridas com enzima ULP-1 para remoção da cauda de solubilidade SUMO.

9.6. Avaliação da interação de sequências scFv a células CD19⁺ por citometria de fluxo

As sequências purificadas foram testadas em células CD19⁺ de maneira semelhante ao protocolo descrito no capítulo 1. As análises também foram feitas em software FlowJo®.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. Amplificação de sequências VH e VL das seleções com peptídeo e célula CD19+

As transformações por eletroporação da biblioteca original tiveram um tempo médio de pulso de 4,32 ns, dentro do sugerido (entre 4-5) para boas eficiências de transformação. Após titulação da biblioteca transformada, foi verificado a presença de $2,6 \times 10^8$ UFC, um valor maior do que a biblioteca original, de $1,64 \times 10^8$ UFC, contemplando, portanto, o repertório desta biblioteca. Abaixo segue tabela (tabela 16) com títulos de fagos utilizados no início e após cada etapa de seleção, que foi utilizado para determinar quantas etapas deveriam ser realizadas até não haver mais enriquecimento de fagos específicos.

Tabela 16. Resumo da titulação de fagos para seleção com peptídeo

Ciclo	Entrada (input)	Saída (output)	E/S (I/O)
R1	$2,2 \times 10^{11}$	$2,63 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$
R2	$1,14 \times 10^{15}$	$6,25 \times 10^4$	$1,8 \times 10^{10}$
R3	$8,2 \times 10^{15}$	$4,95 \times 10^6$	$1,65 \times 10^9$
R4	$4,1 \times 10^{13}$	$5,1 \times 10^3$	8×10^9
R5	$3,6 \times 10^{13}$	$1,09 \times 10^4$	$3,3 \times 10^9$

Foi verificado que, após três etapas de seleção, a quantidade de fagos eluída continuou proporcionalmente baixa em relação aos fagos de entrada, fazendo que a razão E/S (fagos de entrada/fagos eluídos) continuasse constante até diminuir na etapa 5 de seleção (último *round* de seleção executado).

A tabela abaixo (tabela 17) mostra os dados de titulação para a seleção com células.

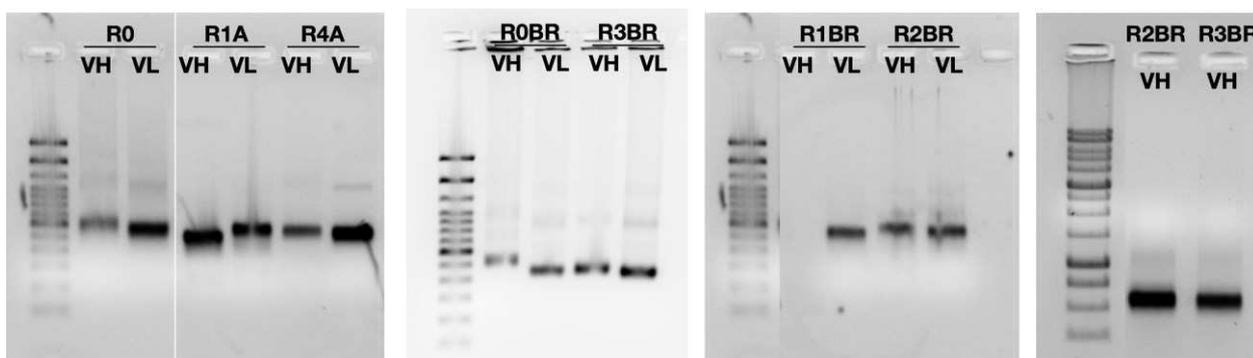
Tabela 17. Resumo da titulação de fagos para seleção com células

Ciclo	Entrada (input)	Saída (output)	E/S (I/O)
R1	$9,4 \times 10^{11}$	$8,9 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6$
R2	$1,36 \times 10^{13}$	$7,96 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
R3	$2,32 \times 10^{12}$	$2,91 \times 10^9$	$1,1 \times 10^3$
R4	$1,06 \times 10^{12}$	$6,64 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$

De forma semelhante a seleção com peptídeo, foi verificado enriquecimento até a etapa 3, com diminuição da quantidade de fagos eluídos a partir da etapa 4. O DNA plasmidial destas

sequências foi amplificado conforme descrito na metodologia e as bandas foram removidas, purificadas e analisadas por NGS. Abaixo segue figura (figura 41) indicando as bandas que foram purificadas.

Figura 41. Fotos dos géis de eletroforese das amplificações de fragmentos VH e VL da seleção anti-CD19



Fonte: elaborado pelo autor. As bandas também foram sequenciadas individualmente por sequenciamento de Sanger após clonagem em vetor pGEM, confirmando a presença de VH e VL a partir da identificação da assinatura de cadeias leve e pesada de anticorpos humanos.

O preparo da amostra foi seguido conforme descrito no capítulo 1, e o resultado da análise de enriquecimento feita pelo ATTILA sugeriu candidatos com enriquecimentos resumido na tabela abaixo (tabela 18).

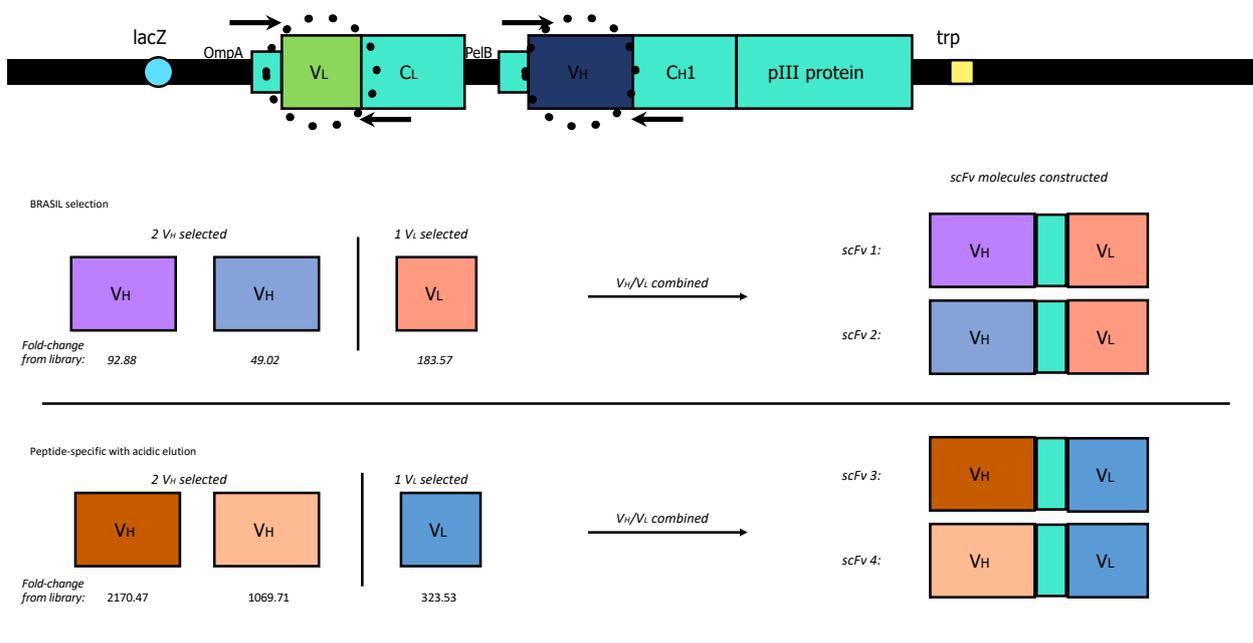
Tabela 18. Resumo dos enriquecimentos encontrados após análise em ATTILA

Seleção	Porção VH		Porção VL	
	Enriquecimento máximo	Enriquecimento mínimo	Enriquecimento máximo	Enriquecimento mínimo
Peptídeo	3582,9621	676,4943	323,5265	156,22
Célula intacta	92,8806	30,9602	183,5717	53,8743

Foi constatado que as sequências enriquecidas na seleção com célula tiveram um *fold-change* significativamente menor do que a seleção com peptídeo. Dado que o uso de células oferece um repertório de epítopos bastante complexo, pode-se explicar que várias sequências foram enriquecidas de forma simultânea. Tal observação faz sentido quando se analisa a diversidade das CDRs, que entre os fragmentos selecionados contra peptídeo são bem semelhantes enquanto as sequências selecionadas com célula são mais variáveis, tanto em sequência quanto em tamanho.

Foram descartadas sequências com CDRs idênticas e duas sequências VH foram selecionadas e combinadas com a sequência VL mais enriquecida, conforme imagem abaixo (figura 42) esquematizando as sequências enriquecidas selecionadas.

Figura 42. Esquematização das sequências candidatas escolhidas para construção de sequências scFv a partir das duas seleções contra CD19



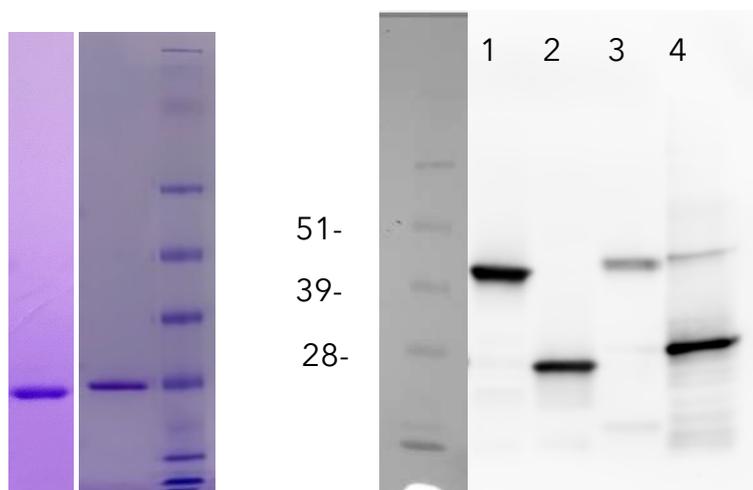
Fonte: elaborado pelo autor. As sequências VH selecionadas foram combinadas com a sequência VL de maior enriquecimento.

As quatro sequências foram submetidas ao protocolo de expressão e purificação descritos no capítulo 1. Todas as sequências também foram sintetizadas com cauda SUMO na porção N-terminal. As duas sequências oriundas da seleção com peptídeo foram nomeadas T2P e T4P, e as duas oriundas da seleção com célula foram nomeadas T1B e T2B.

10.2. Expressão e purificação das sequências candidatas

Apenas T2P e T2B foram expressas de forma satisfatória em sistema bacteriano, como pode ser visto na imagem abaixo (figura 43).

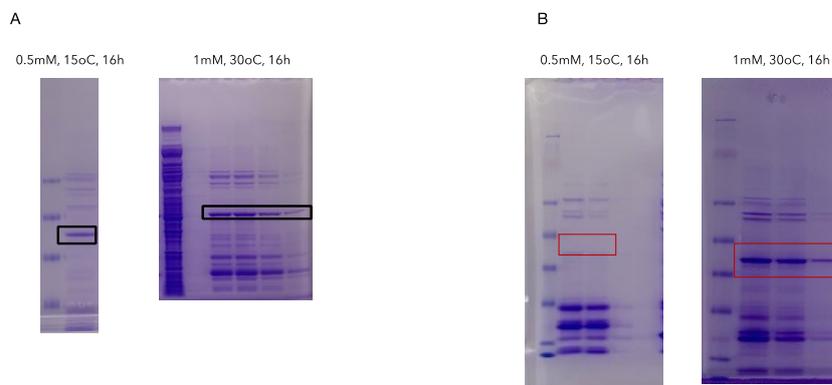
Figura 43. Fotos dos géis de eletroforese e membrana de PVDF dos fragmentos scFv selecionados



Fonte: elaborado pelo autor. Os fragmentos T2P e T2B foram purificados e tiveram a cauda de solubilidade SUMO removida por digestão com enzima ULP-1. Tamanhos esperados para os dois fragmentos antes da digestão com SUMO: T2B (40,2 kDa), T2P (42,3 kDa). Após digestão com ULP-1: T2B: 26,5 kDa, T2P: 28,6 kDa.

As outras duas sequências foram submetidas a protocolo de otimização conforme descrito na metodologia. Apesar da melhora no rendimento observada, não foi suficiente para gerar fragmentos puros o suficiente para teste. A imagem abaixo (figura 44) mostra a melhor condição testada, avaliada em gel de poliacrilamida 12,5%

Figura 44. Fotos dos géis de eletroforese indicando otimização da expressão de T4P e T1B



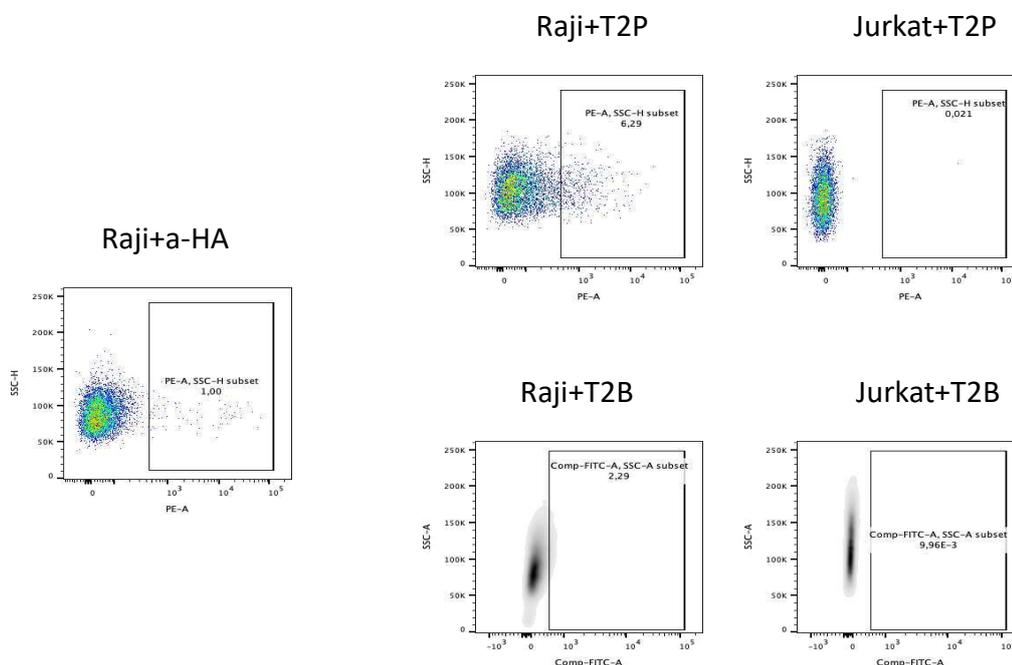
Fonte: elaborado pelo autor. As purificações foram realizadas com tampões A/B. A: testes de expressão e purificação da molécula T4P. B: testes de expressão e purificação da molécula T1B.

Visando obter uma quantidade maior de proteína, otimizações nos protocolos de expressão e purificação podem ser feitas. Foi constatado que durante as etapas de troca de tampão para remoção do imidazol uma grande quantidade de proteína foi perdida, provavelmente devido a agregação no filtro de dialofiltração. Assim, uma estratégia a ser testada no futuro é a eluição pós-cromatografia de afinidade com concentração alta de tampão B em sistema Äkta Pure, visando obter grande parte da proteína-alvo concentrada em poucas frações/tubos. Após isso, a remoção direta do imidazol em coluna de gel filtração pode diminuir a perda de proteínas comparado ao processo de dialofiltração. Este protocolo será testado visando obter uma quantidade maior de proteína em grau de pureza satisfatório. Conforme publicado por Akbari e colaboradores (AKBARI et al., 2015), temperatura, tempo de expressão e concentração de indutor (IPTG) foram as variáveis que mais afetaram a padronização de um scFv de baixa solubilidade, dados que corroboram com os resultados oriundos das diferentes condições de expressão avaliadas.

10.3. Avaliação por citometria de fluxo

Conforme detalhado no capítulo 1, as proteínas T2P e T2B foram avaliadas quanto a sua capacidade de ligação em células CD19⁺ (Raji). A estratégia de *gating* utilizada foi a mesma mostrada na sessão de resultados do capítulo 1. As citometrias foram realizadas três vezes, com bateladas de três expressões diferentes. Abaixo (figura 45) está o resultado de uma das citometrias.

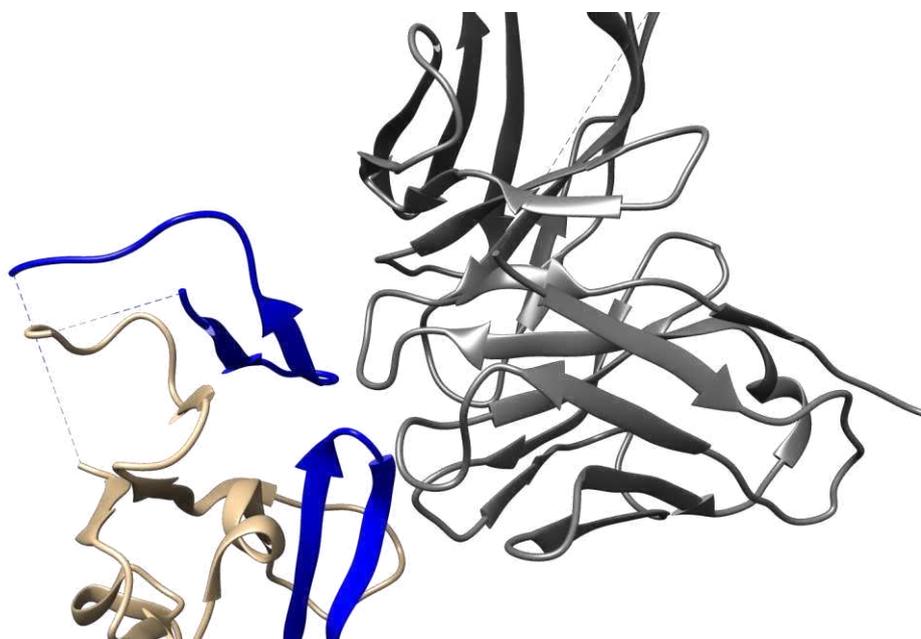
Figura 45. Análise de citometria de fluxo das sequências candidatas



Fonte: elaborado pelo autor. A população positiva foi marcada baseando-se no controle de ligação inespecífica com anticorpo secundário (anti-HA).

As duas proteínas tiveram uma baixa marcação para células Raji (CD19+) e praticamente nenhuma marcação para células Jurkat (CD19-). Como mencionado anteriormente, uma das limitações na avaliação de sequências enriquecidas por NGS é o fato de não se saber qual o par VH-VL correto que foi selecionado a partir da biblioteca. Como foram combinadas sequências diferentes de VH com a mesma sequência VL, é provável que os pares não estejam corretos, o que explicaria o fato de a marcação não ser tão eficaz. Este problema é ainda mais relevante no caso de sequências oriundas da seleção com células, em que outros epítomos do receptor CD19 podem ter sido alvo dos anticorpos presentes na biblioteca, e a combinação de regiões variáveis específicas para epítomos distantes poderia gerar sequências pouco eficazes quanto ao seu potencial de ligação. Em artigo publicado por Klesmith e colaboradores (KLESMITH et al., 2019), foram mapeados epítomos relevantes para os anticorpos comerciais FMC63, 4G7-2E3, 3B10 e B43. Apesar de possuírem epítomos distintos, há regiões de sobreposição relevantes para todos os anticorpos avaliados. Para todos os casos estudados, as regiões de interação não são lineares e envolvem diferentes regiões da porção extracelular do CD19, como exemplificado na figura 46, para o anticorpo FMC63.

Figura 46. Regiões da porção extracelular do CD19 com FMC63



Fonte: elaborado pelo autor a partir da estrutura 7urv. Em cinza, scFv do anticorpo FMC63. Em azul, regiões da porção extracelular do CD19 de interação com FMC63.

O peptídeo desenhado para a seleção realizada é baseado em uma das duas alças de interação com FMC63. Conforme descrito por Klemesmith (2019) e Rougé (2020), diversos anticorpos explorados clinicamente com alta afinidade possuem diferentes pontos de ancoragem e interação. Apesar de algumas regiões peptídicas lineares interagirem com esses anticorpos, como é o caso do rituximabe e seu epítipo canônico ANPSEK, o complexo contexto de interação torna desafiador a obtenção de anticorpos de alta afinidade contra epítipos mais simples, como é o caso de peptídeos pequenos. Para isso, o uso de proteínas inteiras ou regiões peptídicas que componham diferentes alças expostas da proteína alvo podem facilitar o processo de descoberta de novas moléculas para aplicação terapêutica.

As sequências selecionadas serão ainda caracterizadas quanto a sua capacidade de ligação em receptor CD19 por ELISA e interferometria de biocamada. Atualmente o grupo está padronizando a funcionalização de receptores de estreptavidina com o peptídeo biotilado utilizado na seleção por phage display. Além disso, será utilizada proteína de fusão comercial com a porção extracelular do CD19 fusionada a tag de histidina para caracterizar a capacidade de reconhecimento destes fragmentos ao alvo desejado. Ainda, dado que a estrutura deste receptor está depositada em banco de dados (TEPLYAKOV et al., 2018), é possível, com grau de confiabilidade satisfatório, realizar simulações computacionais via docking molecular para

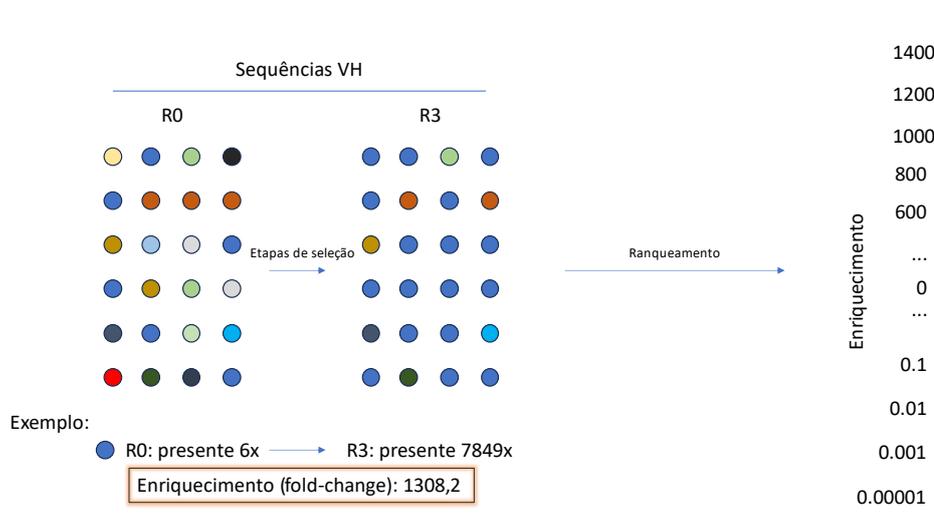
buscar entender qual ou quais epítomos estão envolvidos na interação entre as sequências candidatas e o seu alvo.

10.4. Proposição de novas sequências scFv

Visando testar novas sequências, os dados oriundos do ATTILA foram reanalisados. Considerando que, especialmente para seleção BRASIL, diversos epítomos do CD19 estão disponíveis, a correta proposição de pares VH e VL específicos para os mesmos domínios é essencial para gerar clones funcionais de alta afinidade. Pares VH-VL existentes na biblioteca ao passarem pelo processo de seleção enriquecem na mesma proporção. Apesar de um mesmo VH pode fazer par com diferentes VL, espera-se que tanto o enriquecimento quanto sua frequência sejam proporcionais ao longo das etapas (ciclos) de seleção.

As funções atuais do ATTILA sugerem candidatos baseados em enriquecimento, ranqueando aqueles VHs e VLs com maior ganho de frequência em comparação com a biblioteca original, em um esquema descrito na figura 47.

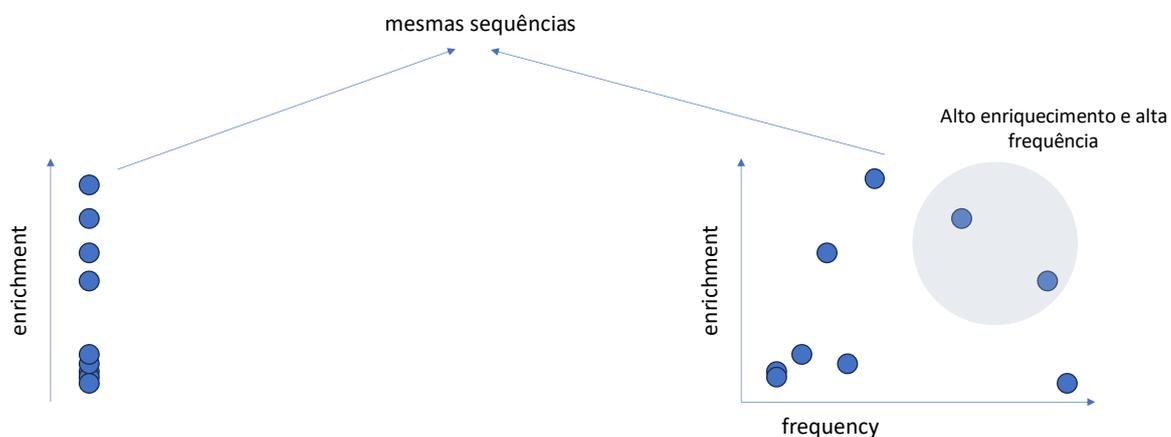
Figura 47. Esquema de ranqueamento de sequências obtidas pelo experimento de phage display



Fonte: elaborado pelo autor. A principal função do ATTILA é de ranquear candidatos com alto enriquecimento, sempre comparando com a biblioteca de origem. Contudo, uma limitação desta metodologia é a correta proposição de pares VH e VL, visto que os enriquecimentos das sequências são gerados separadamente. As sequências (representadas por círculos coloridos) são contadas na etapa final de seleção e na etapa inicial (biblioteca). Após isso, a razão destas frequências é obtida para realizar o ranqueamento.

A fim de propor pares VH-VL que realmente existem na biblioteca, além do enriquecimento, foram utilizados os dados de frequência absoluta em cada etapa de seleção. Para isso, foram utilizados apenas os dados da seleção BRASIL, avaliada em todas as etapas de *biopanning*. Considerando que pares VH-VL possuem enriquecimento e frequência equivalentes ao longo da seleção, foi utilizado uma correlação de Pearson para cada um dos 10 candidatos mais enriquecidos (VH e VL), a fim de propor quais novos pares poderiam ser propostos como scFv, em esquema mostrado na Figura 48.

Figura 48. Esquematização de proposição de scFvs baseado em enriquecimento e frequência

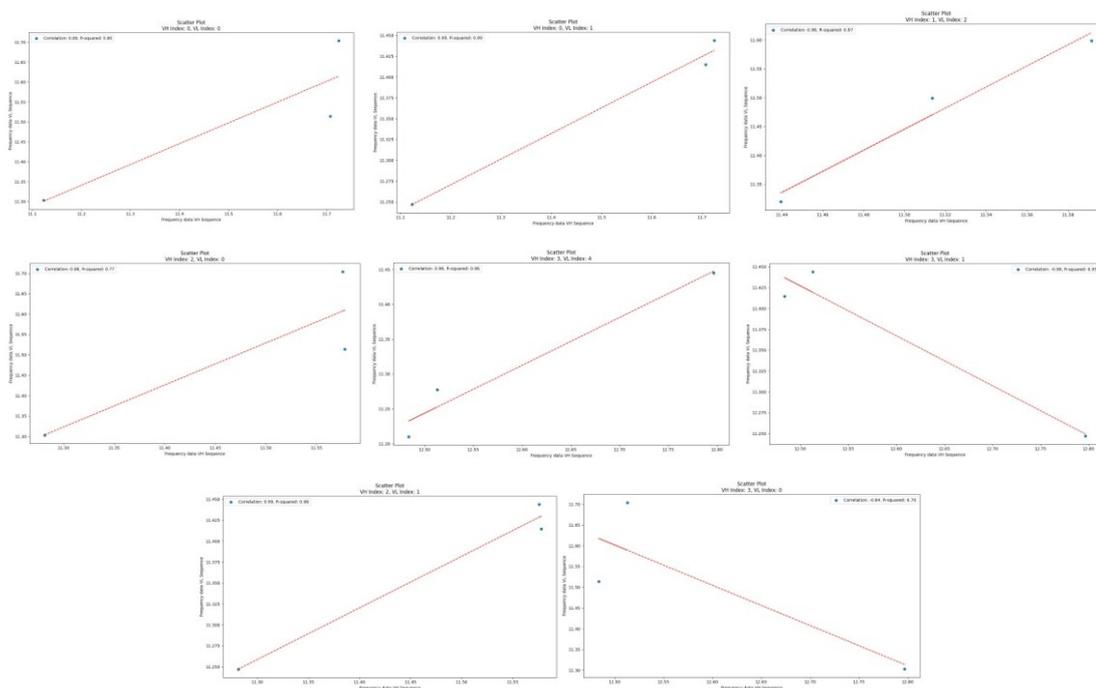


Fonte: elaborado pelo autor. A ferramenta ATTILA propõe os candidatos mais enriquecidos (à esquerda). Ao utilizar também dados de frequência, observa-se sequências que além de altamente enriquecidas, também estão presentes em alta frequência (à direita). Ao longo de diversos ciclos de seleção, as sequências ganhadoras (teoricamente funcionais) têm alto enriquecimento e com ganhos expressivos em frequência (à direita, em destaque). As sequências presentes neste quadrante podem ser utilizadas para proposição de novos scFv.

A correlação de Pearson foi aplicada para os 8 VHs e 8 VLs mais enriquecidos (figura 47), a fim de determinar possíveis correspondências entre tais sequências e, assim, propor pares VH-VL que possam ser funcionalmente viáveis.

Avaliando o padrão de evolução da frequência ao longo das etapas de seleção dos VH e VL mais enriquecidos, foi possível observar a correlação entre determinadas sequências, conforme mostrado na figura 49.

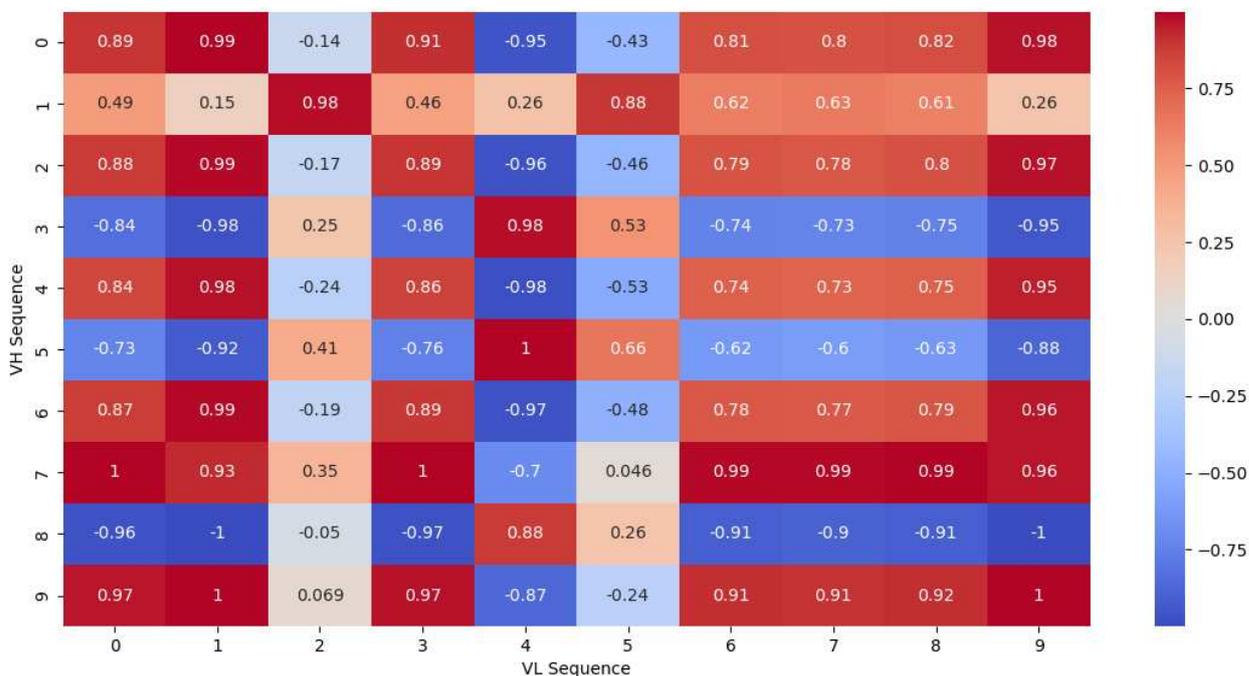
Figura 49. Gráficos de correlação de frequência de VH e VL com alto enriquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. Evolução da frequência de pares VH e VL com alto enriquecimento. A linha de regressão representa a relação entre a variável frequência das duas seqüências em questão, nas três etapas de seleção em questão. Espera-se que a frequência de seqüências relevantes aumente ao longo das etapas e, para seqüências correlatas e com pares existentes na biblioteca, o ganho de frequência seja proporcional.

Ainda, foi possível gerar um mapa de calor com os pares existentes mais prováveis, de acordo com o padrão de enriquecimento de cada VH e VL (figura 50).

Figura 50. Gráfico de calor para pares VH e VL com alto enriquecimento



Fonte: elaborado pelo autor. A partir de dados de evolução de frequência, pode-se propor quais pares VH e VL são mais prováveis de existir, pertencentes à mesma sequência selecionada. Tal análise pode ser relevante para antígenos complexos, como proteínas completas em células.

Mais de uma sequência VL possui alta correlação com algumas sequências VH. Tal fato pode ser explicado pela alta identidade entre as sequências VL e também pela possibilidade de um mesmo VL poder fazer par com mais de um VH. Após reanálise dos dados, foi verificado que os pares VH-VL testados não possuíam alta correlação, e podem não serem oriundos do fragmento de anticorpo selecionado (no caso desta biblioteca CD19, do tipo Fab). Como aprimoramento do *pipeline* de seleção, novas sequências podem ser testadas a fim de obter anticorpos funcionais de alta afinidade.

11 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com a análise obtida pelo ATTILA, foram sugeridas diversas sequências candidatas para os alvos baseados em CD19 oriundos da seleção com peptídeo mimético e de receptor expresso em células eucarióticas. Algumas das sequências selecionadas não foram expressas de forma satisfatória, sendo uma das limitações do sistema bacteriano de expressão, que demanda uma etapa de padronização. Além disso, as duas sequências testadas tiveram baixa marcação em células CD19+. Ferramentas computacionais podem ser utilizadas visando avaliar a interação entre outras sequências candidatas e o receptor CD19. Não há anticorpos monoclonais ou imunoterápicos baseados em anticorpos contra o alvo CD19 de origem humana

aprovados para uso terapêutico até esta data, apesar de existirem vários candidatos em estudos clínicos. Tal fato demonstra a dificuldade de obter sequências totalmente humanas contra este alvo, que vem sendo explorado em diversas imunoterapias.

Diversos artigos descritos na literatura utilizam células e peptídeos como metodologia de seleção de fragmentos de anticorpos contra alvos associados a tumores. As etapas de caracterização avaliam as sequências candidatas pelas mesmas metodologias padrão descritas neste trabalho, além de outras, como: ELISA, western blotting, citometria de fluxo e interferometria de biocamada. Diversas sequências candidatas geralmente são testadas, uma vez que problemas como sequências inespecíficas, proposição errônea de pares VH:VL e sequências específicas, mas com características cinéticas insatisfatórias podem dificultar a proposição de bons candidatos.

A partir dos dados gerados pelo NGS, duas técnicas podem ser utilizadas para sugerir pares corretos a partir de bibliotecas de Fab e scFv, como revisado por Moura-Sampaio e colaboradores (MOURA-SAMPAIO et al., 2022): avaliação de correspondência da frequência de VH e VL em cada etapa de seleção e dados baseados nas coordenadas (posição XY) na *flow cell* sequenciada. A primeira técnica se baseia no fato de que sequências VH/VL de frequência ou enriquecimento similares pertençam ao mesmo anticorpo selecionado. Já a segunda, busca identificar e combinar sequências VH e VL sequenciadas na mesma posição física na *flow cell* do kit de sequenciamento. A segunda técnica mostrou-se mais robusta, provando que o real par VH e VL muitas vezes não é considerado ou montado corretamente a partir de dados de NGS. Assim, novas sequências devem ser testadas seguindo o *pipeline* proposto neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Rituximab, Anti-CD20, Induces In Vivo Cytokine Release But Does Not Impair Ex Vivo T-Cell Responses. **American Journal of Transplantation**, v. 4, n. 8, p. 1357–1360, ago. 2004.
- AHMADZADEH, V. et al. Design, expression and characterization of a single chain anti-CD20 antibody; a germline humanized antibody derived from Rituximab. **Protein Expression and Purification**, v. 102, p. 45–51, out. 2014.
- AKBARI, V. et al. Optimization of a single-chain antibody fragment overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 75–83, 2015.
- AWAN, F. T. et al. CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain–engineered monoclonal antibody. **Blood**, v. 115, n. 6, p. 1204–1213, 11 fev. 2010.
- BARBAS, C. F. et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 18, p. 7978–7982, 15 set. 1991.
- BEZERRA, M. R. L. EVOLUÇÃO DIRIGIDA DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL RITUXIMABE: CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA PARA SELEÇÃO DE MOLÉCULAS ANTI-CD20 COM ALTA AFINIDADE VIA PHAGE DISPLAY. 2019.
- BLASCO, H. et al. Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 325, n. 1–2, p. 127–139, ago. 2007.
- CADWELL, R. C.; JOYCE, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **Genome Research**, v. 2, n. 1, p. 28–33, ago. 1992.
- CHEN, Y. et al. Optimization of anti-CD20 humanized antibody hu8E4 by site-directed mutation based on epitope analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 4, p. 617–622, abr. 2015.
- CHURCH, A. K. et al. Anti-CD20 monoclonal antibody-dependent phagocytosis of chronic lymphocytic leukaemia cells by autologous macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 183, n. 1, p. 90–101, 22 dez. 2015.
- DALAKAS, M. C. B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 4, n. 10, p. 557–567, out. 2008.
- DE-SOUZA, M.; MARCELO DE MACEDO BRÍGIDO; ANDREA QUEIROZ MARANHÃO. **Técnicas básicas em biologia molecular**. 2nd. ed. [s.l.] Universidade de Brasília, 2016.
- DEANS, J. P.; LI, H.; POLYAK, M. J. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts: CD20-mediated apoptosis and lipid rafts. **Immunology**, v. 107, n. 2, p. 176–182, 16 out. 2002.

DONJERKOVIĆ, D.; SCOTT, D. W. Activation-induced cell death in B lymphocytes. **Cell Research**, v. 10, n. 3, p. 179–192, set. 2000.

DU, J. et al. Structural Basis for Recognition of CD20 by Therapeutic Antibody Rituximab. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 15073–15080, maio 2007.

ESCOLANO, A. et al. Sequential Immunization Elicits Broadly Neutralizing Anti-HIV-1 Antibodies in Ig Knockin Mice. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1445–1458.e12, set. 2016.

EVANS, R.; THURBER, G. M. Design of high avidity and low affinity antibodies for in situ control of antibody drug conjugate targeting. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 7677, 10 maio 2022.

FOLTZ, I. N.; KAROW, M.; WASSERMAN, S. M. Evolution and Emergence of Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Cardiologists Need to Know. **Circulation**, v. 127, n. 22, p. 2222–2230, 4 jun. 2013.

FULTON, K. M.; TWINE, S. M. (EDS.). **Immunoproteomics: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 2024

GIORDANO, R. J. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nature Medicine**, v. 7, n. 11, p. 1249–1253, nov. 2001.

GRAM, H. et al. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 8, p. 3576–3580, 15 abr. 1992.

GRIFFITHS, A. D. et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 14, p. 3245–3260, jul. 1994.

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

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

HARRIS, U. J.; LARSON, S. B.; MCPHERSON, A. Comparison of Intact Antibody Structures and the Implications for Effector Function. Em: **Advances in Immunology**. [s.l.] Elsevier, 1999. v. 72p. 191–208.

HAUSER, S. L. et al. Safety experience with continued exposure to ofatumumab in patients with relapsing forms of multiple sclerosis for up to 3.5 years. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 28, n. 10, p. 1576–1590, set. 2022.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126–1136, 1 set. 2005.

HOOGENBOOM, H. R. et al. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 15, p. 4133–4137, 1991.

HORTON, H. M. et al. Potent *In vitro* and *In vivo* Activity of an Fc-Engineered Anti-CD19 Monoclonal Antibody against Lymphoma and Leukemia. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 8049–8057, 1 out. 2008.

HUANG, J. X.; BISHOP-HURLEY, S. L.; COOPER, M. A. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4569–4582, set. 2012.

ILLUMINA. **16S Metagenomic Sequencing Library Preparation**. Illumina, , [s.d.].

Instituto Nacional do Câncer - 2022 - Estimativa 2023. Incidência de câncer no Brasil.pdf, [s.d.].

JARMOSKAITE, I. et al. How to measure and evaluate binding affinities. **eLife**, v. 9, p. e57264, 6 ago. 2020.

KLEIN, C. et al. Epitope interactions of monoclonal antibodies targeting CD20 and their relationship to functional properties. **mAbs**, v. 5, n. 1, p. 22–33, jan. 2013.

KLESMITH, J. R. et al. Fine Epitope Mapping of the CD19 Extracellular Domain Promotes Design. **Biochemistry**, v. 58, n. 48, p. 4869–4881, 3 dez. 2019.

LI, B. et al. Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma. **Blood**, v. 114, n. 24, p. 5007–5015, 3 dez. 2009.

LI, D. et al. Directed evolution of a picomolar-affinity, high-specificity antibody targeting phosphorylated tau. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 31, p. 12081–12094, ago. 2018.

LIU, C. et al. Clinical cancer immunotherapy: Current progress and prospects. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 961805, 11 out. 2022.

LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 91, 2008.

LUO, C. et al. Efficacy and safety of new anti-CD20 monoclonal antibodies versus rituximab for induction therapy of CD20+ B-cell non-Hodgkin lymphomas: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3255, 5 fev. 2021.

MARANHÃO, A. Q. et al. Discovering Selected Antibodies From Deep-Sequenced Phage-Display Antibody Library Using ATTILA. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 117793222091524, jan. 2020.

MOURA-SAMPAIO, J. et al. Reconstruction of full antibody sequences in NGS datasets and accurate VL:VH coupling by cluster coordinate matching of non-overlapping reads. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 2723–2727, 2022.

MÜLLER, T. et al. Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 57, n. 3, p. 411–423, mar. 2008.

- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 7, p. 552–565, 1 jul. 2003.
- PAUL, F.; CARTRON, G. Infusion-related reactions to rituximab: frequency, mechanisms and predictors. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 4, p. 383–389, 3 abr. 2019.
- RAFAEL, M. Immunotherapy for Cancer - NCI. [s.d.].
- ROUGÉ, L. et al. Structure of CD20 in complex with the therapeutic monoclonal antibody rituximab. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1224–1230, 13 mar. 2020.
- SALLES, G. et al. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 21, n. 7, p. 978–988, jul. 2020.
- SEYFIZADEH, N. et al. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 97, p. 275–290, jan. 2016.
- SHAMS, N. et al. Isolation and characterization of human anti-CD20 single-chain variable fragment (scFv) from a Naive human scFv library. **Medical Oncology**, v. 39, n. 11, p. 177, 23 ago. 2022.
- SINGH, V. et al. Surface Levels of CD20 Determine Anti-CD20 Antibodies Mediated Cell Death In Vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111113, 3 nov. 2014.
- SMITH, G. P. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 14 jun. 1985.
- SMITH, M. R. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7359–7368, 20 out. 2003.
- SOUSA-PIMENTA, M. et al. Oxidative Stress and Inflammation in B-Cell Lymphomas. **Antioxidants**, v. 12, n. 4, p. 936, 15 abr. 2023.
- TEDDER, T. F.; INAOKI, M.; SATO, S. The CD19–CD21 Complex Regulates Signal Transduction Thresholds Governing Humoral Immunity and Autoimmunity. **Immunity**, v. 6, n. 2, p. 107–118, fev. 1997.
- TEPLYAKOV, A. et al. Crystal structure of B-cell co-receptor CD19 in complex with antibody B43 reveals an unexpected fold. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 86, n. 5, p. 495–500, maio 2018.
- The humoral immune response. In: Janeway’s immunobiology. n. 7, 2010.
- The molecular basis of antibody formation: a paradox. [s.d.].
- TOBIAS, R. Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform. [s.d.].
- TOBIAS, R. Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform. **Fortébio**, v. 1, [s.d.].

VANDER MAUSE, E. R. et al. Roadmap to affinity-tuned antibodies for enhanced chimeric antigen receptor T cell function and selectivity. **Trends in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 875–890, jul. 2022.

VANDER MAUSE, E. R. et al. Systematic single amino acid affinity tuning of CD229 CAR T cells retains efficacy against multiple myeloma and eliminates on-target off-tumor toxicity. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 705, p. eadd7900, 19 jul. 2023.

YANG, W. et al. Next-generation sequencing enables the discovery of more diverse positive clones from a phage-displayed antibody library. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 3, p. e308–e308, 24 mar. 2017.

YU, X. et al. Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody agonism. **Nature**, v. 614, n. 7948, p. 539–547, 16 fev. 2023.

ZENT, C. S. et al. Rituximab Induces an Inflammatory Cytokine Response with Increased IP-10 (CXCR10) in Patients with Infusion Reactions. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 4171–4172, 15 nov. 2022.