



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

JÚLIA NOGUEIRA DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS Fv-Fc
DERIVADOS DO RITUXIMABE COM A PROTEÍNA DE MEMBRANA CD20**

**FORTALEZA
2025**

JÚLIA NOGUEIRA DA COSTA

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS Fv-Fc
DERIVADOS DO RITUXIMABE COM A PROTEÍNA DE MEMBRANA CD20

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Coelho da
Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado

FORTALEZA

2025

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)

C873a Costa, Júlia Nogueira da.

Avaliação da interação de fragmentos de anticorpos Fv-Fc derivados do Rituximabe com a proteína de membrana CD20 / Júlia Nogueira da Costa. – 2025.

48 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. Engenharia de anticorpos.
2. Fragmentos de anticorpos Fv-Fc.
3. Rituximabe.
4. Análise funcional.
5. Imunoterapia.

I. Título.
CDD 661

JÚLIA NOGUEIRA DA COSTA

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPOS Fv-Fc
DERIVADOS DO RITUXIMABE COM A PROTEÍNA DE MEMBRANA CD20

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia

Aprovada em: 25/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dr^a. Larissa Queiroz Pontes
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos)

A minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo e pela força para perseverar ao longo desta jornada, conciliando-a com tantos outros desafios enfrentados neste período.

Aos meus pais – Liduina e Mauro - cujo apoio incondicional e dedicação foram fundamentais para que eu pudesse trilhar este caminho. Foram meus maiores incentivadores, proporcionando não apenas as oportunidades necessárias para meu crescimento, mas também um alicerce de amor e valores. Sua confiança em mim, mesmo nos momentos em que eu própria duvidava, foi essencial para que eu chegassem até aqui. Sou profundamente grata pela compreensão, pelo cuidado e pela presença constante, mesmo diante das dificuldades.

À minha irmã, Luiza, com quem compartilho os pesares e a leveza da vida. Seu apoio genuíno, seus conselhos sinceros e sua capacidade de me incentivar a buscar sempre o melhor de mim mesma foram indispensáveis ao longo dessa trajetória. Sua visão crítica e seu afeto me fazem crescer não apenas como profissional, mas também como ser humano.

Ao meu namorado, João, que se tornou família. Obrigada pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis e por ser um pilar de força e segurança. Sou grata pela parceria, pelo suporte e pela felicidade que traz para minha vida!

Às minhas primas Mariana e Luciana, por terem incentivado desde cedo minha curiosidade e meu espírito questionador. Às minhas avós Aldenir, Maria e Edna, por todo o carinho e proteção. Aos meus primos Celina e Joaquim que com sua alegria tornaram os dias difíceis mais leves.

Aos amigos que a biotecnologia me presenteou, sou grata por nossas trajetórias terem se cruzado e pelo convívio diário que tornou essa experiência acadêmica mais enriquecedora e leve. Agradeço especialmente a Beatriz Bezerra de Macêdo e Maria Eduarda Guedes Onofre cujo acolhimento e amizade foram essenciais em diversos momentos. Obrigada pela parceria, pelo apoio constante e pelas lições que me ensinaram dentro e fora do laboratório. À Duda, pelo incentivo, pela generosidade ao compartilhar conhecimento e pelas inúmeras vezes em que esteve ao meu lado, inclusive viabilizando minhas atividades na Fiocruz. À Bia, pelo exemplo de integridade e pela inspiração para acreditar nos meus ideais e ocupar todos os espaços com autenticidade.

À excelente orientação do Dr. Gilvan Pessoa Furtado, conduzida com tanta educação e respeito. Obrigada por acreditar no meu trabalho e me dar espaço em um grupo tão relevante cientificamente.

Aos meus colegas de laboratório da Fiocruz Ceará, pelas discussões científicas, apoio cotidiano e momentos de descontração. Um agradecimento especial à Larissa Queiroz Pontes pelo acolhimento desde minha chegada à Fiocruz, pela paciência e generosidade ao compartilhar seu conhecimento, e por acreditar no meu potencial, proporcionando oportunidades que contribuíram significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico. Ao Marcus Rafael Lobo Bezerra, pela orientação contínua, pela valorização da criatividade e do pensamento crítico ao longo do trabalho e pesquisa, e pela amizade construída nesse processo.

Às Agências de Fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

RESUMO

O Rituximabe foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para tratamento oncológico, tendo como alvo a proteína CD20, expressa em linfócitos B e ausente em plasmócitos e células-tronco hematopoiéticas. Ele é amplamente utilizado no tratamento da leucemia linfocítica crônica e dos linfomas não-Hodgkin (LNH), doenças que, juntas, representam um número significativo de casos oncológicos no Brasil. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), entre 2023 e 2025, estima-se que ocorram anualmente cerca de 11.450 novos casos de leucemia e 12.040 de LNH, dentro de um total de aproximadamente 704 mil novos diagnósticos de câncer por ano. Esses dados ressaltam a importância das terapias baseadas em anticorpos monoclonais (mAbs). Apesar do uso consolidado do Rituximabe, sua eficácia pode ser aprimorada por meio da engenharia de anticorpos, incluindo a geração de fragmentos variáveis de cadeia única (scFv's). Esses fragmentos são menores, mais fáceis de manipular em laboratório e apresentam uma produção mais econômica. Além disso, podem ser otimizados por evolução dirigida e selecionados via *phage display* para, posteriormente, serem fusionados a Fragmentos Cristalizáveis (Fc). O fragmento resultante, denominado fragmento variável fusionado ao fragmento cristalizável (Fv-Fc), permite avaliar tanto a capacidade de reconhecimento e ligação ao antígeno quanto a ativação de funções efetoras imunológicas. Tendo isso em vista, este estudo teve como objetivo avaliar de forma comparativa a capacidade de ligação antígeno-específica, expresso na superfície celular, de dois fragmentos Fv-Fc derivados do Rituximabe: um com a sequência original e outro contendo uma mutação projetada para aumentar sua afinidade pelo CD20. Os fragmentos foram expressos em células CHO e purificados por cromatografia. As interações com o CD20 foram avaliadas por citometria de fluxo, utilizando diferentes concentrações dos fragmentos Fv-Fc nativo e mutante. Os Fv-Fc foram obtidos de maneira satisfatória, e os resultados indicaram que o fragmento Fv-Fc mutante apresentou uma capacidade significativamente maior de interação com o CD20. Além disso, não foram observadas interações inespecíficas relevantes, conforme demonstrado pela baixa marcação de células CD20⁻, mesmo nas concentrações mais altas de Fv-Fc testadas. Esses achados sugerem que a mutação introduzida nos scFv's pode contribuir tanto para a especificidade do reconhecimento antigênico quanto para um possível aumento da afinidade da molécula mutante pelo alvo.

Palavras-chave: Rituximabe; Fv-Fc; engenharia de anticorpos; capacidade de ligação

ABSTRACT

Rituximab was the first monoclonal antibody approved for oncological treatment, targeting the CD20 protein, which is expressed on B lymphocytes but absent in plasma cells and hematopoietic stem cells. It is widely used in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and non-Hodgkin's lymphomas (NHL), diseases that together account for a significant number of cancer cases in Brazil. According to the National Cancer Institute (INCA), between 2023 and 2025, approximately 11,450 new cases of leukemia and 12,040 cases of NHL are expected annually, within a total of approximately 704,000 new cancer diagnoses per year. These data highlight the importance of monoclonal antibody (mAb)-based therapies. Despite the established use of Rituximab, its efficacy can be enhanced through antibody engineering, including the development of single-chain variable fragments (scFvs). These fragments are smaller, easier to manipulate in the laboratory, and more cost-effective to produce. Additionally, they can be optimized through directed evolution and selected via phage display, subsequently being fused to crystallizable fragments (Fc). The resulting fragment, termed a variable fragment fused to the crystallizable fragment (Fv-Fc), enables the assessment of both antigen recognition and binding capacity as well as the activation of immune effector functions. In this context, this study aimed to comparatively evaluate the antigen-specific binding capacity of two Fv-Fc fragments derived from Rituximab, expressed on the cell surface: one with the original sequence and another containing a mutation designed to enhance its affinity for CD20. The fragments were expressed in CHO cells and purified by chromatography. Their interactions with CD20 were assessed via flow cytometry using different concentrations of both the native and mutant Fv-Fc fragments. The Fv-Fc fragments were successfully obtained, and the results indicated that the mutant Fv-Fc fragment exhibited significantly higher interaction capacity with CD20. Moreover, no relevant nonspecific interactions were observed, as demonstrated by the low staining of CD20- cells, even at the highest tested Fv-Fc concentrations. These findings suggest that the introduced mutation in the scFvs may contribute both to antigen recognition specificity and to a potential increase in the mutant molecule's affinity for its target.

Keywords: Rituximab; Fv-Fc; Antibody Engineering; Binding Capacity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática e estrutura cristalina de uma molécula de anticorpo (IgG) secretada	15
Figura 2 - Estrutura de um domínio de Imunoglobuliana	16
Figura 3 – Principais classes de anticorpos	17
Figura 4 - Mecanismos de ação de mAbs não conjugados.....	21
Figura 5 -Interação molecular entre moléculas de CD20 e fragmentos Fab derivados do Rituximabe	23
Figura 6 - Exemplos de fragmentos de anticorpos e potencias aplicação terapêuticas dessas moléculas	27
Figura 7 - Mapa do vetor molecular construído para expressão recombiante dos Fv-Fcs em plataforma eucariótica	30
Figura 8 - Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos Fv-Fcs purificados por cromatografia de afinidade e por SEC.....	36
Figura 9 - Imunodetecção por western blotting dos FvFcs WT e e Mut	37
Figura 10 - Estratégia de agrupamento utilizada para isolar as populações celulares de interesse	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Relação entre a massa de FvFc WT e Mut utilizada na marcação e as leituras de Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) obtidas para cada um desses valores.....	39
Gráfico 2 - Comparação do deslocamento de Fluorescência gerada para cada quantidade de massa de FvFc WT e Mut utilizada na marcação das células CD20+.....	39
Gráfico 3 - Comparação da Marcação Celular pelos Fragmentos de Anticorpo FvFc WT e FvFc Mut	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente do Anticorpo
ADCP	Citotoxicidade Dependente de Fagocitose
BCR	Receptor de células B
BiTE	<i>Bispecific T-cell Engager</i>
CAR	Receptor Químérico de Antígeno
CDC	Citotoxicidade Celular dependente do Complemento
CDR	Regiões Determinante de Complementariedade
C _H	Domínio constante da cadeia pesada
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
C _L	Domínio constante da cadeia leve
CTLA	Proteína 4 associada ao Linfócito T Citotóxico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
Fc	Fragmento Cristalizável
FcR	Receptores da porção Fc
FcRn	Receptor Neonatal Fc
FDA	Food and Drug Administration
Fv	Fragmento variável
HC	Cadeia pesados anticorpos
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
Ig	Imunoglobulinas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K _D	Constante de afinidade
LB	Luria Bertani
LC	Cadeia leve dos anticorpos
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
mAbs	Anticorpos Monoclonais
NK	Células Natural Killer
pAbs	Anticorpos policlonais
PBS	Phosphate Buffer Solution
PD-1	Proteína de Morte Celular Programada 1
RPM	Rotações por Minuto

SBF	Soro Bovino Fetal
scFv's	Single Chain Fragment Variable
scFv-Fc	scFv fusionado ao fragmento cristalizável
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEC	Cromatografia por Exclusão Molecular
VC	Volume de Coluna
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
V _H	Domínio variável da cadeia pesada
V _L	Domínio variável da cadeia leve
WT	<i>Wild-Type</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µ	Micro
Da	Daltons
g	Gramas
k	Quilo
L	Litro
m	Mili
™	<i>Trade Mark</i>
η	Nano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Anticorpos: estrutura função e importância biológica	4
1.2 Anticorposmonoclonais como estratégia terapêutica	17
1.3 Aplicação oncológica dos mAbs	19
1.3.1 Rituximabe: terapia anti-CD20	22
1.4 Engenharia de proteínas: enfoque no desenvolvimento de novos mAbs.....	24
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Transformação de <i>E.coli</i> TOP 10 com os plasmídeos contendo os genes que codificam os fragmentos de anticorpos	28
3.2 Expressão de proteínas em plataforma eucariótica.....	29
3.3 Purificação das proteínas recombinantes	30
3.4 <i>Western blotting</i>	31
3.5 Avaliação da capacidade de interação com o CD20 na superfície celular.....	31
3.5.1 Cltura celular.....	31
3.5.2 Marcação das células para citometria de fluxo	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos recombinantes	34
4.2 Wstern blotting.....	35
4.3 Avaliação da capacidade de interação com o CD20 na superfície celular.....	36
5 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	42

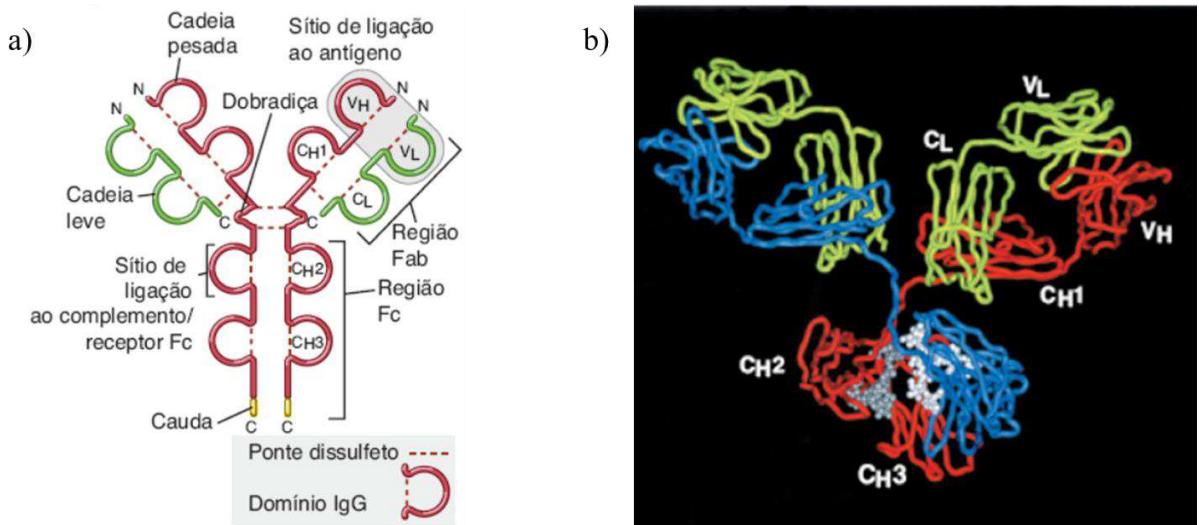
1 INTRODUÇÃO

1.1 Anticorpos: estrutura; função e importância biológica

Os anticorpos são glicoproteínas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas (Ig) que são produzidas pelo sistema imunológico em resposta a estruturas ou substâncias entrinhas ao organismo, denominadas de antígenos. Eles são capazes de reconhecer com notável especificidade regiões antigênicas específicas, os epítulos ou determinantes antigênicos (ABBAS, 2022). Após essa identificação, os anticorpos desempenham suas funções efetoras pela interação com diferentes células e componentes do sistema imune, ativando-os para eliminar os agentes nocivos.

A relação entre estrutura e função dos anticorpos é resultado de uma organização molecular altamente conservada e modular. Cada molécula de anticorpo exibe uma estrutura quaternária simétrica em formato de “Y”, composta por duas cadeias leves (LC, do inglês *Light Chain*) e por duas cadeias pesadas (HC, do inglês *Heavy Chain*) idênticas entre si (Figura 1). Cada heterodímero HC-LC é mantido conectado por ligações dissulfeto. Tanto as cadeias leves, quanto as pesadas são formadas por domínios globulares com sequências de cerca 110 aminoácidos de comprimento e que se dobram independentemente, denominados domínios de imunoglobulina (CHIU et al., 2019). Esses domínios correspondem aos motivos estruturais dos anticorpos e cada um deles é composto por duas camadas de folhas-β pregueadas, que por sua vez são formadas por três a cinco fitas polipeptídicas antiparalelas. Essas camadas são mantidas unidas por uma ponte dissulfeto, e as fitas adjacentes em cada folha-β são conectadas por pequenas alças. Isso garante aos anticorpos resistência conformacional e flexibilidade funcional.

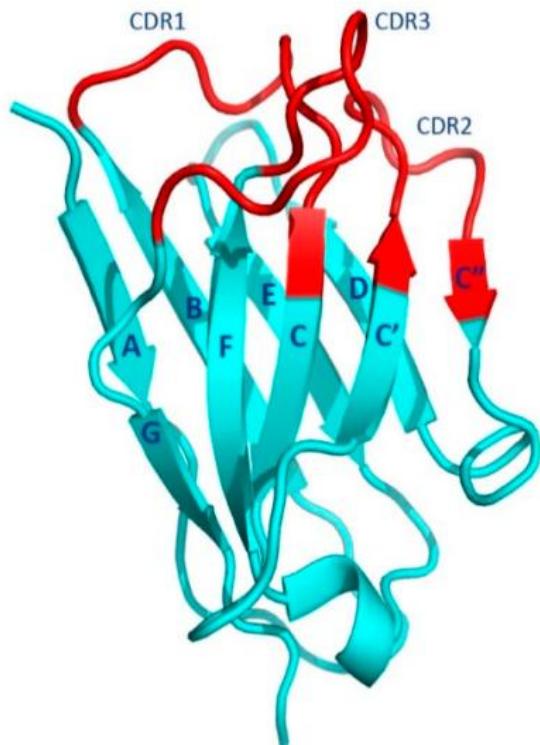
Figura 1- Representação esquemática e estrutura cristalina de uma molécula de anticorpo (IgG) secretada



Fonte: ABBAS, 2022. A imagem (a) apresenta um diagrama esquemático de uma imunoglobulina da classe IgG humana, destacando as cadeias leves (verde) e pesadas (vermelho), além das regiões funcionais Fab e Fc. Já a imagem (b) exibe a estrutura tridimensional de uma IgG humana, representada por um diagrama de fitas obtido por cristalografia de raios X. As cadeias pesadas estão diferenciadas por cores (vermelho e azul), enquanto as cadeias leves são mostradas em verde. Também são visíveis carboidratos (cinza) ligados às cadeias pesadas.

A existência de sequências N-terminais variáveis (V) entre as diferentes moléculas de anticorpo é um aspecto estrutural associado à função primária de reconhecimento de determinantes antigenicos específicos por cada molécula de imunoglobulina. O pareamento entre as porções variáveis da cadeia leve (V_L , do inglês *Variable Light*) e pesada (V_H , do inglês *Variable Heavy*) formam o sítio de reconhecimento do antígeno ou fragmento variável (Fv, do inglês *Fragment Variable*). Além disso, a maior parte dessa diversidade está contida em três trechos curtos de aproximadamente 10 aminoácidos dessas regiões, chamadas de regiões hipervariáveis ou regiões dependentes de complementariedade (CDRs, do inglês *Complementarily-Determining Regions*). Elas correspondem às três alças protuberantes que conectam as fitas polipeptídicas adjacentes das folhas β nas quais os domínios de Ig que compõem V_H e V_L se dobraram, sendo intercaladas por regiões de *framework* (FWR). Dessa forma, tanto os domínios V da cadeia pesada, quanto da cadeia leve apresentam 3 CDRs distintas cada: CDR1, CDR2 e CDR3, totalizando 6 CDRs por sítio de ligação ao antígeno (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura de um domínio de Imunoglobuliana



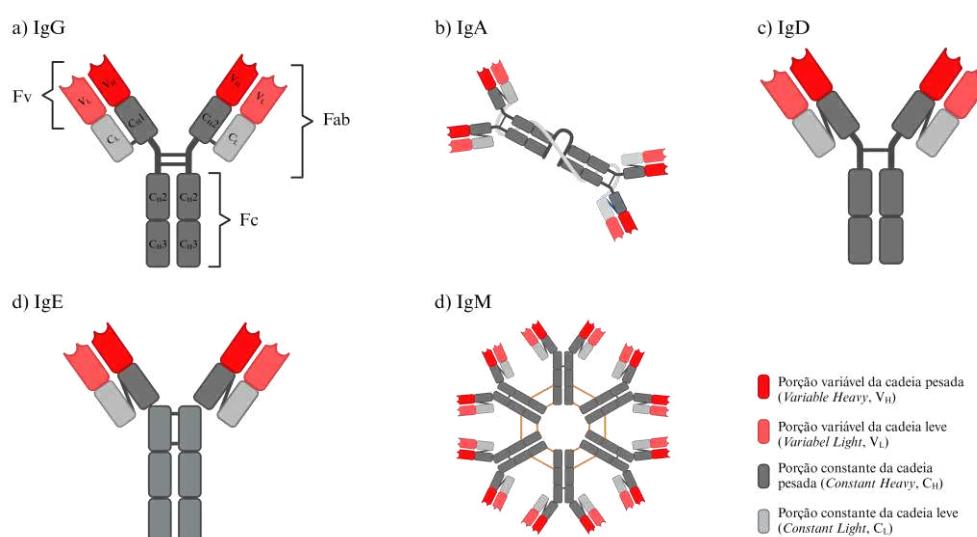
Fonte: Adaptado de CHIU et al., 2019. Estrutura do domínio variável da cadeia pesada (V_H): a imagem em fita (ciano e vermelho) destaca o padrão de dobramento característico das imunoglobulinas (V_H do Fab 388, PDB ID: 5i1a), com as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) em vermelho.

Essa variabilidade é resultado de processos moleculares únicos que ocorrem durante o desenvolvimento dos linfócitos B, células especializadas na produção de anticorpos. O primeiro desses processos é o rearranjo de segmentos gênicos de variedade (V), de diversidade (D) e de junção (J), conhecido como rearranjo V(D)J (TONEGAWA, 1983). Esse mecanismo acontece nos órgãos linfoides primários, especificamente na medula óssea, enquanto os linfócitos B ainda estão imaturos. O rearranjo dos genes que codificam as regiões variáveis das cadeias leve e pesada dos anticorpos resulta na expressão dos receptores de células B (BCRs, do inglês *B Cell Receptors*) na superfície da membrana plasmática. Após a ativação desses linfócitos por um antígeno específico, um segundo mecanismo contribui para a geração de ainda mais diversidade: a hipermutação somática. Esse processo ocorre nos órgãos linfoides secundários, como os linfonodos e o baço, e consiste na introdução de mutações pontuais nas regiões variáveis dos genes dos anticorpos. A hipermutação somática permite o refinamento da afinidade dos anticorpos pelos antígenos, resultando em uma resposta imune mais eficaz. Como resultado, o repertório imune humano é altamente diverso e

individualizado, como observado por BRINEY e colaboradores (BRINEY et al., 2019) que estimaram a existência de sequências únicas de fragmentos Fv da ordem de 10^{16} a 10^{18} .

As cadeias pesadas e leves dos anticorpos possuem sequências de aminoácidos conservadas entre as diferentes moléculas, denominadas porções constantes. Enquanto os domínios variáveis (V_H e V_L) são compostos por um único domínio de imunoglobulina (Ig) cada, as porções constantes diferem entre as cadeias leve e pesada em relação ao número de domínios de Ig que as compõem. As cadeias leves possuem um único domínio constante (C_L , do inglês *Constant Light*). Já as cadeias pesadas apresentam três ou quatro domínios constantes, dependendo do isótipo do anticorpo. Esses domínios são numerados de C_{H1} a C_{H4} , a partir da extremidade aminoterminal em direção à carboxiterminal. As porções C_{H2} a C_{H4} formam outro fragmento funcional, conhecido como fragmento cristalizável (Fc). Esse fragmento medeia interações com receptores celulares (FcR) e componentes do sistema complemento (C1q), desencadeando mecanismos como citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Além disso, sua interação com o receptor neonatal (FcRn) prolonga a meia-vida dos anticorpos na circulação, contribuindo para sua estabilidade (BALDWIN, 2019). A porção constante dos anticorpos também determina sua classificação em cinco isótipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, conforme ilustrado na Figura 3. Em humanos, há subclasses dos isótipos IgA (IgA1 e IgA2) e IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

Figura 3 – Principais classes de anticorpos



Fonte: Elaborada pela autora. Representação esquemática das cinco principais classes de anticorpos encontrados em seres humanos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. No item a) também estão destacados os fragmentos funcionais Fv, Fc e Fab, não explorado no texto e que corresponde aos fragmentos Fv de cada cadeia de imunoglobulina associados aos domínios C_L e C_{H1}.

Dessa forma, a complexa organização estrutural dos anticorpos está diretamente relacionada à sua capacidade de reconhecer抗ígenos com alta especificidade e desencadear respostas imunológicas efetoras. Essa dualidade entre reconhecimento e ativação do sistema imune sustenta a ampla aplicabilidade dos anticorpos, não apenas na imunidade adaptativa, mas também como ferramentas terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas, autoimunes e neoplásicas.

1.2 Anticorpos monoclonais como estratégia terapêutica

O uso de anticorpos como ferramenta terapêutica remonta ao desenvolvimento da soroterapia no final do século XIX, com destaque para o trabalho pioneiro de Emil von Behring e Shibasaburo Kitasato. Eles demonstraram que o soro hiperimune de animais previamente imunizados poderia ser eficaz no combate ao tétano e à difteria, estabelecendo as bases para a imunoterapia passiva (PACKER, 2021). Posteriormente, as moléculas presentes nesse soro responsáveis por conferir proteção contra infecção foram isoladas e identificadas como anticorpos. Uma das características dessa terapia baseada em anticorpos é a presença de um conjunto heterogêneo de moléculas de imunoglobulinas. Isso se deve ao próprio funcionamento do sistema imune durante a montagem de uma resposta mediado por anticorpos, ou resposta imune humoral. Como proposto pela teoria da seleção clonal de Burnet, produzida em 1957, diferentes linfócitos B expressam receptores de membrana (BCRs) específicos para epítópos distintos de um mesmo抗ígeno. Dessa forma, quando um agente invasor entra em contato com o organismo, múltiplos linfócitos B são ativados, cada um reconhecendo um determinante抗ígenico específico. Esses linfócitos proliferam-se e diferenciam-se em plasmócitos secretores de anticorpos, que mantêm a especificidade do BCR original de suas respectivas células B ativadas. Como resultado, a resposta imunológica natural gera uma mistura de anticorpos provenientes de diferentes clones, formando um repertório policlonal.

Tendo isso em vista, torna-se desafiador caracterizar e padronizar os anticorpos policloniais (pAbs, *Polyclonal Antibodies*) para empregá-los como produto terapêutico (CASTELLI; MCGONIGLE; HORNBY, 2019). Contudo, o avanço no entendimento da

imunologia permitiu o desenvolvimento de tecnologias mais específicas e sofisticadas que revolucionaram o tratamento de diversas doenças, como os anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *Monoclonal Antibodies*), moléculas derivadas de clones de uma única célula B ativada e, por isso, com seletividade para um único determinante antigênico.

O marco inicial para a produção de mAbs foi o desenvolvimento da tecnologia do hibridoma em 1975, por Georges Köhler e César Milstein (KOHLER, 1975). Essa técnica baseia-se na fusão de linfócitos B, isolados de animais imunizados com um antígeno de interesse, com células de mieloma. Como resultado, são geradas células híbridas, os hibridomas, que combinam a capacidade dos linfócitos B de produzir anticorpos específicos com a imortalidade das células de mieloma, permitindo a geração contínua de mAbs.

A relevância terapêutica dos anticorpos monoclonais está diretamente ligada às suas características intrínsecas, como estabilidade estrutural, longa meia-vida na corrente sanguínea e alta especificidade na ligação antigênica. Essas propriedades não apenas permitem uma resposta imune direcionada, mas também reduzem efeitos colaterais e toxicidades associadas a interações fora do alvo (*off-target*). Como consequência, os hibridomas passaram a ser amplamente utilizados no campo da pesquisa e do desenvolvimento biofarmacêutico. Sendo assim, a aprovação do primeiro anticorpo monoclonal para uso humano, o Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3), indicado para tratar rejeição aguda de órgãos transplantados, foi realizada em 1986 pela agência regulatória norte americana *Food and Drug Administration* (FDA). Até o ano de 2023, mais de 150 terapias baseadas em anticorpos monoclonais foram aprovadas pela FDA. Dentre elas, 42% são destinadas para indicações oncológicas (SHAPIRO, 2024).

1.3 Aplicação oncológica dos mAbs

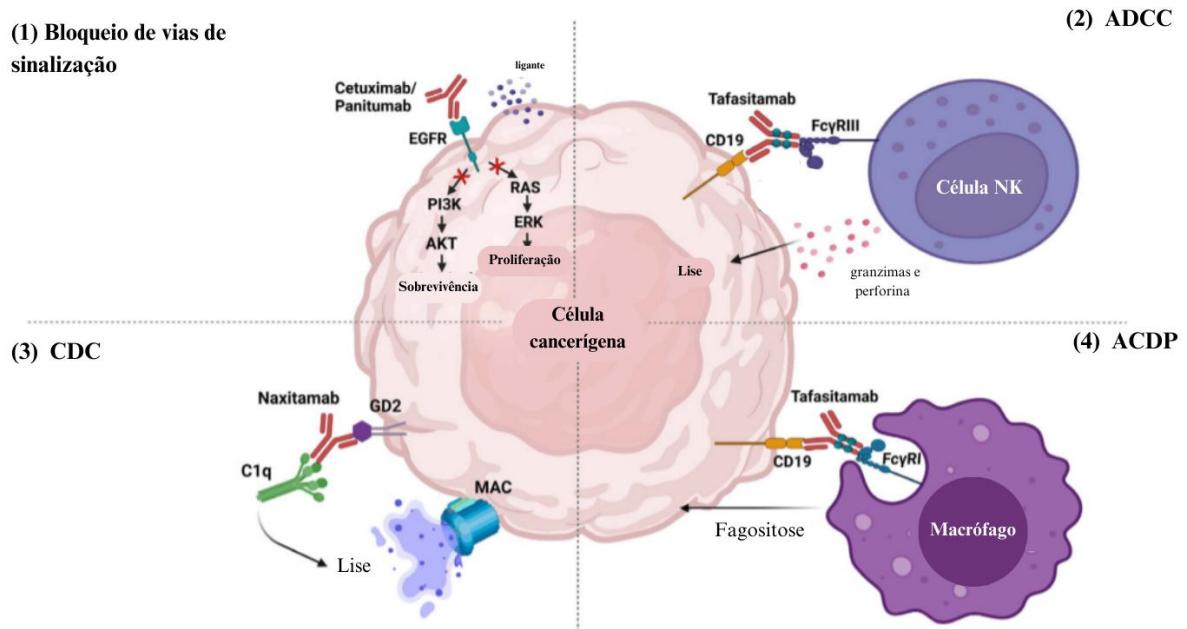
O câncer é um grupo complexo de mais de 100 doenças caracterizadas por alterações fenotípicas, metabólicas e genéticas nas células afetadas. Essas mudanças conferem às células malignas habilidades que contribuem para formação e crescimento tumoral como: a capacidade de sustentar sinais proliferativos, de resistir aos mecanismos de morte celular, de induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e de evadir a vigilância imunológica (HANAHAN, 2022). Esses mecanismos tornam o câncer um dos maiores desafios de saúde pública global. De acordo com o GLOBCAN, produzido pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), em 2022 foram registrados 20 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de mortes (BRAY et al., 2024)).

Nesse contexto, torna-se essencial o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para aplicação em oncologia que sejam capazes de contribuir para o controle da doença, atuando em conjunto com àquelas já amplamente empregadas, como a ressecção cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia. Entre essas novas estratégias, as imunoterapias têm ganhado grande destaque por utilizarem o próprio sistema imunológico do paciente no combate ao câncer. Dentre elas, as terapias baseadas nos mAbs se destacam pela alta especificidade e eficácia no direcionamento de alvos tumorais. A primeira molécula de mAb indicada para tratamento oncológico foi aprovada em 1997, o Rituximabe (Rituxan®, Mabthera®) (ZAHAVI; WEINER, 2020). Ela alveja a proteína de membrana CD20 identificada pela primeira vez em células B cancerosas de pacientes acometidos com Linfoma Não-Hodgkin.

Os mAbs podem eliminar diretamente as células neoplásicas a partir do reconhecimento antigênico pelas porções Fv e da interação com FcRs pela porção Fc, que pode modular o mecanismo de ação a ser deflagrado contra a massa celular tumoral. Ao se ligar à proteína C1q a resposta de CDC é estimulada. Por sua vez, se os receptores do tipo Fc γ RIIIa/CD16, presentes principalmente na superfície de células Natural Killer (NK), são ativados é desencadeada o mecanismo de ADCC. Já a resposta de ADCP é elicitada pela ligação ao Fc γ RIIa expresso majoritariamente por macrófagos (JHAJJ et al., 2023).

A capacidade de proliferação, de migração e de invação de outros tecidos podem ser limitadas com o uso de mAbs. Um exemplo é o anticorpo Bevacizumabe (Avastin®) capaz de se ligar ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*), responsável por estimular a angiogênese quando associado ao seu receptor (Avastin®(bevacizumabe), 2024). Bloquear a interação de fatores de crescimento ao nível do receptor é outra estratégia, como no caso do cetuximabe que se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*) expresso em células neoplásicas de pacientes com câncer cólon retal metastático e com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (ERBITUX ® (cetuximabe), 2020). A Figura 4 sumariza esse e outros mecanismos de ação.

Figura 4 - Mecanismos de ação de mAbs não conjugados



Fonte: adaptado de RODRÍGUEZ-NAVA et al., 2023. Mecanismos efetores dos mAbs terapêuticos com aplicação oncológica. (1) Bloqueio de vias de sinalização, como exercido por cetuximabe a nível do receptor e pelo bevacizumabe através da interação com VEGF. (2) Citotoxicidade celular dependente de anticorpos. (3) Citotoxicidade dependente do complemento. (4) Fagocitose celular dependente de anticorpos. AKT: Proteína quinase B; ERK: Quinase regulada por sinal extracelular; C1q: Componente 1q do complemento; MAC: Complexo de ataque à membrana; Fc_γRIII: Receptor Fc-gama III; Fc_γRI: Receptor Fc-gama I.

Além disso, anticorpos conjugados a drogas (ADCs, *Antibody-Drug Conjugates*) permitem o aumento da entrega direcionada de agentes antineoplásicos às células tumorais por meio do reconhecimento抗原mediado pelo anticorpo. Essa abordagem é especialmente útil em casos de recorrência da doença, como no uso do ado-trastuzumabe emtansina (Kadcyla®) para tratar pacientes com câncer de mama HER2+ metastático ou localmente avançado, que já tenham recebido tratamento prévio com trastuzumabe associado à quimioterapia com taxano (Kadcyla ® (trastuzumabe entansina), 2024)

Os mAbs podem atuar ativando novamente o sistema imunológico, mais especificamente respostas T-dependentes contra o tumor. Isso acontece em detrimento da ligação das moléculas de anticorpo a receptores inibitórios expressos na superfície dos linfócitos T que são utilizados para frear as respostas imunes prolongadas, evitando dano ao organismo ao final do combate a infecções. Por isso eles são chamados de inibidores de checkpoints imunológicos e se ligam a proteínas como PD-1 (do inglês, *Programmed Cell Death Protein 1*) e CTLA-4 (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Alguns exemplos de mAbs anti-PD-1 e anti-CTLA-4, respectivamente, são o Pembrolizumabe (Keytruda®) e Ipilimumab (Yervoy®).

Apesar da expectativa de redução dos efeitos colaterais em células saudáveis não relacionadas à doença, o uso terapêutico dos mAbs pode desencadear diversas reações adversas, incluindo efeitos imunomediados, não imunomediados e citotóxicos diretos (BALDO, 2022). Os primeiros mAbs gerados por tecnologia de hibridoma tinham aplicação terapêutica limitada devido à indução de anticorpos humanos anti-murinos. Atualmente, mAbs com menor percentual de sequências não humanas já estão disponíveis no mercado, no entanto ainda é possível observar respostas imunogênicas contra essas moléculas, como o caso da resposta mediada por IgE contra resíduos de galactose presentes nas regiões V_H do cetuximabe (CHUNG et al., 2008). Outros mecanismos são capazes de levar à hipersensibilidade imune aguda após infusão dos mAbs, como as síndromes de liberação de citocinas, ou de tempestade de citocinas, de lise do tumor e a doença do soro (HANSEL et al., 2010).

A taxa de eficiência do tratamento oncológico com mAbs é influenciada pelos mecanismos que as células neoplásicas utilizam para desenvolver resistência a essas moléculas. Quando as células tumorais não respondem ao agente imunoterápico sem terem sido previamente expostas a ele, a resistência é considerada primária. Esse fenômeno foi descrito por BRAIG e colaboradores (BRAIG et al., 2017), que associaram a presença de polimorfismos de nucleotídeos únicos na sequência do EGFR à resistência das células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço ao cetuximabe. Por outro lado, a resistência é classificada como secundária quando células tumorais inicialmente suscetíveis aos efeitos de um mAb adquirem mutações que reduzem ou impedem sua ação. Esse tipo de resistência foi observado em culturas da linhagem celular de câncer de cólon retal DiFi que, após exposição contínua a um anti-EGFR, aumentaram a expressão desse receptor, tornando-se resistentes ao tratamento (KHELWATTY et al., 2015).

Dessa forma, embora as terapias baseadas em mAbs representem um avanço significativo no tratamento do câncer, é essencial continuar explorando estratégias para minimizar seus efeitos adversos e contornar os mecanismos de resistência, garantindo maior eficácia e segurança para os pacientes.

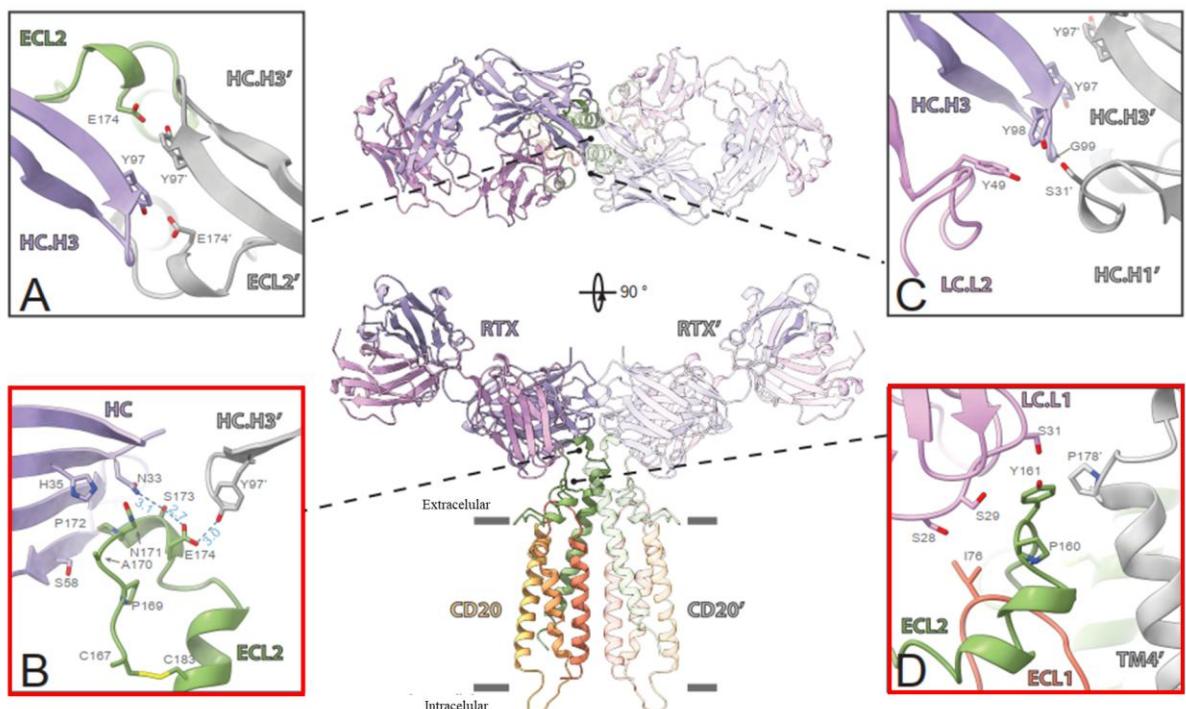
1.3.1 Rituximabe: terapia anti-CD20

O Rituximabe é um anticorpo monoclonal quimérico, composto por uma região variável murina e uma porção Fc do tipo IgG1 humana. Ele reconhece a proteína CD20, expressa na membrana de linfócitos B durante estágios específicos do desenvolvimento dessas

células, não sendo encontradas em células B maduras diferenciadas e células-tronco (CRAGG et al., 2005). Dessa forma, as neoplasias hematológicas mediadas por linfócitos B defeituosos são algumas das indicações clínicas nas quais o Rituximabe é utilizado, dentre elas destacam-se diferentes formas de LNH e a Leucemia Linfocítica Crônica (MabThera® (rituximabe), 2022). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que, dentre os 704 mil novos diagnósticos anuais de câncer para cada ano do período de 2023 a 2025, 12.040 serão de LNH e 11.540 serão de Leucemia (INCA, 2023).

O CD20 tem sua estrutura formada por 4 hélices transmembranares, com suas regiões C e N-terminal localizadas na face interna da membrana plasmática, formando duas alças extracelular conhecidas como alça maior e alça menor. Essa porção exposta na face externa da membrana celular constitui os epítopenos dos mAbs anti-CD20 (KUMAR et al., 2020). Inicialmente, acreditava-se que o Rituximabe se ligava apenas ao epítopo clássico localizado na alça extracelular maior ($^{170}\text{ANPSE}^{174}$) (BINDER et al., 2006) (DU et al., 2007). No entanto, estudos estruturais recentes revelaram um segundo ponto de reconhecimento, formado por regiões das duas alças extracelulares (KUMAR et al., 2020) (Figura 5).

Figura 5 -Interação molecular entre moléculas de CD20 e fragmentos Fab derivados do Rituximabe



Fonte: Adaptado de ROUGÉ et al., 2020. A imagem corresponde a um diagrama de fitas da interação entre duas moléculas de CD20 e dois fragmentos Fab do Rituximabe, obtida por crio-eletromicroscopia. Na porção (b), destacada em um quadro vermelho, observa-se o epítopo clássico do Rituximabe, localizado na alça extracelular maior (ECL2, em verde), com os aminoácidos do Rituximabe e do CD20 envolvidos na interação evidenciados.

Já na porção (d), também em destaque, encontra-se o epítopo secundário do Rituximabe, composto por resíduos de ambas as alças do CD20: a ELC2 e a alça extracelular menor (ELC1, em vermelho). As cadeias pesadas dos fragmentos Fab do Rituximabe estão representadas em roxo, enquanto as cadeias leves aparecem em rosa.

Os anticorpos anti-CD20 são classificados em duas categorias distintas com base na ativação diferencial da citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e na quantidade de moléculas de mAb que se ligam às células B (KLEIN et al., 2013). Os anticorpos do tipo I, como o Rituximabe, induzem uma resposta mais potente via CDC. De acordo com essa afirmação, estão os achados obtidos em um ensaio pré-clínico no qual os efeitos anti-tumorais do Rituximabe foram abolidos em modelos murinos *knockout* para o componente do complemento C1q e que tinham sido inoculados com células de linfoma (GAETANO et al., 2003). Além disso, as células B podem se ligar ao dobro de anticorpos do tipo I em comparação com os anticorpos do tipo II. Foi proposto que essa diferença se baseia na organização das moléculas de CD20 como dímeros na membrana plasmática na forma barris duplos, sendo observado por crio-eletromicroscopia a interação de dois fragmentos Fab do Rituximabe com o dímero, enquanto apenas um Fab do anticorpo tipo II Obinutuzumabe era capaz de se ligar ao alvo (ROUGÉ e et al., 2020).

Contudo, a ativação de CDC não é o único mecanismo envolvido na depleção das células tumor-específicas pelos mAb anti-CD20. Outros processos como deflagração de ADCC e de citotoxicidade direta por indução de vias morte celular também contribuem para sua atividade antineoplásica. Um estudo *in vitro* com cultivo de células obtidas de pacientes com linfoma difuso de grandes células B demonstrou que a atividade de ADCC mediada pelo Rituximabe ocorre principalmente por sua interação com o Fc γ RIIIa de células NK, mas que outras populações celulares CD16+ também eram capazes de interagir com esse mAb e eliminar as células tumorais (VERMI et al., 2018). No entanto, quando comparado ao Obinutuzumabe, o Rituximabe apresenta menor eficiência na indução de apoptose direta. Essa diferença decorre principalmente da ativação de vias de sinalização intracelulares distintas, incluindo o estímulo da via antiapoptótica BCL2 pelo Rituximabe, o que reduz sua capacidade de causar morte celular direta (EDELMANN et al., 2021).

Apesar da eficácia do Rituximabe na depleção de células B tumorais, a resistência ao tratamento pode comprometer sua ação terapêutica. Entre os mecanismos inatos de resistência, destacam-se polimorfismos no receptor Fc γ RIIIa das células NK, observados em crianças e adolescentes com linfoma e leucemia de células B maduras (BURKHARDT et al., 2016). A resistência adquirida a essa molécula também já foi observada. Análises *in vitro* mostraram que linhagens CD20+ inicialmente sensíveis ao Rituximabe perderam a resposta

ao tratamento após exposição a doses progressivamente maiores do anticorpo, fenômeno que foi associado à redução da expressão global de CD20 na membrana celular (CZUCZMAN et al., 2008).

Em relação à afinidade, o Rituximabe possui uma constante de ligação ao CD20 na faixa de 5 nM (REFF et al., 1994). No entanto, estudos comparativos indicam que mAbs anti-CD20 de nova geração apresentam interações mais fortes com o alvo. O AME-133v, por exemplo, exibe uma afinidade de 13 a 20 vezes maior e uma avidez 5 a 7 vezes superior para FcγRIIIa, resultando em uma atividade de ADCC até 10 vezes superior à do Rituximabe.

Dessa forma, o Rituximabe é uma molécula amplamente estudada na imunoterapia e se destaca como um modelo interessante para engenharia de proteínas. Seu sucesso clínico, aliado ao conhecimento detalhado de sua estrutura e mecanismos de ação, permite a otimização de variantes com maior afinidade, avidez e eficácia terapêutica. Modificações em sua região variável e na porção Fc têm sido exploradas para aumentar a potência da resposta imune, reduzir efeitos adversos e superar mecanismos de resistência, tornando-o uma base promissora para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos aprimorados.

1.4 Engenharia de proteínas: enfoque no desenvolvimento de novos mAbs

A engenharia de anticorpos é um campo multidisciplinar que utiliza conhecimentos sobre a estrutura e a função dos domínios dessas moléculas para otimizá-las, ampliando suas aplicações em diagnóstico e terapia. Diversas estratégias são empregadas para aumentar a eficácia e a segurança dos anticorpos, além de aprimorar suas características produtivas. Entre elas, destacam-se a humanização de anticorpos, a modulação da afinidade, a modificação das funções efetoras e a melhoria da estabilidade molecular (CHIU et al., 2019). A modularidade intrínseca das moléculas de anticorpos permite a geração de diferentes formatos de fragmentos, os quais são amplamente empregados no desenvolvimento de mAbs aprimorados (CHEN; YUAN; JIANG, 2020).

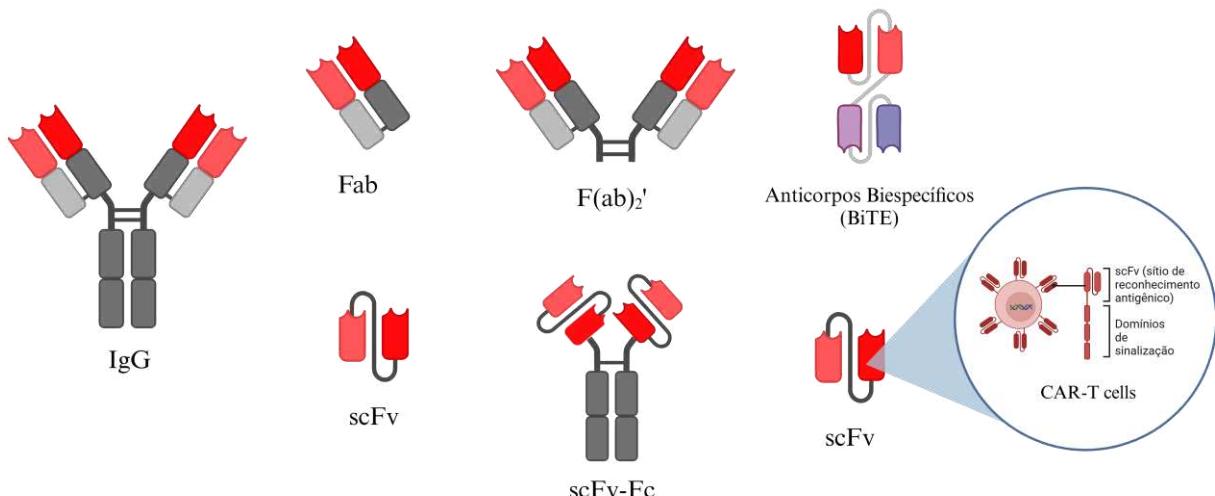
A Figura 6 ilustra os diversos formatos de fragmentos de anticorpos que podem ser produzidos. Dentre eles, destaca-se o fragmento variável de cadeia única (*single-chain fragmente variable*, scFv), composto pelas regiões V_H e V_L conectadas por um *linker* polipeptídico. Com aproximadamente 25 kDa, os scFvs são significativamente menores que as imunoglobulinas completas. (RODRÍGUEZ-NAVA et al., 2023) Além disso, por não possuírem a região Fc, estão livres de glicosilações, o que facilita sua expressão em sistemas

procariotos, reduzindo custos e simplificando a manipulação laboratorial. Apesar de sua estrutura compacta, esses fragmentos mantêm a capacidade de reconhecimento e ligação específica ao antígeno para o qual foram desenvolvidos. Essa característica é particularmente vantajosa para aplicação em estratégias de engenharia de anticorpos voltadas para a maturação da afinidade, como evolução dirigida e *phage display*. Um exemplo disso é o trabalho de Bezerra (BEZERRA, 2019) que construiu uma biblioteca de scFvs derivados do anticorpo Rituximabe para selecionar variantes com maior afinidade pelo CD20.

A versatilidade estrutural dos scFv's permite que sejam ligados a outras moléculas, como corantes fluorescentes e até mesmo outros fragmentos de anticorpos. No contexto clínico, isso se torna relevante pois viabiliza a aplicação tanto diagnóstica, quanto terapêutica dos scFv's. Além disso, outras características, como a alta penetrabilidade tecidual e alta taxa de depuração plasmática, os torna ferramentas úteis para exames médicos por imagens (HAN et al., 2016). Na terapia, os scFv's atuam como constituintes estruturais de receptores quiméricos de抗ígenos (CAR, do inglês *Chimeric Antigen Receptor*) expressos por células T ou NK engenheiradas para aprimorar o reconhecimento抗ígenico e, consequentemente, reativar a resposta citotóxica dessas células imunes contra neoplasias (DUAN et al., 2022).

Além disso, a fusão dos scFv's à porção Fc dos diferentes isótipos e subclasses de imunoglobulinas gera novas moléculas capazes de manter a especificidade da ligação抗ígenica ao mesmo tempo em que podem eliciar respostas imunes efetoras. Os fragmentos resultantes são chamados de fragmentos variáveis fusionados ao fragmento cristalizável (scFv-Fc ou FvFc) e podem possuir um ou mais scFv's, influenciando na avidade e na valência da molécula final. Em detrimento da sua estrutura, essa molécula passa a ser relevante para a pesquisa e o desenvolvimento de novas terapias baseadas em mAbs (Figura 6)

Figura 6 - Exemplos de fragmentos de anticorpos e potencias aplicação terapêuticas dessas moléculas



Fonte: Elaborada pela autora. Estrutura completa de uma molécula de anticorpo da classe IgG e de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos, como Fab, F(ab)₂', scFv e FvFc. No canto superior direito está representado um anticorpo biespecífico conhecido por BiTE (do inglês, *Bispecific T-cell Engager*), composto por dois scFvs unidos por um *linker* polipeptídico. A terapias celular baseada em receptores quiméricos de抗ígenos também está destacada na porção inferior à direita da imagem, uma vez que, fragmentos do tipo scFv podem ser usados nessa tecnologia como os sítio de reconhecimento.

Estudos prévios conduzidos pelo grupo de pesquisa de Engenharia de Proteínas da Fiocruz Ceará, incluindo o doutorado de BEZERRA (BEZERRA, 2024), utilizaram a técnica de *error-prone PCR* (epPCR) para introduzir mutações aleatórias na sequência de um scFv derivado do Rituximabe com o objetivo de otimizar sua afinidade pelo antígeno. Os fragmentos gerados passaram por rodadas sucessivas de seleção via *phage display*, visando a identificação de moléculas candidatas com maior afinidade de ligação ao CD20. No entanto, apesar da seleção bem-sucedida, a caracterização funcional quanto à capacidade de interação ao alvo expresso na superfície celular dessa molécula no formato Fv-Fc ainda não havia sido realizada de maneira mais extensa. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de ligação ao alvo expresso na membrana celular desse scFv mutante, reconstituído no formato Fv-Fc, comparando-o à versão *wild-type* (WT). A identificação de variantes com diferentes afinidades é essencial para compreender os impactos das mutações no reconhecimento antigênico e poder fornecer insumos valiosos para o desenvolvimento de anticorpos otimizados, com potencial para aplicações terapêuticas ou diagnósticas.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Avaliar de forma comparativa a capacidade de ligação ao antígeno-alvo, expresso na superfície celular, de dois fragmentos de anticorpos (FvFc) derivados do rituximabe: um correspondente à molécula de referência (WT) e outro contendo uma mutação em sua sequência aminoacídica (Mut), visando um aumento de afinidade, que foi previamente selecionado em trabalhos do Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde (GEPeSS) da Fiocruz Ceará.

2.2 Objetivos específicos

1. Expressar os fragmentos de anticorpos FvFc nativo e mutante em uma plataforma eucariótica;
2. Purificar as proteínas recombinantes;
3. Avaliar a integridade e pureza dos fragmentos de anticorpos recombinantes obtidos;
4. Confirmar a presença dos fragmentos de anticorpos por ensaio de imunodetecção;
5. Investigar a capacidade de interação dos fragmentos Fv-Fc com o alvo CD20 presente na superfície celular.

3 METODOLOGIA

As atividades desempenhadas no escopo deste projeto foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, Ceará (Fiocruz-CE) e, portanto, os protocolos de qualidade e biossegurança obedeceram às normas do Certificado de Qualidade e Biossegurança (CQB) vigente na instituição com número 526/20 expedido pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). No CQB mencionado, as instalações que compõe o ambiente laboratorial da Fiocruz-Ce estão autorizadas a realizar atividades de pesquisa em regime de contenção de microrganismos geneticamente modificados do Grupo 1 (Nível de Biossegurança: NB-1).

3.1 Transformação de *E.coli* TOP 10 com os plasmídeos contendo os genes que codificam os fragmentos de anticorpos

Células quimiocompetentes de *Escherichia coli* TOP10 foram transformadas por choque térmico com plasmídeos contendo os genes codificadores dos FvFcs WT e Mut (Figura 7). Para isso, foram preparadas misturas reacionais em microtubos de 1,5 mL, contendo:

- 10 µL de MgCl₂ (0,1 M);
- 5 µL de CaCl₂ (0,1 M);
- Volume de DNA suficiente para garantir 20 ng de plasmídeo na reação;
- Água q.s.p. 50 µL.

Em seguida, 50 µL de suspensão celular de *E. coli* TOP10 quimiocompetente foram adicionados a cada mistura reacional. O protocolo de choque térmico foi conduzido com a incubação das células em gelo por 20 minutos, seguida de aquecimento a 42 °C por 45 segundos e retorno imediato ao gelo por mais 45 segundos. Após esse processo, foram adicionados 900 µL de meio SOC a cada tubo, e as culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 220 RPM em agitador orbital por 1 hora, permitindo a regeneração celular.

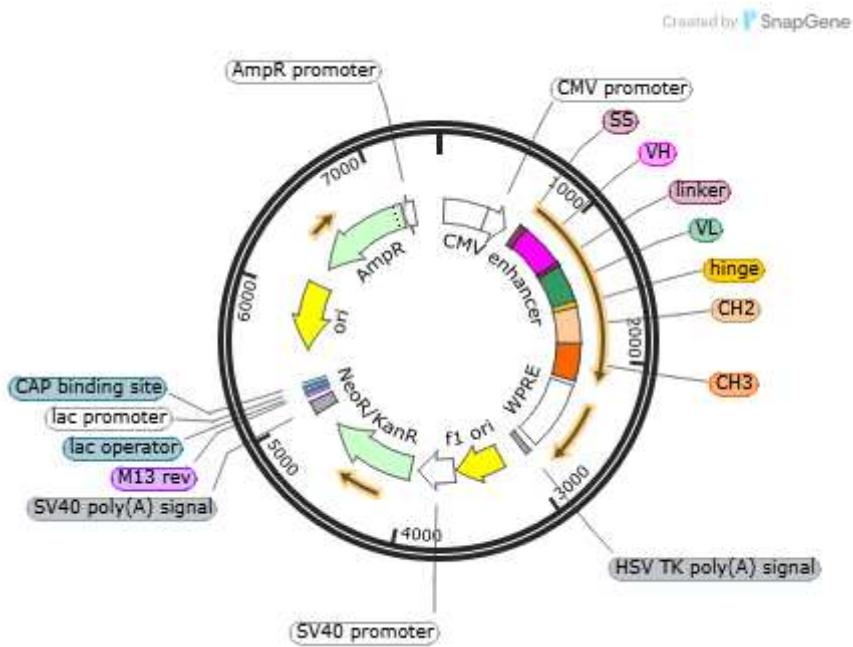
Após a incubação, as células foram centrifugadas a 10.000 × g por 30 segundos, e 900 µL do sobrenadante foram descartados. Os pellets foram ressuspensos no volume remanescente do meio e semeados em placas de Petri contendo 10 mL de meio LB ágar (LB Broth Miller, Neogen®, 2% ágar m/v) suplementado com ampicilina (100 µg/mL). A semeadura foi realizada com *beads* de sílica para garantir uma distribuição uniforme das células. As placas foram então incubadas a 37 ° durante 16 horas em estufa bacteriológica.

No dia seguinte, colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) para a obtenção dos pré-inóculos. Como controle negativo, um tubo contendo apenas meio foi incubado após a adição de uma ponteira estéril. As culturas foram mantidas por 16 horas, à 37 °C e sob rotação de 220 RPM em incubadora orbital (Innova S44i, Eppendorf).

No terceiro dia, um volume do pré-inóculo correspondente a 1% (v/v) do volume final (100 mL) foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL contendo meio LB com ampicilina (100 µg/mL). A cultura foi incubada nas mesmas condições.

A extração e purificação dos plasmídeos foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). O DNA purificado foi então quantificado em Nanodrop® no modo “*Double Stranded DNA*”.

Figura 7 - Mapa do vetor molecular construído para expressão recombiante dos Fv-Fcs em plataforma eucariótica



Fonte: Elaborada pela autora. Vtor pcDNA3.4 contendo a sequência de cada par V_H e V_L dos scFvs WT e Mut, além das sequências das regiões da dobradiça, C_H2 e C_H3 de IgG1 humana que compõem os fragmentos FvFc

3.2 Expressão de proteínas em plataforma eucariótica

O sistema de expressão ExpiCHO™ da *ThermoFisher* foi utilizado para a produção dos fragmentos de anticorpos, seguindo as recomendações do fabricante. A saber, cultivos de 25 mL da linhagem celular ExpiCHO-S™ foram diluídos no dia da transfecção até

uma concentração final de 6×10^6 células viáveis/mL. Para a transfecção, 25 µg dos vetores contendo as sequências codificadoras dos FvFcs nativo e mutante foram diluídos separadamente em meio apropriado, assim como o reagente ExpiFectamine™ CHO. Cada vetor diluído foi incubado por 5 minutos e à temperatura ambiente (20 °C) com alíquotas diluídas de ExpiFectamine™ CHO, formando complexos DNA-reagente. Esses complexos foram cuidadosamente adicionados por gotejamento às suspensões celulares, mantidas em frascos de cultura ventilados de 125 mL sob agitação. Após 18 horas, os reagentes ExpiFectamine™ CHO Enhancer e ExpiCHO™ Feed foram igualmente adicionados às culturas por gotejamento, garantindo a distribuição uniforme nas suspensões celulares agitadas. Todas as etapas de manipulação, incluindo diluições, transfecção e adição de reagentes, foram realizadas de maneira estéril em fluxo laminar para prevenir contaminações. As culturas celulares foram mantidas por 10 dias em uma incubadora orbital (Heracell VIOS 16 0i CO₂ incubator, ThermoFisher) à 37 °C, com atmosfera úmida contendo 8% de CO₂ para que os fragmentos de anticorpos fossem expressos.

Após esse período o sobrenadante da suspensão celular foi clarificado mediante realização de etapas subsequentes de centrifugação; sob rotação de 4000 xg, por 30 minutos e à 4 °C; e de filtração com membrana de poros de 0,45 µm de diâmetro.

3.3 Purificação das proteínas recombinantes

Os FvFcs nativo e mutante foram purificados por meio da realização de duas etapas cromatográficas consecutivas em um cromatógrafo semi-automatizado (ÄKTA Pure, Cytiva®). Primeiramente, foi conduzida cromatografia de afinidade utilizando coluna de proteína A (HiTrap Protein A HP de 1 mL, Cytiva®). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 15 volumes de coluna (VC) de tampão PBS (Fosfato de sódio monobásico 2,96 mM; Fosfato de sódio dibásico 7,4 mM; NaCl 154 mM; pH 7,4) para remoção de contaminantes. Em seguida, os fragmentos de anticorpos foram eluídos com 10 VC de tampão glicina (0,1 M; pH 2,20), em frações de 1mL coletadas em tubos de 2 mL previamente preenchidos com 400 µL de tampão Tris (1M; pH 9,10) para neutralização.

Para seguir com a segunda etapa de purificação, primeiramente, foi necessário concentrar as amostras em um volume de 500 µL através de dialofiltração (Amicon®). As amostras contidas nesse volume final foram submetidas à técnica de cromatografia por exclusão molecular (SEC, do inglês *Size-Exclusion Chromatography*), utilizando uma coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (Cytiva®), na qual elas foram diretamente aplicadas. Em

seguida, foi realizada lavagem da coluna com 1,5 VC de PBS, tampão final de eluição e estocagem das amostras. Ao final da purificação foi realizada quantificação dos fragmentos WT e Mut em Nanodrop® a 280 nm utilizando o modo de leitura para IgG1.

A análise das proteínas presentes nas frações purificadas foi realizada retirando-se alíquotas das amostras correspondentes aos picos cromatográficos. Essas alíquotas foram preparadas para eletroforese em condições redutoras e desnaturantes em gel de poliacrilamida a 12,5%. Após a corrida, o gel foi corado com solução de Azul de Coomassie e descolorido com solução descolorante (10% v/v de Ácido acético; 30% v/v de etanol v/v), permitindo a visualização das bandas.

3.4 Western blotting

A fim de confirmar que as bandas observadas no gel de poliacrilamida correspondem às proteínas de interesse, foram realizados ensaios de *western blotting*. As mesmas amostras utilizadas anteriormente foram preparadas e aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12,5%, sob condições desnaturantes e redutoras, para uma nova corrida eletroforética. Após a separação proteica, os FvFc foram transferidos para duas membranas de nitrocelulose, previamente hidratadas com tampão de transferência (Tris 250 Mm; Glicina 1.92 M; SDS 1% m/v; metanol 20% v/v; pH 8,3), por 17 minutos a 25 volts, em equipamento de eletrotransferência de proteínas do tipo *Semi-Dry Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Biorad®). As membranas foram bloqueadas overnight, à temperatura ambiente (23 °C), sob agitação, com uma solução de 6% de leite desnatado diluído em PBS-Tween (0,05% v/v). Na etapa de detecção, uma das membranas foi incubada com proteína L conjugada à peroxidase, diluída v/v 1:5000 em PBS-Tween (0,05%) acrescido de 3% de leite desnatado. A outra membrana foi incubada com anticorpo anti-Fc humano conjugado à peroxidase (Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP, Invitrogen), diluído v/v 1:1500 na mesma solução de PBS-Tween e leite desnatado. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens de 10 minutos: duas em PBS-Tween (0,05%) e uma em PBS, para remover o excesso dos reagentes. A revelação foi realizada aplicando o substrato da enzima (Pierce™ ECL *Western Blotting* Substrate, ThermoFisher), seguida da visualização das bandas em sistema de fotodocumentação e análise de imagens (iBright Imaging Systems, Invitrogen).

3.5 Avaliação da capacidade de interação com o CD20 na superfície celular

A técnica de citometria de fluxo foi empregada para avaliar a capacidade dos fragmentos de anticorpos de reconhecer e interagir com seu alvo molecular, o CD20, expresso na superfície celular. Para isso, foram utilizadas células das linhagens Raji, linhagem de linfócitos B (CD20+), e Jurkat, linhagem linfooblástica de células T (CD20-).

3.5.1 Cultura celular

A princípio, células criopreservadas foram descongeladas em banho maria à 37°C. Cada alíquota de 1mL, composta de meio RPMI-1640 (Nova Biotecnologia) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma Aldrich®) e com 10% dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich®), foi transferida para um tubo Falcon contendo 9 mL de meio RPMI-1640 completo (cRPMI) (RPMI-1640 acrescido de 10% v/v de SBF). Em seguida, as células seguiram para centrifugação; 300 xg, 5 min, 20 °C, com o sobrenadante sendo posteriormente desprezado. O pellet celular resultante foi ressuspensiondo em 9 mL cRPMI e o volume final foi transferido com auxílio de uma pipeta sorológica para uma garrafa de cultura de 75 cm², que foi incubada em estufa (HERACell Vios 160i, ThermoFisher Scientific®) à 37 °C e sob atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A manutenção do cultivo celular foi realizada a cada 2 ou 3 dias utilizando meio cRPMI fresco. Para monitorar o crescimento e a viabilidade celular, alíquotas de 15 µL foram retiradas do volume total de cultivo e diluídas em solução de Azul de Tripano a 0,4% (Gibco®) na proporção 1:1 (v/v). Após a coloração, as células foram aplicadas em uma câmara de Neubauer para avaliação da confluência e viabilidade sob microscópio óptico.

Após a análise, as células da garrafa de cultura foram centrifugadas a 300 xg, por 5 minutos e à 20 °C. Ao final dessa etapa, sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensiondo em cRPMI fresco, ajustando-se a concentração final para $0,3 \times 10^6$ células/mL.

3.5.2 Marcação das células para citometria de fluxo

No dia da análise por citometria, as células foram contadas novamente em uma câmara de Neubauer para determinar a viabilidade (>95%) e a densidade celular. Em seguida, foram plaqueadas em uma placa de 96 poços com fundo em "U", ajustando-se 4×10^5 células por poço. A placa foi centrifugada a 400 xg por 5 minutos a 20 °C, e o meio de cultura foi descartado. Após a centrifugação, as células foram lavadas com 200 µL de tampão FACS

(PBS 1X, 2 mM de EDTA, 1% v/v de SBF), seguidas de nova centrifugação nas mesmas condições. Ao final dessa etapa, o sobrenadante foi desprezado e as células remanescentes nos poços foram ressuspensas em um volume adequado para garantir a presença de 5 ng, 50 ng, 500 ng, 800 ng, 1000 ng e 2000 ng das proteínas produzidas e purificadas previamente e 300 ng do anticorpo comercial MabThera®, ou de tampão FACS, ou ainda de diluição do anticorpo secundário AlexaFluor® 488-conjugated mouse anti-human IgG1 (Invitrogen) em tampão FACS (1:100 v/v). Isso resultou na configuração da condição teste, do controle positivo, do controle negativo e do controle de ligação inespecífica do ensaio, respectivamente. Todos esses componentes foram incubados à temperatura ambiente (20 °C) por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas novamente com 200 µL de tampão FACS, e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, 60 µL do anticorpo secundário AlexaFluor® 488-conjugated mouse anti-human IgG1 (Invitrogen), diluído em tampão FACS na proporção de 1:100 v/v, foram adicionados a cada poço. A mistura foi homogeneizada por pipetagem e incubada por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Ao final, duas lavagens adicionais foram realizadas e as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão FACS. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACSCelesta™ (BD Biosciences) da plataforma de citometria da Fiocruz Ceará, configurado para adquirir 10.000 eventos por amostra. Os dados obtidos foram analisados utilizando a 10ª versão do software FlowJo®.

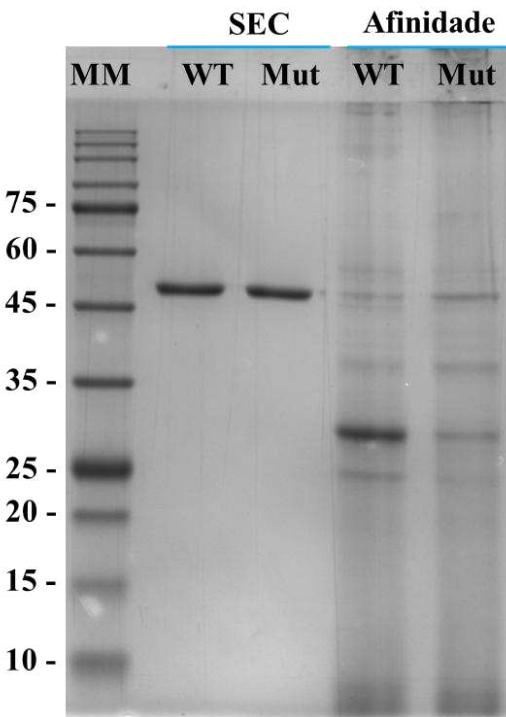
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão e purificação dos fragmentos de anticorpos recombinantes

Após a expressão dos fragmentos de anticorpos e a realização das etapas de purificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12,5%. Inicialmente, foram aplicados no gel 12 µL das frações proteicas purificadas após a cromatografia de afinidade com proteína A. Em seguida, após a realização das etapas de concentração das e de purificação adicional por cromatografia por exclusão molecular, foram aplicados no gel volumes que continham 1 µg de cada proteína recombinante.

Foi possível observar, a partir do perfil eletroforético gerado, bandas na altura de 55 KDa consideradas compatíveis com o peso molecular da cadeia dos FvFcs reduzida (Figura 8). Contudo, também foi identificada a presença de contaminantes nas amostras após a realização da primeira etapa cromatográfica, evidenciando a necessidade das etapas adicionais de purificação. Esse problema foi resolvido com a cromatografia de exclusão molecular, que permitiu a obtenção dos fragmentos de anticorpos com maior grau de pureza. Como descrito por LIU e colaboradores (LIU et al., 2010) mesmo que a cromatografia por afinidade com proteína A seja amplamente utilizada para purificação de mAbs, devido a interação específica dessa proteína com a porção Fc dos anticorpos, ainda são necessárias etapas adicionais de purificação para remoção de contaminantes menores, como proteínas celulares, e agregados de anticorpos.

Figura 8 - Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos Fv-Fcs purificados por cromatografia de afinidade e por SEC



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcador de peso molecular True Color High Range Protein Marker (10-245 kDa) – Sinapse Biotecnologia. O tamanho esperado para a cadeia dos fragmentos FvFc é de 55 kDa.

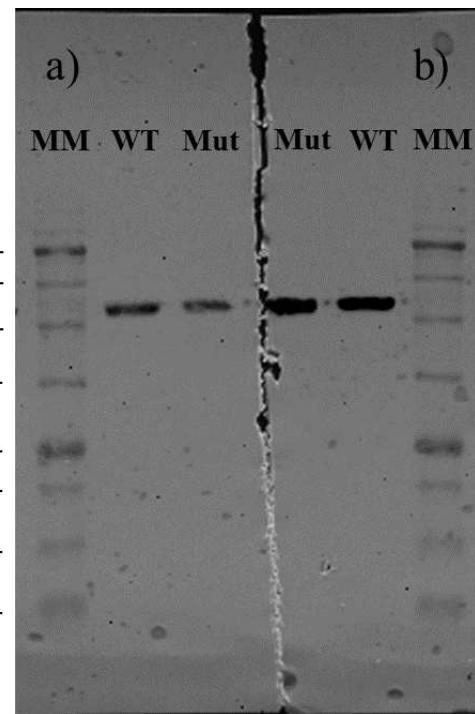
O rendimento da produção das proteínas recombinantes foi calculado a partir da quantificação das alíquotas finais, correspondentes a aproximadamente três frações de 500 µL cada. Os valores obtidos foram 13,1 mg/L para o fragmento WT e 15,47 mg/L para o fragmento Mut. É importante ressaltar que esses valores estão subestimados em relação a produção total de proteína pela expressão recombinante, uma vez que nem todas as frações contendo as moléculas de interesse na etapa inicial de purificação por afinidade foram submetidas à gel-filtração. Além disso, perdas inerentes a cada etapa do processamento *downstream* também impactaram o rendimento final.

4.2 Western Blotting

A verificação das membranas posterior à marcação com proteína L e com o anticorpo secundário anti-Fc humano possibilitou confirmar que as proteínas purificadas constituíam os FvFcs WT e Mut produzidos (Figura 9). Isso se dá pois o anticorpo anti-Fc é capaz de se ligar às porções C_H2 e C_H3 que compõe os fragmentos FvFc. Por outro lado, a proteína L se liga à cadeia leve *kappa* de anticorpos, levando à detecção das porções V_H V_L

dos scFvs covalentemente ligados às regiões Fc de IgG1 humana desse formato de fragmento de anticorpo.

Figura 9 - Imunodetecção por *western blotting* dos FvFc WT e e Mut



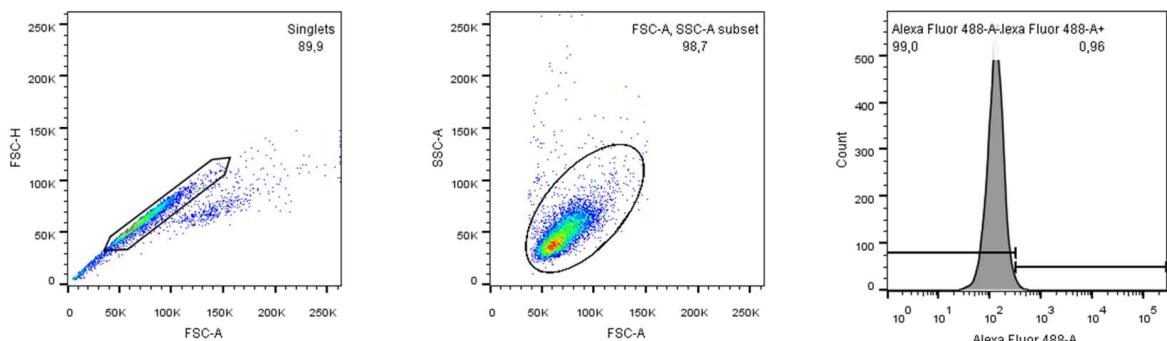
Fonte: Elaborada pela autora. O item A corresponde a membrana incubada com o anticorpo secundário anti-Fc humano, enquanto o item B diz respeito à membrana incubada com proteína L. MM: marcador de peso molecular True Color High Range Protein Marker (10-245 kDa) – Sinapse Biotecnologia. O tamanho esperado para a cadeia dos fragmentos FvFc é de 55 kDa.

4.3 Avaliação da capacidade de interação com o CD20 na superfície celular

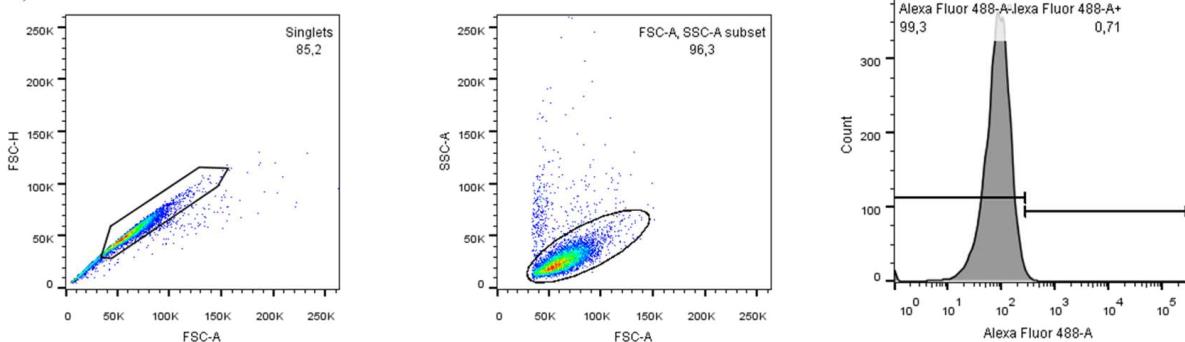
Os fragmentos de anticorpos no formato FvFc produzidos foram caracterizados quanto à sua capacidade de ligação seletiva ao antígeno CD20 expresso na superfície celular por meio de ensaios de marcação simples, analisados por citometria de fluxo, como descrito na metodologia. A estratégia de agrupamento (*gating*) utilizada para isolar a população de células de interesse e visualizar a porcentagem de células marcadas é mostrada na Figura 10. Esse processo foi aplicado tanto para analisar as células CD20+ (Raji), quanto as células CD20- (Jurkat).

Figura 10 - Estratégia de agrupamento utilizada para isolar as populações celulares de interesse

a) Células Raji



b) Células Jurkat

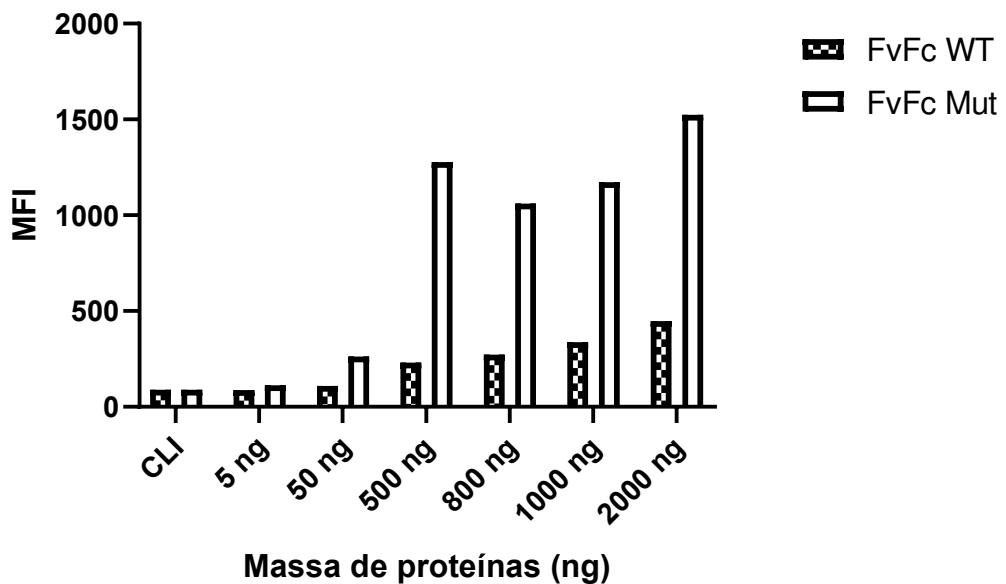


Fonte: Elaborada pela autora. A imagem representa a estratégia de agrupamento utilizada para isolar a população de células de interesse. O processo ocorre da esquerda para a direita, tanto para as células da linhagem Raji quanto Jurkat: nos primeiros quadros, as células individuais são selecionadas. Em seguida, o subconjunto celular resultante é analisado com base na morfologia e no tamanho, permitindo a definição da população final. Por fim, os histogramas, referentes ao controle de ligação inespecífica (CLI), ilustram a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo, mostrando uma quantidade de células marcadas inferior a 1%.

A marcação das células CD20+ com diferentes concentrações dos fragmentos de anticorpos revelou diferenças na capacidade de ligação ao alvo entre o FvFc WT e o FvFc Mut (Gráficos 1 e 2). O fragmento Mut apresentou um aumento significativo na fluorescência conforme a quantidade de proteína adicionada aumentava. Em contraste, a fluorescência registrada após a marcação das células Raji com o fragmento WT manteve-se em níveis mais baixos e relativamente constantes ao longo das concentrações testadas.

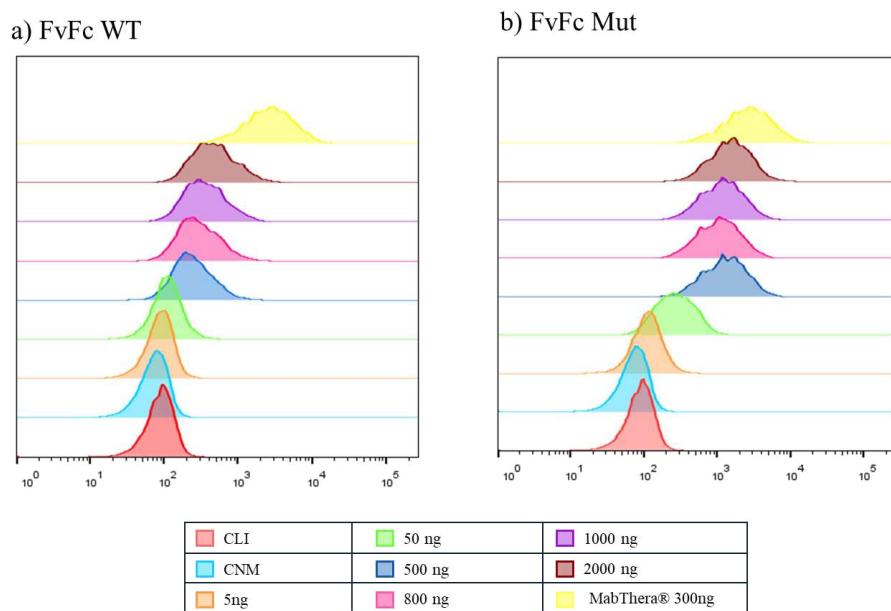
A partir de 500 ng do fragmento Mut, 99,5% da população de interesse foi marcada, enquanto a maior concentração do fragmento WT resultou em uma marcação de 88%. Contudo, nenhuma das duas moléculas marcou significativamente as células CD20- (<2%), independentemente das massas de proteínas utilizadas (dados não mostrados). Isso indica baixa existência de interações inespecíficas com outras moléculas ou receptores expressos na superfície celular.

Gráfico 1- Relação entre a massa de FvFc WT e Mut utilizada na marcação e as leituras de Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) obtidas para cada um desses valores



Fonte: Elaborada pela autora. O gráfico de barras indica a Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) das populações marcadas com diferentes quantidades de ambos os fragmentos de anticorpos testados.

Gráfico 2 - Comparação do deslocamento de Fluorescência gerada para cada quantidade de massa de FvFc WT e Mut utilizada na marcação das células CD20+

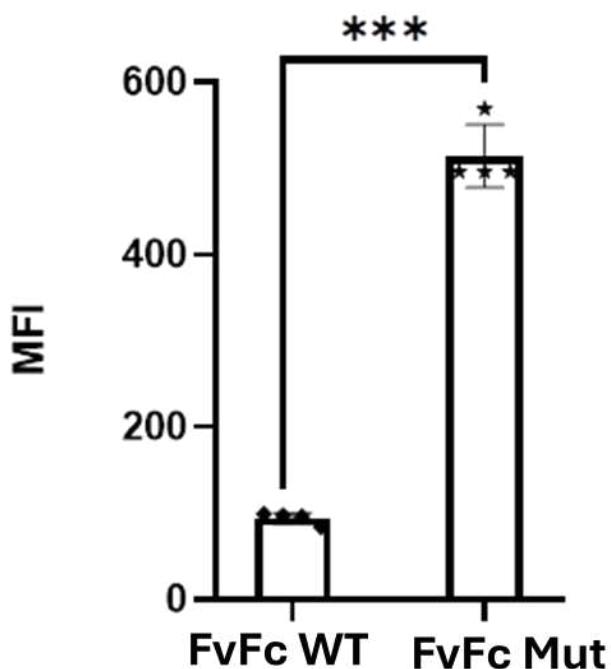


Fonte: Elaborada pela autora. Conjunto de histogramas gerados para todos os tratamentos aplicados a linhagem celular Raji (CD20+), quanto maior o deslocamento para à direita do CLI, maior a leitura de fluorescência produzida pela marcação com os fragmentos de anticorpos. *CLI: Controle de Ligação Inespecífica; CNM: Controle Não Marcado.*

Para avaliar diferenças estatisticamente significativas na marcação entre as duas moléculas, foi realizado um experimento em quadruplicata biológica utilizando 1000 ng de

cada fragmento de anticorpo (Gráfico 3). O teste t de Student não pareado indicou que a molécula Mut produziu uma marcação significativamente maior em comparação à WT.

Gráfico 3 - Comparação da Marcação Celular pelos Fragmentos de Anticorpo FvFc WT e FvFc Mut



Fonte: Elaborada pela autora. Comparação da marcação celular pelos fragmentos de anticorpo FvFc WT e FvFc Mut. Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) das células marcadas com 1000 ng dos fragmentos FvFc WT e FvFc Mut, seguidos de detecção com anticorpo anti-Fc humano conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor-488. Os valores de MFI apresentados correspondem à subtração do MFI do controle de ligação inespecífica. O teste t de Student não pareado indicou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos, com maior marcação observada para o FvFc Mut. Os dados representam média ± desvio padrão (SD), com $n = 4$ réplicas biológicas.

Os ensaios de citometria indicam que a mutação randômica inserida na sequência do scFv do Rituximabe por eP-PCR não afetou negativamente a capacidade de reconhecimento e ligação ao antígeno específico; pelo contrário, beneficiou-a, conforme evidenciado pela maior marcação das células Raji (CD20+) pelo Fv-Fc Mut em comparação ao fragmento nativo, potencialmente pelo aprimoramento da afinidade pelo CD20. Esse achado reforça a influência das alterações na estrutura da região variável sobre a capacidade de interação com o alvo. Conforme evidenciado por Teixeira (TEIXEIRA et al. 2022), a construção de bibliotecas de anticorpos a partir da triagem de sequências das regiões de CDR permitiu eliminar padrões associados à instabilidade estrutural e perda de potência das moléculas, como a presença de sítios de isomerização de aspartato, e à reatividade cruzada

inespecífica, como resíduos de glicina sequenciais. Com essa abordagem, os autores conseguiram selecionar fragmentos de anticorpos com afinidade na faixa de picomolar (K_D médio de 96 pM) que não apresentavam ligação a proteínas não relacionadas.

Durante os processos de recombinação gênica e de hipermutação somática, que levam à maturação da afinidade das moléculas de anticorpo no organismo, as regiões de CDR não são as únicas que passam por modificações—mutações nas regiões de *framework* (FWR) também podem impactar a afinidade e a capacidade de neutralização dos anticorpos. Estudos demonstram que essas mutações desempenham um papel fundamental na estabilidade estrutural e na flexibilidade conformacional dos anticorpos, influenciando diretamente na interação com o antígeno. Na pesquisa conduzida por Henderson e colaboradores (HENDERSON et al. 2019) foi evidenciado que mutações nas FWRs podem modificar a flexibilidade interdomínios dos anticorpos, afetando a orientação relativa dos domínios variáveis (V_H e V_L) e a plasticidade do parátopo, sítio de reconhecimento抗igenico nas moléculas de imunoglobulina. No contexto dos anticorpos amplamente neutralizantes contra o HIV-1, mutações na região de "cotovelo" do fragmento Fab foram associadas a ajustes estruturais que permitiram maior adaptação ao antígeno. Além disso, tais mutações podem compensar efeitos desestabilizadores das mutações nas CDRs, garantindo que a afinidade aumentada não comprometa a estabilidade da molécula

Apesar da indicação de melhoria na afinidade a partir do observado nos ensaios de citometria de fluxo, é fundamental caracterizar quantitativamente esse parâmetro para a interação de cada par FvFc-CD20, permitindo validar de maneira mais precisa se o aumento de MFI reflete, de fato, uma maior afinidade pelo CD20. Técnicas como Interferometria de Biocamada e de Ressonância Plasmônica de superfície poderiam ser utilizadas para esse objetivo, complementando os achados.

Outro aspecto importante, é a necessidade de avaliar a capacidade dos fragmentos FvFc e Mut de eliciar as funções efetoras associadas ao mecanismo de ação do Rituximabe. A afinidade de um anticorpo pelo seu alvo é um dos fatores determinantes para sua eficácia terapêutica, sendo tradicionalmente otimizada para alcançar interações de alta estabilidade. No entanto, a relação entre afinidade e funcionalidade depende do mecanismo de ação do anticorpo, e diferentes estratégias de modulação da afinidade podem ser necessárias para maximizar seu potencial terapêutico. No caso de anticorpos citotóxicos, como o Rituximabe, uma afinidade elevada pode favorecer a ligação sustentada ao alvo, garantindo a opsonização eficiente das células marcadas e promovendo a ativação de mecanismos efetores mediados por Fc, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e a citotoxicidade

mediada por complemento (CDC). No entanto, Mazor e colaboradores. (MAZOR et al. 2016) demonstraram que, para determinados alvos, anticorpos com constantes de afinidade menores podem apresentar atividade citotóxica superior. O estudo revelou que um anticorpo com um K_D de 148 nM induziu uma resposta mais robusta de ADCC em comparação com variantes de maior afinidade, sugerindo que a dissociação mais rápida pode favorecer a reativação contínua dos efetores imunológicos e o recrutamento eficiente de células imunes.

Além da citotoxicidade mediada por anticorpos, a modulação da afinidade também tem papel crítico na funcionalidade dos anticorpos agonistas, projetados para ativar receptores imunológicos e amplificar respostas celulares. Estudos recentes (YU et al. 2023), demonstraram que a redução da afinidade pode, paradoxalmente, aumentar a eficácia desses anticorpos. O estudo avaliou variantes de afinidade de anticorpos direcionados a receptores imunomoduladores, como CD40, 4-1BB e PD-1, e mostrou que anticorpos de afinidade reduzida promovem maior agregação de receptores na membrana celular, resultando em ativação mais eficiente das células-alvo. No modelo de CD40, por exemplo, variantes de baixa afinidade induziram expansão aprimorada de células T e aumento da resposta antitumoral, desafiando a noção convencional de que maior afinidade é sempre desejável para anticorpos terapêuticos.

Esses achados reforçam que a definição da afinidade ideal de um anticorpo deve considerar não apenas a estabilidade da interação antígeno-anticorpo, mas também a dinâmica da ativação biológica desejada. Por isso, correlacionar o impacto da mutação na capacidade de ligação ao alvo com a eficiência das respostas efetoras fornecerá informações valiosas para a otimização de anticorpos vidando o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou o impacto de uma mutação inserida na sequência de um scFv derivado do rituximabe, fusionado à porção Fc de um IgG1 humana, em comparação com a molécula de referência reconstituída no mesmo formato (FvFc). As proteínas recombinantes foram expressas em uma plataforma eucariótica e purificadas com protocolos que resultaram em quantidades satisfatórias e alto grau de pureza para realização posterior dos ensaios de citometria, conforme verificado por SDS-PAGE. A presença dos fragmentos recombinantes foi detectada em ensaios de *western blotting*, utilizando duas moléculas de detecção distintas, um anticorpo anti-Fc humano e proteína L. A análise funcional revelou diferenças significativas na capacidade de ligação ao alvo entre o fragmento mutante e o nativo. Enquanto isso, as células CD20⁺ não foram marcadas pelo Fv-Fc WT e Mut de maneira expressiva. Esses resultados indicam que a mutação inserida na sequência do scFv analisado no presente estudo contribuiu para o aumento na capacidade de reconhecimento e de ligação ao antígeno alvo, expresso em sua conformação nativa na superfície celular. Esses efeitos também são indicativos de possíveis aumentos na afinidade dos scFv's pelo CD20. Contudo, estudos sobre a cinética de interação de cada par FvFc-CD20 e a determinação das constantes de afinidade (K_D) contribuirão para aprofundar a compreensão dos achados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo. Além disso, caracterizações adicionais são necessárias, especialmente quanto à indução de mecanismos efetores típicos do Rituximabe. Isso permitirá avaliar se a mutação melhora o reconhecimento antigênico e potencializa a ativação da resposta imune simultaneamente.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. Imunologia Celular e Molecular. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2022.
- AVASTIN® (bevacizumabe). Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. Solução injetável 25 mg/mL, 4 mL e 16 mL. São Paulo: Roche, 2024. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 8 fev. 2025.
- BALDO, B. A. Immune-and Non-Immune-Mediated Adverse Effects of Monoclonal Antibody Therapy: A Survey of 110 Approved Antibodies. **Antibodies**, v. 11, n. 1, 1 mar. 2022.
- BALDWIN, W. M.; VALUJSKIKH, A.; FAIRCHILD, R. L. The neonatal Fc receptor: Key to homeostatic control of IgG and IgG-related biopharmaceuticals. **American Journal of Transplantation**, v. 19, n. 7, p. 1883-1894, 1 jul. 2019.
- BEZERRA, Marcus Rafael Lobo. Evolução dirigida da região variável do anticorpo monoclonal Rituximabe: construção de uma biblioteca para seleção de moléculas Anti-CD20 com alta afinidade via phage display. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019
- 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. 2024. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2024.
- BINDER, M. et al. The epitope recognized by rituximab. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 1975–1978, 15 set. 2006.
- BRAIG, F. et al. Cetuximab resistance in head and neck cancer is mediated by EGFR-K521 polymorphism. **Cancer Research**, v. 77, n. 5, p. 1188–1199, 1 mar. 2017.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024.
- BRINEY, B. et al. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. **Nature**, v. 566, n. 7744, p. 393–397, 21 fev. 2019.
- BURKHARDT, B. et al. Impact of Fc gamma-receptor polymorphisms on the response to rituximab treatment in children and adolescents with mature B cell lymphoma/leukemia. **Annals of Hematology**, v. 95, n. 9, p. 1503–1512, 1 set. 2016.
- CASTELLI, M. S.; MCGONIGLE, P.; HORNBYS, P. J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 7, n. 6, p. e00535, 1 dez. 2019.
- CHIU, M. L. et al. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. **Antibodies**, v. 8, n. 4, p. 55, 1 dez. 2019.

CZUCZMAN, M. S. et al. Acquisition of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1561–1570, 1 mar. 2008.

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, 18 maio 2007.

DUAN, Y. et al. Tuning the ignition of CAR: optimizing the affinity of scFv to improve CAR-T therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, p. 45, 1 jan. 2022.

EDELMANN, J. et al. Rituximab and obinutuzumab differentially hijack the B cell receptor and NOTCH1 signaling pathways. **iScience**, v. 24, n. 2, p. 102018, 19 fev. 2021.

ERBITUX® (cetuximabe). Merck S/A. Bula para o profissional de saúde. Solução injetável 5 mg/mL. Rio de Janeiro: Merck, 2020.

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

HANSEL, T. T. et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 4, p. 325–338, abr. 2010.

HENDERSON, R.; WATTS, B.E.; ERGIN, H.N. et al. Selection of immunoglobulin elbow region mutations impacts interdomain conformational flexibility in HIV-1 broadly neutralizing antibodies. **Nat Communications**, v. 10, n. 654, fev. 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08415-7>

JHAJJ, H. S. et al. Unlocking the potential of agonist antibodies for treating cancer using antibody engineering. **Trends in Molecular Medicine**, v. 29, n. 1, p. 55–72, 1 jan. 2023.

KHELWATTY, S. A. et al. Acquired resistance to anti-EGFR mAb ICR62 in cancer cells is accompanied by an increased EGFR expression, HER-2/HER-3 signalling and sensitivity to pan HER blockers. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 7, p. 1010–1019, 29 set. 2015.

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.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 7 ago. 1975.

KUMAR, A. et al. Binding mechanisms of therapeutic antibodies to human CD20. **mAbs**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2022.

LIU, H. F. et al. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. **mAbs**, v. 2, n. 5, p. 480–499, set. 2010.

MabThera® (rituximabe) Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. Solução para diluição para infusão 100 mg/10/mL, 500 mg/ 50 mL. São Paulo/SP: Roche, 2022.

- MAZOR, Y. et al. Enhancement of immune effector functions by modulating IgG's intrinsic affinity for target antigen. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157788, 1 jun. 2016.
- PACKER, D. The history of the antibody as a tool. **Acta Histochemica**, v. 123, n. 5, p. 151758, 1 maio 2021.
- REFF, M. E. et al. Depletion of B Cells In Vivo by a Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody to CD20. **Blood**, v. 83, p. 443–445, 15 jan. 1994.
- 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.
- SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S41–S52, fev. 2010.
- SHAPIRO, M. A. Regulatory considerations in the design, development and quality of monoclonal antibodies and related products for the diagnosis and treatment of cancer. **Frontiers in Oncology**, 2024.
- TEIXEIRA, A. A. R. et al. Simultaneous affinity maturation and developability enhancement using natural liability-free CDRs. **mAbs**, v. 14, n. 1, 2022.
- TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, p. 575–581, 14 abr. 1983.
- VERMI, W. et al. Slan+ monocytes and macrophages mediate CD20-dependent b-cell lymphoma elimination via ADCC and ADCP. **Cancer Research**, v. 78, n. 13, p. 3544–3559, 1 jul. 2018.
- Yu, X.; ORR, C.M.; CHAN, H.T.C. et al. Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody. **Nature**, v. 614, p. 539-547, fev. 2023.
<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05673-2>
- ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 3, p. 34, 1 set. 2020.