



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

LARISSA QUEIROZ PONTES

CONSTRUÇÃO, POR DESENHO RACIONAL, E CARACTERIZAÇÃO DE
VARIANTES DE AFINIDADE DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO
MONOCLONAL RITUXIMABE

FORTALEZA
2019

LARISSA QUEIROZ PONTES

CONSTRUÇÃO, POR DESENHO RACIONAL, E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES
DE AFINIDADE DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL
RITUXIMABE

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

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

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P858c Pontes, Larissa Queiroz.

Construção, por desenho racional, e caracterização de variantes de afinidade da região variável do anticorpo monoclonal Rituximabe / Larissa Queiroz Pontes. – 2019.
74 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

Coorientação: Profa. Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca.

1. Mutagênese sítio-dirigida. 2. Engenharia de anticorpos. 3. Rituximabe. 4. scFv. I. Título.

CDD 660.6

LARISSA QUEIROZ PONTES

CONSTRUÇÃO, POR DESENHO RACIONAL, E CARACTERIZAÇÃO DE VARIANTES
DE AFINIDADE DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL
RITUXIMABE

Defesa de dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Engenharia de anticorpos

Aprovada em: 07/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Maurício Fraga Van Tilburg
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À minha família: Marcos, Doralice, Amanda e
Priscila.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda a força espiritual que me concedeu para trilhar meus caminhos e me orientar diante da caminhada da vida, pela clareza de pensamento e de discernimento e pela paz.

Aos meus pais, Marcos Aurélio Pontes e Doralice Queiroz Pontes, por todo apoio, dedicação, cuidado, atenção e compreensão durante esses anos dessa curta, porém intensa caminhada acadêmica, sempre mostrando os caminhos corretos e seus valores e por serem meus exemplos de vida. À minha irmã, Amanda Pontes, por ser sempre a maior entusiasta da família quando o assunto é Biotecnologia e por sempre mostrar tanto amor, orgulho por mim e confiança no meu trabalho, sendo minha inspiração diária. À minha avó, Marlene de Freitas, que mesmo distante e sem entendimento direto sobre ciência, sempre me encoraja a ser uma pessoa melhor e ir além.

À minha companheira Priscila Sales, por todo o suporte nesta caminhada, por me fazer enxergar e crer no meu potencial quando eu não acreditava, por fazer parte dos meus sonhos e me deixar fazer parte dos seus, por estar sempre pronta a me ajudar, não importa a hora nem o momento, por sempre ter uma palavra amiga e amável e por todo o amor.

Aos amigos que a Biotecnologia me deu para a vida e tantos outros que a escalada acadêmica me fez encontrar. À Lia Pinho, pelo entusiasmo constante em nos fazer crescer, pelas palavras de incentivo no momento certo. Ao Marcus Rafael Lobo Bezerra, pelo compartilhamento diário de conhecimento e inspiração, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela parceria empreendedora. Ao Wallady da Silva Barroso, pela amizade sempre pronta a ouvir, pelo sorriso fácil em dias difíceis.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela orientação, pelo empenho em ensinar e me fazer crescer, por me instigando a ter senso crítico, proporcionando, assim, meu crescimento profissional. À Dra. Marcela Gambim, pela co-orientação, sempre disposta a ajudar no que preciso fosse, pelos conhecimentos tão francamente compartilhados. Aos alunos do laboratório, os quais sempre estão dispostos a ajudar e veem isso como uma forma de aprender. Ao grupo de Bioinformática da FIOCRUZ pela parceria. A todo o grupo do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) na Universidade de Fortaleza (UNIFOR), pela ótima infra-estrutura e pela frutífera parceria.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio (Código de Financiamento 001). À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), por ser a instituição que me proporcionou

aprendizados que levarei para o resto da vida e por fazer brilhar meus olhos com a pesquisa. À Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo aprendizado acadêmico e não acadêmico e por me fazer enxergar e respeitar as diferenças.

A todos que de outras maneiras estiveram envolvidos com este trabalho e que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O câncer, ou neoplasia, é uma patologia caracterizada pela proliferação descontrolada de células que pode ocorrer em diferentes tecidos. É de grande importância o desenvolvimento de medicamentos capazes de remediar, reduzir os sintomas ou evitar metástases. Nesse contexto, a imunoterapia surge como uma das estratégias mais bem-sucedidas para o tratamento das neoplasias. O Rituximabe é um anticorpo monoclonal utilizado no tratamento de linfomas. Seu mecanismo de ação se baseia no fato de que este anticorpo se liga à proteína CD20 expressa na membrana plasmática dos linfócitos B, levando à depleção destas. Porém, alguns pacientes apresentam resistência ao tratamento. Nesse sentido, no presente trabalho são propostas mutações na região variável do Rituximabe a fim de aumentar a afinidade do anticorpo pelo epítipo CD20. As mutações foram sugeridas através de desenho racional *in silico* em parceria com o grupo de bioinformática estrutural da Fiocruz Ceará. Os mutantes foram posteriormente obtidos *in vitro*, pela técnica de mutagênese sítio-dirigida, na forma de fragmentos do tipo scFv, cujas sequências foram confirmadas por sequenciamento na plataforma da Fiocruz-PE. Os fragmentos foram caracterizados por ensaios de dicroísmo circular e de desnaturação protéica. A capacidade de ligação destes scFvs ao antígeno foi avaliada por ELISA. Como resultados, os fragmentos de anticorpo expressos foram obtidos na forma solúvel; obteve-se, por dicroísmo circular, a confirmação do perfil de estrutura secundária em folhas- β tanto do scFv nativo como dos mutantes; através do ELISA, constatou-se que todos os fragmentos interagiram com o peptídeo contendo o epítipo, com destaque para o quádruplo mutante MUT3; e os scFvs apresentaram um perfil de desnaturação térmica semelhante entre si, obtido por fluorescência intrínseca do triptofano. O trabalho abre possibilidades futuras de construção de moléculas no formato scFv-Fc (com maior afinidade ao epítipo do CD20), acoplando-se os fragmentos de maior afinidade a um domínio Fc, onde a molécula resultante, além de apresentar maior afinidade pelo alvo, apresentará maior estabilidade quando comparada ao fragmento scFv e possibilidade de elicitar funções efetoras. A perspectiva é que a melhora na afinidade possa representar melhora na atividade citotóxica.

Palavras-chave: Mutagênese sítio-dirigida. Engenharia de anticorpos. Rituximabe. scFv.

ABSTRACT

Cancer, also known as neoplasia, is a pathology characterized by uncontrolled proliferation of cells that can occur in different tissues. It is of major concern that drug development be capable of mitigate, reduce symptoms or prevent metastasis. Thereby the aforementioned, immunotherapy happens to be one of the most successful strategies on cancer treatment. Rituximab is a monoclonal antibody used in the treatment of lymphomas. Its mechanism of action is based on the interaction between it and the CD20 membrane protein expressed on B lymphocytes, guiding them to depletion. However, many patients are resistant to this treatment. In this study, we propose mutations on the variable region of Rituximab in order to increase its affinity to the CD20 epitope. Structural bioinformatics researchers of Fiocruz-CE in collaboration with our group suggested mutations based on structural and energetic features. These mutants were obtained *in vitro* by site-directed mutagenesis, specifically on its scFv format, and their sequences confirmed on Fiocruz-PE platform. The fragments were characterized by circular dichroism, had their capacity of binding confirmed by ELISA, and had their performance of protein denaturation and stability of antibody fragments evaluated by intrinsic tryptophan fluorescence. As results, our expression strategy led us to get all soluble fragments; it was possible to trace a secondary structure profile of β -sheet to the wt and to the mutants scFv; by ELISA, it was feasible to confirm the binding capacity of all fragments to peptide, which contains the epitope, where the quadruple mutant MUT3 was highlighted; and all the fragments presented a similar thermal denaturing profile by intrinsic tryptophan fluorescence. This work avenues future constructs on the scFv-Fc format, where it will be possible to chain the variants with highest affinities to an Fc domain. The resulting molecule will be more stable than the antibody fragment, will be capable of elicit immune effector functions, as well as will comprise higher affinity to the CD20 antigen. The perspective is the better is the affinity; the greater will be cytotoxic activity.

Keywords: Site-directed mutagenesis. Antibody engineering. Rituximab. scFv.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura geral de um anticorpo	18
Figura 2	– Produção de anticorpos monoclonais com o uso de hibridoma	19
Figura 3	– Representação esquemática dos principais mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais	20
Figura 4	– Ilustração da proteína transmembrana CD20	22
Figura 5	– Mecanismos de ação do Rituximabe	23
Figura 6	– Principais fragmentos de anticorpos utilizados para engenharia	25
Figura 7	– Visão geral da técnica de PCR mutagênica	30
Figura 8	– Plasmídeos relevantes para o trabalho	40
Figura 9	– Estrutura tridimensional da interação scFv nativo e alça de CD20, potencial de interação intermolecular e análise estrutural para sugestão de mutante	50
Figura 10	– Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas com ligação scFv-SUMO	51
Figura 11	– SDS-PAGE (12,5 %) de scFv-SUMO e scFv	52
Figura 12	– Vias metabólicas otimizadas na SHUFFLE	53
Figura 13	– SDS-PAGE (12,5 %) de scFv nativo e mutantes pós clivagem da SUMO	54
Figura 14	– <i>Western Blot</i> do scFv nativo e mutantes	56
Figura 15	– Espectro de dicroísmo circular do scFv nativo	57
Figura 16	– Espectro de dicroísmo circular dos mutantes	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Aprovações pelo FDA para novas aplicações de biofármacos e novas licenças para biológicos	16
Gráfico 2 – ELISA scFv nativo e mutantes	59
Gráfico 3 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência de acordo com a desnaturação proteica	61
Gráfico 4 – Temperaturas de inflexão obtidas através da desnaturação proteica	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das coordenadas de reação delimitadas, tempos de simulação e janelas de refinamento necessários para cada sistema obtido	37
Tabela 2 – Rendimentos em mg de proteínas por litro de cultura dos fragmentos de anticorpo (scFv) expressos em SHUFFLE e purificados	54
Tabela 3 – Médias e desvios-padrão observados no ELISA	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDI	Associação Brasileira para o Desenvolvimento da Indústria
ABIQUIFI	Associação Brasileira de Química Fina
Ac	Anticorpos
ADCC	Citotoxicidade mediada por Células Anticorpo-Dependente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento
CD	Dicroísmo Circular
CDC	Citotoxicidade Dependente de Complemento
CDR	Região de Determinação de Complementariedade
DM	Dinâmica Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Imunoglobulinas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LF	Linfoma Folicular
LH	Linfoma Hodgkin
LNH	Linfoma não-Hodgkin
mAbs	Anticorpos Monoclonais
MS	Ministério da Saúde
MSD	Mutagênese Sítio-Dirigida
MST	Termoforese em microescala
NK	<i>Natural killer</i>
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonil
RDC	Resoluções da Diretoria Colegiada
Rg	Raio de giro
RMSD	<i>Root Median Square Deviation</i>
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	Tetrametilbenzidina

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
Å	Angstrom
Da	Daltons
\$	Dólar
γ	Gama
κ	Kappa
®	Marca Registrada
μ	Micro
m	Mili
n	Nano
Φ	Phi
%	Porcentagem
Ψ	Psi
K	Quilo
R\$	Real
U	Unidade enzimática
ξ	Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Produtos Biológicos	14
1.1.1	<i>Anticorpos Monoclonais Terapêuticos</i>	17
1.2	Rituximabe	21
1.3	Engenharia de anticorpos	24
1.3.1	<i>Desenho Racional de proteínas</i>	27
1.3.2	<i>Mutagênese Sítio-Dirigida</i>	27
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Desenho racional do scFv nativo	33
3.1.1	<i>Modelagem do scFv de Rituximabe</i>	33
3.1.2	<i>Simulação de dinâmica molecular do scFv de Rituximabe em água</i>	33
3.1.3	<i>Simulação de dinâmica molecular do complexo scFv de Rituximabe-alça de CD20</i>	34
3.1.4	<i>Análises estruturais</i>	35
3.1.5	<i>Cálculo de ΔG de ligação</i>	36
3.2	Desenho de primers	38
3.3	Obtenção de células bacterianas, de vetores plasmidiais, do gene <i>single-chain fragment variable</i> (scFv) do anticorpo monoclonal Rituximabe e do peptídeo biotilado contendo o epítipo do Rituximabe	39
3.4	Obtenção de células bacterianas competentes por método químico	40
3.5	Transformação bacteriana	40
3.6	Miniprep	41
3.7	Digestão plasmidial com enzimas de restrição	41
3.8	Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida	42
3.9	Purificação de amostras a partir da excisão do gel e de solução	42
3.10	Ligação entre vetor e inserto	43
3.11	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	43
3.12	Expressão heteróloga do scFv em sistema bacteriano	44

3.13	Cromatografia de afinidade para purificação proteica	44
3.14	Dicroísmo circular	46
3.15	Western Blot	47
3.16	ELISA com peptídeo	47
3.17	Ensaio de estabilidade térmica de proteínas	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Desenho racional do scFv nativo e mutantes	49
4.2	Clonagem molecular do scFv nativo	50
4.3	Produção das variantes de scFv do Rituximabe	51
4.4	Expressão heteróloga do scFv nativo e mutantes em sistema procarioto	51
4.5	Western Blot	55
4.6	Dicroísmo circular	56
4.7	ELISA com peptídeo	58
4.8	Estabilidade térmica de proteínas	60
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer ou neoplasia é um conjunto de doenças onde as células dos tecidos acometidos crescem de maneira desordenada, obtendo a capacidade de invadir tecidos. As causas dessa proliferação descontrolada são multifatoriais, o que dificulta o tratamento, pois um paciente pode responder ao tratamento e outro não, justamente por conta da dificuldade em determinar a causa da doença (INCA, 2018).

Quanto à origem, os cânceres podem ser chamados de carcinomas, quando começam em tecidos epiteliais; melanomas, quando em tecidos conjuntivos; e linfomas, quando tem início no sistema linfático do indivíduo. Os linfomas são classificados em Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH), baseados em diferenças morfológicas.

No Brasil, estudos realizados pelo INCA estimam mais de 10.000 novos casos de linfoma não-Hodgkin no biênio 2018-2019 (INCA, 2018). Essa é a 11^a neoplasia mais frequente, acometendo homens e mulheres de maneira semelhante. Existem mais de 20 tipos diferentes de LNH a partir dos diferentes tipos de glóbulos brancos, como os linfócitos B, as células T e as células NK (do inglês, *natural killer*) (INCA, 2018).

Medicamentos contra câncer, os quimioterápicos, convencionais são conhecidos pelos inúmeros efeitos colaterais, normalmente, gerados pela baixa especificidade ao alvo, acarretando destruição de células cancerosas, mas também das não cancerosas que circundam a região tumoral. Diante disso, as empresas farmacêuticas vêm trabalhando para aperfeiçoar o tratamento de modo a poupar as células saudáveis, tornando, assim, a terapia mais direcionada ao alvo (células tumorais) (ELGUNDI *et al.*, 2016). Uma alternativa que tem se mostrado bastante promissora é a imunoterapia, a qual compreende o uso de anticorpos monoclonais no tratamento das neoplasias.

1.1 Produtos Biológicos

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), produtos biológicos são medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal e medicamentos obtidos por procedimento biotecnológicos (ANVISA, 2011). Esta agência delibera, entre outras atividades, a definição e regras de comercialização desse tipo de produto no país. Através de Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC), regulamenta-se todos

os aspectos relacionados à caracterização, produção, embalagem e distribuição de produtos biológicos no Brasil.

A RDC N° 55/2010 dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos ou não, sendo assim definidas as principais moléculas pertencentes à categoria de biológicos: vacinas, imunoderivados, medicamentos contendo microrganismos vivos atenuados ou mortos e anticorpos monoclonais (ANVISA, 2011).

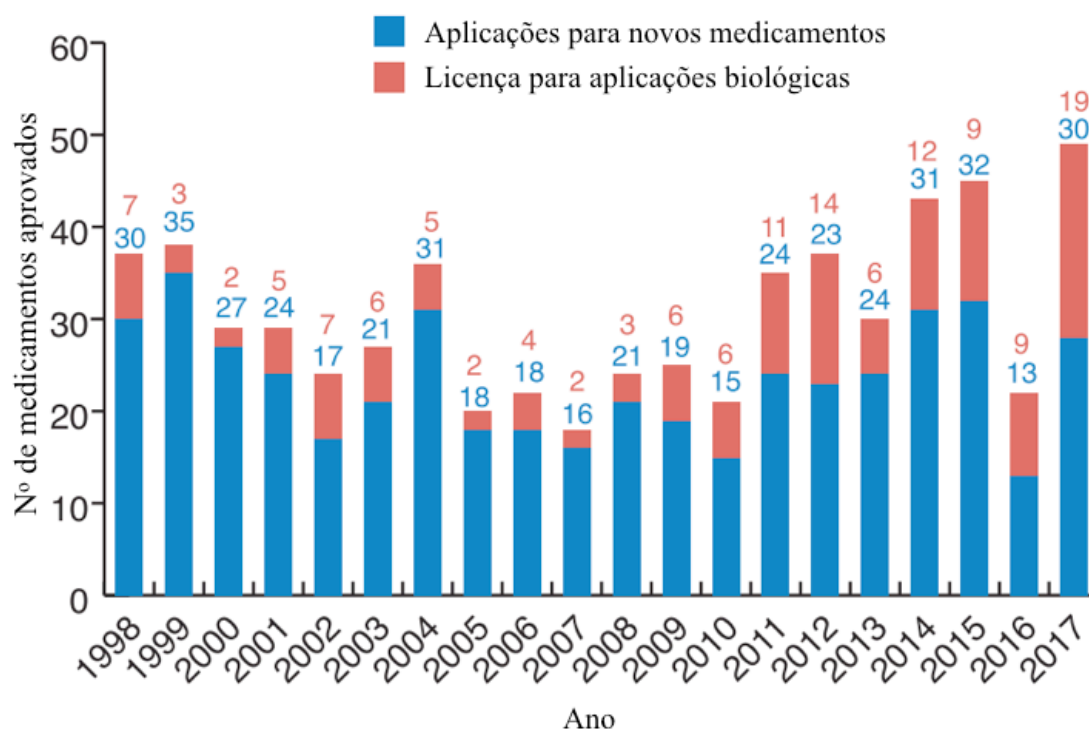
Na indústria farmacêutica, um nome genérico foi dado a fármacos produzidos por rota biotecnológica: biofármacos. Este termo está relacionado com proteínas manipuladas por técnicas de DNA recombinante, como os anticorpos monoclonais, onde essas biomoléculas podem ser obtidas através de cultivo celular ou de microrganismos e suas modificações.

Os biofármacos podem ainda ser divididos em gerações, onde os de primeira geração são aqueles em que a sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes é idêntica à da proteína nativa. Esta geração endereçou-se para repor ou aumentar o nível dessas proteínas heterólogas, sendo um exemplo dessa geração as terapias de reposição enzimática. Os biofármacos de segunda geração são proteínas cuja sequência pode ser modificada, interessando aqui uma melhoria da propriedade terapêutica, como redução da imunogenicidade e aumento de afinidade entre o ligante e a proteína (REIS *et al.*, 2009).

Os anticorpos monoclonais constituem-se uma classe de biofármacos cujo mercado mundial é crescente desde o lançamento do primeiro anticorpo monoclonal, o Muromonabe, utilizado no tratamento contra a rejeição de transplante de rins, em 1986. Na década de 1990, começou-se a comercializar anticorpos monoclonais do tipo quiméricos e seguindo-se à essa aprovação, o mercado se mostrou mais receptivo aos biofármacos, bem como às modificações desses anticorpos, como os humanizados e os totalmente humanos. Até 2013, o mercado global de anticorpos monoclonais teve sua receita movimentando cerca de \$75 bilhões, o que representou, aproximadamente, 50% da venda de todos os produtos biofarmacêuticos do mundo (ECKER *et al.*, 2015). Somente em 2017, o *Food and Drug Administration* (FDA), órgão americano equivalente à ANVISA brasileira, aprovou 49 novas biomoléculas com função terapêutica recentemente descoberta e liberou 19 licenças de uso para novos biológicos (MORRISON, 2018). O Gráfico 1 ilustra essas aprovações desde 1998 até 2017 pelo FDA, onde percebe-se um aumento gradual nos medicamentos aprovados por este órgão. Essas biomoléculas terapêuticas anualmente aprovadas compreendem biológicos novos, prontos para serem comercializados (Licença para aplicações biológicas) e novas moléculas a

serem estudadas nas fases clínicas do desenvolvimento de fármacos em humanos (Aplicações para novos medicamentos).

Gráfico 1 – Aprovações pelo FDA para novas aplicações de biofármacos e novas licenças para biológicos



Fonte: Adaptado de MORRISON, 2018. Em vermelho, novos medicamentos licenciados para serem comercializados, e, em azul, estudos com novas moléculas para ingresso nas fases clínicas em humanos.

O cenário de produção brasileira de biofármacos é ainda fortemente dependente de importação (MOTA *et al.*, 2014). Embora alguns laboratórios nacionais tenham recebido grande aporte de dinheiro como medida de desenvolver esses medicamentos, existe uma grande necessidade de importação desses produtos pelo Brasil, onerando o Sistema Único de Saúde (SUS). O governo brasileiro gasta cerca de R\$ 4 bilhões por ano com a importação desses produtos biotecnológicos. Estes itens correspondem a 51% dos gastos do Ministério da Saúde (MS), no entanto, representam apenas 4% da quantidade adquirida pelo MS (ABIQUIFI, 2016). Diante disso, o Banco Nacional de Desenvolvimento (BNDES) tem investido em fábricas de biofármacos, criando, até mesmo, um programa destinado a este setor, somando, desde 2004, recursos da ordem de R\$ 3,5 bilhões. Desde 2014, com o início da produção nacional, o governo espera economizar R\$ 225 milhões por ano (ABDI, 2013).

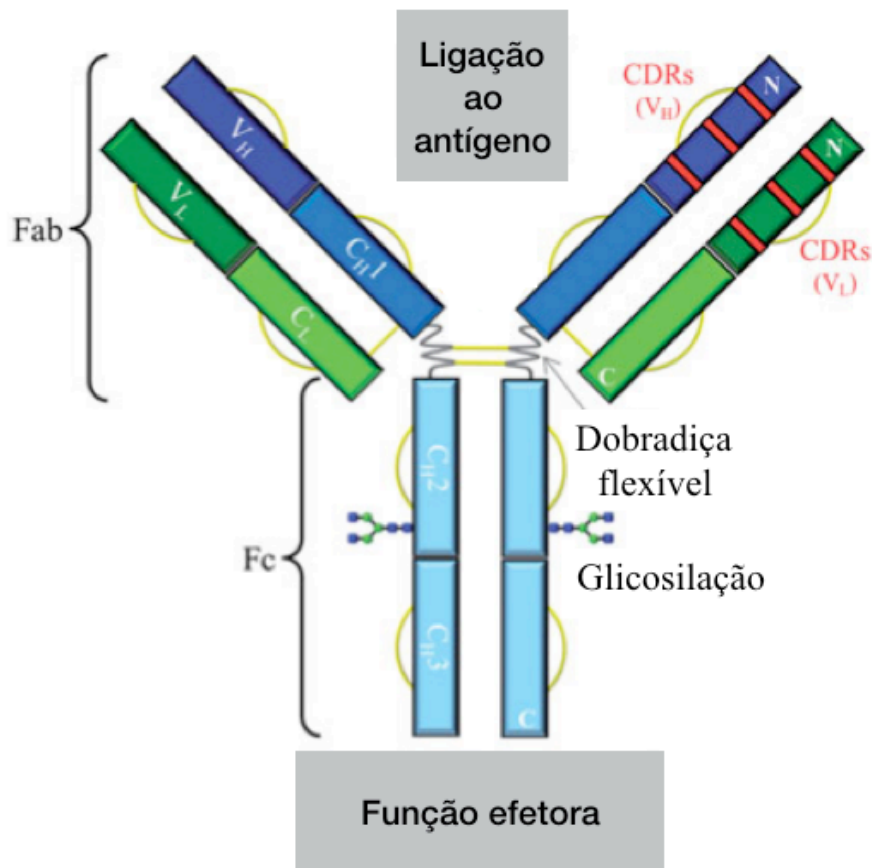
1.1.1 Anticorpos Monoclonais Terapêuticos

Os anticorpos (Ac), também chamados de imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas circulantes produzidas em resposta à exposição a estruturas estranhas conhecidas como antígenos. Tais moléculas, representadas esquematicamente na Figura 1, são responsáveis pela imunidade humoral do corpo e possuem duas cadeias leves (representadas pela letra L, do inglês *light*) e pesadas (representadas pela letra H, do inglês *heavy*), cada uma dessas cadeias possuem, ainda, regiões variáveis e constantes. As regiões variáveis são responsáveis pela interação com o antígeno e contém as regiões hipervariáveis (CDRs, do inglês *Complementarity Determining Regions*), que de fato fazem o contato físico com o antígeno. Existem 6 CDRs, 3 provenientes da porção variável da cadeia leve e 3, da cadeia pesada. As regiões hipervariáveis conferem aos anticorpos uma especificidade única e, quando interagem com o antígeno, ditam a força e afinidade desta ligação (KENNEDY *et al.*, 2017).

O fragmento cristalizável (Fc) formado pelas regiões constantes das cadeias pesadas, assim chamadas por terem menor variabilidade na sequência de aminoácidos, é responsável pelo recrutamento de outras células para elicitar a função efetora. Uma região de dobradiça, variando de 10 a 60 resíduos de aminoácidos, localizada entre Fab e Fc confere flexibilidade à molécula, permitindo que ao se ligar a diferentes antígenos, ela possa sofrer leves distorções sem comprometer a estrutura como um todo (ABBAS *et al.*, 2015). A porção Fc apresenta, ainda, uma glicosilação (asparagina 297 no domínio CH2), que é responsável pela conformação da cadeia, bem como por modular a interação com os receptores de Fc (FcγR), importantes desencadeadores dos mecanismos efetores (KENNEDY *et al.*, 2017; FONSECA *et al.*, 2018).

Os anticorpos humanos possuem 5 isotipos (classes): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, os quais são caracterizados pelas diferenças em suas estruturas, concentrações no sangue, principais funções, localizações e forma como são secretados (alguns são dímeros, outros monômeros ou, ainda, pentâmeros). Existem, também, subclasses ou subtipos dos IgA (IgA1 e IgA2) e IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) humanos, as quais apresentam diferenças estruturais que implicam em propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas (ABBAS *et al.*, 2015).

Figura 1 – Estrutura geral de um anticorpo

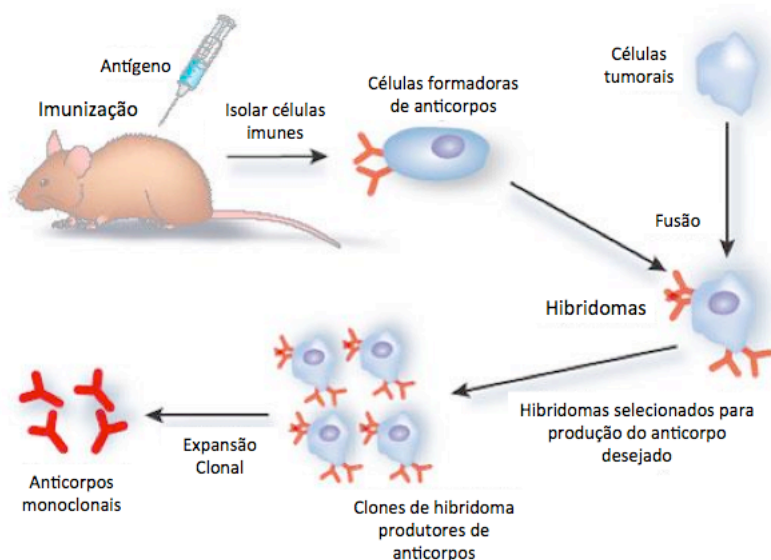


Fonte: Adaptado de KENNEDY *et al.*, 2017. Região Fab: porção de ligação ao antígeno, compreende V_H (região variável pesada), V_L (região variável leve), C_L (região constante leve) e C_{H1} (região constante pesada 1). As cadeias leve e pesadas são unidas por ligações dissulfeto. As regiões de CDRs estão presentes apenas nas porções variáveis. A região de dobradiça confere flexibilidade para a interação da porção Fab com o antígeno. Região Fc: fragmento cristalizável, também conhecido como região constante, a qual possui uma glicosilação e é responsável por elicitar funções efetoras, além de promover o escape da degradação dos lisossomos.

Em 1975, Georges J. F. Köhler e César Milstein descreveram os primeiros anticorpos monoclonais (mAb, do inglês *monoclonal Antibody*) com a descoberta da técnica de hibridização celular somática. Essa técnica procurou solucionar alguns inconvenientes de se trabalhar com anticorpos policlonais, sendo o principal deles a possibilidade de haver reações cruzadas indesejadas entre os anticorpos e os antígenos (MURPHY *et al.*, 2010a).

A tecnologia do hibridoma consiste na fusão de células esplênicas de camundongos previamente imunizados com células de um mieloma (tumor de células plasmáticas) de camundongo, resultando em células híbridas, que proliferam indefinidamente, assim como secretam anticorpos específicos contra o antígeno usado para imunizar o animal (Figura 2) (MURPHY *et al.*, 2010).

Figura 2 – Produção de anticorpos monoclonais com o uso de hibridoma



Fonte: Adaptado de MICHNICK, SIDHU, 2008. Camundongos previamente imunizados têm suas células formadoras de anticorpos isoladas e fusionadas a células de mieloma, formando o hibridoma propriamente dito. Esse hibridoma passará por uma etapa de triagem para obtenção das células produtoras dos anticorpos específicos para um dado antígeno. Logo após, há a expansão clonal, onde aumenta-se a quantidade de anticorpos provenientes apenas de um único tipo de célula e específicos para um determinado antígeno.

A partir do sucesso na obtenção desses anticorpos, abriu-se um horizonte de possibilidades de sua utilização para tratamento de doenças que exigem alta especificidade a um alvo, como as neoplasias, com efeitos colaterais reduzidos. Desta forma, o mercado de produtos biotecnológicos passou a utilizar essa ferramenta da tecnologia do hibridoma para alcançar maior eficiência com medicamentos no tratamento do câncer, gerando um produto de alto valor agregado, devido à dificuldade de obtenção, do baixo rendimento e do alto custo e tempo para produção e comercialização.

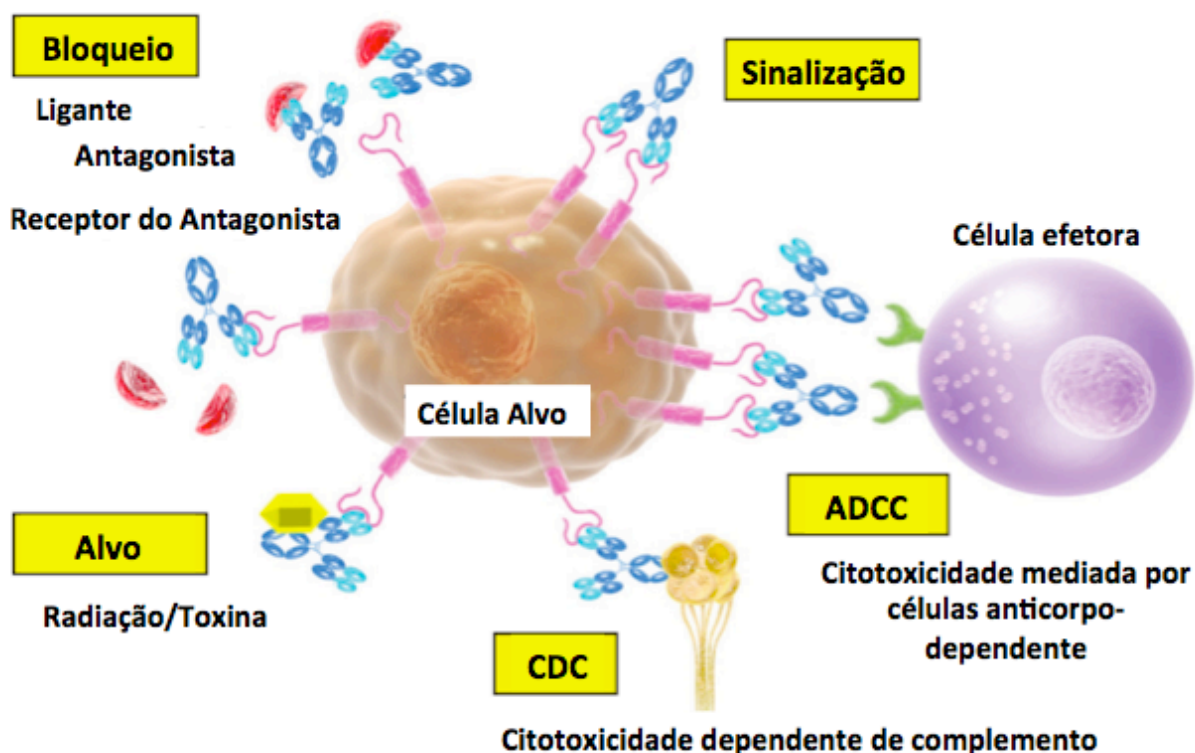
O desenvolvimento de anticorpos monoclonais terapêuticos teve sua explosão na década de 1980, e o primeiro anticorpo terapêutico (murino) foi lançado em 1986 como agente imunossupressor de órgãos transplantados chamado Orthoclone OKT3 (Muromonabe) (ECKER *et al.*, 2015; SUZUKI *et al.*, 2015). Desde então, tem-se um constante aperfeiçoamento de técnicas objetivando a melhoria da afinidade do anticorpo pelo antígeno, a redução da imunogenicidade e da citopenia, resultando em menores doses dos medicamentos, assim como dos efeitos adversos que esses medicamentos causam (GUAN *et al.*, 2015).

A nomenclatura de anticorpos monoclonais segue uma ordem quanto aos sufixos, os quais ajudam a revelar a composição dos mesmos. Anticorpos murinos possuem sufixo -omabe; quiméricos, -ximabe; humanizados, -zumabe; e humanos -umabe (BUSS *et al.*,

2012). Esses sufixos também nos dão uma ideia quanto a imunogenicidade observada nessas moléculas, uma vez que ela está relacionada à origem e à composição da proteína.

Os mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais podem variar entre si, mas os principais são: apoptose ou morte celular programada, citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC, do inglês *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), além da fagocitose (ADCP, do inglês *antibody-dependent cellular phagocytosis*) (KASI *et al.*, 2012), como representado na Figura 3. Os anticorpos podem interagir com ligantes ou receptores expressos na superfície celular e, com isso, bloquear a cascata de sinalização; podem, também, recrutar outras células imunológicas, como células NK, a fim de eliminar a célula invasora; podem desencadear processos citotóxicos na célula, ocasionando seu rompimento, entre outros mecanismos, de modo a eliminar a célula ou o patógeno invasor detectado pelo sistema imunológico.

Figura 3 – Representação esquemática dos principais mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais



Fonte: Adaptado de SUZUKI *et al.*, 2015. Célula-alvo ao centro, evidenciando os mecanismos pelos quais os anticorpos terapêuticos exercem suas atividades. Pode haver um bloqueio do receptor (impedimento) ou a marcação do anticorpo com moléculas tóxicas ou radioativas, alterações nas cascatas de sinalização celular, mecanismo de ADCC, onde os anticorpos elicitam respostas de outras células do sistema imune, especialmente as *Natural Killer* e mecanismo CDC, onde o sistema complemento é recrutado.

Esses mecanismos de ação, muitas vezes, são combinados pelas empresas do setor

(bio)farmacêutico para o tratamento de neoplasias. Uma consequência do sucesso dessa estratégia são os medicamentos considerados *blockbusters*, ou seja, fármacos com vendas anuais de US\$ 1 bilhão/ano (CARTER; LAZAR, 2017). Os anticorpos monoclonais figuram no topo das listagens de medicamentos mais vendidos e rentáveis para as grandes empresas farmacêuticas. Alguns exemplos são o Rituximabe, um anti-CD20 que depleta células tumorais por mecanismos de ADCC, CDC e indução de apoptose, Ipilimumabe, um anti-CTLA-4 importante no *checkpoint* imunológico, o qual se liga e antagoniza seus receptores e Trastuzumabe, um anti-HER2 que inibe o crescimento tumoral nas mamas, além de também ocasionar depleção por ADCC (CARTER; LAZAR, 2017; ZHOU; MARKS, 2017).

1.2 Rituximabe

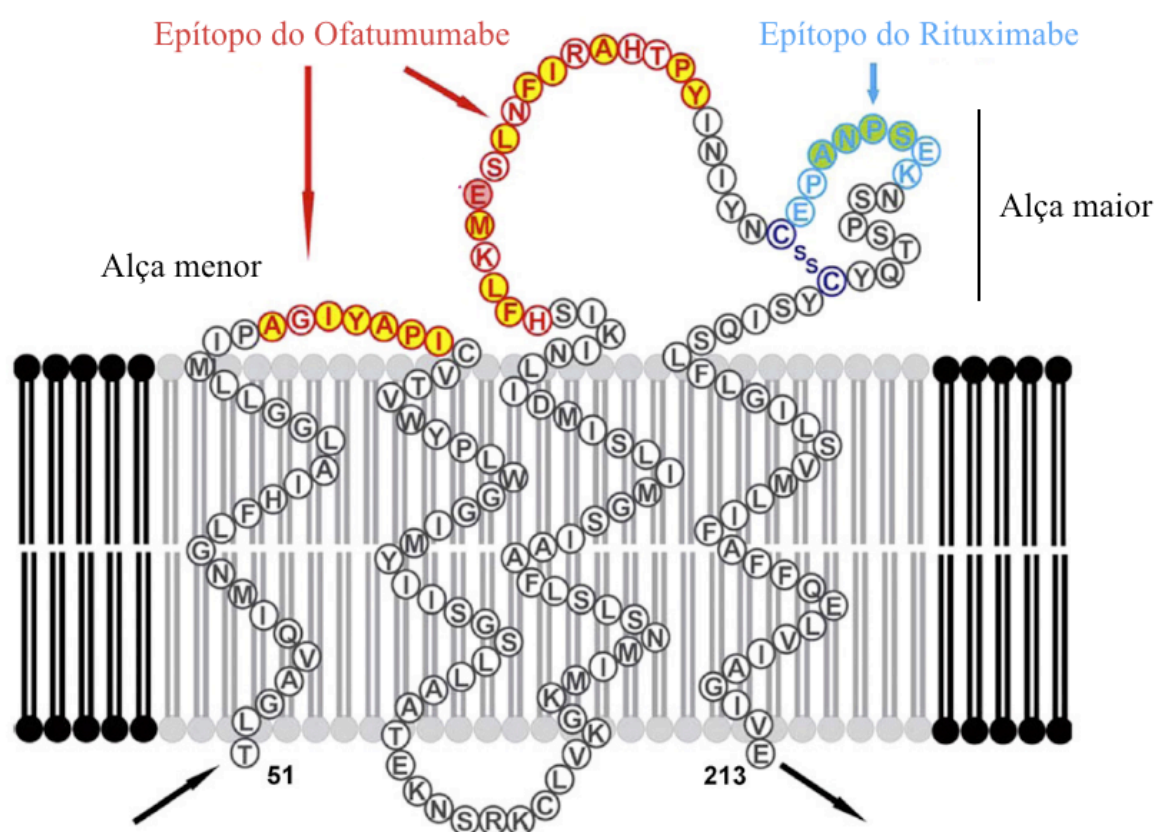
O Rituximabe (MabThera[®], Rituxan[®]) é um anticorpo monoclonal quimérico (tipo I), o qual possui uma região Fc IgG1 humana e uma região variável murina, a qual reconhece o antígeno CD20. É utilizado no tratamento de linfoma não-Hodgkin, linfoma difuso de grandes células B, leucemia linfocítica crônica, artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico. Pode ser administrado com outros fármacos, como ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (R-CHOP), mas também em combinação com alguns quimioterápicos, associado e conjugado a outras pequenas moléculas ou até mesmo como uma monoterapia (PIERPONT *et al.*, 2018). A região Fc é humana, o que confere vantagens deste anticorpo frente a anticorpos totalmente murinos, tais como: menor imunogenicidade, função efetora ativada de forma satisfatória em pacientes e meia-vida prolongada na circulação sanguínea, uma vez que tal região interage com os receptores Fc humanos (FEUGIER, 2015).

O CD20, o antígeno do Rituximabe, é uma proteína tetra-transmembrana glicosilada, de 33 KDa (que pode ser fosforilada quando em intensa proliferação, como no caso de células cancerosas (SEYFIZADEH *et al.*, 2016)), expressa quase exclusivamente em células B e pré-B, mas não em plasmócitos e em células pró-B. Essa proteína contém a porção N e C-terminal intracelular e dois *loops* (alças) extracelulares, uma maior e outro menor, sendo nestas regiões que se encontram os epítomos de diferentes anticorpos terapêuticos anti-CD20 (Figura 4). Sua função biológica ainda não é muito bem elucidada, porém acredita-se que ela seja um canal iônico de cálcio (FEUGIER, 2015; PIERPONT *et al.*, 2018).

O Rituximabe foi o primeiro anticorpo monoclonal a ser aprovado, pelo FDA, em 1997, sendo seu uso voltado ao tratamento de LNH. Segundo Du *et al.* (2007), após estudos

de cristalografia com a porção Fab do mAb co-cristalizada com a alça maior do CD20, o epítipo do Rituximabe corresponde aos resíduos 163-187 do *loop* extracelular maior do CD20 (Figura 4). Esta região contém duas porções essenciais para o sucesso na interação entre o anticorpo e o antígeno: os resíduos ¹⁷⁰ANPS¹⁷³, os quais estão intrinsecamente relacionados à ligação com mAb e a ponte dissulfeto formada entre os resíduos de cisteína nas extremidades do epítipo, sem a qual, observou-se a incapacidade de ligação do anticorpo (DU *et al.*, 2007).

Figura 4 – Ilustração da proteína transmembrana CD20

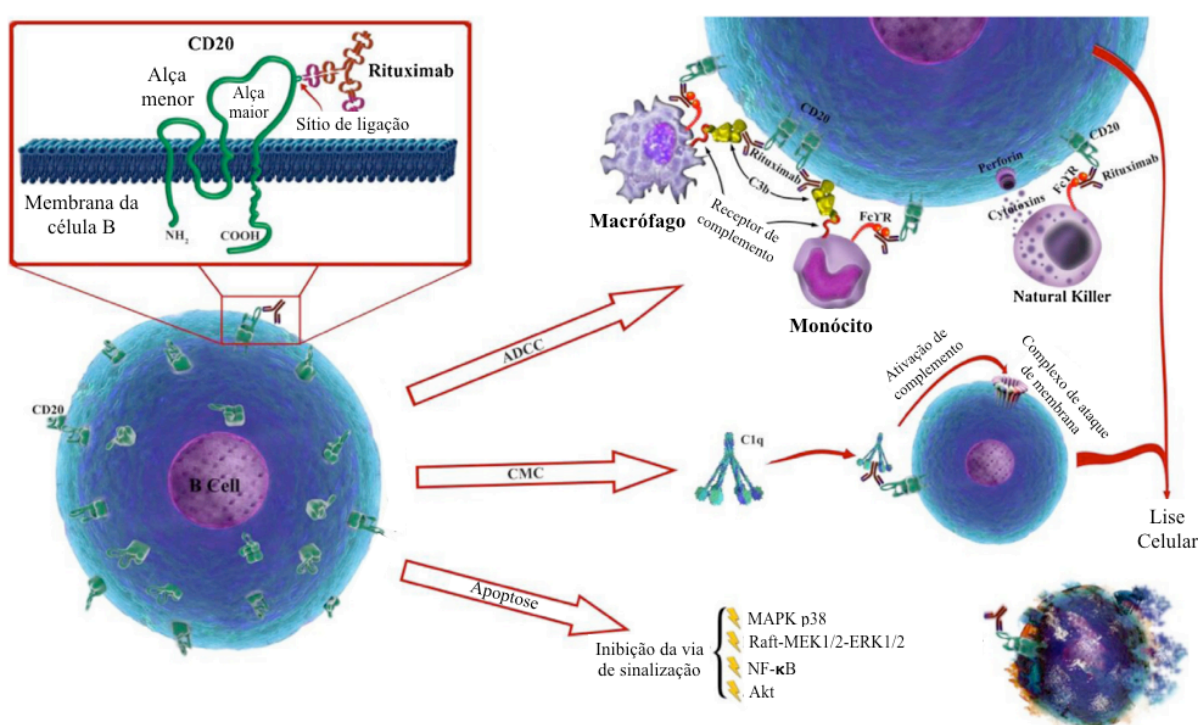


Fonte: Adaptado de DU *et al.*, 2009. Em azul, evidencia-se o epítipo do Rituximabe, bem como a região ANPS de interação mais efetiva com o mAb. Na alça maior, está representada a ligação dissulfeto, essencial para a interação entre o Rituximabe e o CD20. Em vermelho, ilustra-se o epítipo do Ofatumumabe, outro anticorpo monoclonal anti-CD20.

Os mecanismos de ação pelos quais o Rituximabe age são diversos, incluindo ADCC (majoritária), CDC e, em menor intensidade, apoptose, como representado na figura 5 (JAIN; O'BRIEN, 2013; SEYFIZADEH *et al.*, 2016). A ADCC é desencadeada através da ligação da região Fc do anticorpo com o receptor FcγR presente nas células efetoras do sistema imune, como células NK, macrófagos e granulócitos. CDC é estimulada a partir do recrutamento de

moléculas do complemento pelo reconhecimento via porção Fc do anticorpo ligado ao CD20, promovendo a lise da célula tumoral. A via de toxicidade direta, ou apoptótica, provém da afinidade de ligação entre o anticorpo e o epítipo. Em geral, as vias de sinalização que levam a célula cancerosa à apoptose são complexas e envolvem diversas moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e proteínas intermediárias. Algumas rotas de sinalização estudadas são a via de inibição de MAPK, de NF- κ B e Akt (CARDARELLI *et al.*, 2002; BAGACEAN *et al.*, 2016; SEYFIZADEH *et al.*, 2016).

Figura 5 – Mecanismos de ação do Rituximabe



Fonte: Adaptado de SEYFIZADEH *et al.*, 2016. Mecanismos ação apresentados pelo mAb Rituximabe: ADCC, CMC (ou CDC) e apoptose (representada a nível molecular pelas vias de sinalização desencadeadas pelo anticorpo).

O entendimento da cinética de ligação entre antígeno e anticorpo é fundamental para o sucesso da engenharia de proteínas, bem como de imunossaios (DINH *et al.*, 2016). A análise de afinidade ocorre através da medida das constantes de associação (K_{on}) e de dissociação (K_{off}) entre epítipo e parátipo, originando assim a razão K_{on}/K_{off} , também conhecida como K_D , fornecendo informações quantitativas a cerca da afinidade com que o anticorpo se liga e desliga do antígeno. Quanto maior o valor de K_{off} (consequentemente, menor o valor de K_D), maior a afinidade do mAb (MURPHY *et al.*, 2010b). Em geral, os anticorpos monoclonais disponíveis no mercado apresentam constantes de dissociação baixas

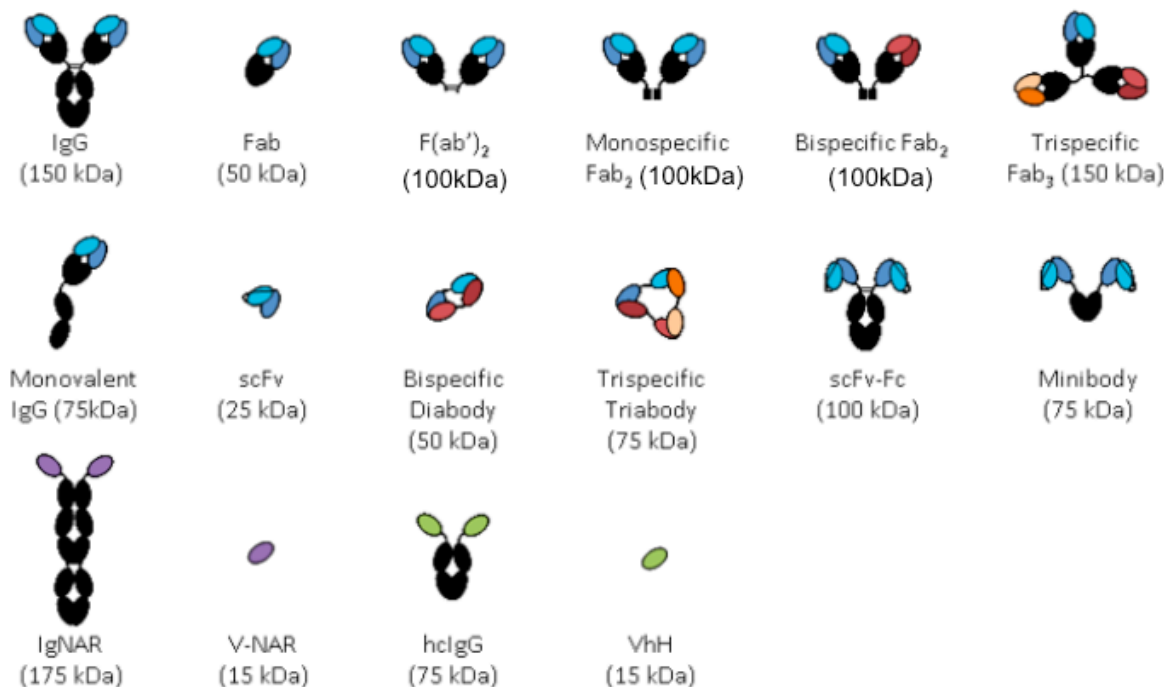
na faixa de 10^{-11} M (KAYMAKCALAN *et al.*, 2009). No entanto, o Rituximabe apresenta constante na ordem de 10^{-9} M, propriedade que pode ser melhorada para o aumento da morte celular por apoptose. Essa afinidade pelo antígeno é crítica para sua aplicação terapêutica e advém de interações eletrostáticas em resíduos específicos nas CDRs (FUKUNAGA; TSUMOTO, 2013).

Em 2018, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), estimou que o impacto orçamentário da compra desse medicamento no tratamento de LNH é de, aproximadamente, R\$ 20.000,00 por paciente. É urgente, portanto, a necessidade de maiores investimentos para o desenvolvimento da indústria nacional de biofármacos. Essa via de crescimento alavanca tanto o setor farmacêutico/biotecnológico diretamente, quanto auxilia na desoneração do SUS, ampliando, assim, as oportunidades de tratamento para os mais necessitados da rede pública de Saúde.

1.3 Engenharia de anticorpos

A engenharia de anticorpos evoluiu a partir dos estudos de proteólise de anticorpos com papaína ou pepsina, com ou sem redução das ligações dissulfeto que unem as cadeias peptídicas (LERNER, 2016) e do aperfeiçoamento da pesquisa envolvendo anticorpos monoclonais, onde percebeu-se a importância e a funcionalidade de fragmentos de anticorpos, não sendo necessário o uso da molécula inteira para exercer determinada função (KENNEDY *et al.*, 2017; SAEED *et al.*, 2017). Isso, também, proporcionou o estudo de inúmeros fragmentos diferentes, adequados para cada propósito (Figura 6). Atualmente, a engenharia de anticorpos busca estudar tanto os anticorpos monoespecíficos, aqueles que possuem apenas um epítipo alvo, possuindo assim uma bivalência para este antígeno, como para os bispecíficos, os quais têm a capacidade de ligar-se a dois diferentes antígenos ou dois diferentes epítopos no mesmo antígeno (KONTERMANN; BRINKMANN, 2015; SPASEVSKA *et al.*, 2015).

Figura 6 – Principais fragmentos de anticorpos utilizados para engenharia



Fonte: Adaptado de <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-engineering/antibody-fragments/>. A partir de uma molécula de IgG, inúmeros fragmentos, de diferentes tamanhos podem ser obtidos de acordo com características específicas desejadas. Anticorpos de tubarão (IgNAR) e de camelídeos (hcIgG) que possuem apenas a cadeia pesada também geram fragmentos bastante estudados

A maioria dos fragmentos de anticorpos que vêm sendo estudados é derivado de IgG, pois estes são os mais abundantes entre os humanos e os melhores alvos (bio)farmacêuticos devido às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dessas moléculas. A figura 6 mostra alguns fragmentos, obtidos através de técnicas de engenharia de anticorpos, como a porção Fab (do inglês, *antigen-binding fragment*) (monovalente, bivalente e trivalente, reconhecendo um, dois e três antígenos distintos, respectivamente); o scFv (do inglês, *single-chain fragment variable*), cuja composição contempla apenas os domínios variáveis tanto da cadeia pesada, como da cadeia leve, unidos por um pequeno *linker* peptídico bastante flexível (em geral, composto por glicina e serina), que podem originar dímeros e trímeros de scFv; uma molécula do tipo scFv-Fc; os *minibodies*, quando fundidos com a porção C_{H3} e os *nanobodies* (V-NAR; VhH), domínios variáveis derivados de anticorpos de tubarão (IgNAR) ou de camelídeos (hcIgG), destituídos de cadeia leve (HOLLIGER; HUDSON, 2005; MUYLDERMANS; SMIDER, 2016).

O tamanho reduzido dos fragmentos (scFv = 25 kDa, por exemplo) em relação aos anticorpos completos (150 kDa) promove uma diminuição na meia vida destas moléculas, visto que são eliminadas facilmente pelos rins, pois estes conseguem metabolizar compostos de até 55 kDa (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Acrescido disso, em geral são moléculas desprovidas da porção Fc, domínio que se liga ao receptor neonatal (FcRn) responsável pela meia vida das IgGs (FONSECA *et al.*, 2018).

A escolha do formato depende do objetivo de uso. *Minibodies* podem ser ideais para terapias em tumores, pois possuem rápida eliminação do corpo (*clearance*) e menor meia-vida, além de serem melhor absorvidos pelo tumor. Os scFvs são ótimos para atingir alvos, pois possuem alta penetrância nos tecidos e, portanto, surgem como alternativa à terapia em tumores sólidos (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Assim, há uma grande versatilidade no uso dessas moléculas, as quais devem ser escolhidas de acordo com o objetivo de uso e a infraestrutura disponível (LUGOVSKOY, 2017). Além disso, a maioria dos fragmentos de anticorpos podem ser expressos em sistema bacteriano por serem moléculas pequenas, menos complexas que IgGs, desprovidas de glicosilação, sendo uma alternativa para baratear o custo da produção de moléculas terapêuticas.

A indústria farmacêutica percebeu a importância e o valor agregado que estas biomoléculas podem ter e utiliza-se disso para melhorar parâmetros farmacocinéticos de suas moléculas, a fim de tornar os tratamentos, especialmente contra câncer, mais direcionados, com menos efeitos colaterais, mais fáceis de serem administrados para população, em geral, e que, se possível, diminuam o índice de reincidência do tumor.

Buscando melhorias estruturais, que podem refletir no efeito terapêutico da molécula, a engenharia de anticorpos tem utilizado ferramentas de biologia molecular para melhorar propriedades desejadas ou até mesmo funcionalizar tanto a molécula completa como seus fragmentos. Essa área do conhecimento tem duas grandes vertentes: a evolução dirigida (abordagem combinatorial) e o desenho racional. A primeira delas relaciona-se à geração de diversidade genética seguida de triagem de acordo com a característica que se deseja melhorar, através de técnicas modernas, como a *error prone* PCR, a qual consiste na incorporação tendenciosamente errônea de nucleotídeos pela DNA polimerase, gerando mutações pontuais aleatórias na sequência gênica (HOLLAND *et al.*, 2016). A segunda abordagem, o desenho racional, utiliza informações de estruturas depositadas em bancos de dados para simular e modelar computacionalmente, de forma dinâmica, essas moléculas em um ambiente mais próximo do celular.

1.3.1 Desenho racional de proteínas

A abordagem racional na engenharia de proteínas utiliza métodos computacionais, como a simulação de dinâmica molecular (DM) para estudar as interações entre diferentes proteínas a nível molecular (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). Este método é usado, pois, uma vez que a forma tridimensional da proteína é determinante de sua função, a flexibilidade estrutural que a simulação de DM proporciona, fornece informações a cerca da atividade proteica a nível atômico-molecular, as quais, muitas vezes, não podem ser acessadas por outras técnicas experimentais, como a cristalografia de raios X (DURRANT; MCCAMMON, 2011; HOLLINGSWORTH; DROR, 2018; REBOUÇAS, 2018).

As simulações de DM predizem como cada átomo de uma proteína (ou outra biomolécula) se move, de acordo com as forças que atuam sob ele, ao longo do tempo, baseado em modelos físicos de interação interatômica (HOLLINGSWORTH; DROR, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Informações estruturais e energéticas são utilizadas para determinar a interação entre proteína-proteína, como as que ocorrem entre um anticorpo e seu antígeno ou entre uma enzima e seu substrato, bem como as interações em diferentes solventes nos quais essas biomoléculas se encontram (REBOUÇAS, 2018).

Observações estruturais entre resíduos-chave na interação entre antígeno-anticorpo, bem como a análise do potencial de interação intermolecular entre esses resíduos podem ser utilizadas como base para o desenvolvimento de moléculas mutantes, onde há o realce de propriedades desejadas. No caso dos anticorpos, especificidade e afinidade pelo alvo são características notáveis que podem ser beneficiadas com o uso do desenho racional, implicando melhorias na função dessas biomoléculas (RABIA *et al.*, 2018).

1.3.2 Mutagênese sítio-dirigida

A mutagênese sítio dirigida (MSD) se refere à técnica de introdução, deleção ou modificação de nucleotídeos no DNA alvo em locais pré-definidos (dirigidos) visando melhorias na afinidade, na seletividade e em propriedades físico-químicas (BANTA *et al.*, 2013; XU; ZHANG, 2016). Essa técnica é bastante utilizada no estudo de enzimas, especialmente as de interesse industrial, buscando melhorias frente à resistência a mudanças

de pH e temperatura, comuns desse setor (FURTADO *et al.*, 2018); e no estudo de anticorpos monoclonais, visando refinar a afinidade dessas moléculas com seu antígeno (CHIU; GILLILAND, 2016), bem como melhorar meia-vida e reduzir imunogenicidade (FONSECA *et al.*, 2018).

As mutações, como dito anteriormente, tem o objetivo de realçar propriedades da molécula em estudo. No caso de proteínas, como os anticorpos, modificações na sequência de aminoácidos podem causar mudanças estruturais, o que pode ser avaliado por análises *in silico* de simulação de dinâmica molecular (LI *et al.*, 2014). A troca de resíduos ácidos por básicos pode proporcionar maior afinidade entre resíduos da proteína-ligante; a mutação de resíduos pode expor o epítipo de forma mais expressiva, de modo a contribuir para uma melhor afinidade entre os ligantes; muitas vezes, a interação entre dois resíduos causa distorções nas nuvens eletrônicas adjacentes, possibilitando o acesso a cadeias laterais, proporcionando o aparecimento de interações (geralmente, de natureza fraca) (BETTS; RUSSEL, 2003; VERLI, 2014; SEIFI; WALTER, 2018).

Pode-se realizar a MSD por métodos baseados e não baseados em PCR (extensão enzimática de oligonucleotídeos mutagênicos anelando-se ao DNA molde). No entanto, os mais comuns são os baseados em PCR sendo, assim, os mais estudados. Os métodos tradicionais baseados na reação da polimerase utilizam, normalmente, três tipos diferentes de PCR a saber: *megaprimer*, extensão *overlap* e PCR invertida. Essas técnicas são desvantajosas por exigirem duas rodadas de PCR ou múltiplas etapas de tratamento enzimático e modificação ou purificação do *primer* ou do molde (WU *et al.*, 2013).

Na técnica de *megaprimer*, duas rodadas de PCR e três *primers* são exigidos, dois flanqueadores e um mutagênico com a alteração na base desejada. Em uma, um primer flanqueador e o mutagênico interno são usados para gerar o *megaprimer*, o qual corre em uma eletroforese, de onde é extraído e purificado. Na segunda rodada, o *megaprimer* e o outro primer flanqueador geram a sequência de DNA completa com a mutação desejada (TYAGI *et al.*, 2004).

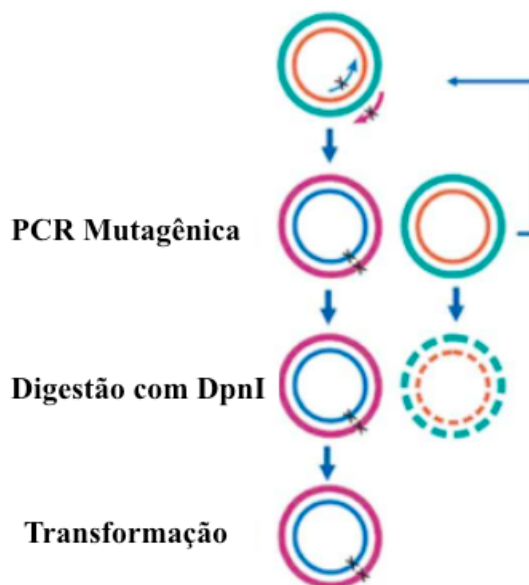
Na técnica de extensão *overlap*, na primeira rodada de reação, segmentos do gene alvo são amplificados a partir de um molde usando dois *primers* flanqueadores (a e d) distintos nas extremidades 5' das duas fitas, enquanto dois *primers* internos mutagênicos (b e c) também são introduzidos. Assim, quando os produtos AB e CD forem desnaturados durante a segunda rodada, as extremidades 3' complementares criadas pelos *primers* (b e c) irão anelar. Os

primers a e d irão, preferencialmente, amplificar o produto AD com a mutação (HECKMAN; PEASE, 2007).

A técnica de PCR invertida, é uma técnica simples, onde um conjunto de *primers* mutagênicos copiam todo o DNA plasmidial molde, um tendo como local de início o oligonucleotídeo a ser mutado e outro, a posição imediatamente anterior ao primeiro e com sentido reverso. Há a necessidade de se utilizar oligonucleotídeos-5'-fosforilados e uma polimerase cuja atividade exonucleásica $5' \rightarrow 3'$ foi suprimida (*Pfu* DNA Polimerase) e deve-se usar a T4 DNA ligase para unir as extremidades cegas deixadas na reação (RABHI *et al.*, 2004). Vê-se, portanto, as desvantagens operacionais deste método que requer muitas rodadas de PCR para que se obtenha uma porcentagem adequada de mutantes e, a cada rodada, deve-se purificar o produto de PCR do gel para que se tenha o mínimo de DNA molde circular possível.

Modificações das técnicas acima descritas proporcionaram o aperfeiçoamento das reações, cujo objetivo era introduzir mutações em um DNA. Com isso, e utilizando alguns tópicos do protocolo do *QuickChange*[®] *kit*, desenvolveu-se um processo de PCR mutagênica, onde os *primers* complementares contém as alterações desejadas. No entanto, o desenho desses *primers* é decisivo, pois eles possuem uma região de sobreposição (extremidade 5') e outra de não-sobreposição (extremidade 3'), a fim de reduzir o aparecimento de dímeros de *primers*, os quais irão, preferencialmente, anelar-se na região de DNA que se pretende modificar. Utiliza-se, também, uma polimerase de alta fidelidade, a fim de minimizar as possibilidades de aparecimento de mutações causadas pela enzima. Para assegurar que ao final da reação todo o DNA plasmidial seja amplificado, porém que tenha sido amplificado pelo *primer* mutagênico e que não contenha mais DNA molde, utiliza-se a enzima de restrição DpnI, a qual cliva adeninas metiladas de sequências GATC, encontradas frequentemente no DNA bacteriano (LIU; NAISMITH, 2008) (Figura 7).

Figura 7 – Visão geral da técnica de PCR mutagênica



Fonte: Adaptado de GONZÁLEZ; FILLAT, 2018. Primeiro passo refere-se ao anelamento do *primer* mutagênico na sequência de interesse em uma PCR, seguida de reação de digestão com a enzima DpnI, a qual cliva o DNA plasmidial molde. Após este procedimento, transforma-se em uma cepa bacteriana competente, onde o crescimento de colônias é comprobatório da correta transformação. No entanto, necessita-se do sequenciamento do DNA para garantir a inserção correta da mutação no gene de interesse.

Os mutantes gerados em diversas rodadas de PCR mutagênica, visando a posterior expressão e, conseqüente, produção de biofármacos, devem passar por técnicas de caracterização reconhecidas internacionalmente (Conselho Nacional de Harmonização – ICH), onde análises biológicas, físico-químicas e de propriedades imunológicas são feitas (CHAUHAN; SOOD, 2016).

Existem diversas formas de caracterizar estruturalmente essas moléculas, tais como o dicroísmo circular, eletroforese capilar, ressonância magnética nuclear, ultracentrifugação analítica e calorimetria diferencial (CHAUHAN; SOOD, 2016). Uma dessas técnicas tem especial destaque pela sua simplicidade e robustez de resultado: o dicroísmo circular. Essa metodologia é largamente utilizada para caracterizar mutantes considerando suas estruturas secundárias através da incidência de luz circularmente polarizada na molécula. O desvio observado na luz polarizada para a direita e para a esquerda cria um padrão característico de cada tipo de estrutura secundária, como α -hélice e folha- β , sendo possível, assim, definir se a mutação proposta acarretou mudança de estrutura, o que implica diretamente na função da proteína (GREENFIELD, 2006).

A utilização de ferramentas de bioinformática, somado ao aperfeiçoamento das técnicas de mutagênese sítio-dirigida tem permitido a rápida produção de proteínas mutantes,

facilitando o estudo da importância dos resíduos de aminoácidos na estrutura e função de diversas proteínas (TILLER; TESSIER, 2015).

Na tentativa de melhorar a resposta de pacientes resistentes ao Rituximabe, a proposta deste trabalho é a criação de variantes do fragmento do tipo scFv do Rituximabe com maior afinidade ao CD20, utilizando a técnica de mutagênese sítio dirigida e a bioinformática como ferramentas. Como a região variável de um anticorpo é a responsável pela afinidade deste, tais variantes foram construídas na forma de fragmentos scFv. Essa construção nos permite trabalhar com a expressão em sistema bacteriano, o que reduz os custos do processo. O estudo traz a possibilidade de selecionar fragmentos com maior afinidade para posterior construção de um anticorpo completo, onde será possível avaliar as funções efetoras do anticorpo com a região variável de afinidade melhorada, buscando-se assim uma molécula com maior potencial apoptótico e maior eficácia terapêutica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Construir, por desenho racional, e caracterizar variantes de *single-chain fragment variable* (scFv) do anticorpo monoclonal anti-CD20 Rituximabe, com diferentes afinidades pelo seu epítipo.

2.2 Objetivos específicos:

- Modelar e realizar simulação de dinâmica molecular do scFv do Rituximabe;
- Clonar e expressar o scFv do Rituximabe;
- Realizar mutagênese sítio-dirigida no scFv do Rituximabe, inserindo mutações propostas por análises energéticas e estruturais de bioinformática;
- Expressar as variantes de scFv gerados;
- Avaliar a capacidade de ligação do scFv nativo e mutantes ao alvo CD20;
- Caracterizar a estrutura secundária dos fragmentos de anticorpos produzidos por dicroísmo circular;
- Realizar ensaio de desnaturação térmica dos fragmentos de anticorpo produzidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho racional do scFv nativo

3.1.1 Modelagem do scFv de Rituximabe

As coordenadas atômicas do fragmento F_{ab} do Rituximabe foram obtidas de dados cristalográficos depositados no PDB, código 2OSL. A partir destas coordenadas, obteve-se as estruturas dos domínios variáveis leve (V_L , 106 resíduos) e pesado (V_H , 121 resíduos) para montagem do fragmento scFv. A estrutura do *linker* (GGGS)₃ foi construída no programa Swiss-PDBViewer por adição de resíduos de aminoácidos à porção C-terminal do domínio V_H e conectada ao domínio V_L pela porção N-terminal. Essa sequência de resíduos de glicina e serina foi escolhida para conferir flexibilidade e por ser a mais utilizada na construção de scFv. O scFv de Rituximabe foi submetido ao servidor H++ para estimar os estados de protonação dos resíduos a um pH de 7,4 (pH fisiológico).

3.1.2 Simulação de dinâmica molecular do scFv de Rituximabe em água

O pacote NAMD 2.12 foi utilizado para as simulações de DM, pois contém as ferramentas necessárias para preparação dos sistemas submetidos à DM, programas de análises estruturais e energéticas, além de protocolo definido e adaptado para cálculo de energia livre de ligação pelo método ABF.

O sistema scFv em solução aquosa foi constituído em uma caixa cúbica de dimensões de 90 Å, onde o scFv foi solvatado por uma camada de moléculas de água do modelo TIP3P de ~20 Å a partir da superfície da proteína. Seis íons Cl^- foram adicionados para eletroneutralizar o sistema. Os átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína através do programa *psfgen* do pacote NAMD2.12, e o campo de força CHARMM27 foi utilizado para modelar as interações entre átomos ligados e não ligados, assim obtendo-se a topologia para submissão à simulação de DM. A temperatura foi de 310 K, mantida utilizando o termostato de Langevin. O sistema completo resultou em 49155 átomos.

O seguinte protocolo foi utilizado para termalizar o sistema e prepará-lo para a fase de produção da simulação de DM: 5000 passos de minimização de energia para otimização da geometria da proteína e seus contatos, utilizando o algoritmo de gradiente conjugado (CG); seguindo-se de período de termalização para relaxar a estrutura do scFv e equilibrar as

moléculas de água adicionadas, consistindo em 100 ps de *ensemble* canônico (NVT), representado por número de partículas e volume fixos e temperatura controlada, e 500 ps em *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT), no qual o número de partículas é constante e a pressão e temperatura são controladas. A etapa de aquisição da trajetória seguiu por 200 ns em *ensemble* NPT e foi realizada em triplicata (chamadas de S1, S2 e S3), partindo de velocidades iniciais diferentes.

Os potenciais de interação de longo alcance e de curto alcance foram calculados até um raio *cutoff* de 12 Å. O algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME) foi utilizado para tratar a descontinuidade ao se usar este raio de corte. O algoritmo de restrições utilizado foi o SHAKE, e um *timestep* de 2 fs foi utilizado para a integração das equações de movimento. Para as etapas de *ensemble* NPT, a pressão foi mantida em 1 atm, utilizando o barostato de Langevin/Nosé-Hoover. A trajetória da etapa de produção foi coletada a cada 2000 passos.

3.1.3 Simulação de dinâmica molecular do complexo scFv de Rituximabe-alça de CD20

A partir das estruturas do scFv equilibradas em água da triplicata S1, S2 e S3, avaliou-se a interação com a alça de CD20, cujas coordenadas cristalográficas estão depositadas juntamente com o fragmento F_{ab} de Rituximabe no PDB, código 2OSL.

As estruturas finais de scFv de S1, S2 e S3 foram sobrepostas com a estrutura cristalográfica dos domínios V_H e V_L para o melhor posicionamento com a alça de CD20, respeitando a conformação do sítio de interação e das regiões de CDR. Os sistemas em solução aquosa foram constituídos por uma caixa cúbica de dimensões 110x100x80 Å. Foram adicionadas moléculas de água do modelo TIP3P e cinco íons Cl^- para eletroneutralização do sistema. Os átomos de hidrogênio foram adicionados e assim obteve-se três sistemas do complexo scFv de Rituximabe-alça de CD20 para submissão à simulação de DM. Ao final da preparação, os sistemas continham 83506 átomos cada.

O seguinte protocolo foi utilizado para termalizar e preparar os três sistemas para a fase de produção das simulações de DM: 5000 passos de minimização de energia para otimização da geometria do complexo scFv-alça e maus contatos, utilizando CG; seguindo-se de 500 ps NVT, mantendo scFv e alça de CD20 fixos; 600 ps NPT com imposição de restrição de posição de $3 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ do scFv e da alça de CD20, sendo a força de imposição gradualmente reduzida em $0,5 \text{ kcal mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ a cada 100 ps até sua anulação; e finalmente 2 ns NPT com o sistema livre de restrições de posição. A etapa de aquisição da

trajetória seguiu por 100 ns em *ensemble* NPT. Os parâmetros utilizados foram os mesmos da simulação do scFv em água.

3.1.4 Análises estruturais

As estruturas coletadas das simulações foram monitoradas para definir o momento de alcance do equilíbrio estrutural em solução aquosa. O Desvio Quadrático Médio (DQMD ou RMSD – *Root Mean Square Deviation*) dos átomos de carbono- α ($C\alpha$), após sobreposição par a par dos mesmos e tendo como referências as estruturas inicial e final de cada simulação de DM, foi calculado segundo a equação:

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left| \frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2 \right|^{\frac{1}{2}}$$

Onde M é o somatório das massas dos átomos de $C\alpha$ de i até N ; e $r_i(t)$ é a posição do átomo i no tempo t . O *linker* foi desconsiderado para os cálculos de RMSD, pois flutuações consideráveis já são esperadas devido à sua característica flexível. A influência da oscilação na estrutura de cada domínio (V_H e V_L) foi avaliada por cálculos de RMSD após a sobreposição individual desses domínios. Dessa forma, é possível estabelecer se as flutuações estruturais do scFv são decorrentes de flutuações em um dos domínios ou se há orientação estrutural entre eles. Para este último caso, foi avaliado o desvio de V_H tendo como sobreposição o domínio V_L , e vice-versa, ou seja, a sobreposição de um domínio e o cálculo do desvio do outro, para estimar se há movimentação de um em relação ao outro.

O raio de giro (R_g) foi calculado pelo programa *gmx gyrate* do pacote GROMACS 5.1.3 para medir possíveis alterações estruturais na modelagem do scFv, visto que o mesmo é derivado da estrutura cristalográfica do fragmento F_{ab} , com adição de um *linker* flexível. Foram calculados os R_g de scFv e dos domínios separadamente. A curva de R_g estável revela o alto grau de compactidade proteica, reflexo do enovelamento estável da proteína.

Análise de cluster, calculada pelo programa *gmx cluster* do pacote GROMACS, foi realizada com o objetivo de avaliar a homogeneidade de estruturas visitadas na DM e qual delas melhor representa as estruturas de cada um dos três sistemas do scFv de Rituximab em água, agrupando estruturas similares em até 1,94 Å de RMSD.

Os potenciais eletrostáticos e de Lennard-Jones foram monitorados visando o momento de alcance da estabilidade estrutural do complexo scFv-alça, através do somatório destes potenciais de interação intermolecular (PII). O PII ao longo do tempo de simulação foi avaliado pelo programa *gmx energy* do pacote GROMACS. Os contatos polares entre scFv e alça foram determinados pelo programa PyMOL 1.7.

3.1.5 Cálculo do ΔG de ligação

Após as análises estruturais, o sistema S3 foi descartado, pois houve perda de interação da alça de CD20 pelo scFv. Dois outros sistemas foram montados para esta etapa de cálculo do ΔG de ligação do complexo scFv-alça, além de S1 e S2. Um dos dois sistemas, denominado de Cristal, consiste em um modelo do complexo scFv-alça a partir das coordenadas cristalográficas de 2OSL do PDB, não submetido às etapas de 100 ns de DM de S1 e S2, somente à fase de termalização. O sistema Cristal foi incluído para determinar se a hidratação da proteína com equilíbrio da estrutura em água influencia no cálculo de ABF em relação à estrutura cristalográfica não equilibrada e, conseqüentemente, nos valores encontrados para o ΔG de ligação.

A coordenada de reação ξ escolhida foi a distância entre os centros de massa do scFv e da alça de CD20, sendo um tipo de variável coletiva indicada para o método ABF aplicado a complexos anticorpo-ligante. Sendo assim, o primeiro passo foi calcular essa distância para as estruturas finais dos sistemas Cristal, S1 e S2, sendo considerada a distância do “estado ligado”. Posteriormente, a alça de CD20 de cada sistema foi transladada ao longo do eixo X, através do programa *gmx editconf* do pacote GROMACS, até que estivesse distante o suficiente do scFv para que os potenciais de Lennard-Jones e de Coulomb (potenciais de átomos não ligados) fossem equivalentes a zero, sendo anotada a distância entre os centros de massa para o estado “não ligado”. Dessa forma, a coordenada de reação de cada sistema foi delimitada.

Para partir da distância do estado “ligado” até a distância do estado “não ligado” desejada, o método ABF aplica uma força, obtida por simulação de DM, sobre a alça de CD20 em direção a coordenada de reação para permitir tal afastamento ao longo do eixo X, mantendo-se a posição do scFv de Rituximabe fixa. O valor médio da força aplicada é calculado para cada ponto da trajetória, e a integração desses valores, fornece o valor de ΔG de ligação, sendo utilizado o valor de $0,001987 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ para a constante de Boltzmann

(κ_B) e temperatura de 310 K.

Com a coordenada de reação definida, o primeiro passo foi simular cada sistema por 5 ns para obter as configurações iniciais de cada janela de simulação de ABF, sendo os valores de força média computados a cada 1 Å (amplitude). As janelas foram definidas tomando a coordenada de reação e delimitando-a a cada 2 Å. A partir dessas configurações, cada janela foi simulada de 5 em 5 ns, amplitude refinada para 0,1 Å, até que a curva de energia livre de ligação convergisse, ou seja, quando a curva obtida de uma janela de tempo de simulação segue o mesmo perfil da curva da janela imediatamente anterior, diz-se que o sistema convergiu quanto aos valores de energia ao longo da coordenada de reação e não é necessário prosseguir para mais uma janela de simulação de 5ns. Todas as janelas com constante de força padrão de $10 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ como potencial de fronteira, ou seja, uma força constante aplicada para evitar que as conformações visitadas durante a simulação apresentem valores de variável coletiva distintos da janela considerada, fora dos seus limites. O refinamento e consequente melhora da amostragem foi obtido reduzindo o tamanho da janela de simulação quanto à coordenada de reação.

A tabela 1 resume e delimita todas as simulações realizadas até o tempo de convergência, evidenciando todas as janelas e refinamentos necessários para estimativa factível do ΔG de ligação do complexo scFv-alça.

Tabela 1 – Resumo das coordenadas de reação delimitadas, tempos de simulação e janelas de refinamento necessários para cada sistema obtido

	Cristal	S1	S2
Coordenada de Reação (Å)	23 a 43	21 a 41	23 a 41
Tempo de Simulação (ns)	0-25	0-25	0-15
Janelas (Å)	23-25	21-23	23-25
	25-27	23-25	25-27
	27-29	25-27	27-29
	29-31	27-29	29-31
	31-33	29-31	31-33
	33-35	31-33	33-35
	35-37	33-35	35-37

	37-39	35-37	37-39
	39-41	37-39	39-41
	41-43	39-41	
Refinamentos (Å)	25-26	21,8-	27-28
	27-28	22,8	
	28-29	25,8-	
		26,8	
		26,8- 27,8	

As metodologias empregadas na modelagem do scFv do Rituximabe e da alça de CD20 no receptor, nas simulações de dinâmica molecular do fragmento e do complexo scFv+alça, além das análises estruturais (desvio quadrático médio) e de energia de ligação foram realizadas em parceria com o grupo de bioinformática estrutural da Fiocruz-CE, o qual idealizou os protocolos expostos.

3.2 Desenho de *primers*

Dois tipos de *primers* diferentes foram desenhados: os *primers* mutagênicos e os *primers* para clonagem do scFv. Estes últimos foram idealizados para se anelar no inserto e introduzirem, por PCR, os sítios de restrição de duas endonucleases, *Bam*HI e *Hind*III. Em vermelho, encontram-se as sequências de reconhecimento das enzimas.

pSumoFw: 5` - ATC**GGATCC**CAAGTGCAACTGCAACAAC - 3`

pSumoRv: 5` - GCG**AAGCTT**TTATTTGATTTCAGTTTGG - 3`

Os *primers* utilizados na PCR mutagênica foram desenhados de modo a possuir uma região de complementariedade entre si e outra de anelamento ao plasmídeo usado como molde, sendo estas últimas, sequências maiores que as sequências complementares, o que torna a temperatura de anelamento desta região de 5 a 10 °C maior (LIU; NAISMITH, 2008). Esta metodologia, também, produz *primers* mais extensos do que os usados em amplificações tradicionais. A mutação a ser inserida deve estar sempre na região de complementariedade dos oligos mutagênicos. Foram desenhados, para este fim, pares de *primers*, correspondentes

às mutações, produzindo simples, duplos, triplos e quádruplos mutantes. O *primer* dito *Forward* (Fw) inicia anelamento no sentido 5' → 3', enquanto o dito *Reverse* (Rv), no sentido 3' → 5'.

As sequências utilizadas para desenhar os *primers* não serão mostradas nesse trabalho por serem alvo de propriedade intelectual de grupos da Fiocruz e, em breve, serão patenteadas, necessitando-se assim manter esse sigilo.

3.3 Obtenção de células bacterianas, de vetores plasmidiais, do gene *Single-Chain Fragment Variable* (scFv) do anticorpo monoclonal Rituximabe e do peptídeo biotilado contendo o epítipo do Rituximabe

A linhagem de *E. coli* Top10 foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (Unifor). (Certificado de Qualidade em Biossegurança: 0294/10, responsável: Kaio César Simiano Tavares). A cepa bacteriana de *E. coli* SHUFFLE foi adquirida comercialmente da empresa New England Biolabs (NEB).

O vetor pET-SUMO e o vetor pET-ULP foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). O vetor pET-ULP foi cedido em um estoque (500 µL de ULP em BL21 e 500 µL de glicerol 50%) transformado em cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21.

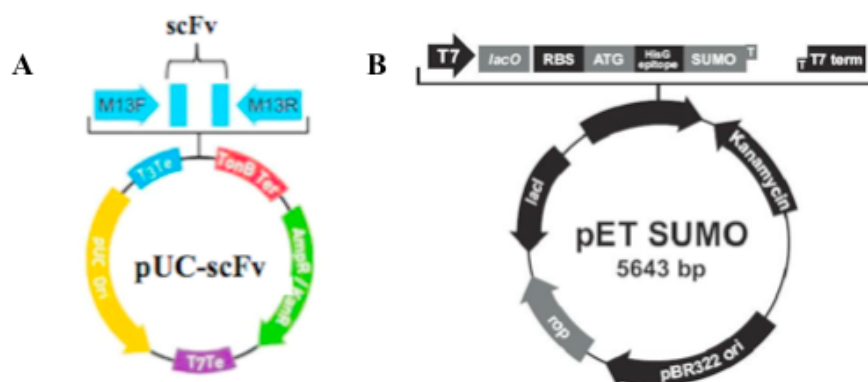
O gene do scFv do Rituximabe utilizado neste projeto foi obtido através da empresa GenOne[®]. Tal gene encontrava-se no vetor de clonagem contendo pUC ori, aqui chamado de pUC. Este gene expressa 242 aminoácidos, listados abaixo. O *linker* está indicado em vermelho.

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGN
 GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV
 WGAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSY
 IHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ
 WTSNPPTFGGGTKLEIK

O peptídeo biotilado foi adquirido comercialmente da empresa Biomatika. Ele possui peso molecular de 3075,48 Da, pureza de 95 % e sua sequência é composta de biotina-NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ. Em vermelho, estão representados os resíduos de cisteína, que promovem a ligação dissulfeto essencial à interação antígeno-anticorpo, como já

elucidado no item 1.2.

Figura 8 – Plasmídeos relevantes para o trabalho



Fonte: Elaborado pela autora. A) Plasmídeo pUC-scFv, onde foi clonado o scFv do Rituximabe construído por síntese gênica. B) Mapa do plasmídeo pET-SUMO.

3.4 Obtenção de células bacterianas competentes por método químico

As duas linhagens utilizadas passaram por processo de químico-competência. Fez-se um pré-inóculo com colônias isoladas em 5 mL de meio Luria Bertani (LB). As linhagens Top10 e SHUFFLE foram crescidas sem antibiótico. Deixou-se crescer *overnight* a 37 °C. Inoculou-se 100 mL de meio LB com 1 mL de pré-inóculo crescido anteriormente. Deixou-se crescer a 200 rpm (Agitador orbital Marconi MA420), 37 °C até atingir a densidade ótica (D.O.) 600 nm entre 0.4 – 0.6 (~2-3 horas). O espectrofotômetro foi zerado com meio LB puro para medições. Ao atingir a D.O., centrifugou-se o restante do meio de cultivo por 10 minutos a 5000 x g, e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante, ressuspendendo-se as células gentilmente com 40 mL de MgCl₂ (0,1 M) previamente preparado. Seguiu-se nova centrifugação a 4 °C, 3000 x g durante 10 minutos e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se novamente o *pellet* com 2 mL de CaCl₂ (0,1 M). As células foram deixadas 20 minutos no gelo, e, em seguida, foram adicionados 1 mL de glicerol 50%. A amostra foi dividida em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL previamente gelados e, seguiu-se o congelamento a -80 °C.

3.5 Transformação bacteriana

A linhagem de *E.coli* TOP10 foi transformada, a fim de receber tanto o plasmídeo pETSUMO e pETSUMO-mutantes quanto o pUC-scFv, contendo o gene de interesse

(inserto) para multiplicação destes vetores. Para realização deste experimento, utilizou-se em um tubo de 1,5 mL, 1 µL de pETSUMO (100 ng) e 50 µL de Top10 competente; em outro tubo de 1,5 mL, 0,5 µL de pUC-scFv (50 ng) e 50 µL de TOP10 competente. Cada experimento foi feito em duplicata e os controles negativos não continham os plasmídeos, sendo o volume preenchido com água. Os quatro tubos permaneceram 30 minutos no gelo, seguidos de 1 minuto em banho seco a 42 °C e 2 minutos em gelo novamente (choque térmico). Às células, adicionou-se 900 µL de meio LB e seguiu-se protocolo de regeneração, onde os tubos permaneceram sob agitação em agitador por 1 hora a 37 °C e 200 rpm. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 7000 x g por 5 minutos, onde descartou-se grande parte do sobrenadante, homogeneizando gentilmente o *pellet* em um restante de solução. Utilizou-se 50 µL do homogeneizado para plaqueá-los em 10 mL de meio LB ágar, contendo seu respectivo antibiótico de resistência (carbenicilina 50 mg/mL para pUC-scFv e canamicina 34 mg/mL para pETSUMO) *overnight* a 37 °C em estufa. Para transformação das células SHUFFLE (cepa de expressão) tanto para pETSUMO-scFv como para pETSUMO-mutantes, utilizou-se protocolo semelhante ao acima descrito.

3.6 Miniprep

Os miniprep's (reações de extração do DNA plasmidial) foram realizados seguindo as instruções contidas no manual do fabricante do *kit* comercial da Promega® (Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems). Após a realização do experimento, seguiu-se para a quantificação dos plasmídeos em aparelho NanoDrop (ThermoScientific®).

3.7 Digestão plasmidial com enzimas de restrição

Para digestão do pETSUMO e do pUC-scFv, foram preparados diferentes tubos de 1,5 mL. Para o pUC-scFv, inicialmente, fez-se uma reação em cadeia da polimerase para aquisição dos sítios de restrição de *BamHI* e *HindIII* utilizando-se os *primers* relatados na seção 3.2 desta dissertação. Em seguida, montou-se a reação de digestão do produto de PCR da seguinte maneira: Albumina Sérica Bovina (BSA) 10x, tampão 10x multicore (Promega®), 10 U da enzima de restrição *BamHI* (Promega®), 10 U de *HindIII* (Promega®), cerca de 1 µg de DNA plasmidial, seguindo as recomendações do fabricante. Para pETSUMO, a reação foi montada como se segue: Albumina Sérica Bovina (BSA) 10x, tampão 10x multicore

(Promega[®]), 10 U da enzima de restrição *BamHI* (Promega[®]), 10 U de *HindIII* (Promega[®]), cerca de 1 µg de DNA plasmidial, seguindo as recomendações do fabricante. As enzimas permaneceram em suporte gelado durante todo o procedimento. Posteriormente, os tubos foram incubados a 37 °C durante 3 horas. Após esse período, as amostras foram deixadas em 65 °C durante 15 minutos para desnaturação das enzimas.

Para digestão do plasmídeo molde utilizado nas PCR mutagênicas (pETSUMO-scFv), utilizou-se ~1 µg de DNA (produto da PCR), tampão 10x multicore (Promega[®]), BSA 10x, 1 U da enzima de restrição *DpnI* (Promega[®]), completando-se o volume até 20 µL com água pura. A reação foi incubada por 1 hora a 37 °C e inativada a 65 °C durante 15 minutos.

3.8 Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Preparou-se gel de agarose 1 % (1 g de agarose em 100 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)) para corrida. Os parâmetros de corrida foram: 100 V, 100 mA.

Os tubos foram preparados para encerrar um volume final de 12 µL da seguinte forma: os tubos com pETSUMO, pETSUMO-mutantes e com pUC-scFv continham 10 µL de DNA, 2 µL de tampão de amostra contendo Gel-Red (diluído 5x). Utilizou-se 7 µL do marcador de peso molecular de 1 Kb.

Para o gel de poliacrilamida utilizado para análise da expressão do scFv, scFv-SUMO e de mutantes, foi feito um gel de 12% de acrilamida (*lower*), sendo adicionados para o *lower* gel ou gel de corrida: 3,150 mL de água, 2,1 mL de bis-acrilamida 40 %, 1,75 mL de solução *lower* Tris 4x e 80 µL de uma mistura com TEMED e APS 10 %. Para o *upper* ou gel de empilhamento 3,6 %, utilizou-se: 2,17 mL de água, 0,33 mL de bis-acrilamida 40%, 0,83 mL de *upper* Tris 4x e 100 µL de mistura com TEMED e APS 10 %. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie brilliant Blue G-250.

3.9 Purificação de amostras a partir de excisão do gel e de solução

A purificação da amostra a partir de banda excisada do gel ou de solução foi obtida seguindo as instruções contidas no manual do fabricante do *kit* comercial Promega[®] (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System). Após a realização do experimento, seguiu-se para a quantificação dos plasmídeos em aparelho NanoDrop (ThermoScientific[®]).

3.10 Ligação entre vetor e inserto

Para a reação de ligação do scFv ao vetor pETSUMO, foram utilizados tubos de 1,5 mL contendo: 100 ng de vetor, ~62 ng de inserto, tampão da ligase 2x, 1 U de ligase e água pura. Os controles negativos somente não continham DNA. A incubação ocorreu *overnight* à temperatura de 4 °C. Após esse período, bloqueou-se a reação de ligação, incubando os tubos a 65 °C por 15 minutos.

O cálculo da quantidade de inserto é dado pela seguinte fórmula, sugerida pelo fabricante:

$$\frac{\text{ng de vetor} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de vetor}} \times \text{razão molar (inserto/vetor)} = \text{ng de inserto}$$

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Realizou-se PCR para amplificação do fragmento e inserção dos sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII*, utilizando scFv. Para reação, utilizou-se tampão HF 5x, mix de dNTPs (200 mM de concentração final), 200 mM final de cada um dos *primers* chamados de pSUMO *forward* e pSUMO *reverse*, 1U da DNA polimerase *Phusion* de alta fidelidade, ~20 ng de scFv e completou-se o volume com água.

Os parâmetros utilizados no termociclador Biometra® (Israel) para a reação descrita acima foram: 98 °C por 2 minutos; 98 °C por 30 segundos, seguidos de 60 °C por 10 segundos e 72 °C por 15 segundos; por fim, 72 °C por 5 minutos. 30 ciclos foram executados.

Para PCR das colônias provenientes da ligação entre pETSUMO e scFv, utilizou-se tubos de 0,2 mL, contendo Master Mix 4G® (mistura de tampão, dNTP's, magnésio e DNA polimerase), 200 mM final de *primer* T7 pro e de *primer* T7 ter, água ultrapura e DNA proveniente de esfregaço das colônias (Top10).

Os parâmetros utilizados no termociclador Biometra® foram: 95 °C por 3 minutos; 95 °C por 30 segundos, seguidos de 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; por fim, 72 °C por 10 minutos. 30 ciclos foram executados.

Para produção de mutantes, utilizou-se, como molde, pETSUMO-scFv em reações de 50 µL, compostas de tampão HF 5x, mix de dNTPs (200mM de concentração final), 500 mM

final de cada um dos *primers* mutagênicos (*Forward* e *reverse*, conforme descrito no item 3.2 deste trabalho), dimetilsulfóxido (DMSO), 1 U da DNA polimerase *Phusion* de alta fidelidade, ~20 ng de pETSUMO-scFv e completou-se o volume com água.

Os parâmetros utilizados no termociclador Biometra[®] para a reação descrita acima foram: 98 °C por 3 minutos; 98 °C por 15 segundos, seguidos de temperaturas de anelamento oscilando entre 60 °C por 30 segundos, e 72 °C por 3 minutos; por fim, 72 °C por 5 minutos. 12 ciclos foram executados.

3.12 Expressão heteróloga do scFv em sistema bacteriano

Os inóculos de pETSUMO-scFv e de pETsumo-mutantes em SHUFFLE foram preparados, separadamente, com 250 mL de meio LB com antibiótico canamicina (40 µg /µL) em erlenmeyer estéril. Adicionou-se 5 mL de bactérias crescidas provenientes de colônias de um pré-inóculo (5 mL). Essa cultura foi incubada em agitador orbital a 37 °C e 200 rpm (Marconi MA420), medindo-se a densidade ótica (D.O.) até que esta atingisse 0.4 a 600 nm de absorbância.

Induziu-se a expressão com isopropil-β-D-tiogalactopiranosose (IPTG) concentração final de 0,3 mM *overnight*, a 20 °C, em agitador orbital a 180 rpm (Marconi MA420). Após esse período, o restante da cultura seguiu para centrifugação a 8000 x g por 15 minutos e 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressolubilizado em 10 mL de tampão de ligação (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8). Acrescentou-se, também, 1 % do detergente Triton X-100 e 1 mM final do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF).

Para a lise celular por sonicação (amplitude 50%, Ciclo 1), aproximadamente, 10 mL de amostra seguiu 15 ciclos de 30 segundos em sonicação e 30 segundos em descanso, alternados, por cerca de 15 repetições. Após a sonicação, o lisado celular foi centrifugado a 10.000 x g, 30 min, a 4 °C. Somente o sobrenadante seguiu para os passos de purificação, pois a proteína de interesse deve estar solúvel para que tenhamos a atividade biológica desejada.

3.13 Cromatografia de afinidade para purificação proteica em matriz de sílica com níquel imobilizado

Realizou-se cromatografia de afinidade em matriz de sílica com níquel imobilizado (1 mL), a fim de purificar o scFv e os mutantes expressos de forma heteróloga (a 20 °C) em 250 mL de cultura de *E.coli* SHUFFLE pETSUMO-scFv e pETSUMO-mutantes. Preparou-se tampão de lise (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0), tampões de lavagem (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8,0) 40 mM Imidazol, 60 mM Imidazol e 100 mM Imidazol e tampão de eluição (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0). Todos os tampões foram filtrados em filtro de 0.22 µm antes de inseridos na coluna. Após as coletas com fluxo de aproximadamente 1 mL/min, mediu-se absorvância em espectrofotômetro a 280 nm em cubeta de quartzo.

Inicialmente, o sobrenadante do lisado celular e 1 mL de coluna His-Link (Promega[®]), previamente equilibrada com tampão de ligação, foi incubado por 1h sob agitação e em banho de gelo. A fração não-retida (*flow through*) foi coletada para controle da purificação, embora essas moléculas sejam aquelas que não interagem ou interagem muito fracamente com a matriz cromatográfica, o que não é o caso da nossa proteína com cauda de histidina. Aplicou-se tampões de lavagem e acompanhou-se a absorvância (280 nm) em espectrofotômetro até a linha de base. Em seguida, transferiu-se o tampão de eluição para a coluna, coletando-se todo o conteúdo, leu-se a absorvância (280 nm) em espectrofotômetro até se obter, novamente, a linha de base após o pico de eluição.

A cauda SUMO é uma proteína de fusão conhecida por auxiliar no correto enovelamento proteico, em um processamento pós-traducional conhecido como SUMOilação (YANG *et al.*, 2017). A figura 8B mostra o mapa do plasmídeo pETSUMO e nele é possível observar a seguinte ordem: cauda HisTag-SUMO-N-terminal da proteína. Após a expressão, é conveniente a excisão da cauda, procedimento realizado através da enzima ULP Sumo Protease, que cliva a cauda SUMO expressa nos scFv-SUMO e seus mutantes, levando consigo a cauda de histidina (HisTag). Um novo passo cromatográfico é necessário para a purificação do scFv e seus mutantes (agora sem as proteínas de fusão). Essa cromatografia se dá de uma forma diferente, pois, nesse caso, os picos não retidos contém as proteínas heterólogas. Da mesma forma, a coluna é incubada com o conteúdo pós-digestão com ULP, passa-se este conteúdo pela coluna e obtém-se as proteínas recombinantes puras. Uma corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 12,5 % permite a visualização do progresso da digestão e da purificação

A protease foi previamente expressa de maneira similar aos fragmentos de anticorpo utilizados nesse trabalho. Após purificação das duas proteínas, elas foram quantificadas por

fluorímetro Qubit (Thermo Fischer Scientific®), conforme especificações do fabricante. A reação de clivagem da ULP SUMO protease se dá através da incubação *overnight* a 4 °C da proteína fusionada com a ULP, em uma proporção de 15:1 m/m (15 mg de proteína de interesse para 1 mg de ULP).

O conteúdo da digestão passa por incubação com 1 mL de coluna previamente lavada (conforme mostrado acima) e equilibrada com tampão (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) por 1 hora em banho de gelo, sob agitação. Após esse período, as proteínas heterólogas clivadas são coletadas como pico não retido, monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm (cubeta de quartzo) até a linha de base, uma vez que elas não possuem mais nenhuma cauda que as façam interagir com a matriz cromatográfica. Dessa forma, obtém-se o scFv e mutantes sem cauda, prontos para análises biológicas.

3.14 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) permite obter dados a respeito da estrutura secundária da proteína, além de se poder determinar a temperatura de melting (T_m) (GREENFIELD, 2007a, 2007b), ou seja, a temperatura em que 50% das moléculas estão desnaturadas (YAO *et al.*, 2018). Esse método espectroscópico baseia-se na capacidade que proteínas (e outras macromoléculas) têm de desviar a luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda. Essa diferença no desvio é decorrente dos ângulos diedros Φ e Ψ característicos de cada tipo de estrutura secundária, a qual se repete ao longo da cadeia principal polipeptídica (RANJBAR; GILL, 2009; NELSON D; COX M, 2014; WOODY, 2015).

Realizou-se a análise de CD do scFv nativo e mutantes. Para isso, o scFv foi solubilizado em tampão fosfato 20 mM, pH 7, filtrado em filtro de 0.22 μ m, na concentração de 0,25 mg/mL (quantificação em Qubit). O espectro do CD utilizado foi o chamado “far-UV” coletando-se desvios de 190 a 240 nm, o que é capaz de fornecer o perfil de estrutura secundária das moléculas, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 mm de caminho ótico, comportando até 300 μ L de volume e taxa de varredura de 1 nm/s. O gráfico de T_m foi fornecido pela curva de desnaturação obtida com gradiente de temperatura entre 25 a 100 °C a 220 nm, linearidade da rampa: 2 °C/min. O experimento foi realizado nas dependências da sala de estudos com proteínas do bloco 871 (Programa de pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais – UFC) em espectropolarímetro de dicroísmo circular Jasco® J815 (Jasco

int, Tokyo).

3.15 *Western Blot*

Para realização do *western blot*, correu-se um gel de poliacrilamida 12,5 % em condições desnaturantes e redutoras, conforme apresentado no item 3.8 deste trabalho. Para isso, utilizou-se 1 µg de scFv, de controle positivo (Rituximabe comercial) e de mutantes sem cauda e purificados. Após a corrida, foi realizada a transferência dessas proteínas para membrana de nitrocelulose (Amersham™) por duas horas a 100 V em aparato Biorad®. A membrana foi corada com Ponceau para confirmar a transferência das proteínas e, em seguida, lavada com PBST (PBS + 0,1 % Tween). Seguiu-se o bloqueio com 5 % de leite desnatado diluído em PBST *overnight*, a 4 °C. Logo após 3 lavagens de 10 minutos cada sob agitação em temperatura ambiente, incubou-se a membrana com a proteína L-HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) 1:5000 (v/v), diluída em PBST, por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, 3 lavagens de 10 minutos cada retiraram o excesso de proteína L e a membrana seguiu para revelação por quimioluminescência com luminol, segundo protocolo do fabricante (GE Healthcare Amersham ECL™).

3.16 ELISA com peptídeo

A técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto foi realizada para determinar se os scFvs produzidos (nativo e mutantes) mantêm a capacidade de ligação ao antígeno CD20 (TOHIDKIA *et al.*, 2017). Com essa finalidade, imobilizou-se 100 µL de peptídeo (responsável por conter o epítipo do Rituximabe) diluído em PBS/poço (concentração final de 1 µg) em placa de 96 poços MaxiSorp (Nunc-Immuno™), *overnight* a 4 °C. Após as 16 h, a placa foi lavada 3 vezes com PBST (PBS + 0,05 % Tween 20). Em seguida, bloqueou-se com cada poço com 150 µL de leite desnatado 5 % diluído em PBS por duas horas a temperatura ambiente. Logo após, a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBST e então aplicou-se 100 µL/poço dos fragmentos de Rituximabe (scFv nativo e mutantes) e do próprio Rituximabe comercial (MabThera®), utilizado como controle positivo, a 150 µg/mL cada, diluídos em PBS e em triplicata, por uma hora a temperatura ambiente. Seguiu-se novas lavagens (3 vezes) com PBST, seguida de incubação de 100 µL do conjugado de proteína L-HRP 1:1500 (v/v) diluída em PBS incubadas por uma hora a

temperatura ambiente. Após esse período, lavou-se duas vezes com PBST e uma vez somente com PSB, antes de aplicar 100 µL do substrato tetrametilbenzidina (TMB). Essa reação durou cerca de 20 minutos, sendo, logo após, parada com 50 µL ácido sulfúrico 2 M, seguindo-se a leitura da placa em leitor de ELISA a 450 nm (TOHIDKIA *et al.*, 2017 adaptado).

3.17 Ensaio de estabilidade térmica de proteínas

Análises da estabilidade térmica e integridade estrutural comparativas foram realizadas através de experimento de emissão de fluorescência intrínseca sob aquecimento dos resíduos fluoróforos triptofano e tirosina, os quais emitem fluorescência nas faixas de 350 nm e 330 nm, respectivamente. A fluorescência do triptofano é usada para monitorar o grau de enovelamento da proteína, uma vez que esse resíduo é bastante sensível a mudanças conformacionais na molécula e, dessa forma, fornece informações a cerca da estrutura secundária e terciária das proteínas (MONSELLIER; BEDOUELLE, 2005; WEICHEL *et al.*, 2008). Com o aquecimento das proteínas, os resíduos de triptofano, que se encontram em uma região mais interna da proteína quando em meio polar devido ao seu caráter hidrofóbico, sofrem distorções conformacionais, aumentando assim sua emissão de fluorescência (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

O ensaio foi realizado em equipamento Tycho™ NT.6 (NanoTemper, Munich), no qual 10 µL das amostras (MabThera®, scFv nativo e mutantes) foram inseridas em capilares, aquecidas de 35 °C a 95 °C, com rampa de 30 °C por minuto. Esse equipamento permite avaliar a desnaturação protéica e a estabilidade de biomoléculas em diferentes tampões e pH's, comparar condições de armazenamento e comprovar viabilidade protéica de acordo com o tempo de estocagem (<https://nanotempertech.com/tycho/>).

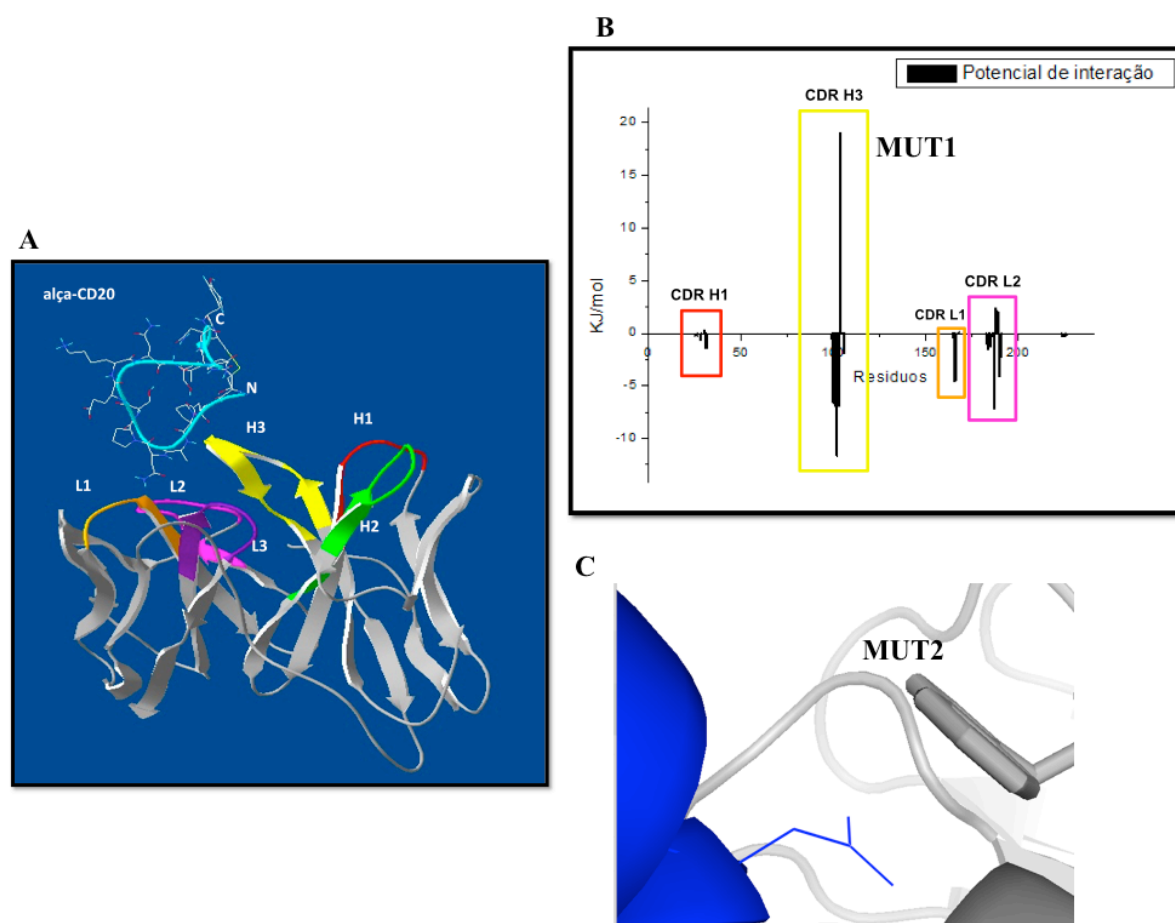
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho racional do scFv nativo e mutantes

A modelagem e a simulação de dinâmica molecular realizada pelo grupo de bioinformática estrutural da Fiocruz Ceará proporcionaram um estudo investigativo da estrutura tridimensional do Rituximabe, o que pode ser visualizado pela figura 9A, onde pode-se perceber a aproximação da alça de CD20 no receptor e os resíduos nas CDRs interagindo entre si (ferramenta de visualização utilizada: PyMOL). A partir do gráfico de potencial de interação intermolecular (PII) da figura 9B, nota-se que o eixo y representa a energia livre de Gibbs, o que fornece um indicativo de quão favorável uma interação é, onde valores positivos refletem interações desfavoráveis e valores negativos, interações favoráveis. Portanto, energias com valores positivos como as observadas na CDR3 representam interações desfavoráveis, sendo alvo de desenho racional e posterior mutagênese. O resíduo da CDR3 evidenciado num retângulo amarelo na figura 9B foi sugerido para mutagênese e o scFv mutante correspondente foi denominado MUT1. Na figura 9C, está representada a interação entre a alça do CD20 e um resíduo presente também na CDR3, o qual originou uma sugestão de mutação que deu origem ao scFv denominado MUT2.

Os mutantes produzidos não tiveram sua posição e aminoácidos revelados no momento por serem alvo de patenteamento. No entanto, uma nomenclatura não oficial será usada neste trabalho, sendo os MUT1 e MUT2 os mutantes simples sugeridos pelo desenho racional e MUT3, MUT4 e MUT5, mutantes múltiplos. O MUT4 é um mutante de referência da literatura (LI *et al.*, 2009). LI *et al.* (2009) observaram que o triplo mutante H57DE/H102YK/L93NR apresentou aumento de afinidade refletindo, também, um aumento na capacidade apoptótica desse fragmento do tipo Fab (LI *et al.*, 2009). Utilizamos esse mutante como um referencial, pois, até o momento, este é o único trabalho relatado envolvendo variantes de afinidade do Rituximabe. O MUT3 é um quádruplo mutante (MUT4+MUT2) e o MUT5, um duplo mutante (MUT1+MUT2). Uma característica importante desses mutantes é que eles são modificações em CDRs, regiões de interação intensa com o alvo, e o objetivo destas mutações é promover uma maior afinidade pelo epítopo, quer sejam as sugestões guiadas por análises energéticas, quer sejam por análises estruturais.

Figura 9 – Estrutura tridimensional da interação scFv nativo e alça de CD20, potencial de interação intermolecular e análise estrutural para sugestão de mutante

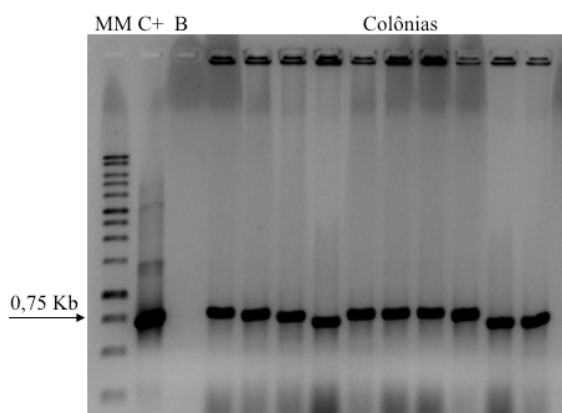


Fonte: Adaptada de REBOUÇAS, 2018. A) Estrutura da alça de CD20 interagindo com o scFv nativo. As regiões coloridas evidenciam as CDRs da cadeia pesada (H) e CDRs de cadeia leve (L); B) Potencial de Interação Intermolecular entre resíduos do scFv com a alça do CD20 no receptor; C) A alça de CD20 está representada em azul, interagindo com o resíduo em CDR. Essa interação levou à sugestão do MUT2.

4.2 Clonagem molecular do scFv nativo

Após transformação da reação de ligação do scFv ao vetor pET-SUMO, seguiu-se uma PCR das colônias crescidas para confirmar a correta inserção do gene ao vetor. Para tal, 10 colônias transformadas foram usadas como “molde” numa reação de PCR, usando os primers pSUMO forward e pSUMO reverse, que anelam próximos aos sítios de clonagem do vetor. O gene scFv possui 741 pb e, como os primers anelam bem próximo ao gene, esperava-se um fragmento de, aproximadamente, 750 pb. O resultado da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose e está apresentado na figura 10.

Figura 10 – Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas com ligação scFv-SUMO



Fonte: Elaborada pela autora. Gel de agarose 1% comprobatório de clonagem do scFv em pETSUMO. MM: marcadores de peso molecular 1Kb (1 Kb DNA ladder Promega[®]); C+: controle positivo (gene de scFv clonado em outro vetor); B: branco; colônias clonadas.

4.3 Produção dos variantes de scFv do Rituximabe

Os variantes de scFv foram produzidos de acordo com PCR mutagênica descrita no item 3.11. Após a PCR, os clones tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento realizado na unidade Fiocruz – PE.

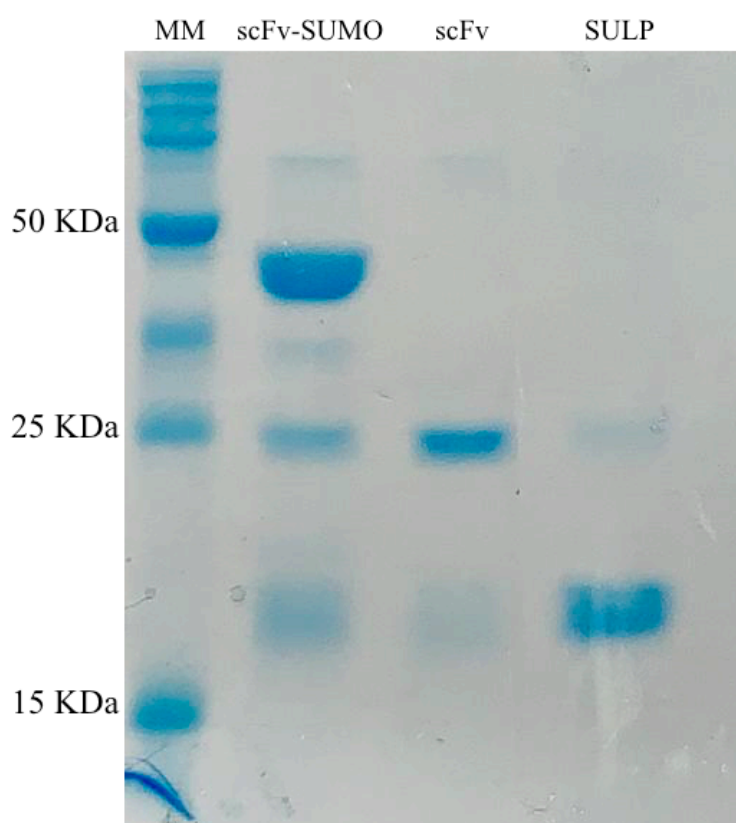
Até o momento, apenas um trabalho de nosso conhecimento gerou mutantes do Rituximabe utilizando como molde a porção Fab. LI *et al.* (2009) realizaram diferentes rodadas de mutagênese, onde eles obtiveram mutantes simples, duplos e triplos. Nesse trabalho, estimou-se a constante de afinidade (K_D) dos mutantes por citometria de fluxo e correlacionou-se essa medida com a porcentagem de apoptose nas células em estudo. Um triplo mutante (H57DE/H102YK/L93NR), embora tenha apresentado medida de afinidade semelhante ao mutante duplo (H57DE/H102YK), foi o mais eficaz no tocante à indução de apoptose (LI *et al.*, 2009).

4.4 Expressão heteróloga do scFv nativo e mutantes em sistema procarioto

Uma das colônias positivas da figura 10 e os mutantes foram transformados em cepa SHUFFLE de *E. coli* e sua expressão foi induzida, conforme protocolo descrito no item 3.12. Após purificação, tem-se o resultado obtido nas figuras 11 e 13. O scFv-SUMO possui massa

aparente de 48 KDa, enquanto que o scFv (pós clivagem) apresenta massa em torno de 25 KDa.

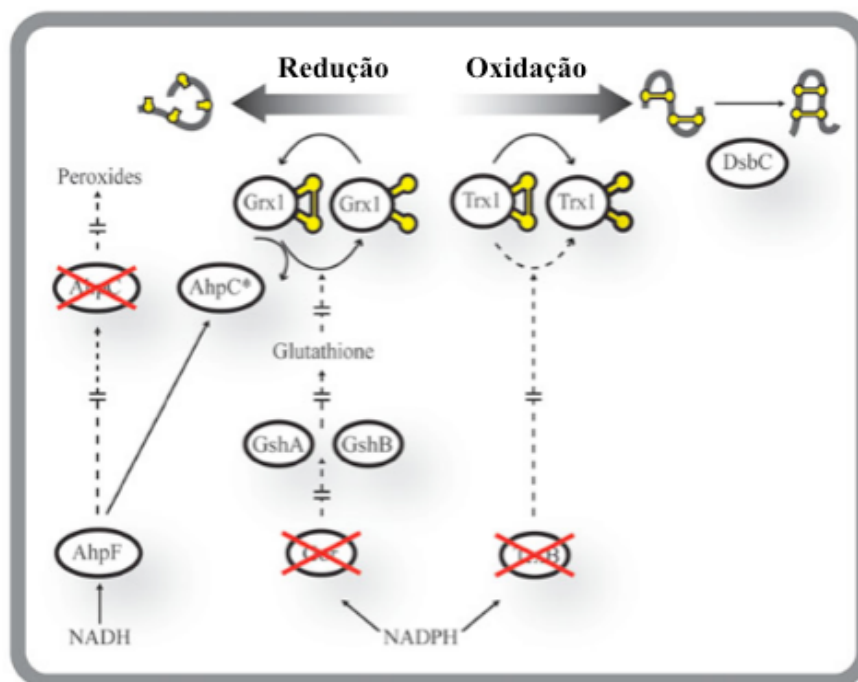
Figura 11 – SDS-PAGE (12,5 %) de scFv-SUMO e scFv



Fonte: Elaborado pela autora. MM: marcadores de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers Promega[®]); scFvSUMO: scFv com cauda SUMO; scFv: após a digestão, sem as caudas; Sulp: evidencia somente a ULP ligada a cauda SUMO (cerca de 18 KDa).

A cepa SHUFFLE é uma cepa comercial engenheirada de modo a ter dois genes nocauteados (*trxB* e *gor*), envolvidos nas vias da tioredoxina e da glutaredoxina, suprimindo rotas de sinalização de morte celular. Isso implica desvios metabólicos que favorecem a produção de uma redutase AhpC* (Figura 12). Uma outra modificação é a expressão aumentada (*overexpression*) da proteína DsbC no citoplasma, o que confere a grande vantagem da SHUFFLE: favorecimento da formação de pontes dissulfeto no citoplasma da bactéria (LOBSTEIN *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2016).

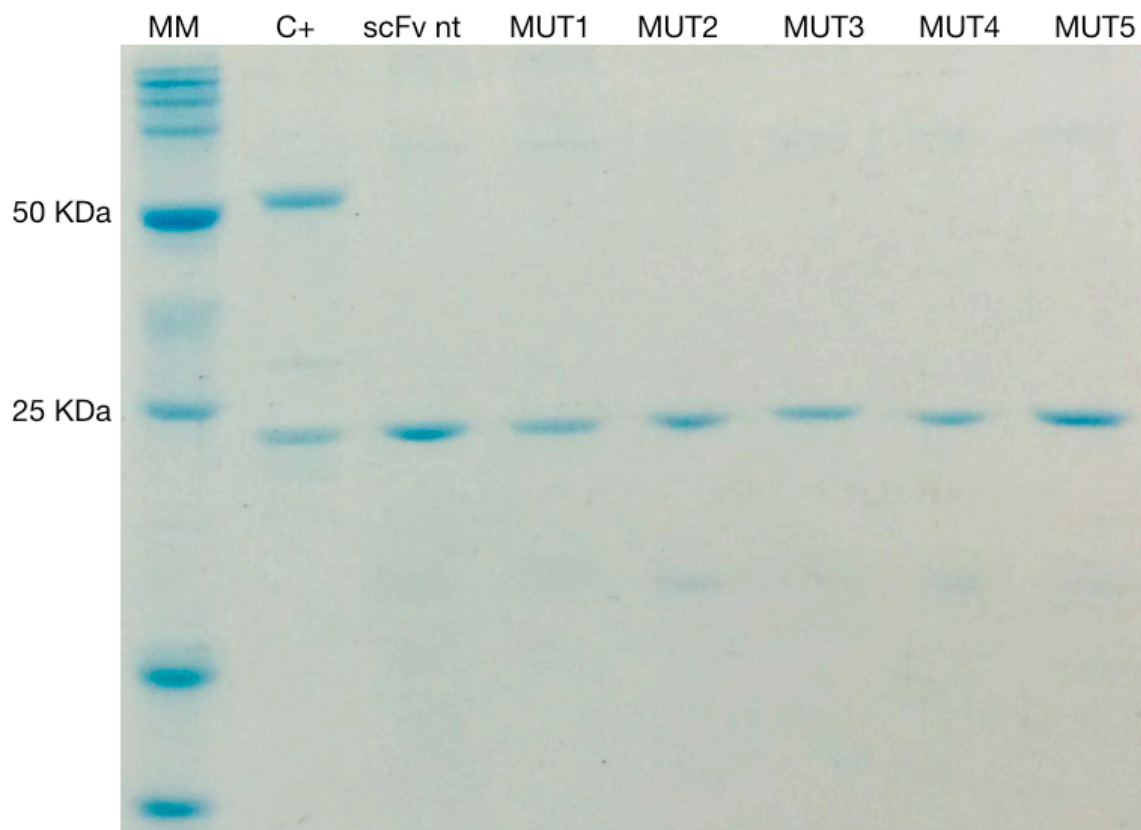
Figura 12 – Vias metabólicas otimizadas na SHUFFLE



Fonte: Adaptado de REN *et al.*, 2016. As vias riscadas em vermelho foram deletadas ou suprimidas do genoma de SHUFFLE. Houve uma superexpressão de DsbC, promovendo um ambiente mais oxidativo no citoplasma, facilitando a formação das pontes dissulfeto.

Diferentes estratégias foram estudadas para que fosse possível se obter proteínas melhor dobradas (*folding*), solúveis e capazes de formar pontes dissulfeto em sistemas procariotos, que naturalmente apresentam dificuldades em produzir proteínas com as características citadas. Alguns grupos co-expressam o fragmento de anticorpo com chaperonas (YOUSEFI *et al.*, 2018), outros buscam utilizar peptídeos sinais que enviam a proteína recém-sintetizada ao periplasma (onde acredita-se ser um ambiente mais favorável a formação de pontes dissulfeto) (DEWI *et al.*, 2016), alguns outros buscam usar cepas engenheiradas (ZARSCHLER *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014). Para cada proteína diferente, um conjunto de fatores influenciam, pois há uma mudança de comportamento nas condições de reação e, portanto, não existe um protocolo único e padrão.

Figura 13 – SDS-PAGE (12,5 %) de scFv nativo e mutantes pós clivagem de SUMO



Fonte: Elaborada pela autora. MM: marcadores de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers Promega[®]); scFv nt: scFv nativo; MUT: mutantes.

A tabela 2 mostra os rendimentos obtidos nas expressões do scFv-SUMO e mutantes, antes e após a clivagem com a proteína ULP Sumo Protease, portanto, tem-se representadas na tabela as proteínas com cauda e sem cauda. Os valores de quantificação protéica foram obtidos através do fluorímetro Qubit[®] 2.0, seguindo protocolo conforme fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabela 2 – Rendimentos em mg proteínas por litro de cultura dos fragmentos de anticorpo (scFv) expressos em SHUFFLE e purificados

Proteína purificada	Rendimento (mg/L) com SUMO	Rendimento (mg/L) após clivagem da cauda SUMO
scFv nativo	8,0	2,5

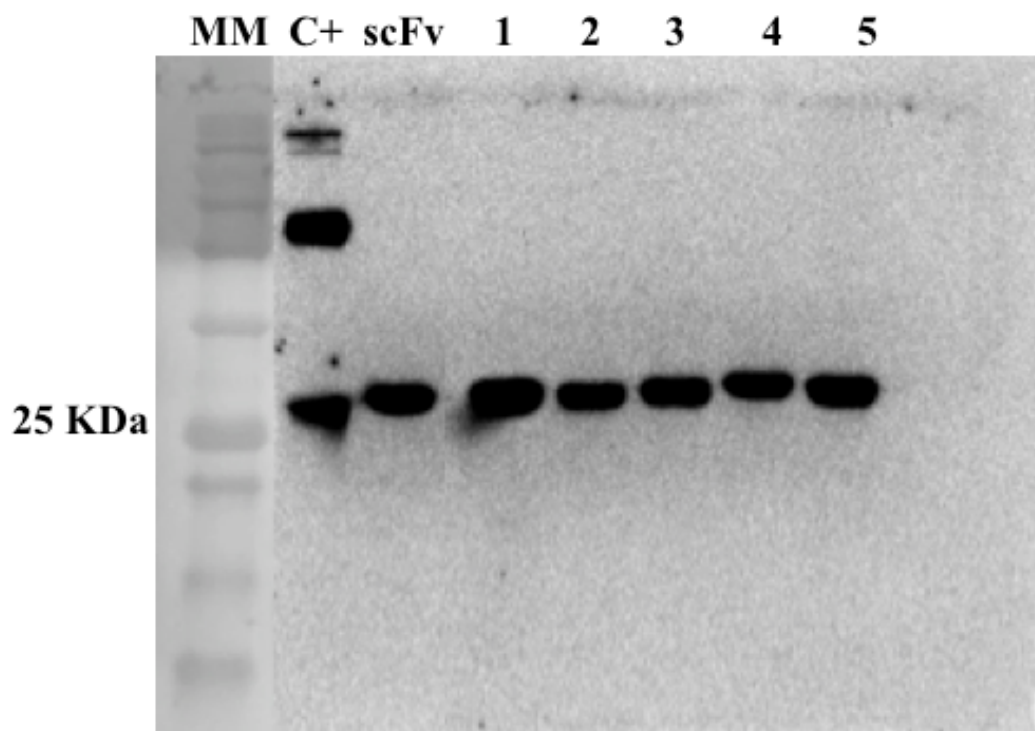
MUT1	8,0	2
MUT2	10,0	2,5
MUT3	8,0	2
MUT4	6,0	1,5
MUT5	8,0	1,7

Fonte: Elaborada pela autora. Os valores de rendimento são aproximados e utiliza os padrões próprios do fluorímetro, como recomendado pelo fabricante.

Os rendimentos obtidos são corroborados com a literatura, como os observados por Sonoda *et al.* (2010) e Wang *et al.* (2013), que co-expressaram scFv e chaperonas (utilizando vetores e cepas bacterianas diferentes das usadas neste trabalho), a fim de melhorar o enovelamento protéico e, com isso, aumentar o rendimento (SONODA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013); e por Sharma *et al.* (2014), que utilizou como estratégia o uso de um vetor com um peptídeo-sinal que envia a proteína para o periplasma, compartimento celular que favorece a formação de ligações dissulfeto (SHARMA *et al.*, 2014). Em alguns trabalhos, observou-se a estratégia de uso do vetor de expressão pETSUMO, os quais conseguiram rendimentos elevados de proteína solúvel (YE *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2015). Zarschler *et al.* (2013) e Gaciarz *et al.* (2016) expressando fragmento de anticorpos de domínio único na cepa modificada SHUFFLE obtiveram rendimentos de proteínas solúvel superiores a 200 mg/L (ZARSCHLER *et al.*, 2013; GACIARZ *et al.*, 2016). Observa-se, portanto, que cada proteína deve ter parâmetros padronizados de cepa, vetor, condições de crescimento, concentração de indutor, entre outros fatores para melhorar os rendimentos de expressão e purificação.

4.5 Western Blot

Um ensaio de *Western Blot* foi realizado com o intuito de confirmar a presença de scFvs (sem cauda), através da ligação desses com a proteína L-HRP (Figura 14). A proteína L é uma proteína da parede celular de *Peptostreptococcus magnus*, capaz de ligar em regiões V_L de cadeias leve κ 1, κ 3 e κ 4 com alta afinidade, sem restrições quanto à classe do Ig (PALONI; CAVALLOTTI, 2017). Portanto, ela consegue identificar o scFv pela cadeia leve, sendo utilizado no trabalho, como descrito na metodologia item 3.15.

Figura 14 – *Western Blot* dos scFvs nativo e mutantes

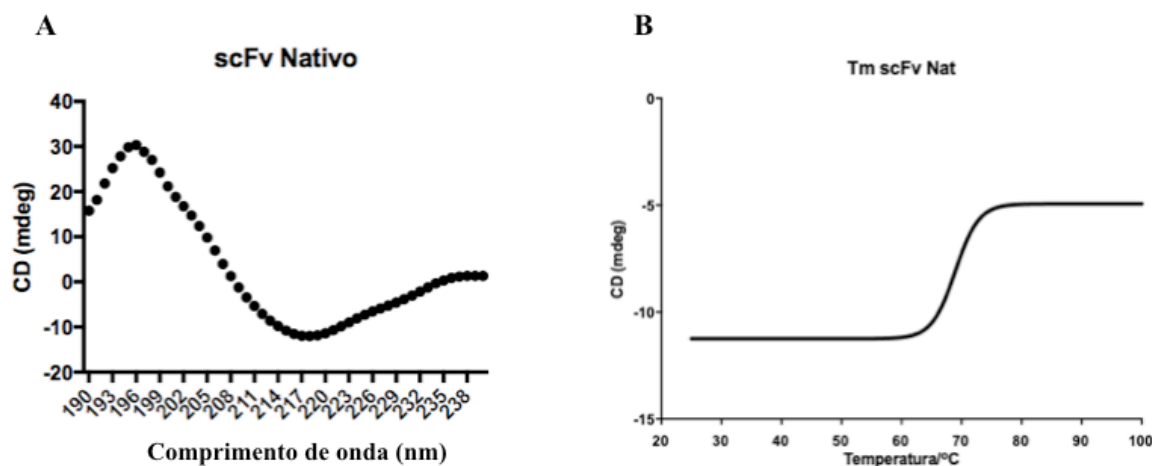
Fonte: Elaborado pela autora. MM: Marcadores de peso molecular True Color Sinapse; C+: controle positivo Mabthera[®]; scFv: fragmento nativo; 1, 2, 3, 4, 5: mutantes.

Observa-se, portanto, a capacidade de ligação da proteína L com o scFv nativo, bem como com todos os variantes apresentados (MUT1, MUT2, MUT3, MUT4, MUT5), indicando integridade na montagem das cadeias.

4.6 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular realizado com o scFv nativo e mutantes buscou fazer uma predição da estrutura secundária dos fragmentos, bem como temperatura de *melting* do scFv nativo. Com base nesse método, pode-se prever a estrutura secundária dos mutantes e atribuir possíveis mudanças de função biológica apenas à mutação pontual e não devido à perda e/ou modificação na estrutura secundária da proteína. Essa caracterização por CD é essencial na comparação entre mutantes e uma proteína cuja sequência é a nativa, especialmente quando se deseja incrementar funções protéicas nessa mutação (RANJBAR; GILL, 2009; YAO *et al.*, 2018).

Figura 15 – Espectro de dicroísmo circular do scFv nativo

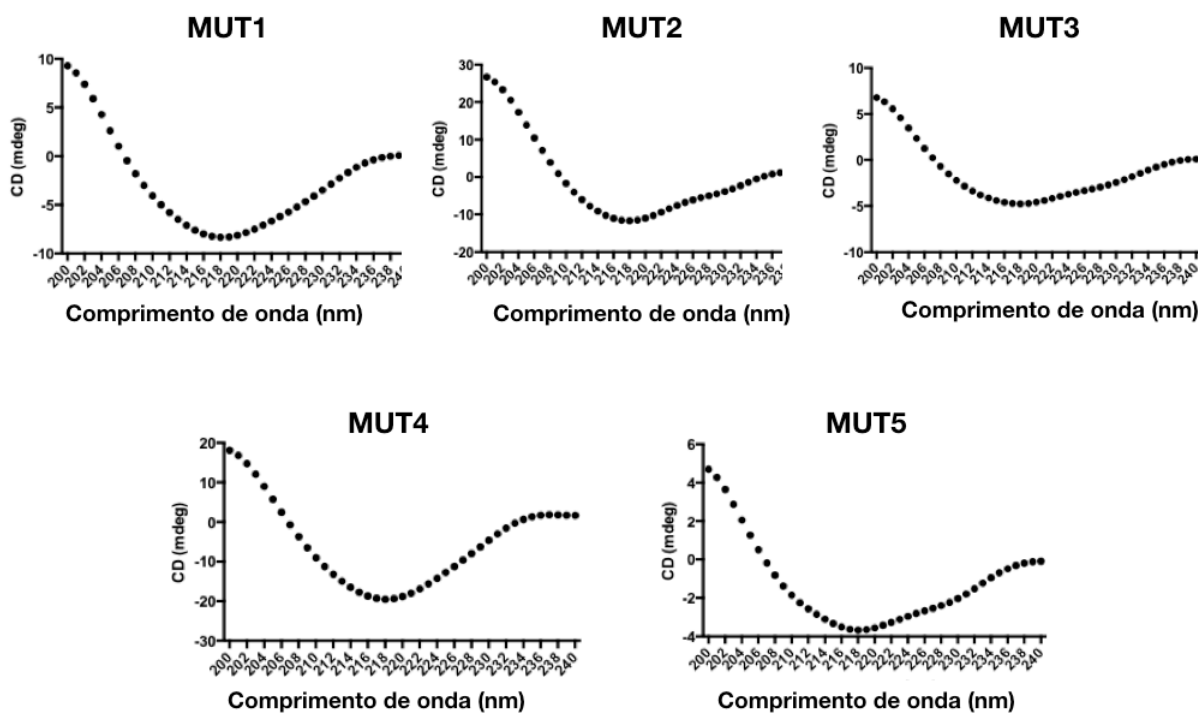


Fonte: Elaborada pela autora. A) Espectro de dicroísmo circular em “far-UV”; B) Curva de *melting* a 220 nm.

O espectro observado na figura 15A é característico de uma estrutura secundária em folhas β , onde observa-se uma banda com mínimo negativo em 218 nm e outra e um pico positivo em 195 nm. Esse padrão estrutural é comum em anticorpos, uma vez que vários estudos de cristalografia confirmam essas folhas β (LIN *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2018). Na figura 15B, observa-se a curva de *melting*, determinando o perfil de desnaturação do scFv, bem como sua temperatura de transição, a qual pode ser calculada em $T_m \approx 68 \text{ }^\circ\text{C}$ (GREENFIELD, 2007a).

O espectro observado na figura 16 é elucidativo de que as mutações realizadas não comprometeram a estrutura secundária dos fragmentos, fortalecendo assim a hipótese de que possíveis modificações na função biológica dessas moléculas advêm da modificação estrutural proposta pelo desenho racional, e não devido a alterações significativas da estrutura característica da proteína, corroborando com outros estudos de proteínas mutantes (CATANZANO *et al.*, 1998; FODALE *et al.*, 2014).

Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular dos mutantes

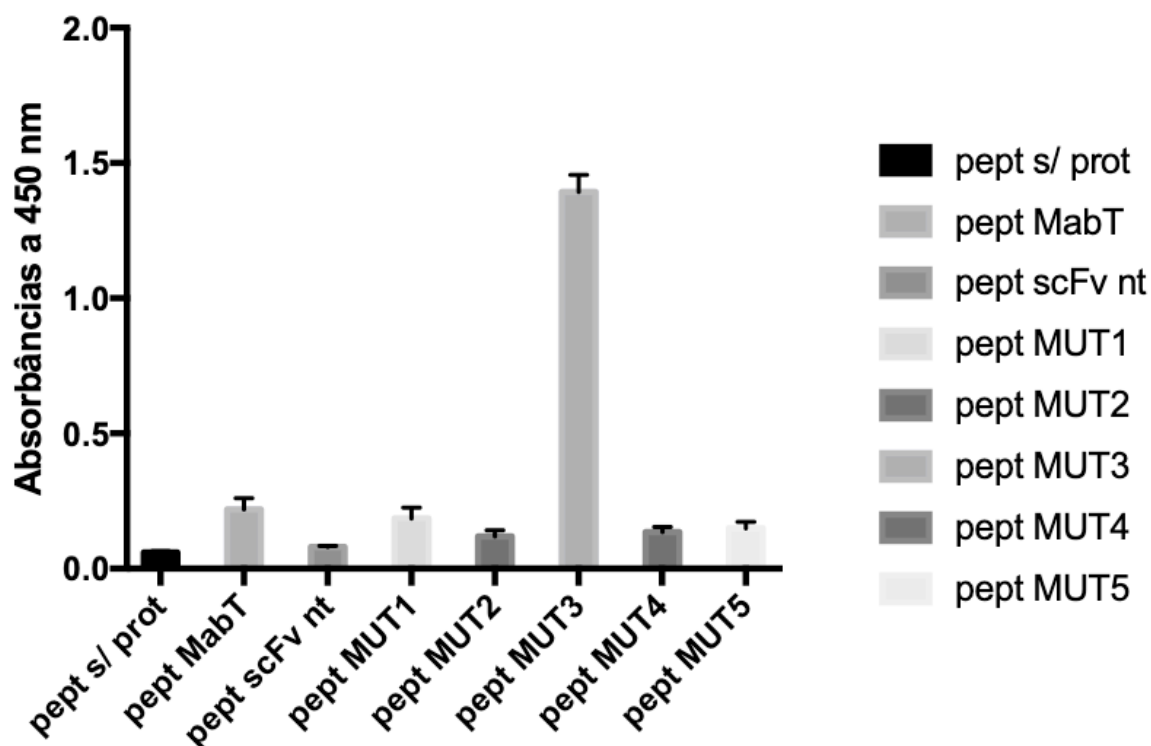


Fonte: Elaborada pela autora. Espectro de dicroísmo circular em “far-UV” dos fragmentos scFv mutantes do Rituximabe.

4.7 ELISA com peptídeo

O ELISA foi realizado com o scFv nativo e mutantes, a fim de comparar a interação destes com um peptídeo contendo o epítipo do Rituximabe, previamente adsorvido na microplaca. Utilizou-se o Rituximabe comercial (MabThera[®]) como controle positivo e o resultado apresentado no gráfico 2:

Gráfico 2 – ELISA scFv nativo e mutantes



Fonte: Elaborado pela autora. Pept: peptídeo imobilizado em placa de ELISA de 96 poços. Como controle negativo, (pept s/ proteína) é utilizado apenas o anticorpo secundário (proteína L) no ensaio.

O gráfico 2 indica que todos os fragmentos de anticorpos utilizados mantêm capacidade de ligação com o antígeno. Outros trabalhos também realizaram ensaios como esse para determinar a capacidade de interação (CRAGG *et al.*, 2004; HAMPSON *et al.*, 2010; SANCHEZ *et al.*, 2010; AHMADZADEH *et al.*, 2014), embora tenham usado condições distintas.

Os médias e os desvios-padrão do gráfico 2, obtidos através do programa Prism 7, estão listados na tabela 3:

Tabela 3 – Médias e desvios-padrão observados no ELISA

Amostras	Média + Desvio-padrão
Peptídeo sem proteína	0.0593 ± 0.007
MabThera	0.2187 ± 0.043

scFv nativo	0.08 ± 0.004
MUT1	0.1847 ± 0.041
MUT2	0.1187 ± 0.024
MUT3	1.3933 ± 0.063
MUT4	0.135 ± 0.019
MUT5	0.1487 ± 0.025

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na tabela 3, os scFv mutantes possuem média de absorvância superior ao scFv nativo, no entanto, os valores possuem um caráter qualitativo. Vale destacar que o MUT3 apresentou um valor de absorvância muito superior aos demais, o que pode indicar uma possível maior interação com o peptídeo adsorvido na placa. Embora o Rituximabe comercial tenha sido utilizado como controle, é importante destacar que mesmo tendo sido usada a mesma concentração de anticorpo (150 µg/mL), o número de moléculas de scFv contidas nessa concentração é maior que o número de moléculas do Rituximabe.

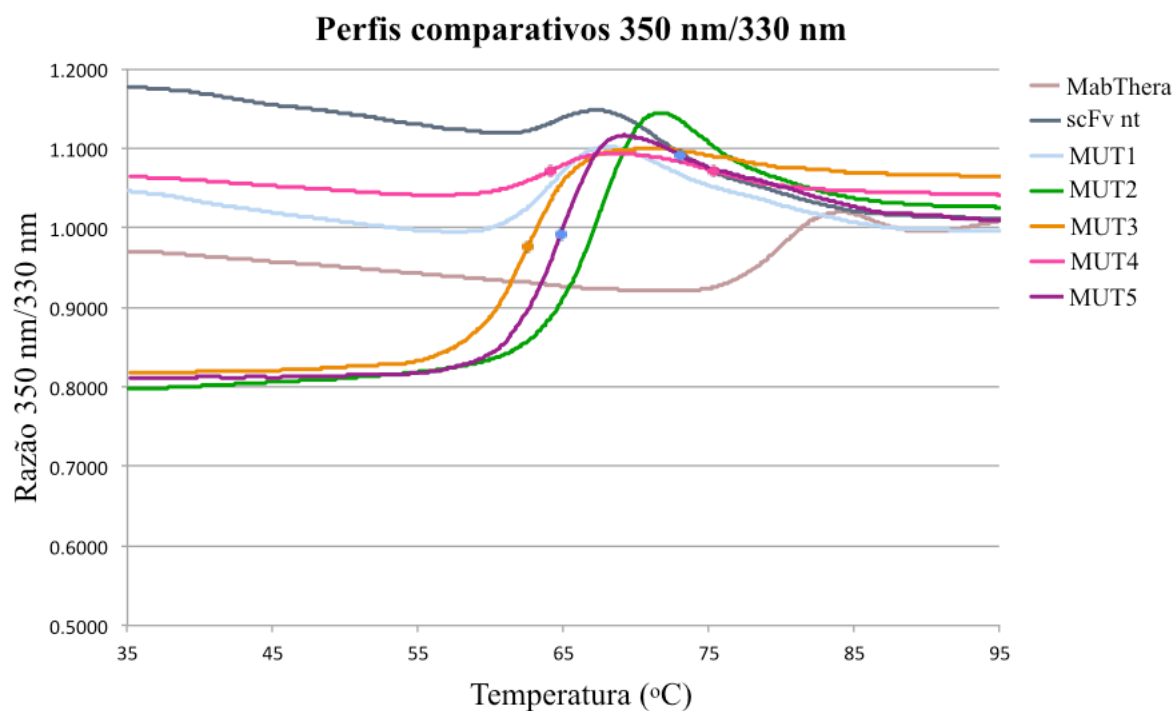
4.8 Ensaio de estabilidade térmica de proteínas

O gráfico 3 mostra os perfis comparativos do ensaio de estabilidade térmica realizada com o Rituximabe comercial, scFv nativo e mutantes. À medida que há o aquecimento do sistema, o sinal de fluorescência se altera, indicando transições no enovelamento protéico. A temperatura onde essas transições ocorrem é chamada de temperatura de inflexão e é representada como a primeira derivada da curva.

A média das temperaturas de inflexão observadas no scFv nativo (60 °C) é diferente da temperatura de melting observada pela técnica de dicroísmo circular (68 °C). Isso se deve a inúmeros fatores, como o princípio básico de cada técnica ser diferente; a sequência da proteína analisada pode não ter a quantidade de triptofanos suficientes para atingir um sinal alto ou, ainda, dependendo do meio onde esses resíduos se encontram, eles podem estar mais expostos ou menos disponíveis para interação; como a fluorescência da proteína é derivada dos resíduos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e, em menor quantidade, fenilalanina), então proteínas grandes podem não ter fluorescência suficiente devido a uma

possível baixa frequência desses resíduos na sequência (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014; JERABEK-WILLEMSSEN *et al.*, 2014).

Gráfico 3 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência de acordo com a desnaturação proteica

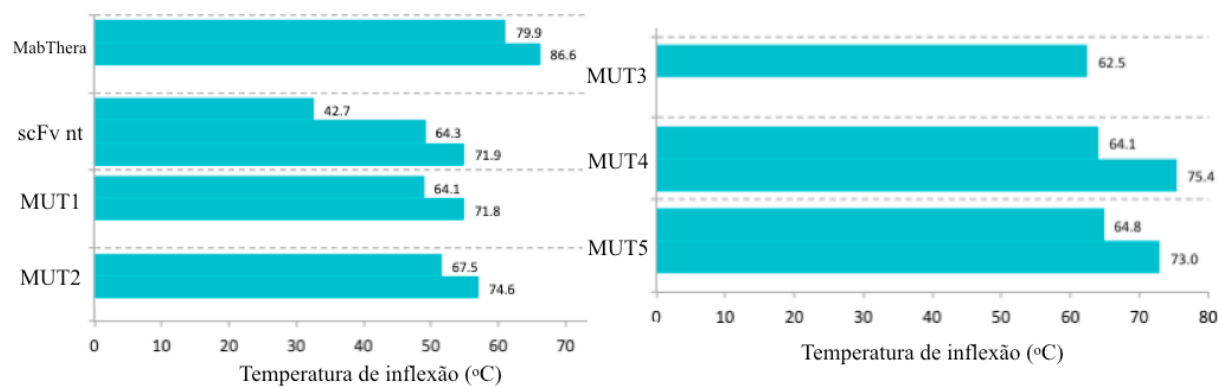


Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se, a partir do gráfico 3, que os fragmentos de scFv produzidos apresentam pequenas diferenças quanto ao perfil de emissão de sinal de fluorescência. Isso ocorre devido à grande identidade nas sequências protéicas comparadas, visto que as mutações implementadas são pontuais. A curva referente ao Rituximabe comercial (MabThera[®]) apresenta um deslocamento no eixo horizontal, indicando temperaturas de inflexão mais elevadas, especialmente devido ao fato de esta molécula ser mais complexa que os fragmentos, pois trata-se de um anticorpo completo, o qual apresenta ligações dissulfeto intra e intercadeia em sua estrutura, bem como é uma proteína bivalente, possuindo 4 domínios.

O gráfico 4 representa os valores das temperaturas de inflexão obtidas com a desnaturação térmica das proteínas analisadas.

Gráfico 4 – Temperaturas de inflexão obtidas através da desnaturação térmica



Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou ser viável a produção de variantes na região determinante de complementariedade no formato scFv de forma recombinante (sistema procarioto) do anticorpo monoclonal Rituximabe, a partir do desenho racional. A produção desses fragmentos de anticorpos manteve propriedades estruturais dessas moléculas, possibilitando, assim, a utilização posterior em ensaios *in vitro* relacionados à função biológica de morte celular.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8a Edição. [S.L.]: Elsevier, 2015. 1195 p.
- AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). Disponível em: http://www.abdi.com.br/Paginas/noticia_detalhe.aspx?i=3586. Acesso em 25 set 2018.
- AHMADZADEH, V.; FARAJNIA, S.; HOSSEINPOUR FEIZI, M. A.; KHAVARINEJAD, R. A. Design, expression and characterization of a single chain anti-CD20 antibody; a germline humanized antibody derived from Rituximab. **Protein expression and purification**, v. 102, p. 45–51, 2014.
- ANVISA, A. N. DE V. S. **Registro de Produtos Biológicos Bases Legais e Guias - Coletânea**. 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIA FARMOQUÍMICA E DE INSUMOS FARMACÊUTICOS (ABIQUIFI). Disponível em: <http://abiquifi.org.br/biofarmacos-causam-rombo-de-r-2-bi-nas-contas/>. Acesso em 25 set 2018.
- BAGACEAN, C.; ZDRENGHEA, M.; TEMPESCU, A.; CRISTEA, V.; RENAUDINEAU, Y. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia: from uncertainties to promises. **Immunotherapy**, v. 8, n. 5, p. 569–581, 2016.
- BANTA, S.; DOOLEY, K.; SHUR, O. Replacing antibodies: engineering new binding proteins. **Annual review of biomedical engineering**, v. 15, n. April, p. 93–113, 2013.
- BETTS, M. J.; RUSSEL, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. **Bioinformatics for Geneticists**. 2003.
- BUSS, N. A.; HENDERSON, S. J.; MCFARLANE, M.; SHENTON, J. M.; HAAN, L. DE. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 615–622, 2012.
- CARDARELLI, P. M.; QUINN, M.; BUCKMAN, D.; et al. Binding to CD20 by Anti-B1 Antibody or F (ab')₂ is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 51, p. 15–24, 2002.
- CARTER, P. J.; LAZAR, G. A. Next generation antibody drugs: Pursuit of the “high-hanging fruit.” **Nature Reviews Drug Discovery**, 2017.
- CATANZANO, F.; GRAZIANO, G.; CAFARO, V.; et al. Circular dichroism study of ribonuclease A mutants containing the minimal structural requirements for dimerization and swapping. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 277–285, 1998.
- CHAUHAN, R.; SOOD, N. Biopharmaceuticals: New yet Natural. **British Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–19, 2016.
- CHIU, M. L.; GILLILAND, G. L. Engineering antibody therapeutics. **Current Opinion in**

Structural Biology, v. 38, p. 163–173, 2016.

CRAGG, M. S.; BAYNE, M. B.; TUTT, A. L.; et al. A new anti-idiotypic antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2540–2543, 2004.

DEWI, K. S.; RETNONINGRUM, D. S.; RIANI, C.; FUAD, A. M. Construction and periplasmic expression of the anti-EGFRvIII ScFv antibody gene in escherichia coli. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 1, p. 141–152, 2016.

DINH, T. L.; NGAN, K. C.; SHOEMAKER, C. B.; et al. Using antigen-antibody binding kinetic parameters to understand single-molecule array immunoassay performance. **ACS Analytical Chemistry**, 2016.

DU, J.; WANG, H.; ZHONG, C.; et al. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 15073–15080, 2007.

DU, J.; YANG, H.; GUO, Y.; DING, J. **Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody Ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20**. 2009.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, n. 71, 2011.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **mAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2015.

ELGUNDI, Z.; RESLAN, M.; CRUZ, E.; SIFNIOTIS, V.; KAYSER, V. The state-of-play and future of antibody therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016. Elsevier B.V.

FEUGIER, P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas. **Future oncology (London, England)**, v. 11, n. 9, p. 1327–42, 2015.

FODALE, V.; KEGULIAN, N. C.; VERANI, M.; CARIULO, C. Polyglutamine- and Temperature- Dependent Conformational Rigidity in Mutant Huntingtin Revealed by Immunoassays and Circular Dichroism Spectroscopy. **PloS One**, p. 1–31, 2014.

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

FUKUNAGA, A.; TSUMOTO, K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 26, n. 12, p. 773–780, 2013.

FURTADO, G. P.; LOURENZONI, M. R.; FUZO, C. A.; et al. Engineering the affinity of a family 11 carbohydrate binding module to improve binding of branched over unbranched polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. Elsevier B.V.

GACIARZ, A.; VEIJOLA, J.; UCHIDA, Y.; et al. Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of *E. coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 22, p. 1–10, 2016. BioMed Central.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins : A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22518–22538, 2014.

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

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2007a.

GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2733–2741, 2007b.

GUAN, M.; ZHOU, Y.; SUN, J.; CHEN, S. Adverse events of monoclonal antibodies used for cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.

HAMPSON, G.; WARD, T. H.; CUMMINGS, J.; et al. Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. **Journal of Immunological Methods**, v. 360, n. 1–2, p. 30–38, 2010. Elsevier B.V.

HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nat Protoc**, v. 2, n. 4, p. 924–932, 2007.

HOLLAND, E. G.; ACCA, F. E.; BELANGER, K. M.; et al. In vivo Elimination of Parental Clones in General and Site- directed Mutagenesis. **J Immunol Methods**, , n. 417, p. 67–75, 2016.

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

HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018. Elsevier Inc.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018 - Incidência do Câncer no Brasil. 2018.

JAIN, P.; O'BRIEN, S. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. **Expert opinion on biological therapy**, v. 13, n. 2, p. 169–182, 2013.

- JERABEK-WILLEMSEN, M.; ANDRÉ, T.; WANNER, R.; et al. MicroScale Thermophoresis : Interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p. 101–113, 2014. Elsevier B.V.
- KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.
- KASI, P. M.; TAWBI, H. A.; ODDIS, C. V; KULKARNI, H. S. Clinical review: Serious adverse events associated with the use of rituximab - a critical care perspective. **Critical Care**, v. 16, n. 4, p. 231, 2012.
- KAYMAKCALAN, Z.; SAKORAFAS, P.; BOSE, S.; et al. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. **Clinical Immunology**, v. 131, n. 2, p. 308–316, 2009. Elsevier Inc.
- KENNEDY, P. J.; OLIVEIRA, C.; GRANJA, P. L.; et al. Monoclonal antibodies : technologies for early discovery and engineering. **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–15, 2017. Informa Healthcare USA, Inc.
- KONTERMANN, R. E.; BRINKMANN, U. Bispecific antibodies. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 838–847, 2015. Elsevier Ltd.
- LERNER, R. A. Combinatorial antibody libraries: new advances, new immunological insights. **Nature Reviews Immunology**, 2016. Nature Publishing Group.
- LI, B.; ZHAO, L.; GUO, H.; et al. Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma. **Blood**, v. 114, n. 24, p. 5007–50515, 2009.
- LI, M.; PETUKH, M.; ALEXOV, E.; PANCHENKO, A. R. Predicting the impact of missense mutations on protein-protein binding affinity. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 10, n. 4, p. 1770–1780, 2014.
- LIN, J. C.; GLOVER, Z. K.; SREEDHARA, A. Assessing the Utility of Circular Dichroism and FTIR Spectroscopy in Monoclonal-Antibody Comparability Studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4459–4466, 2015. Elsevier Masson SAS.
- LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC biotechnology**, v. 8, p. 91, 2008.
- LIU, Z.; ZHANG, J.; FAN, H.; et al. Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in Escherichia coli. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 302–306, 2015. Elsevier B.V.
- LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; et al. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 1, 2012. BioMed Central Ltd.

LUGOVSKOY, A. A. Engineering Antibodies as Drugs: Principles and Practice. **Molecular Biology**, v. 51, n. 6, p. 772–781, 2017.

MICHNICK, S. W.; SIDHU, S. S. Submitting antibodies to binding arbitration. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 6, p. 326–329, 2008.

MONSELLIER, E.; BEDOUELLE, H. Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 18, n. 9, p. 445–456, 2005.

MORRISON, C. Fresh from the biotech pipeline-2017. **Nature Biotechnology**, 2018.

MOTA, F. B.; CASSIOLATO, J. E.; GADELHA, C. A. G. Futuro da pesquisa , desenvolvimento tecnológico e produção industrial de biofarmacêuticos no Brasil. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 8, n. 4, p. 461–477, 2014.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. **Imunobiologia de Janeway**. 7a ed. [S.L.]: Atmed, 2010. 899 p.

MUYLDERMANS, S.; SMIDER, V. V. Distinct antibody species: Structural differences creating therapeutic opportunities. **Current Opinion in Immunology**, v. 40, p. 7–13, 2016.

NELSON D; COX M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. [S.L.]: Atmed, 2014. 1250 p.

PALONI, M.; CAVALLOTTI, C. Molecular modeling of the interaction of protein L with antibodies. **ACS Omega**, v. 2, n. 10, p. 6464–6472, 2017.

PIERPONT, T. M.; LIMPER, C. B.; RICHARDS, K. L. Past, Present, and Future of Rituximab—The World’s First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. June, 2018.

RABHI, I.; GUEDEL, N.; CHOUK, I.; et al. A novel simple and rapid PCR-based site-directed mutagenesis method. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 27–34, 2004.

RABIA, L. A.; DESAI, A. A.; JHAJJ, H. S.; TESSIER, P. M. Understanding and overcoming trade-offs between antibody affinity, specificity, stability and solubility. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 365–374, 2018. Elsevier B.V.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques : Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chem. Biol. Drug Des**, v. 74, p. 101–120, 2009.

REBOUÇAS, A. DE S. *Estudo da interação do scfv do anticorpo rituximab com a alça do receptor cd20 : avaliação da energia livre de ligação pelo método abf para proposição de biobetters*. 2018. 84f. *Dissertação de mestrado* – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. D. L.; SILVA, L. G. DA; et al. Biotecnologia Para Saúde Humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, v.

29, p. 359–392, 2009.

REN, G.; KE, N.; BERKMEN, M. Use of the SHuffle strains in production of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 2016, p. 5.26.1-5.26.21, 2016.

SAEED, A. F. U. H.; WANG, R.; LING, S.; WANG, S. Antibody engineering for pursuing a healthier future. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–28, 2017.

SANCHEZ, A. B.; NGUYEN, T.; DEMA-ALA, R.; et al. A general process for the development of peptide-based immunoassays for monoclonal antibodies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 919–925, 2010.

SEIFI, M.; WALTER, M. A. Accurate prediction of functional, structural, and stability changes in PITX2 mutations using in silico bioinformatics algorithms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–23, 2018.

SEYFIZADEH, N.; SEYFIZADEH, N.; HASENKAMP, J.; HUERTA-YEPEZ, S. 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, 2016.

SHARMA, S. K.; SURESH, M. R.; WUEST, F. R. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer. **Protein Expression and Purification**, v. 102, p. 27–37, 2014. Elsevier Inc.

SONODA, H.; KUMADA, Y.; KATSUDA, T.; YAMAJI, H. Functional expression of single-chain Fv antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli* by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones. **Protein Expression and Purification**, v. 70, n. 2, p. 248–253, 2010. Elsevier Inc.

SPASEVSKA, I.; DUONG, M. N.; KLEIN, C.; DUMONTET, C. Advances in Bispecific Antibodies Engineering: Novel Concepts for Immunotherapies. **Journal of Blood Disorders & Transfusion**, v. 06, n. 01, p. 1–8, 2015.

SRIVASTAVA, A.; NAGAI, T.; SRIVASTAVA, A.; MIYASHITA, O. Role of Computational Methods in Going beyond X-ray Crystallography to Explore Protein Structure and Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, 2018.

SUZUKI, M.; KATO, C.; KATO, A. Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. **Journal of toxicologic pathology**, v. 28, n. 3, p. 133–9, 2015.

TILLER, K. E.; TESSIER, P. M. Advances in Antibody Design. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 17, p. 191–216, 2015.

TOHIDKIA, M. R.; SEPEHRI, M.; KHAJEH, S.; BARAR, J.; OMIDI, Y. Improved Soluble ScFv ELISA Screening Approach for Antibody Discovery Using Phage Display Technology. **SLAS discovery**, p. 2472555217701059, 2017.

TYAGI, R.; LAI, R.; DUGGLEBY, R. G. A new approach to “megaprimer” polymerase

chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. **BMC biotechnology**, v. 4, p. 2, 2004.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1^a ed. São Paulo: SBBq, 2014.

WANG, R.; XIANG, S.; FENG, Y.; et al. Engineering production of functional scFv antibody in *E. coli* by co-expressing the molecule chaperone Skp. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. November, p. 72, 2013.

WEICHEL, M.; BASSARAB, S.; GARIDEL, P. Probing Thermal Stability of MAbs By Intrinsic Tryptophan Fluorescence. **BioProcess International**, 2008.

WOODY, R. W. The development and current state of protein circular dichroism. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v. 4, p. 5–34, 2015.

WU, D.; GUO, X.; LU, J.; et al. A rapid and efficient one-step site-directed deletion, insertion, and substitution mutagenesis protocol. **Analytical Biochemistry**, v. 434, n. 2, p. 254–258, 2013.

XU, J.; ZHANG, W. Strategies used for genetically modifying bacterial genome : site-directed mutagenesis , gene inactivation , and gene over-expression. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 17, n. 2, p. 83–99, 2016.

YANG, Y.; HE, Y.; WANG, X.; et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. **Open Biology**, v. 7, n. 10, 2017.

YAO, H.; WYNENDAELE, E.; XU, X.; KOSGEI, A.; SPIEGELEER, B. DE. Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 50–64, 2018. Elsevier B.V.

YE, T.; LIN, Z.; LEI, H. High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 311–317, 2008.

YOUSEFI, M.; FARAJNIA, S.; MOKHTARZADEH, A.; et al. Soluble Expression of Humanized Anti-CD20 Single Chain Antibody in *Escherichia coli* by Cytoplasmic Chaperones Co-expression. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 141–146, 2018.

ZARSCHLER, K.; WITECY, S.; KAPPLUSCH, F.; FOERSTER, C.; STEPHAN, H. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 97, 2013. Microbial Cell Factories.

ZHANG, X.; XIE, J.; SUN, Y.; et al. High-level expression, purification, and characterization of bifunctional ScFv-9R fusion protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5499–5506, 2014.

ZHOU, Y.; MARKS, J. D. Mechanism of Action for Therapeutic Antibodies Blockade of Ligand – Receptor Interaction. **Biosimilars of Monoclonal Antibodies: A Practical Guide**

to Manufacturing, Preclinical, and Clinical Development, 2017.

Antibody fragments. Absolute antibody. Disponível em:
<https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-engineering/antibody-fragments/>.
Acesso em: 25 set 2018.