



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

IGOR CABRAL STUDART

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO
DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL OFATUMUMABE**

FORTALEZA

2019

IGOR CABRAL STUDART

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA
REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL OFATUMUMABE

Monografia apresentada ao Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Pedagógico: Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves.

Orientador Técnico-científico: Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

Coorientadora: 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)

S922e Studart, Igor Cabral.
Expressão heteróloga e avaliação da capacidade de ligação da região variável do anticorpo monoclonal Ofatumumabe / Igor Cabral Studart. – 2019.
73 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves / Dr. Gilvan Pessoa Furtado .
Coorientação: Profa. Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca.

1. Ofatumumabe. 2. Expressão heteróloga. 3. CD20. 4. Fragmentos de anticorpos. I. Título.

CDD 661

IGOR CABRAL STUDART

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA
REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL OFATUMUMABE

Monografia apresentada ao Centro de Ciências
da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 04/12/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves (Orientador Pedagógico)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Gilvan Pessoa Furtado (Orientador Técnico-científico)
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - CE)

Dra. Maria Cláudia dos Santos Luciano
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À força misteriosa subjacente à vida, que nos possibilita estar presentes, corajosamente, nessa instigante e desafiadora passagem, oportunidade única de testemunharmos o universo, aprendermos e compartilharmos experiências.

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz, pelo apoio financeiro e oportunidade de estágio, contribuindo imensamente para minha formação.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela excelente orientação científica e apoio em todos os aspectos.

À Dra. Marcela Helena Gambim Fonseca, pelas contribuições durante a execução dos experimentos, pela coorientação e todo apoio prestado.

Ao Dr. Murilo Siqueira Alves, pela disponibilidade em ser meu orientador pedagógico; à Dra. Maria Cláudia dos Santos Luciano, por aceitar participar da minha banca e pelas valiosas contribuições; e ao Dr. Kaio César Simiano Tavares pela parceria com nosso grupo de pesquisa e disponibilidade em contribuir sempre.

À Universidade de Fortaleza, em especial ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento e Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, pela infraestrutura cedida na realização dos experimentos.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação acadêmica, em especial ao Prof. Dr. Cléverson Diniz Teixeira de Freitas, por me proporcionar a primeira oportunidade científica.

À coordenação, a todos os professores do Bacharelado em Biotecnologia da UFC e ao Gilmar Ferreira da Costa, por sua grande gentileza e solicitude.

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

Aos amigos do Grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas, Ariany, Bruna, Davi, Gabriella, Larissa, Ludmila e Marcus Rafael, pelos ensinamentos e todo apoio prestado.

Aos amigos que pude encontrar por esse novo caminho, em especial, Guilherme, Luísa e Marcella, sem os quais seria muito difícil a caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Proteases Vegetais, em especial à Maria Zelândia por todos os ensinamentos.

À minha companheira, Natália, por dividir e construir comigo a vida, pela confiança e parceria a cada passo; e à Elis, por me proporcionarem o amor mais genuíno que se pode receber.

Às minhas irmãs, Catarina, Lourdes, Narjane e Roza e ao meu irmão, Milton.

Aos meus pais, Marcilda e Milton, e aos meus sogros, Graça e Ivan, por me acolherem nesse mundo e me proporcionarem todo amor e provisão.

The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day. (EINSTEIN, 1955, p. 64).

RESUMO

Ofatumumabe é um anticorpo monoclonal humano anti-CD20 utilizado no tratamento de doenças em que a depleção de células B é uma estratégia relevante, como Leucemia Linfóide Crônica, Linfomas não-Hodgkin e Esclerose Múltipla. O fragmento variável de cadeia única (scFv) é uma construção em que os domínios variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo são unidos por um *linker*. Algumas vantagens estão associadas ao formato de scFvs, principalmente devido ao seu tamanho reduzido, quando comparados aos anticorpos completos, e à possibilidade de serem expressos em sistema procarioto. O presente estudo visou expressar, purificar e avaliar a capacidade de ligação do scFv do Ofatumumabe. Pretende-se, em estudos futuros, aplicar este scFv como referencial em ensaios biológicos associados tanto à determinação dos resíduos cruciais do Ofatumumabe envolvidos em sua capacidade de ligação à molécula CD20 (parátipo), bem como no contexto da busca pela geração de mutantes com propriedades melhoradas, como anticorpos completos com afinidade superior ou especificidade alterada. Para a expressão heteróloga, foram utilizados o vetor pET-SUMO e a cepa de *Escherichia Coli* SHuffle. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna contendo níquel. Avaliou-se a purificação por SDS-PAGE, e realizaram-se imunoenaios para a avaliação da capacidade de ligação (*Western blot* e ELISA). Houve um rendimento médio de 4,3 mg/L de cultura a partir da expressão e purificação da porção solúvel. Pela análise eletroforética e pelo *Western blot*, obteve-se evidência da expressão do scFv. Os imunoenaios realizados não puderam confirmar a retenção da capacidade de ligação do scFv às células CD20⁺ aplicadas nestes testes. Conclui-se que a proteína recombinante foi expressa parcialmente solúvel e que estudos futuros de otimização do processo ainda serão necessários para se alcançar maior rendimento na produção do scFv. A busca por estratégias experimentais de avaliação adequada da capacidade de ligação para este scFv permanece como desafio. As restrições associadas ao uso de células que devem manter o antígeno alvo íntegro em suas membranas, de modo que exponham adequadamente a dupla região do epítipo para interação com o fragmento em questão, bem como as possíveis limitações do próprio tipo de fragmento para aplicação nesses testes – além de prováveis alterações estruturais da proteína – podem estar na base da dificuldade de detecção da capacidade de ligação do scFv obtido.

Palavras-chave: Ofatumumabe. Expressão heteróloga. CD20. Fragmentos de anticorpos.

ABSTRACT

Ofatumumab is a human anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of diseases in which B cell depletion might be beneficial, such as Chronic Lymphoid Leukemia, Non-Hodgkin's Lymphoma and Multiple Sclerosis. The single-chain fragment variable (scFv) is a construct in which the light and heavy chain variable domains of an antibody are joined by a linker. Some advantages are associated with the scFv format, mainly due to its reduced size when compared to whole antibodies and its ability to be expressed in prokaryotic system. The present study aimed to express, purify and assess the binding capacity of the scFv from Ofatumumab. In future studies, it is intended to apply this scFv as a reference in biological assays associated with the determination of crucial Ofatumumab residues involved in its binding capacity to the CD20 molecule, as well as in the context of the production of mutants with improved properties. For expression, pET-SUMO was used as the vector and the *Escherichia Coli* SHuffle was the strain chosen. Purification was performed by nickel-containing column affinity chromatography. Purification was evaluated by SDS-PAGE, and immunoassays were performed to assess binding capacity (Western blot and ELISA). There was an average yield of 4.3 mg/L of culture from expression and purification of the soluble fraction. By electrophoresis and Western blot, evidence of scFv expression was obtained. The immunoassays performed could not confirm retention of scFv binding capacity to CD20⁺ cells applied in these assays. It was concluded that the recombinant protein was expressed partially soluble. Future studies of process optimization will still be necessary to achieve higher yield in scFv production. The search for experimental strategies to properly assess scFv binding capacity remains a challenge. The restrictions associated with the use of cells that must keep the target antigen available on their membranes so that they adequately expose the double epitope region for interaction of the analyzed fragment throughout the assay, as well as the possible limitations of the fragment type itself for application in these tests – in addition to probable structural changes in scFv – may underlie the difficulty of detecting the binding capacity of the scFv obtained.

Keywords: Ofatumumab. Heterologous expression. CD20. Antibody fragments.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Evolução do uso de anticorpos monoclonais terapêuticos..... | 20 |
| Figura 2 – Rituximab e Ofatumumab apresentam diferentes sítios de ligação ao CD20..... | 23 |
| Figura 3 – Principais mecanismos de ação de mAbs anti-CD20 esquematizados | 24 |
| Figura 4 – Representação esquemática de anticorpo IgG (~150 KDa) | 25 |
| Figura 5 – Representação esquemática do fragmento scFv (~27kDa) | 26 |
| Figura 6 – Modificações metabólicas da cepa de E. coli SHuffle..... | 29 |
| Figura 7 – Modelo do vetor pET-SUMO | 33 |
| Figura 8 – Análise eletroforética da PCR de amplificação do gene do scFv e inclusão dos sítios para as enzimas <i>BamHI</i> e <i>HindIII</i> | 46 |
| Figura 9 – Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas com ligação do gene scFv-OFA no vetor pET-SUMO..... | 47 |
| Figura 10 – Teste de digestão com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>HindIII</i> do plasmídeo purificado | 48 |
| Figura 11 – Alinhamento global e eletroferograma..... | 50 |
| Figura 12 – Análise eletroforética da expressão e purificação do scFv-SUMO (géis 1 e 2).... | 51 |
| Figura 13 – Gel SDS-PAGE 12% correspondente à purificação, após a remoção da cauda SUMO | 54 |
| Figura 14 – <i>Western blot</i> : membranas de nitrocelulose reveladas por quimioluminescência e por método cromogênico. | 56 |
| Figura 15 – Citometria de fluxo - análise da expressão de CD20 na membrana das células K562 | 59 |
| Figura 16 – <i>Western blot</i> do ensaio de ligação (membranas reveladas por quimioluminescência)..... | 62 |
| Figura 17 – Repetição <i>Western blot</i> do ensaio de ligação (membranas reveladas por método cromogênico) | 63 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – ELISA com células para avaliação da capacidade de ligação do scFv 66

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Rendimentos em mg de proteína por litro de cultura de expressão em duas expressões realizadas..... | 55 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| ADCC | <i>Antibody-dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i> |
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| BCRJ | Banco de Células do Rio de Janeiro |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CDC | <i>Complement Dependent Cytotoxicity</i> |
| CDR | <i>Complementarity Determining Region</i> |
| DAI | Doença Autoimune |
| D.O. | Densidade Ótica |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> |
| EMRR | Esclerose Múltipla Remitente Recorrente |
| Fab | <i>Fragment Antigen Binding</i> |
| Fc | Fragmento Cristalizável |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| FSC | <i>Forward Scatter</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| Ig | Imunoglobulina |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| LB | Luria-Bertani |
| LLC | Leucemia Linfocítica Crônica |
| mAb | <i>Monoclonal Antibody</i> |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PE | <i>Phycoerythrin</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| scFv | <i>Single-chain Fragment variable</i> |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SFB | Soro Fetal Bovino |

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| SUMO | <i>Small Ubiquitin-like Modifier</i> |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TMB | 3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| HCl | Ácido clorídrico |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| A | Ampere |
| Cm | Centímetros |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| MnCl ₂ | Cloreto de Manganês |
| Da | Dalton |
| US\$ | Dólar Estadunidense |
| G | Grama |
| °C | Grau Celsius |
| H | Hora |
| K | Kappa |
| L | Litro |
| ® | Marca Registrada |
| μ | Micro |
| M | Mili |
| M | Molar |
| N | Nano |
| Pb | Pares de Base |
| % | Porcentagem |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| ™ | Trade Mark |
| V | Volts |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | Câncer | 18 |
| 1.2 | Biofármacos | 18 |
| 1.3 | mAbs no tratamento do câncer e de doenças autoimunes | 21 |
| 1.4 | CD20 e anti-CD20 | 22 |
| 1.5 | Fragmento variável de cadeia única (scFv) | 25 |
| 1.6 | Justificativa | 27 |
| 2 | OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 | Objetivo geral | 31 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 31 |
| 3. | MATERIAIS | 32 |
| 3.1 | Obtenção dos materiais | 32 |
| 3.2 | Vetor de expressão | 32 |
| 3.3 | Cepas de <i>E. coli</i> | 33 |
| 3.4 | Linhagens de células humanas | 34 |
| 3.5 | Proteína L-HRP | 34 |
| 4 | MÉTODOS | 35 |
| 4.1 | Clonagem do gene do scFv em pET-SUMO | 35 |
| 4.1.1 | <i>Amplificação do inserto</i> | 35 |
| 4.1.2 | <i>Reações de digestão</i> | 35 |
| 4.1.3 | <i>Reação de ligação</i> | 36 |
| 4.1.4 | <i>Transformação de <i>E. coli</i> TOP10</i> | 36 |
| 4.1.5 | <i>PCR de colônias</i> | 37 |
| 4.1.6 | <i>Teste de digestão e envio das amostras para sequenciamento</i> | 38 |
| 4.2 | Obtenção de células de <i>E. coli</i> quimiocompetentes para transformação | 38 |
| 4.3 | Transformação das cepas de expressão <i>E. coli</i> SHuffle e Rosetta | 39 |
| 4.4 | Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida | 39 |
| 4.5 | Expressão heteróloga do scFv do Ofatumumabe e da SUMO-protease | 40 |
| 4.6 | Purificação proteica por cromatografia de afinidade | 41 |
| 4.7 | Clivagem da cauda SUMO | 42 |
| 4.8 | <i>Western blot</i> | 42 |
| 4.9 | Citometria de fluxo das linhagens de células humanas K562 | 43 |
| 4.10 | Ensaio de avaliação da capacidade de ligação do scFv ao antígeno | 44 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.10.1 | <i>Incubação de células com o scFv</i> | 44 |
| 4.10.2 | <i>ELISA</i> | 45 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 5.1 | Clonagem do gene do scFv no vetor pET-SUMO | 46 |
| 5.2 | Expressão e purificação do scFv do Ofatumumabe em <i>E.coli</i> SHuffle T7 express | 50 |
| 5.3 | Clivagem da cauda SUMO e purificação | 53 |
| 5.4 | Rendimentos | 54 |
| 5.5 | <i>Western blot</i> | 55 |
| 5.6 | Citometria de fluxo para análise da expressão do antígeno nas linhagens K562 | 57 |
| 5.7 | Ensaio de ligação | 60 |
| 5.7.1 | <i>Western blot</i> | 60 |
| 5.7.2 | <i>ELISA</i> | 64 |
| 6 | CONCLUSÃO | 67 |
| | REFERÊNCIAS | 68 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o termo genérico que se refere a um conjunto de doenças de fundo genético e/ou epigenético e que apresentam como característica em comum o crescimento desordenado de células com potencial de invadir tecidos e órgãos, podendo, assim, espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2019; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013; PINHO, 2005). As neoplasias linfo-hematológicas (leucemias e linfomas) representaram 3,5% dos mais de 518 mil novos casos de câncer em homens e mulheres do ano de 2012 (ANDRADE *et al.*, 2013) e 5,5% dos mais de 417 mil novos casos de câncer em geral do ano de 2018 (INCA, 2018). Embora tendam a representar anualmente menos de 6% do total de incidências de novos casos de câncer na população brasileira, essas doenças onco-hematológicas contribuem para o grande impacto que o câncer em geral representa para a saúde pública nacional.

De acordo com o INCA (2018), a incidência em 2018 de cânceres hematológicos diagnosticados correspondeu a mais de 23 mil novos casos. Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), os gastos no tratamento de cânceres em geral cresceram em 66%, passando de R\$ 2,1 bilhões em 2010, para R\$ 3,5 bilhões em 2015. No mesmo período, o Sistema Único de Saúde (SUS) apresentou um aumento de 292 mil para 393 mil pacientes em tratamento de câncer (BRASIL, 2016), e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano de 2030, 27 milhões de pessoas serão acometidas por algum dos mais de 100 tipos de câncer, das quais, 17 milhões poderão vir a óbito (INCA, 2018). Diante de um desafio de tamanha importância para a saúde pública, o delineamento de políticas estratégicas de enfrentamento faz-se necessário, o que inclui o desenvolvimento de novos medicamentos que possam, sobretudo, ser disponibilizados pelo SUS. Nesse sentido, a busca por alternativas com maior especificidade e eficácia, associada a menores efeitos colaterais para os pacientes, está na base do que impulsionou a utilização de medicamentos biológicos (imunoterápicos) no contexto do câncer. (RODRIGUES *et al.*, 2012).

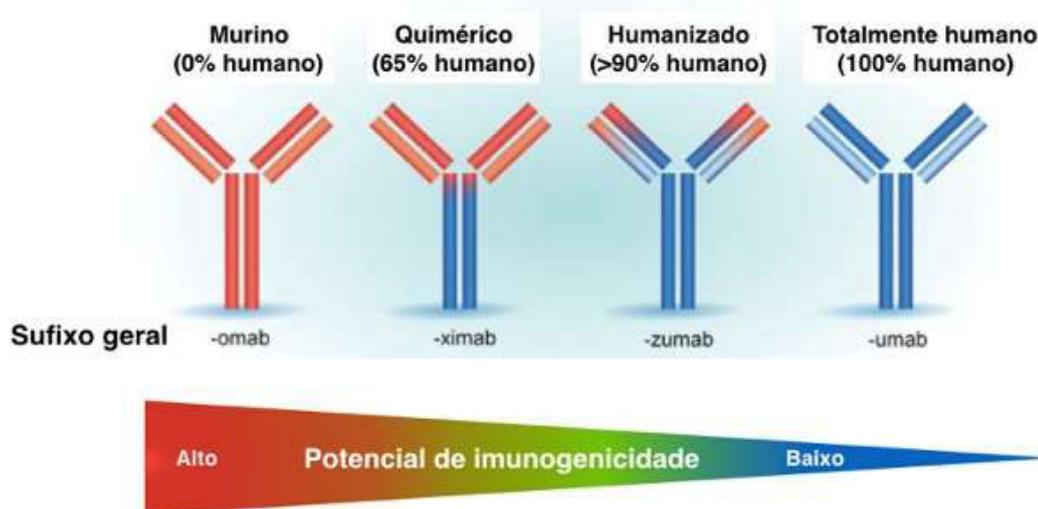
1.2 Biofármacos

Biofármacos são medicamentos obtidos a partir de sistemas ou processos biológicos, sendo aplicados no contexto de doenças diversas como estratégia terapêutica

geralmente mais específica e, conseqüentemente, mais eficiente do que os fármacos sintéticos (MULLER; MILTON, 2012; KINTZING *et al.*, 2016). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) considera como medicamentos biológicos, vacinas, soros hiperimunes, hemoderivados, hormônios, anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *monoclonal antibodies*), medicamentos contendo microrganismos vivos atenuados ou mortos e biomedicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal e vegetal ou por processos biotecnológicos (ANVISA, 2010). Não só a busca, mas também o número de moléculas biológicas que chega em estágio clínico globalmente têm sido cada vez maior (STROHL, 2018), o que está associado ao concomitante esforço científico de prospecção e validação de novos alvos e otimização estrutural das moléculas, facilitados por novas tecnologias e por recursos de bioinformática, essenciais aceleradores dos processos.

Os mAbs são moléculas de imunoglobulina advindas de um único clone de linfócito B, ou seja, apresentam afinidade específica para uma sequência única (epítipo) de um determinado alvo molecular (antígeno). A produção de mAbs foi originalmente realizada a partir da metodologia de hibridoma, desenvolvida em 1975 por Köhler e Milstein, a qual se vale da capacidade natural do sistema imune de mamíferos de produzir diferentes linhagens clonais de linfócitos B expressando, portanto, anticorpos capazes de se ligar a diferentes epítopos de um mesmo antígeno (anticorpos policlonais), aliando isso à possibilidade de isolamento de linhagens específicas dessas células e fusão destas com células de mieloma imortalizadas, para a produção de um determinado anticorpo selecionado (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Embora o método tenha sido essencial para a produção de mAbs em larga escala, como os clones de células B são obtidos a partir de murinos, a posterior aplicação terapêutica desses mAbs em humanos gera, em muitos casos, efeitos indesejados associados ou ao não reconhecimento por parte da maquinaria efetora do sistema imune do paciente, atrapalhando assim a eficácia do tratamento (CHAMES *et al.*, 2009), ou à imunogenicidade das porções murinas desses biofármacos, podendo gerar respostas graves em alguns pacientes. Nesse contexto, visando à atenuação desses problemas, métodos moleculares de engenharia genética passaram a integrar as técnicas de produção de mAbs que, agora, além de anticorpos quiméricos, ou seja, portadores de partes humanas (porção constante) e murinas (porção variável) podem ser modificadas para apresentarem características mais próximas das dos anticorpos humanos (os anticorpos humanizados) ou, ainda, anticorpos inteiramente humanos, estabelecendo-se enormes avanços terapêuticos (figura 1) (FOLTZ *et al.*, 2013).

Figura 1 – Evolução do uso de anticorpos monoclonais terapêuticos



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

O aumento da afinidade e da especificidade dos mAbs, além da maior tolerância por parte dos pacientes, eleva consideravelmente a eficiência desses fármacos, otimizando sua segurança e fazendo com que sejam classificados como produtos terapêuticos de alto valor agregado (ECKER *et al.*, 2015). De janeiro de 2010 a julho de 2014, 54 biofármacos foram aprovados na Europa e nos Estados Unidos, 17 deles eram mAbs. Em 2013, dentre os 54 produtos biológicos aprovados nesse período, 6 mAbs estiveram entre os 10 biofármacos mais vendidos naquele ano. No mesmo ano, a venda de mAbs aplicados apenas no contexto do câncer equivaleu a 29% de toda a movimentação global associada ao mercado oncológico de 2013 (WALSH, 2014). Estima-se que o mercado de medicamentos oncológicos movimentará mais de US\$ 100 bilhões em 2020, baseando-se nas tendências de anos anteriores (VIDAL; FIGUEREDO; PEPE, 2018). Em 2016, 80% dos medicamentos mais vendidos no mundo eram biológicos (STROHL, 2018). No período de janeiro de 2014 a julho de 2018, a aprovação de biofármacos na Europa e nos EUA foi de 132 produtos, estando entre eles 68 mAbs (WALSH, 2018). Apenas no ano de 2018, 12 mAbs tiveram sua primeira aprovação ou na Europa ou nos EUA, um número recorde, indicativo da intensificação da produção desse tipo de biofármaco (KAPLON; REICHERT, 2019).

Nesse cenário, o Brasil é um país bastante impactado economicamente devido à sua dependência de importação desses produtos. Em 2014, os gastos com a compra apenas de biofármacos equivaleram a 43% de todo o orçamento do SUS naquele ano, apesar de tais

medicamentos representarem apenas 5% do total de medicamentos comprados pelo Ministério da Saúde (CAMBRICOLI, 2016). Diante disso, fica clara a necessidade de investimentos contínuos em ciência e tecnologia de base nacional que possam vir a ser capazes de enfrentar tais desafios.

1.3 mAbs no tratamento do câncer e de doenças autoimunes

A imunoterapia integra o conjunto de abordagens terapêuticas possíveis para o câncer, juntamente com a radioterapia, quimioterapia e a intervenção cirúrgica (ROCHE, 2019), e está associada, entre outras abordagens, à aplicação de mAbs com ação antitumoral (INCA, 2019).

As células neoplásicas, em seu característico crescimento rápido e descontrolado, valem-se de mecanismos de evasão que as tornam relativamente imperceptíveis ao sistema imunológico e, assim, não deflagre respostas que visem à eliminação dessas células. Com isso, um dos principais mecanismos de ação dos mAbs aplicados na imunoterapia antineoplásica se refere ao restabelecimento da capacidade do sistema imunológico de discriminar as células doentes, conseqüentemente, atacando-as. Para isso, desenvolvem-se mAbs com especificidade para determinadas sequências aminoacídicas de proteínas presentes na superfície das células que se busca eliminar.

Além das neoplasias, um outro grupo de doenças relevantes que ainda carecem de abordagens de enfrentamento mais eficientes, são as doenças autoimunes (DAI). Elas representam um grupo de mais de 100 doenças bastante diversificadas que podem envolver qualquer órgão ou sistema. Dentre as DAI, incluem-se doenças crônicas e raras que apresentam como característica em comum falhas em mecanismos de regulação do sistema imune em relação ao controle do reconhecimento de estruturas próprias por células efetoras, culminando, assim, no ataque contra os próprios tecidos (MSR, 2019). O envolvimento da atividade defeituosa de linfócitos – tanto pela produção de autoanticorpos como mediadores pró-inflamatórios que acabam sendo direcionados para tecidos saudáveis, desencadeando, assim, os sintomas dessas doenças – representa um campo vasto para o desenvolvimento e aplicação de imunoterápicos diversos.

A eliminação de células é um mecanismo natural importante na seleção negativa de linfócitos autorreativos, assim como na remoção de células cronicamente ativadas depois de uma resposta imune a um patógeno, indicando que defeitos nesse mecanismo podem

representar um papel importante no surgimento dessas doenças (EBRAHIMIYAN *et al.*, 2018), sendo, portanto, a busca pela depleção dessas células um caminho terapêutico promissor. Diante disso, o uso de mAbs não só no contexto de neoplasias de linfócitos, vem sendo continuamente avaliado em estudos clínicos também contra doenças como Esclerose Múltipla, Artrite Reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, entre outras (RASTETTER *et al.* 2004).

1.4 CD20 e anti-CD20

CD20 é uma fosfoproteína transmembranar expressa em células pré-B e em células B maduras, não ocorrendo em células-tronco medulares nem em plasmócitos, o que a configura como um alvo ideal no contexto de doenças em que a eliminação de células B se estabelece como uma estratégia terapêutica vantajosa. Dado que células B tumorais tendem a superexpressar a proteína (CARTRON *et al.*, 2004) – desempenhando um provável papel importante para a diferenciação e proliferação dessas células (DU *et al.*, 2007) – mAbs anti-CD20 são utilizados principalmente na terapia de neoplasias de células B, ou seja, linfomas e leucemias linfocíticas, tendo, em geral, seu uso não somente como agente isolado, mas como imunoadjuvante ou em associação à quimioterapia. Adicionalmente, esses biofármacos têm sido cada vez mais aplicados no tratamento de doenças autoimunes, uma vez que suas manifestações sintomáticas decorrem, muitas vezes, diretamente da atividade defeituosa de linfócitos (RASTETTER *et al.* 2004).

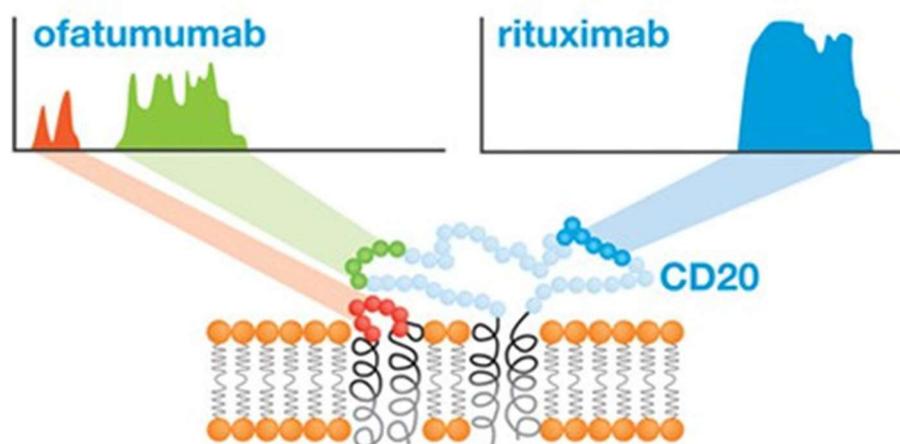
O primeiro e ainda principal mAb anti-CD20, o Rituximabe, foi aprovado pelo órgão regulador americano *Food and Drug Administration* (FDA) em 1997 para ser utilizado no tratamento de Linfomas não-Hodgkin; em seguida, passou a ser utilizado de forma combinada com outros quimioterápicos em casos de Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) CD20⁺ e, mais recentemente, vem sendo aplicado no tratamento de Artrite Reumatoide não responsiva a outras terapias (WOLVERTON; ARLOOK, 2015).

Desde o surgimento do Rituximabe, outros mAbs anti-CD20 foram desenvolvidos com propriedades diferenciadas. O Ofatumumabe (HuMax-CD20™, Genmab; Arzerra™, GSK) foi autorizado em 2009 pelo FDA para o tratamento da LLC. Trata-se de um mAb completamente humano, com alta afinidade, que atua inibindo a ativação de linfócitos B e promovendo a sua depleção. Ele ainda é utilizado principalmente no tratamento de LLC e vem sendo avaliado para Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (EMRR) (MSS, 2019). Tendo o mesmo alvo antigênico do Rituximabe, é aplicado também em casos de Linfomas Não-Hodgkin

recidivantes e em pacientes refratários ou intolerantes ao Rituximabe (GALANINA *et al*, 2017).

O Ofatumumabe apresenta epítipo constituído de resíduos de aminoácidos contidos nas duas alças extracelulares da proteína CD20, estabelecendo, assim, diferenças importantes em relação ao Rituximabe, o qual é o principal mAb utilizado na imunoterapia direcionada contra linfócitos B e cujo epítipo se concentra na alça maior da proteína CD20 (figura 2). Estudos pré-clínicos comparativos com o Rituximabe, demonstraram que o Ofatumumabe tem maior afinidade à proteína CD20 (TEELING *et al.*, 2004) e ativa mais facilmente a via de citotoxicidade por acionamento do complemento (CDC) para destruição das células tumorais (HAMMADI *et al*, 2010; LIN, 2010). Além disso, sua origem é completamente humana, diferentemente do Rituximabe, cuja porção variável é de origem murina, o que pode estar atrelado ao potencial relativo de imunogenicidade e alergenicidade desses biofármacos.

Figura 2 – Rituximabe e Ofatumumabe apresentam diferentes sítios de ligação ao CD20

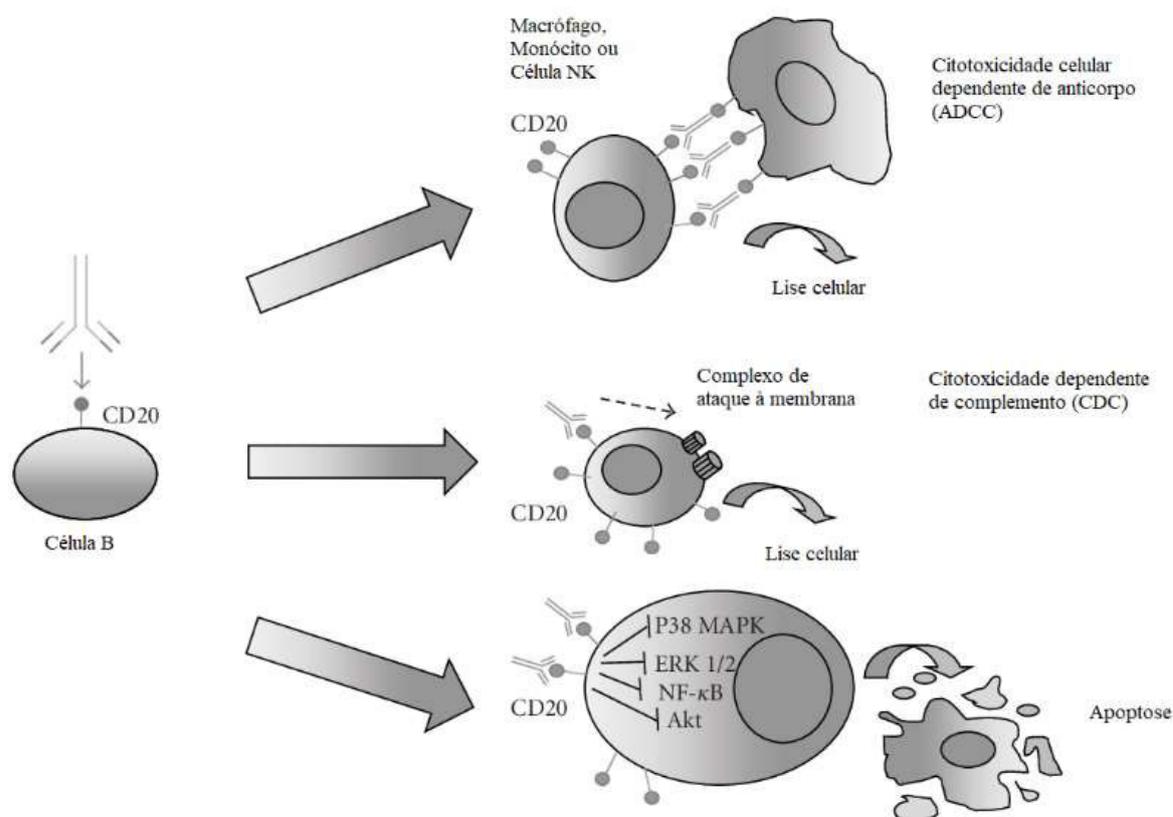


Fonte: PEPSCAN, 2015. Ofatumumabe possui um sítio de ligação descontínuo que envolve a alça menor e a alça maior enquanto Rituximabe se liga a um epítipo contínuo na alça maior.

MABs anti-CD20, como Ofatumumabe, podem auxiliar, portanto, o sistema imunológico do paciente a combater as células cancerosas. No entanto, os mecanismos de depleção celular desencadeados pela ligação dos anticorpos anti-CD20 ao seu alvo são, na realidade, variáveis (ilustrados na figura 3), podendo envolver citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC, do inglês *antibody-dependent cell mediated cytotoxicity*), acionamento de vias de sinalização para apoptose (citotoxicidade direta), ou ainda citotoxicidade por ativação do complemento (CDC, do inglês *complement dependent cytotoxicity*), sendo este último o principal mecanismo atribuído ao Ofatumumabe, o que,

especula-se, pode estar associado ao fato de parte de seu epítipo localizar-se em uma porção muito próxima à membrana da célula B (TEELING *et al.*, 2006, 2004; BEUM *et al.*, 2008), ou seja, na alça extracelular menor da molécula de CD20 (figura 2), favorecendo, assim, a formação de regiões na membrana com alta densidade dos integrantes moleculares envolvidos no complexo necessário para a resposta CDC; mas a via ADCC também é atribuída à atividade do Ofatumumabe (WIERDA *et al.*, 2010).

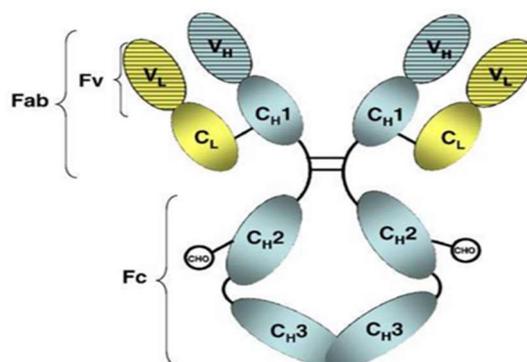
Figura 3 – Principais mecanismos de ação de mAbs anti-CD20 esquematizados



Fonte: adaptado de MOTTA, 2010. Embora os mecanismos de ação *in vivo* tanto do Rituximabe como do Ofatumumabe ainda não sejam completamente compreendidos, as principais vias de eliminação de células B por esses mAbs estão entre citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), e indução direta à apoptose.

O Ofatumumabe é uma molécula IgG1 *kappa*. Anticorpos IgG são bivalentes e estruturalmente apresentam a porção Fc, fragmento cristalizável (do inglês *fragment crystallizable*) – a qual integra a região constante e recruta efetores do sistema imunológico – e a porção Fab, fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *fragment antigen binding*) que contém as regiões variáveis que promovem a interação do anticorpo com o seu antígeno, conferindo propriedades essenciais, como afinidade e especificidade pelo alvo (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática de anticorpo IgG (~150 KDa)



Fonte: adaptado de Weisser e Hall, 2009. Cadeias pesadas em azul, com suas regiões variáveis V_H e cadeias leves em amarelo, com suas regiões variáveis V_L . A ligação com o antígeno se dá pela região Fab, tendo na porção Fv a ligação específica com o antígeno.

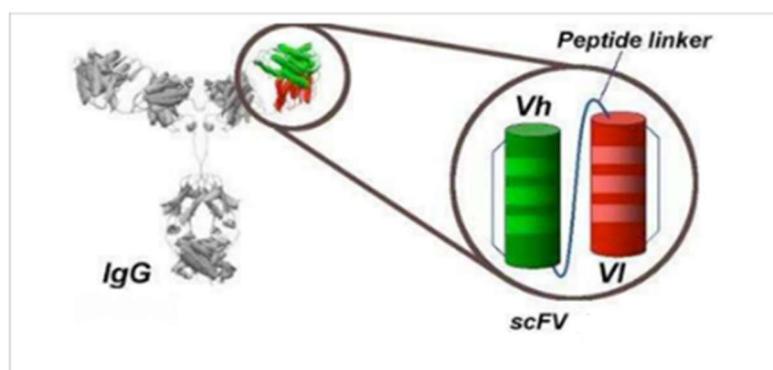
Todos os anticorpos compartilham componentes estruturais básicos. As quatro subunidades das imunoglobulinas, duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, são conectadas entre si por quatro pontes dissulfeto. A combinação entre resíduos de aminoácidos contidos nas cadeias variáveis leve e pesada de cada extremidade da porção Fab gera a região de especificidade de ligação ao antígeno, na qual estão contidas as regiões de determinação de complementaridade (CDR), também chamadas de regiões hipervariáveis, cujas sequências gênicas são determinadas pelo processo de recombinação somática, principal responsável pela geração da enorme variabilidade entre os anticorpos. Cada cadeia variável apresenta três CDR, sendo, portanto, cada parátipo constituído pela combinação de seis CDR. Além de IgG – o tipo de imunoglobulina mais abundante no sangue e envolvido nas respostas adaptativas secundárias – existem outras quatro classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE e IgM), cada uma associada a um tipo diferente de cadeia pesada da molécula. As IgM estão envolvidas nas respostas primárias contra patógenos, IgD são receptores de linfócitos B, IgA são responsáveis pela defesa em mucosas, e IgE estão envolvidas em respostas antiparasitárias e alergias (ABBAS, 2010).

1.5 Fragmento variável de cadeia única (scFv)

Os scFvs (scFv, do inglês *Single-chain Fragment variable*) (figura 5) vêm sendo amplamente utilizados nos estudos de engenharia de proteínas para o desenvolvimento de mAbs melhorados. Há diversas vantagens associadas ao uso desse fragmento, visto que se trata de uma proteína que, além de conservar os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do

anticorpo ao seu antígeno (MAYNARD; GEORGIU, 2000), é menor e menos complexa do que a molécula completa do anticorpo, já que se constitui apenas das porções variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo conectadas por um pequeno *linker* peptídico, podendo, assim, servir tanto a interesses de âmbito farmacocinético estratégicos, quanto à simplificação na obtenção heteróloga em plataformas procariontas.

Figura 5 – Representação esquemática do fragmento scFv (~27kDa)



Fonte: NASCIMENTO, 2009. Em verde tem-se a região variável da cadeia pesada V_H e em vermelho, a região variável da cadeia leve V_L . O polipeptídeo que liga os domínios aparece em azul.

Os scFvs obtidos a partir de anticorpos monoclonais vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos para o tratamento de diversos tipos de câncer, tendo exibido atividade antitumoral significativa em vários casos (LIU *et al.*, 2015). O menor tamanho do scFv confere-lhe maior penetrabilidade nos tecidos, permitindo um maior alcance a tumores sólidos, muitas vezes inacessíveis para mAbs completos (YOKOTA *et al.*, 1992). Outra característica importante associada ao seu tamanho é que os scFvs são mais facilmente eliminados pelo organismo (HOLLIGER; HUDSON, 2005), o que pode ser uma vantagem em aplicações combinadas desses fragmentos acoplados a outras drogas, reduzindo-se o impacto de possíveis efeitos colaterais, mas também representa uma limitação devido ao possível curto período de disponibilidade da molécula no organismo, comprometendo-se, assim, sua ação terapêutica (WHINTROP *et al.*, 2003). Os scFvs podem, ainda, ser conjugados a radioisótopos e a partículas metálicas (ORDIKHANI *et al.*, 2016) ou se ligar a diversas moléculas importantes na terapia contra cânceres, desde RNA de interferência e peptídeos efetores (SAFDARI *et al.*, 2016), a lipossomos carreadores de fármacos (RÜGER *et al.*, 2005), dirigindo-as para uma ação mais restrita ao alvo pretendido, reduzindo-se, assim, efeitos indesejados.

MAbs com maior afinidade por seus alvos tendem a apresentar propriedades terapêuticas superiores, sendo, portanto, potencialmente mais eficientes na capacidade de

geração de seus respectivos mecanismos de depleção celular. A engenharia de anticorpos, por meio de técnicas como mutagênese sítio-dirigida, combinada com o desenho racional – modificações de nucleotídeos na sequência original do gene alvo, a partir de informações de análises *in silico*, baseadas em simulações das condições do ambiente celular e em estruturas depositadas em bancos de dados, visando à obtenção de proteínas com propriedades diferenciadas (BANTA *et al.*, 2013; KARPLUS; MCCAMMON, 2002) – pode se valer inicialmente da utilização de um scFv, que, posteriormente, poderá ser usado como base para a expressão de mAbs completos mais efetivos, menos imunogênicos, ou ainda, para o desenvolvimento de formatos baseados em scFv para uso terapêutico, que possam fornecer melhores resultados, em virtude das vantagens atreladas às próprias características dos pequenos fragmentos, conforme citado anteriormente. Outra abordagem da engenharia de proteínas para a obtenção de moléculas funcionalmente melhoradas é a evolução dirigida, a qual se baseia na geração de diversidade genética pela indução de mutações aleatórias a partir do gene alvo, o que envolve a geração de bibliotecas de mutantes e, em seguida, um método de triagem de acordo com as características buscadas na nova proteína (PACKER; LIU, 2005).

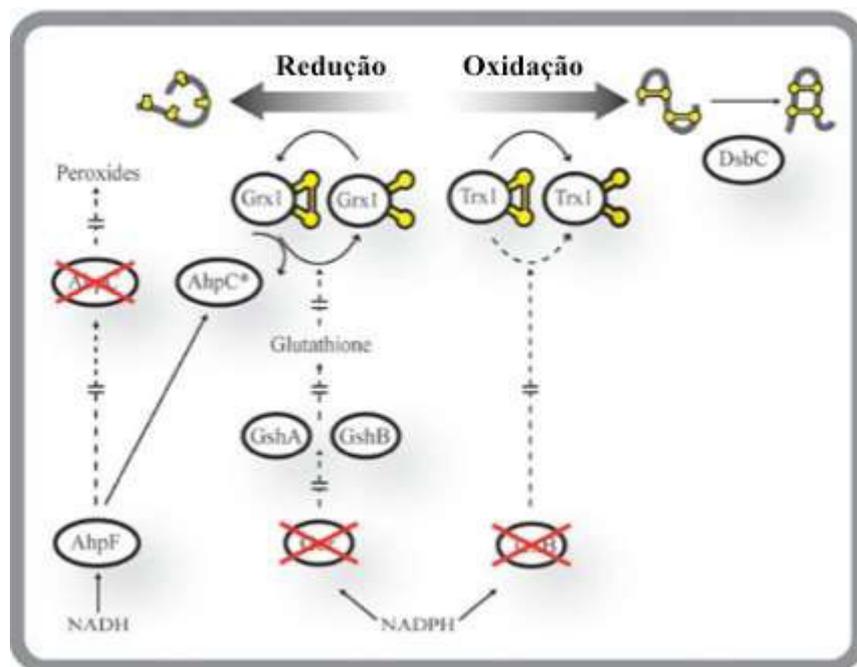
1.6 Justificativa

Apesar de os resíduos de aminoácidos da proteína CD20 envolvidos na ligação do Ofatumumabe serem conhecidos (LIN, 2010; TEELING *et al.*, 2006), a confirmação mais precisa dos resíduos de aminoácidos cruciais do anticorpo para a manutenção de sua atividade – não apenas dentro de suas regiões de determinação de complementaridade (CDR), mas também que sejam essenciais para a estabilidade conformacional, aproximação e suporte à ligação ao seu alvo – ainda é um campo aberto de investigação básica importante para a geração de informação que forneça potenciais alvos de modificações, as quais poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de novas gerações de anticorpos monoclonais terapêuticos com atividade otimizada e, principalmente, que possam ser produzidos nacionalmente e em grande escala. Nesse sentido, é importante ressaltar que tanto Rituximabe quanto Ofatumumabe precisam ser importados pelo Brasil, sendo que apenas o primeiro é distribuído gratuitamente pelo SUS, contribuindo para os enormes gastos despendidos anualmente com medicamentos pelo Governo Brasileiro.

Como um passo inicial para futuros ensaios, este trabalho visou à expressão heteróloga, em sistema procarioto, da região variável do Ofatumumabe, no formato scFv. O

grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas da Fiocruz-CE vem trabalhando no sentido de padronizar a expressão de diferentes scFvs, testando diversos vetores e linhagens de *Escherichia coli*. No âmbito desses ensaios, detectaram-se alguns desafios, principalmente associados a dificuldades na recuperação da proteína a partir do periplasma bacteriano e baixos rendimentos de scFv na forma solúvel, ficando a maior parte expressa em agregados, denominados corpos de inclusão. Essa insolubilidade é possivelmente decorrente de um enovelamento incorreto do scFv quando expresso no sistema procarioto, devido, sobretudo, à ausência de maquinarias de modificações pós-traducionais, necessárias para essas proteínas, e ambiente citoplasmático fortemente redutor nesses organismos. Dessa forma, optou-se, neste trabalho, pela utilização da cepa *E.coli* SHuffle T7 *express*, a qual é engenheirada para promover a formação de pontes dissulfeto de proteínas expressas no citoplasma, apresentando um ambiente citoplasmático mais propício para a obtenção de proteínas heterólogas mais complexas. SHuffle é uma cepa comercial que foi obtida a partir do nocaute de genes (*trxB* e *gor*) envolvidos nas vias da tiorredoxina e da glutarredoxina (figura 6), responsáveis pela manutenção do forte potencial redutor do citoplasma bacteriano. A simples supressão dessas vias impediria a sobrevivência da bactéria pela impossibilidade de restauração de formas ativas (reduzidas) de enzimas essenciais para o crescimento da célula, como a ribonucleotídeo redutase (GON *et al.*, 2006), no entanto, a ocorrência de desvios metabólicos que favorecem a produção da redutase AhpC*, proveniente de uma peroxidase que sofreu mutação, permite que a célula tenha um potencial de redução suficiente para a manutenção de funções essenciais para sua sobrevivência (REN *et al.*, 2016). Além disso, a cepa SHuffle superexpressa a proteína DsbC, uma chaperona que propicia a formação adequada de pontes dissulfeto no ambiente citoplasmático (LOBSTEIN *et al.*, 2012).

Figura 6 – Modificações metabólicas da cepa de *E. coli* SHuffle



Fonte: adaptado de REN *et al.*, 2016. Intermediários cortados em vermelho representam as vias suprimidas (tracejadas) do genoma da SHuffle. A superexpressão de DsbC facilita a formação de pontes dissulfeto no ambiente citoplasmático.

Para otimizar a produção do scFv recombinante na fração solúvel, utilizou-se, neste trabalho, o vetor plasmidial pET-SUMO, o qual adiciona à porção N-terminal da proteína expressa uma SUMO-tag, que, além de aumentar as chances de ocorrência de um dobramento mais adequado, promove, sobretudo, uma maior solubilidade para o complexo proteico almejado, uma vez que a presença da cauda SUMO determina a necessidade de uma tradução mais lenta por parte da maquinaria bacteriana. O vetor pET-SUMO dispõe de gene de resistência à canamicina como marcador de seleção e do promotor T7 no controle da transcrição do complexo de interesse. O promotor T7 só é reconhecido pela RNA polimerase T7 (originalmente proveniente do fago T7), a qual é aproximadamente 20 vezes mais ativa que a RNA polimerase bacteriana (STUDIER *et al.*, 1990). O gene da RNA polimerase T7 deve estar codificado separadamente no DNA genômico da bactéria hospedeira (cepa de expressão) sob o controle do promotor *lac*. O operador *lac* também está acoplado ao promotor T7 no vetor, o que faz com que apenas na presença do indutor seja possível tanto a expressão da RNA polimerase T7 como também a liberação do repressor *lac* da região operadora no vetor de expressão, reduzindo-se, assim, drasticamente, os níveis de expressão basal do complexo de interesse sem a presença do indutor. Com a presença do operador *lac* no plasmídeo, a expressão basal da RNA

polimerase T7 não é suficiente para que ocorra, concomitantemente, uma significativa expressão basal do gene de interesse (DUBENDORFF; STUDIER, 1991).

Além disso, a proteína, nesse caso, não é enviada para o periplasma, o que, embora, a princípio, tenderia a ser visto como uma vantagem que potencialmente otimizaria o rendimento, gera, no entanto, dificuldades associadas à sua recuperação a partir desse compartimento, uma vez que a lise parcial das células bacterianas mostrou-se um desafio em testes anteriores, nos quais foram utilizados vetores com essa característica de endereçamento periplasmático.

Com a finalidade de aplicar-se o scFv do Ofatumumabe como referencial em futuros ensaios que visem à geração de mutantes – tanto para investigação e determinação dos resíduos de aminoácidos chave envolvidos no parátipo deste mAb, bem como para o desenvolvimento de novos anticorpos anti-CD20 que apresentem eficiência otimizada – buscou-se, neste trabalho, expressá-lo em sistema heterólogo e padronizar um ensaio para verificação de sua capacidade de ligação ao seu antígeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Obter o scFv do Ofatumumabe por sistema procarioto de expressão e avaliar sua capacidade de ligação ao antígeno CD20.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene do scFv do Ofatumumabe no vetor de expressão;
- Transformar as linhagens de clonagem e expressão com o vetor construído;
- Expressar o scFv do Ofatumumabe em sistema heterólogo;
- Purificar o scFv por cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado;
- Avaliar por imunoenaios a capacidade de ligação do scFv ao antígeno CD20.

3. MATERIAIS

3.1 Obtenção dos materiais

O gene do scFv do Ofatumumabe utilizado neste trabalho foi obtido comercialmente através da empresa FastBio Ltda. O gene foi sintetizado e disponibilizado em vetor de clonagem pUC-57, o qual foi utilizado como fonte do inserto transferido para o vetor pET-SUMO. A sequência dos 243 resíduos de aminoácidos codificados pelo gene (na orientação Vh-linker-VI) está mostrada abaixo, sendo o *linker* indicado em vermelho.

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWN
 SGSIGYADSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGM
 DVWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ
 SVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA
 VYYCQQRSNWPITFGQGRLEIK

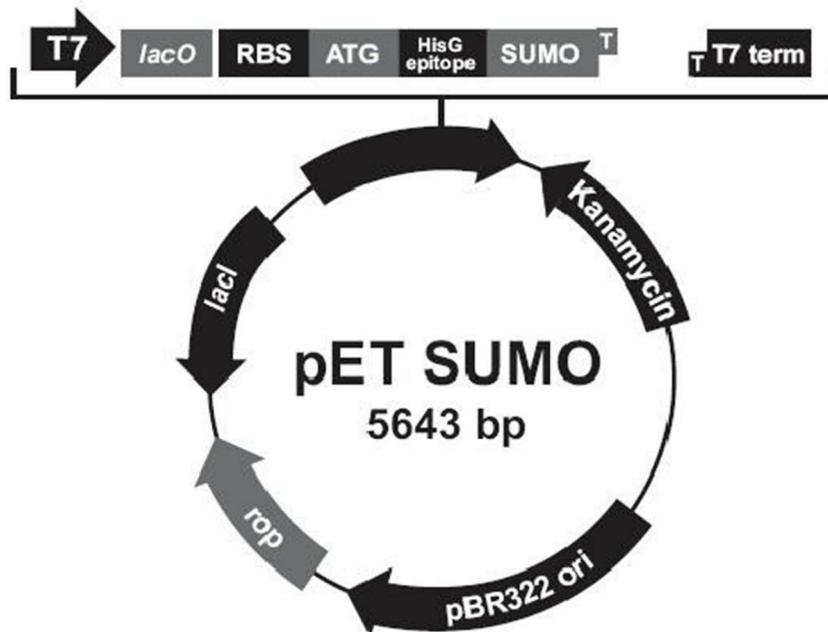
A linhagem de *Escherichia coli* SHuffle foi obtida comercialmente junto à empresa New England Biolabs. O vetor plasmidial pET-SUMO e pET28a-ulp1 (que codifica a SUMO-protease) foram gentilmente cedidos pelo pesquisador Carlos Paier, da Universidade Estadual de Campinas. A linhagem de *E. coli* Rosetta (utilizada para expressão da SUMO-protease, Ulp1) foi cedida pelo professor Richard John Ward, da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto. A linhagem de *E. coli* Top10 foi cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza (Unifor) (Certificado de Qualidade em Biossegurança 0294/10, responsável técnico Kaio César Simiano Tavares), no qual todos os experimentos deste projeto foram realizados. As linhagens de células humanas Raji foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e as linhagens K562-WT e K562-CD20⁺ foram doadas pelo INCA.

3.2 Vetor de expressão

O vetor pET-SUMO (figura 7) possibilita a expressão da proteína de interesse como proteína de fusão, acrescentando em sua extremidade N-terminal a proteína denominada pequeno modificador ubiquitina-símile (SUMO, do inglês, *small ubiquitin-like modifier*),

cuja função é permitir altos níveis de expressão de proteínas recombinantes, com maior probabilidade de terem um enovelamento adequado e de permanecerem solúveis

Figura 7 – Modelo do vetor pET-SUMO



Fonte: Invitrogen. Mapa esquemático do vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen).

3.3 Cepas de *E. coli*

A cepa *E. coli* Top10 foi utilizada nas etapas de clonagem gênica. Ela fornece alta eficiência de transformação, permitindo uma replicação estável de um grande número de cópias de plasmídeos. A cepa *E. coli* Rosetta foi utilizada como célula hospedeira para a expressão da SUMO protease. Ela é derivada da BL21 e é bastante usada para otimizar a expressão de proteínas eucarióticas codificadas por códons raramente utilizados por bactérias, ela é suplementada com RNA transportadores para 6 códons raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) presentes em um plasmídeo que apresenta gene de resistência a cloranfenicol como marcador de seleção. A cepa *E. coli* SHuffle T7 *express* foi aplicada como célula de expressão do scFv do Ofatumumabe. Ela apresenta modificações que favorecem a formação de pontes dissulfeto no ambiente citoplasmático bacteriano e aumentam a probabilidade de ocorrência de um enovelamento adequado para a proteína recombinante.

3.4 Linhagens de células humanas

As células Raji representam uma linhagem estabelecida na década de 1960 a partir de células de linfoma de Burkitt. Por tratarem-se de linfócitos B, expressam naturalmente a fosfoproteína transmembranar CD20, alvo molecular do mAb Ofatumumabe. As células K562-WT e K562CD20⁺ são, respectivamente, a linhagem selvagem (WT, do inglês *wild type*) – obtida a partir de células de leucemia mieloide humana – e uma linhagem modificada geneticamente dessas células para expressar a proteína CD20. As três linhagens são células que crescem em suspensão e foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 0,45% de glicose, 1 mM de piruvato de sódio, 0,15% de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) previamente inativado, e 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina. Essas células foram aplicadas nos ensaios de avaliação da capacidade de ligação do scFv obtido ao seu antígeno.

3.5 Proteína L-HRP

A proteína L conjugada à peroxidase HRP (do inglês *horseradish peroxidase*) (Pierce) foi utilizada nos ensaios de *Western blot* e ELISA. A proteína L é uma proteína recombinante obtida comercialmente, originalmente derivada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, que se liga à cadeia leve κ das imunoglobulinas, sem interferir no sítio de ligação ao antígeno. A proteína L também é capaz de se ligar aos fragmentos de anticorpos do tipo scFv e Fab, uma vez que eles mantêm pelo menos parte da cadeia leve. Desse modo, a proteína L pode ser aplicada em imunoenaios para a detecção da ocorrência de tais proteínas.

4 MÉTODOS

4.1 Clonagem do gene do scFv em pET-SUMO

4.1.1 Amplificação do inserto

O gene do scFv do Ofatumumabe foi amplificado por PCR utilizando-se como *template* o plasmídeo comercial pUC57 contendo o gene do scFv. Para a reação utilizaram-se *primers* específicos para a sequência do gene, desenhados de modo a acrescentarem às extremidades do *amplicon* sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (em vermelho nas sequências abaixo):

OFA-sumo-*forward* (5'-ATCGGATCCGAGGTGCAGCTGGTTGAAAG-3')

OFA-sumo-*reverse* (5'-GCGAAGCTTTTATTTAATCTCCAGACGGGTGC-3')

Foi preparada uma reação contendo 10 µL do tampão da enzima *Go Taq*, 1 µL de cada *primer*, 4 µL do mix de dNTPs, 1 µL (10 U) da enzima *Go Taq* (Promega®), 0,5 µL do *template* e 32,5 µL de água ultrapura livre de DNase. Um controle negativo para a reação foi preparado com a substituição do *template* por 0,5 µL de água ultrapura. O termociclador (*Whatman Biometra® T1 Thermocycler*) foi programado para execução de ciclos compreendidos por 5 etapas: 1) 95 °C por 2 minutos; 2) 95 °C por 30 segundos; 3) 52 °C por 1 minuto; 4) 72 °C por 5 minutos; 5) 72 °C por 5 minutos. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 29 vezes, resultando em 30 ciclos. O produto de PCR foi, na sequência, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0% e purificado através do *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System*, conforme instruções do fabricante.

4.1.2 Reações de digestão

Duas reações de digestão utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI (Promega®) e *Hind*III (Promega®) foram preparadas para o produto de PCR e para o vetor pET-SUMO, de modo que ambos adquirissem extremidades coesivas complementares. Cada reação foi separadamente preparada em tubos de 1,5 mL para um volume final de 20 µL, contendo 2 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 10X; 2 µL do tampão E da enzima (Promega®); 1 µL (10 U) de cada enzima de restrição; e aproximadamente 1 µg de DNA em cada reação, respectivamente, produto de PCR purificado e solução do plasmídeo pET-SUMO – ambos

quantificados em aparelho *NanoDrop 2000* (ThermoScientific®) – ajustando-se com água ultrapura o volume necessário para completar 20 µL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 3 horas em banho seco e, em seguida, as enzimas foram inativadas a 65 °C por 15 minutos.

A fim de evitar-se uma auto-ligação do DNA plasmidial, o vetor pET-SUMO digerido foi então incubado por 1 h com a enzima fosfatase alcalina SAP (Promega®) (10 U da enzima, 2 µL de tampão 10X, e todo o produto da digestão), que foi inativada a 74 °C por 10 minutos. O produto foi, em seguida, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%. A banda correspondente ao plasmídeo linearizado foi excisada do gel, quantificada e purificada através do *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega®), conforme instruções do fabricante. O volume obtido após a purificação foi concentrado por evaporação em banho seco, quantificado e utilizado para a reação de ligação.

4.1.3 Reação de ligação

A reação de ligação do scFv ao vetor pET-SUMO foi preparada em tubos de 1,5 mL para um volume final de 20 µL, contendo aproximadamente 100 ng de plasmídeo; 65 ng de inserto; 2 µL de tampão 10X da enzima *T4 DNA ligase*; 1 µL (1 U) da enzima *T4 DNA ligase* (Promega®) e o volume ajustado com água ultrapura para completar 20 µL. Um controle negativo foi preparado pela adição de água em vez de inserto. Os tubos foram incubados *overnight* a 4 °C. Na sequência, a reação foi interrompida pela incubação dos tubos a 70 °C por 10 minutos. A razão molar inserto/vetor aplicada foi de 5:1. O cálculo para obtenção da quantidade de inserto a ser utilizada na reação de ligação é dado pela seguinte fórmula, sugerida pelo fabricante:

$$[(\text{ng de vetor} \times \text{kb do inserto}) \div \text{kb do vetor}] \times \text{razão molar inserto/vetor} = \text{ng de inserto}$$

4.1.4 Transformação de *E. coli* TOP10

O produto da reação de ligação foi utilizado para a transformação por choque térmico de células quimiocompetentes da cepa de *E. coli* TOP10 a fim de que ela recebesse o plasmídeo contendo o gene de interesse (pET-SUMO-scFv-OFA) e, conseqüentemente, multiplicá-lo ao longo de suas gerações clonais. Nesse contexto, culturas estoque de 100 µL da cepa quimiocompetente foram descongeladas em banho de gelo e, em tubos de 1,5 mL,

adicionaram-se às culturas 5 µL do produto de ligação. O experimento foi feito em duplicata e como controle negativo da transformação foi utilizado o controle negativo da reação de ligação (em que água foi adicionada em vez de inserto). Os tubos permaneceram 30 minutos no gelo, seguidos de 1 minuto em banho seco a 42 °C e 2 minutos em gelo novamente para que o choque térmico fosse efetuado. Na sequência, adicionaram-se às células 900 µL de meio LB para etapa de regeneração, em que os tubos foram submetidos à agitação de 200 rpm em agitador orbital (Marconi MA-420), a 37 °C por 1 h. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 10000 \times g por 3 minutos, 950 µL do sobrenadante foram descartados, e o *pellet* obtido foi ressuspenso nos aproximadamente 50 µL de meio restantes, sendo, em seguida, aplicados sobre 10 mL de meio LB-ágar seletivo (canamicina 40 µg/mL) em placas de Petri, as quais foram posteriormente incubadas *overnight* a 37 °C em estufa bacteriológica.

4.1.5 PCR de colônias

Para confirmação da presença do plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse, realizou-se PCR a partir da seleção de 9 colônias crescidas isoladamente nas placas em meio contendo canamicina após o protocolo de transformação. O procedimento foi feito a partir da coleta por raspagem, através da ponta de uma ponteira estéril, de parte de cada colônia selecionada, a qual foi, em seguida, submersa em tubo de 0,2 mL contendo 22,5 µL de *Master Mix* (QuatroG) (tampão Tris-HCl pH 8,5 + dNTP's + MgCl₂ + KCl + *Taq* DNA polimerase); 1 µL de *primer T7pro* e 1 µL de *primer T7ter* (ambos a uma concentração final de 0,2 mM) e 0,5 µL de água ultrapura e livre de DNase. Uma reação de controle positivo foi feita utilizando-se como molde um vetor pET28a contendo o gene de outro scFv estudado pelo grupo (inserto de aproximadamente 748 pb, assim como o do gene de interesse) previamente produzido, e uma reação em que apenas a ponteira estéril sem a presença de DNA foi utilizada como branco.

Os parâmetros programados no termociclador (*Whatman Biometra® T1 Thermocycler*) foram: 1) 95 °C por 3 minutos, 2) 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 3) 55 °C por 30 segundos (anelamento), 4) 72 °C por 30 segundos (extensão) e 5) 72 °C por 10 minutos. As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 29 vezes, efetuando-se 30 ciclos no total.

Os produtos de PCR foram diluídos em tampão de amostra para análise após corrida eletroforética em gel de agarose 1,0%.

A parte que restou na placa de 3 colônias selecionadas, dentre aquelas que se mostraram positivas pela PCR, foi, separadamente, inoculada em 5 mL de meio LB adicionado de canamicina (40 µg/mL) e incubada a 37 °C em agitador orbital a 200 rpm por 16 h. Na

sequência, as 3 culturas bacterianas obtidas foram submetidas a um protocolo de extração e purificação de seu DNA plasmidial através do *Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems* (Promega®), conforme estabelecido pelo fabricante.

4.1.6 Teste de digestão e envio das amostras para sequenciamento

Na busca por evidências adicionais da presença do inserto no plasmídeo extraído e purificado das colônias selecionadas, submeteu-se uma pequena quantidade de cada amostra de DNA obtido (300 ng de cada amostra) a uma reação com as enzimas *BamHI* e *HindIII* (0,5 µL de cada uma delas), tampão E e BSA 10X, incubadas por 1 h a 37 °C com a finalidade de se avaliar, após eletroforese em gel de agarose 1,0%, a ocorrência das respectivas bandas correspondentes tanto ao vetor parcialmente digerido como um pouco do inserto liberado pela ação das enzimas de restrição.

10 µL das amostras obtidas das 3 colônias selecionadas na concentração de 60 ng/µL foram preparadas e enviadas para sequenciamento na unidade da Fiocruz de Pernambuco, onde, por método de Sanger e pelo uso de *primers T7pro* e *T7ter*, sequenciaram-se as amostras. A qualidade do sequenciamento e os resultados foram analisados através do *software Bioedit*, em que alinhamentos globais entre as sequências geradas e a sequência original do scFv do Ofatumumabe foram realizados pela ferramenta *Clustal W* para verificação da presença da sequência do gene de interesse.

4.2 Obtenção de células de *E. coli* quimiocompetentes para transformação

As linhagens utilizadas foram submetidas a um protocolo para aquisição de quimiocompetência. A partir da inoculação de colônias isoladas previamente obtidas em placas de Petri por esgotamento, cultivaram-se as células em 5 mL de meio LB na ausência de antibióticos, para as cepas Top10 e SHuffle, e suplementado com cloranfenicol (34 µg/mL) para a cepa Rosetta. Após crescimento *overnight* a 37 °C, 1 mL de cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB, incubado a 37 °C sob agitação de 200 rpm, até atingir-se a densidade ótica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,4 – 0,6. O espectrofotômetro foi zerado com meio LB sem células e a D.O.₆₀₀ das culturas foi acompanhada periodicamente. Após atingir-se a D.O. pretendida, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se as células cuidadosamente em 40 mL de MgCl₂ (0,1 M). Em seguida,

realizou-se nova centrifugação a 4 °C por 10 minutos a 3000 x g, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o *pellet* em 2 mL de CaCl₂ (0,1 M). As células foram, então, deixadas por 20 minutos no gelo e, na sequência, adicionou-se a elas 1 mL de glicerol 50%. As amostras foram divididas em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL previamente mantidos em gelo, seguindo para armazenamento a -80 °C.

4.3 Transformação das cepas de expressão *E. coli* SHuffle e Rosetta

As transformações das cepas de expressão SHuffle e Rosetta foram realizadas pelo método de choque térmico seguindo protocolo semelhante ao apresentado na seção 4.1.4 a partir de células quimiocompetentes previamente obtidas. No entanto, no contexto dessas células, a cada tubo adicionaram-se 10 µL de MgCl₂ (0,1 M) e 5 µL de CaCl (0,1 M), 1 µL de DNA (vetor plasmidial contendo o gene de interesse, ou seja, respectivamente, pET-SUMO-scFvOFA e pET28a-ulp1), completando-se com água estéril para um volume final de 50 µL. A este volume adicionaram-se 50 µL das respectivas células competentes que estavam armazenadas a -80 °C, sendo os tubos mantidos em gelo por 20 minutos, seguidos de 15 minutos a 37 °C em banho seco e 2 minutos em gelo novamente. Cada experimento foi feito em duplicata e os controles negativos foram estabelecidos pela adição de água estéril em substituição ao DNA. Na sequência, adicionaram-se às células 900 µL de meio LB e seguiu-se protocolo de regeneração. As células foram plaqueadas em 10 mL de meio LB-ágar adicionado de canamicina (40 µg/mL) (SHuffle), e cloranfenicol (34 µg/mL) + canamicina (40 µg/mL) (Rosetta).

4.4 Eletroforese em gel de agarose e de poliacrilamida

Prepararam-se géis de agarose 1% (1 g de agarose em 100 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA pH 8) para as corridas eletroforéticas de separação e avaliação de DNA. A tensão aplicada em cada corrida foi de 100 V. Em tubos de 0,5 mL, prepararam-se as amostras, para cada volume final desejado, a serem aplicadas no gel, pela adição de tampão de amostra 5X (Loading Dye + GelRedTM) aos produtos de digestão, PCR, extração e purificação. Em cada corrida, utilizaram-se 7 µL de solução de marcadores de pesos moleculares de 1 Kb (DNA ladder Promega®).

Para as eletroforeses em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizados na separação e análise da expressão do scFv e da ULP1, bem como no contexto da avaliação da

capacidade de ligação, como etapa prévia para o *Western blot*, preparou-se, em cada caso, gel de poliacrilamida 12% (desnaturante e redutor), e a tensão aplicada nas corridas eletroforéticas foi de 100 V. O gel é composto por duas partes: o gel de corrida – contendo 12% de acrilamida – e o gel de empilhamento – contendo 3,6% de acrilamida. Tendo sido respectivamente preparados conforme as quantidades a seguir. Gel principal: 3,150 mL de água; 2,1 mL de bisacrilamida 40%, 1,75 mL de tampão Tris-HCl 4X (contendo SDS e pH 8,8) e 80 µL de uma mistura com TEMED e APS 10%. Para o gel de empilhamento, utilizou-se: 2,17 mL de água, 0,33 mL de bisacrilamida 40%, 0,83 mL de tampão Tris-HCl 4X (contendo SDS e pH 6,6) e 100 µL de mistura com TEMED e APS 10%. Cada amostra foi adicionada de tampão 5X concentrado (contendo glicerol, β-mercaptoetanol e azul de Coomassie) em tubos de 1,5 mL, aquecida por 10 minutos a 100 °C. 7 µL de solução de marcadores de pesos moleculares (TrueColor High Range P M Sinapse) foram aplicados em cada corrida.

4.5 Expressão heteróloga do scFv do Ofatumumabe e da SUMO-protease

Para expressão do scFv, 250 mL de LB suplementado com canamicina (40 µg/mL) e 1% v/v de MgCl₂ (0,1 M) foram inoculados com 5 mL de cultura de *E. coli* SHuffle (pré-inóculo) transformada com vetor pET-SUMO-scFv. Essa cultura foi incubada em agitador orbital a 37 °C e 200 rpm, acompanhando-se o crescimento bacteriano por meio da medição da D.O.₆₀₀ em intervalos de tempo determinados, até atingir-se uma D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. Após a D.O. ser atingida, isopropil-β-D-tiogalactopiranosose (IPTG) 0,3 mM (concentração final) foi adicionado como indutor da expressão, que seguiu para agitador orbital a 22 °C, 180 rpm, por 16 h. Adicionalmente, testou-se a indução a partir de D.O.₆₀₀ de 0,8 e IPTG 0,1 mM (concentração final). Após as 16 horas, o meio foi dividido em 5 tubos de 50 mL, que foram centrifugados a 4000 x g, por 30 minutos, a 4 °C; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* armazenado a -20 °C. Os *pellets* armazenados foram ressuspensos em 15 mL de tampão de lise (tampão de equilíbrio utilizado na cromatografia descrita a seguir), acrescido de 1% v/v de Triton X-100 e do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF) na concentração final de 1 mM. A amostra foi, então, sonicada em banho de gelo, ao longo de aproximadamente 10 ciclos compreendidos pela alternância entre 20 segundos de sonicação a uma amplitude de 30% e 40 segundos de intervalo. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 10000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. Adicionalmente, 1 mL do sonicado foi reservado em microtubo para ser submetido às mesmas condições de centrifugação, a fim de

que tanto o sobrenadante como o precipitado (ressuspendido no mesmo volume de tampão de lise) fossem, posteriormente, analisados por SDS-PAGE.

A SUMO-protease (ULP1) foi obtida a partir do plasmídeo pET28a-ulp1 e usado para transformação da cepa de *E. coli* Rosetta. Sua expressão foi realizada pelo cultivo das células transformadas em meio contendo os antibióticos canamicina (40 µg/mL) e cloranfenicol (36 µg/mL), indução com IPTG 0,5 mM (concentração final), a partir de D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6, a 30°C por 4 h. Sua recuperação e avaliação foram realizadas de forma semelhante aos passos descritos acima para o scFv.

4.6 Purificação proteica por cromatografia de afinidade

A purificação do scFv do Ofatumumabe ligado à cauda SUMO (scFvOFA-SUMO) foi realizada manualmente por meio de cromatografia de afinidade em matriz de sílica contendo níquel imobilizado, o qual é capaz de interagir com o anel imidazólico dos resíduos constituintes da cauda de 6 histidinas (*His-tag*) contidas no complexo expresso *His-tag*-SUMO-N-terminal do scFv. Utilizou-se tampão Fosfato-NaCl (Fosfato 100 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0), contendo diferentes concentrações de imidazol (lise/equilíbrio: 10 mM; lavagem: 50 mM; eluição: 300 mM). O volume de sobrenadante obtido após sonicação foi incubado juntamente com 1 mL (para uma expressão em 250 mL de LB) da coluna *His-Link* (Promega®) previamente equilibrada com tampão de lise (mesmo tampão de equilíbrio da cromatografia) em Erlenmeyer estéril, sob agitação e em banho de gelo. Após 1 h de incubação, o material foi transferido para o tubo suporte e a cromatografia foi realizada por gravidade, a um fluxo de aproximadamente 1 mL/minuto. A coluna cromatográfica foi lavada progressivamente com tampão Fosfato-NaCl contendo 10 e 50 mM de imidazol, para remoção de proteínas não ligadas e de proteínas ligadas de forma inespecífica à coluna cromatográfica. A eluição da proteína alvo foi feita com 300 mM de imidazol. Em espectrofotômetro, acompanharam-se as alterações na absorbância (a 280 nm) até se estabelecer a linha de base (ausência de proteínas) em cada fração como critério para a troca de tampões e finalização da eluição. Das frações coletadas e armazenadas a 4 °C, alíquotas foram então preparadas para análise por SDS-PAGE 12%. Após a corrida, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue G-250 sob agitação por algumas horas e, posteriormente, descorado com solução de ácido acético, etanol e água (na proporção v/v de 10:30:60). O conteúdo de imidazol presente nas frações de scFvOFA-SUMO foi removido e as amostras foram concentradas em tampão Fosfato-NaCl a partir da utilização de

tubos de concentração com membrana de 10 KDa. A quantificação do conteúdo proteico obtido no volume final foi realizada através de fluorímetro de *Qubit*[®] (Thermo Fischer Scientific[®]), conforme especificações do fabricante.

4.7 Clivagem da cauda SUMO

Para que se possa submeter o scFv a diversos ensaios biológicos, pode ser essencial para a acurácia dos resultados a remoção da cauda SUMO do complexo obtido. A clivagem da SUMO do complexo expresso e purificado (scFvOFA-SUMO) é catalizada pela enzima ULP1 Sumo-protease, cuja reação foi preparada na proporção de 1:15 (massa de ULP1 : massa de scFvOFA-SUMO), a 4 °C, por 16 h. Após a reação de clivagem da cauda SUMO, um novo passo cromatográfico foi necessário. Equilibrou-se o conteúdo reacional sem imidazol com 1 mL de coluna *His-Link* por 1 h em banho de gelo e, na sequência, realizou-se uma nova cromatografia de afinidade, na qual a fração não retida na coluna representa, dessa vez, a parte que contém o scFv, enquanto a cauda SUMO clivada permanece presa à coluna por meio da cauda de histidinas a ela associada, sendo, portanto, eluída com 300 mM de imidazol e também coletada para avaliação da digestão. Após a purificação, as frações foram analisadas por SDS-PAGE 12%, de acordo com o procedimento anteriormente citado. A fração contendo o scFv do Ofatumumbe foi, então, concentrada, novamente quantificado pelo *kit* do fluorímetro de *Qubit*[®], e alíquotas foram armazenadas a -80 °C.

4.8 Western blot

Foi realizado um ensaio de *Western blot*, a fim de se atestar por imunodeteção a presença do scFv (com e sem a cauda SUMO) nas bandas a ele atribuída no gel de poliacrilamida após a corrida eletroforética. Rituximabe comercial (MabThera[®]) e o scFv do Rituximabe (produzido anteriormente pelo nosso grupo) foram utilizados como controles positivos. Aplicou-se 1 µg de cada amostra proteica em um gel de poliacrilamida 12%, realizando-se uma eletroforese em condições desnaturantes e redutoras na tensão de 100 V. Após a corrida, foi feita a transferência dessas proteínas para membrana de nitrocelulose (Amersham[™]) por 2 h a 100 V, em aparato Biorad[®] em banho de gelo. A membrana foi corada com Ponceau para confirmar a transferência das proteínas e, em seguida, lavada com PBS-T (PBS + 0,1% v/v Tween 20). A membrana foi, então, bloqueada com 5% de leite bovino

desnatado diluído em PBS-T, por 16 h, a 4 °C. Em seguida, após 3 lavagens de 10 minutos cada, sob agitação e à temperatura ambiente, incubou-se a membrana com proteína L conjugada à peroxidase HRP, na proporção 1:5000 (v/v), diluída em PBS-T, por 1 h sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, após 3 lavagens com intervalos entre elas de 10 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente, retirou-se o excesso do conjugado L-HRP e a membrana seguiu para revelação por quimioluminescência, segundo protocolo do fabricante (GE Healthcare Amersham ECL™) ou por adição de substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), segundo protocolo do fabricante (Novex® Invitrogen).

4.9 Citometria de fluxo das linhagens de células humanas K562

Como etapa prévia importante para a validação dos ensaios de avaliação da capacidade de ligação realizados neste e em outros estudos, as linhagens K562 aplicadas foram avaliadas por nosso grupo através de citometria de fluxo, com o intuito de se atestar a presença da molécula de CD20 na membrana das células utilizadas como portadoras do antígeno do scFv testado no presente trabalho, bem como de se evidenciar a ausência de tal alvo nas células da linhagem selvagem, utilizada como controle negativo. Após estimativa da concentração de células em cultivo através do método de contagem por amostragem em câmara de Neubauer, estabeleceu-se a quantidade de aproximadamente 5×10^5 células para serem, após lavagem com PBS para remoção do meio, incubadas com um anticorpo comercial anti-CD20 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), fluorocromo que emite fluorescência verde a 525 nm ao ser excitado por um laser a 488 nm. Em seguida, os *pellets* foram lavados com PBS para remoção das proteínas que não se ligaram, ressuspensos em tampão FACS (PBS + 4% SFB) e aplicados no citômetro. No mesmo contexto, uma linhagem adicional de K562 modificada para expressar a proteína CD19 – um outro alvo de interesse, específico de linfócitos B, aplicado em muitas estratégias imunoterápicas recentes e também estudado pelo nosso grupo – foi analisada em conjunto, tendo sido usado, por isso, adicionalmente, um anticorpo comercial anti-CD19 marcado com o fluorocromo ficoeritrina (PE), o qual emite fluorescência a 578 nm, ao ser excitado pelo laser a 488 nm. Todos os resultados foram analisados através do *software FlowJo*.

Dentro do citômetro, as células em suspensão em tampão salino são individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida. À medida que o fluxo é interceptado por um feixe de luz, proveniente de um laser, ocorre a dispersão do feixe em várias

direções, o que é determinado por diversas características intrínsecas de cada célula (tamanho, estrutura interna, morfologia e densidade ótica), podendo também ser detectada a fluorescência emitida por marcadores aplicados em tratamentos prévios, classificando-se, assim, cada célula como um evento (BROWN; WITTEWER, 2000). As células individuais são então agrupadas diferencialmente dentro das populações analisadas. Ao se estabelecer o controle negativo, esta população é utilizada como referencial a partir do qual as outras populações são comparadas por análise gráfica da dispersão entre elas. A detecção do desvio frontal do feixe que intercepta a partícula está associada ao tamanho da célula, o que se dá por dispersão linear (FSC, *forward scatter*), enquanto a detecção de desvios ortogonais está relacionada à complexidade da célula, principalmente sua granulosidade, que é determinada pela dispersão lateral (SSC, *side scatter*) (SHAPIRO, 1995).

4.10 Ensaios de avaliação da capacidade de ligação do scFv ao antígeno

4.10.1 Incubação de células com o scFv

A fim de se analisar qualitativamente a retenção da capacidade do scFv obtido de reconhecer seu alvo (proteína CD20) e a ele se ligar, realizaram-se testes de incubação do scFv do Ofatumumabe (sem e com a cauda SUMO) junto às linhagens celulares que expressam a proteína CD20 em suas membranas (Raji e K562-CD20⁺) assim como à linhagem que não expressa o antígeno em questão (K562-WT), que foi usada, portanto, como controle negativo. De cada uma das linhagens utilizadas, após estimação da concentração de células em cultivo através do método de contagem por amostragem em câmara de Neubauer, estabeleceu-se a quantidade de aproximadamente 1×10^6 células para serem aplicadas em cada teste. As células foram inicialmente lavadas para a remoção do meio, o que foi feito por sequências de centrifugação das culturas a 1600 rpm por 2 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em PBS. Em seguida, cada *pellet* obtido foi ressuscitado em 5 mL de PBS (1×10^6 células/mL), os quais foram igualmente distribuídos em 5 tubos de 2 mL, cada tubo correspondendo a um tratamento a ser testado. Cada linhagem foi testada nos seguintes tratamentos: 1) sem adição de proteína (controle negativo); 2) adição de MabThera[®] (controle positivo); 3) adição do scFv do Rituximabe (controle positivo); 4) adição do scFv do Ofatumumabe; e 5) adição do scFv do Ofatumumabe com a cauda SUMO. Para os tratamentos 2 a 5, 100 μ L de solução de cada proteína na concentração de 100 μ g/mL (em PBS) foram

adicionados aos respectivos tubos já contendo as células. Para os controles negativos, 100 µL contendo apenas o tampão foram adicionados aos tubos. Os tratamentos foram incubados por 1 h a 4 °C e, em seguida, centrifugados a 2000 rpm por 2 minutos. Os *pellets* foram lavados com o tampão para remoção das proteínas adicionadas que não se ligaram às células. Cada *pellet* foi ressuscitado em 30 µL de tampão de amostra e submetido à eletroforese (SDS-PAGE) para subsequente análise por *Western blot*.

4.10.2 ELISA

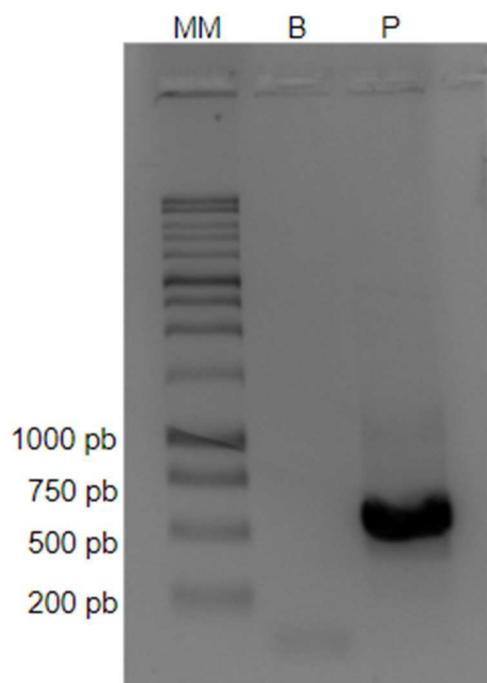
Como estratégia alternativa para avaliação da capacidade de ligação do scFv obtido, as mesmas linhagens celulares (Raji, K562-CD20⁺ e K562-WT) foram aplicadas em um ELISA. As células foram fixadas em microplaca de 96 poços na etapa de sensibilização, sendo centrifugadas a 1600 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos, o *pellet* lavado 3 vezes com PBS e a concentração celular ajustada para 1×10^7 células/mL. Foram pipetados 100 µL (1×10^6 células) em cada poço utilizado. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 40 minutos. Posteriormente, 50 µL de paraformaldeído 4% (em fosfato 0,1 M) foram adicionados em cada poço para fixação das células. As placas foram incubadas a 4 °C *overnight*. No dia seguinte, o paraformaldeído foi removido lavando-se a placa 10 vezes com PBS. Para bloqueio dos sítios inespecíficos, foram adicionados 200 µL/poço de leite bovino desnatado (LBD) 4% (m/v) em PBS e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h. Após esse procedimento, houve lavagem da placa com PBS-T (0,05% Tween 20). Foram adicionados 100 µL/poço das respectivas proteínas a 100 µg/mL (LBD 1% em PBS). Os mesmos tratamentos descritos na seção 4.10.1 foram realizados em duplicata, totalizando-se 30 poços. Aos controles de ligação inespecífica, adicionou-se apenas diluente (LBD 1% em PBS). A placa foi incubada por 1 h à temperatura ambiente e, em seguida, lavada 3 vezes com PBS-T. Na sequência, foram adicionados 100 µL/poço do conjugado proteína L-HRP (Pierce) 1:4000 (v/v) em LBD 1% em PBS. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 h. As lavagens foram repetidas (sendo a última sem Tween 20) e, em seguida, 100 µL do substrato da HRP, TMB, foram aplicados nos poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 a 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ 2 M, seguindo-se a leitura da placa em leitor de ELISA a 450 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Clonagem do gene do scFv no vetor pET-SUMO

O produto da PCR de amplificação do gene do scFv foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,0% (figura 8). Na imagem, verifica-se a ocorrência da amplificação pela presença da banda correspondente ao gene amplificado, não havendo amplificação no controle negativo da reação, em que o DNA molde (pUC57-scFvOFA) não foi adicionado.

Figura 8 – Análise eletroforética da PCR de amplificação do gene do scFv e inclusão dos sítios para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III



Fonte: elaborado pelo autor. Gel de agarose 1,0% que confirma a amplificação do molde. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA ladder Promega®); B: branco; P: produto da PCR.

Para que fosse possível inserir o gene do scFv no vetor pretendido, primeiramente fazia-se necessária a disponibilidade desse gene em quantidades razoáveis e apresentando extremidades compatíveis com o vetor linearizado, após tratamento com as enzimas de restrição, cujos sítios de reconhecimento estão presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor pET-SUMO.

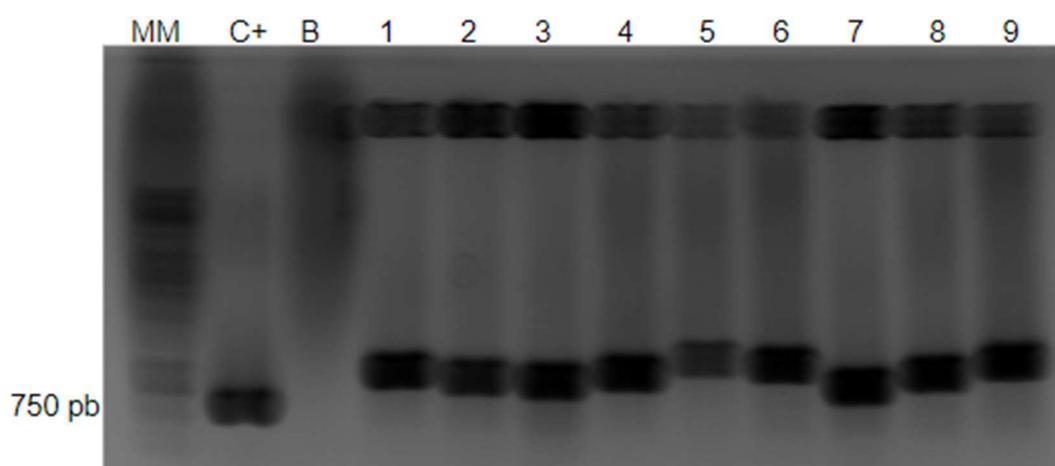
Uma opção recorrente nesses casos é o tratamento direto do vetor comercial com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para linearizar o vetor de expressão, o que deve ser

feito preferencialmente com duas enzimas de restrição diferentes, gerando-se, assim, extremidades que não sejam autocomplementares, de modo que se evite a recircularização do vetor sem a entrada do inserto, além de permitir uma inserção unidirecional do gene no novo plasmídeo. Para isso, é preciso garantir-se a ausência da sequência de reconhecimento das enzimas escolhidas dentro da sequência do gene de interesse e, além disso, uma etapa de separação e purificação do gene destacado após a digestão para utilizá-lo, posteriormente, na reação de ligação com o vetor pET-SUMO.

Optou-se pela amplificação do gene do scFv presente no vetor de origem (pUC57) por PCR, a partir da utilização de *primers* desenhados para anelarem-se especificamente à sequência do gene de interesse, adicionando às extremidades da sequência amplificada, convenientemente, sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, as quais apresentam seus sítios de reconhecimento localizados nas extremidades do sítio múltiplo de clonagem do vetor, permitindo uma correta introdução do inserto, *in frame*, com a fase de leitura gênica.

Após reações de digestão e ligação entre o produto da PCR e o vetor pET-SUMO, a cepa de clonagem *E. coli* Top10 transformada teve 9 colônias obtidas em meio seletivo submetidas a PCR de colônias, na qual se verificou resultado positivo para a presença do vetor pET-SUMO contendo o inserto em todas elas (figura 9). O controle positivo da reação utilizado (pET28a-scFv-Ritux) apresenta um *amplicon* um pouco menor que o do pET-SUMO-scFv, dado que os *primers* específicos para as regiões *T7promoter* e *T7terminator* (presentes em ambos os vetores flanqueando a região de inserção) incluem a sequência da cauda SUMO no vetor pET-SUMO o que confere ao produto da PCR desse vetor alguns pares de bases a mais em relação ao controle (altura de aprox. 1000 pb esperadas para pET-SUMO-scFv) .

Figura 9 – Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas com ligação do gene scFv-OFA no vetor pET-SUMO

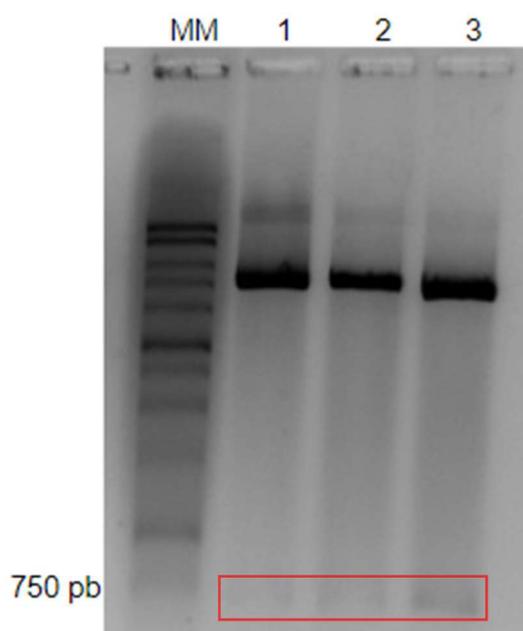


Fonte: elaborado pelo autor. Gel de agarose 1,0% que indica a transformação das colônias selecionadas com o vetor pET-SUMO contendo o gene do scFv do Ofatumumabe. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA ladder Promega®); C+: controle positivo (gene de outro scFv clonado em pET28a); B: branco; 1-9: colônias clonadas usadas como molde.

A PCR de colônias representa uma estratégia importante de análise para a seleção adequada de colônias que de fato contenham o plasmídeo com o gene de interesse inserido. O simples crescimento de colônias em meio contendo o antibiótico marcador de seleção do vetor não garante a presença nem do vetor nem do inserto, dada a possibilidade de surgimento de contaminações com colônias de cepas resistentes ao antibiótico ou de transformação de algumas bactérias com plasmídeo sem inserto (embora tenham sido usadas enzimas de restrição distintas e o vetor tenha sido tratado com fosfatase para a redução dessa possibilidade). A amplificação do inserto a partir de *primers* que se anelam em regiões flangeadoras do sítio de restrição permite a detecção dupla (inserto e vetor), já que a região de anelamento é específica do vetor em questão e caso não houvesse inserto entre essas regiões, o produto da PCR seria de tamanho menor, aparecendo em uma altura abaixo de 200 pb no gel.

Três colônias foram selecionadas e um teste de digestão parcial dos plasmídeos extraídos das colônias transformadas e cultivadas em meio seletivo foi realizado, sendo analisado em gel de agarose 1,0% (Figura 10), no qual se verifica a presença da banda correspondente ao inserto (~750 pb) se destacando do vetor. Esse teste teve como objetivo um diagnóstico qualitativo simples de confirmação da presença do inserto no vetor extraído.

Figura 10 – Teste de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III do plasmídeo purificado



Fonte: elaborado pelo autor. Gel de agarose 1,0% que traz indicação adicional da inserção do gene do scFv do Ofatumumabe no vetor pET-SUMO a partir da digestão dos plasmídeos purificados de 3 colônias selecionadas. MM: marcadores de peso molecular (1 Kb DNA ladder Promega®); 1-3: plasmídeos de colônias positivas selecionadas liberando o fragmento referente ao inserto. As colônias submetidas ao teste tiveram posteriormente o DNA plasmidial sequenciado, confirmando a presença do gene do scFv. Bandas correspondentes à liberação do inserto destacadas em vermelho.

As fracas bandas atribuídas ao inserto se devem ao fato de o teste ter sido realizado a partir de apenas 300 ng de DNA e menor tempo de incubação em relação ao indicado para a digestão com essas enzimas.

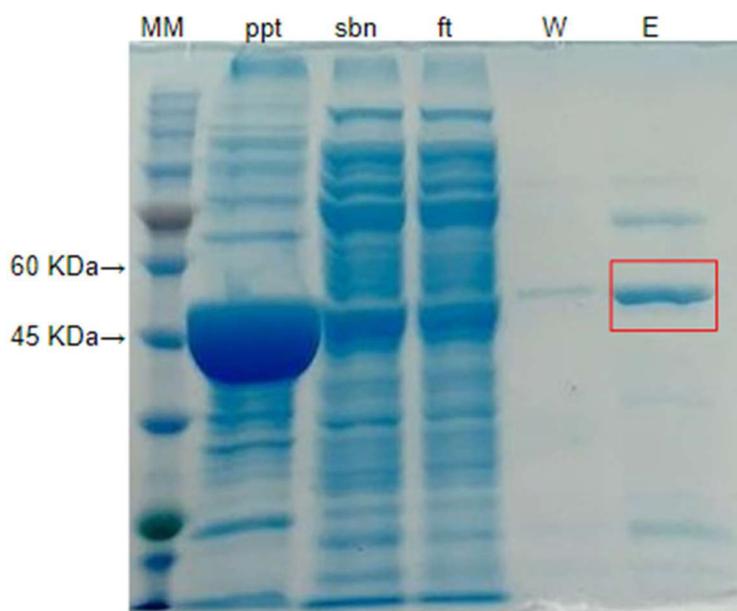
A PCR é uma ferramenta extremamente útil e eficiente para a geração de grandes quantidades do DNA com que se deseja trabalhar, permitindo alterações e acréscimos de sequências estratégicas, mas, por outro lado, podendo ter sua eficiência comprometida por influência de vários parâmetros, tais como tamanho do gene, fidelidade e processividade da DNA polimerase utilizada e as propriedades dos *primers* aplicados. Nesse contexto, dada a possibilidade de ocorrência de mutações ao longo da amplificação e subsequente inserção de sequências alteradas que possam comprometer a expressão adequada da proteína almejada, bem como diante da possibilidade de ineficiência na reação de ligação entre inserto e vetor, buscaram-se indícios e evidências adicionais da correta inserção do gene de interesse no vetor pretendido. Nesse sentido, além do indício obtido pelo teste de digestão parcial (mostrado acima), amostras do DNA plasmidial das 3 colônias foram enviadas para sequenciamento, através do qual foi confirmada a presença da sequência do scFv do Ofatumumabe nos vetores selecionados. Para o sequenciamento também foram utilizados os *primers T7pro* e *T7ter* e os resultados foram avaliados através do *software* Bioedit®, usando a ferramenta de alinhamento *Clustal W*. Partes do alinhamento global realizado entre a sequência da colônia 3 (a qual foi usada no prosseguimento do trabalho) e a sequência original do scFv, além de um trecho do eletroferograma do sequenciamento dessa colônia – mostrado apenas como indicativo da qualidade do sequenciamento realizado – estão ilustrados na figura 11.

Na figura 12-A, exibem-se os perfis das frações solúvel e insolúvel obtidas, respectivamente, a partir do sobrenadante e do precipitado após a sonicação. Apesar de sua ocorrência na fração solúvel, ainda se verifica uma grande quantidade da proteína no precipitado, denotando que o rendimento na fração solúvel ainda pode ser um alvo de otimização do processo, sobretudo, quando o enfoque vier a ser o escalonamento da produção. As frações obtidas a partir da cromatografia realizada logo após a sonicação indicam a presença da banda aproximadamente na altura correspondente aos 46 KDa do scFv-SUMO. Percebe-se, a partir do gel, que parte da proteína foi eluída da coluna já na fração de lavagem (com apenas 50 mM de imidazol), indicando, assim, possíveis problemas associados ao processo de purificação. Géis obtidos na sequência, após a clivagem da cauda SUMO, assim como quantificação e detecção por *Western blot* foram utilizados como evidências complementares para a confirmação da obtenção do scFv.

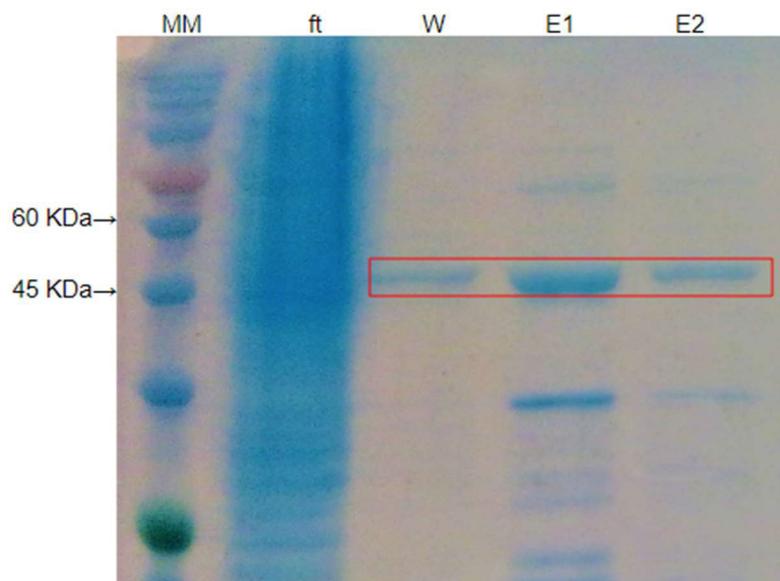
No evento de expressão associado à figura 12-B, ao se proceder a primeira etapa cromatográfica, verificou-se que proteínas contaminantes ficaram retidas na coluna, saindo junto com o scFv na primeira fração de eluição (E1), o que foi atenuado a partir do segundo passo cromatográfico, após a remoção da cauda SUMO.

Figura 12 – Análise eletroforética da expressão e purificação do scFv-SUMO (géis 1 e 2)

A



B



Fonte: elaborado pelo autor. Géis SDS-PAGE 12%. MM: marcadores de peso molecular (TrueColor Broad High Range P M Sinapse); ppt: precipitado; sbn: sobrenadante; ft: *flow through* (não-retido); W: 50 mM de imidazol; E, E1 e E2: 300 mM de imidazol. Banda correspondente ao scFv-SUMO (aprox. 46 KDa) em destaque. (A) Gel 1, amostra não submetida à posterior clivagem da cauda SUMO. (B) Gel 2, amostra submetida, em seguida, à clivagem da cauda SUMO. As demais bandas em E1 correspondem a proteínas contaminantes que acabam se ligando à coluna, sendo eluídas no primeiro passo cromatográfico.

A grande quantidade da proteína evidenciada pela banda na fração do precipitado, característico da presença de corpos de inclusão, indica ainda uma limitação importante na obtenção da proteína solúvel em sistema procarioto mesmo diante das estratégias adotadas. Trabalhos usando abordagens similares de expressão de scFvs indicam ainda a manutenção da maior parte da proteína obtida na fração insolúvel, mesmo com a co-expressão de chaperonas (YOUSEFI et al, 2018), o que demonstra a dificuldade em se evitar tal evento. Testes de modificações sistemáticas nos parâmetros de expressão, a fim de se padronizar um protocolo otimizado de obtenção especificamente do scFv do Ofatumumabe serão ainda necessários (LOBSTEIN et al, 2012), uma vez que foram utilizados, para esse trabalho, condições já pré-estabelecidas no contexto da expressão de outro scFv estudado previamente por nosso grupo de pesquisa. Assume-se de antemão que a redução da temperatura de expressão teria um grande potencial de impactar positivamente na obtenção de um melhor rendimento na fração solúvel (HU et al, 2007). Testes de expressão com a combinação de diferentes parâmetros associados à redução da temperatura serão realizados no futuro em busca da padronização e otimização do

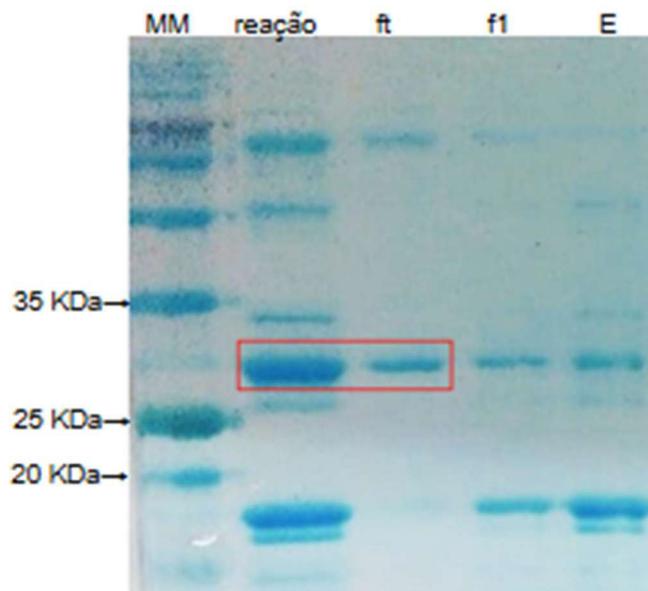
processo. Altas taxas de expressão, levando a um rápido aumento na concentração da proteína recombinante dentro da célula, tendem a promover um enovelamento incorreto, fazendo com que ela se acumule nos corpos de inclusão. No entanto, testes de expressão (não mostrados neste texto) em que se empreendeu redução da concentração do indutor (IPTG) de 0,3 mM para 0,1 mM bem como indução a partir de D.O. mais elevada (0,6 a 0,8) não resultaram em diferenças significativas nos rendimentos obtidos.

5.3 Clivagem da cauda SUMO e purificação

Após a reação de clivagem da cauda SUMO do complexo obtido, o sistema reacional foi submetido a nova cromatografia de afinidade em coluna com níquel e, na sequência, analisado por SDS-PAGE 12%. Verifica-se no gel da figura 13 (continuação da expressão representada na figura 12-B) a banda na altura de aproximadamente 30 KDa correspondente ao scFv sem as caudas (*SUMOTag* e *HisTag*) sendo eluído, portanto, sem se reter à coluna, dado que a cauda de histidinas foi removida, sendo, por sua vez, eluída junto à cauda SUMO (banda de ~ 18 KDa).

Especula-se que a retenção da cauda SUMO no complexo poderia atrapalhar a acurácia dos dados obtidos em ensaios posteriores aos quais o scFv será submetido, interferindo potencialmente na estrutura e conseqüentemente na atividade do scFv ou podendo interagir com moléculas utilizadas nos ensaios, de modo a alterar sinais detectados. Diante de tal questionamento, parte das proteínas de fusão expressas não foi submetida à digestão com ULP1, para ser, então, aplicada em ensaios posteriores, com o intuito de se analisar a possível influência das *tags* para os resultados.

Figura 13 – Gel SDS-PAGE 12% correspondente à purificação, após a remoção da cauda SUMO



Fonte: elaborado pelo autor. MM: marcadores de peso molecular (TrueColor High Range P M Sinapse); reação: sistema reacional após a clivagem da cauda SUMO, contendo scFv sem a cauda (aprox. 30 KDa, em destaque) e SUMO (aprox. 18 KDa); ft: *flow through*, contendo o scFv sem a cauda SUMO (aprox. 30 KDa); f1: lavagem com 50 mM de imidazol (início da eluição da ULP e da cauda SUMO); E: eluição com 300 mM de imidazol (ULP na altura de aprox. 30 KDa e a cauda SUMO na altura de aprox. 18 KDa).

As etapas adicionais associadas à clivagem da cauda SUMO representam importantes reduções nas quantidades de proteína ao longo do processo. Embora a adição de um passo cromatográfico auxilie na remoção de contaminações oriundas de possíveis imperfeições da cromatografia, as perdas são significativas ao final do processo e poderiam ser evitadas, caso a digestão não fosse imprescindível para os ensaios pretendidos. Os ensaios realizados neste trabalho ainda não puderam ser conclusivos na resposta dessa pergunta, e este é um tema que continua sob investigação por nosso grupo de pesquisa.

5.4 Rendimentos

A média de rendimentos obtidos avaliados a partir de dois eventos de expressão sob as mesmas condições, nos quais a cauda SUMO chegou a ser posteriormente removida da proteína de fusão, foi de 4,28 mg de proteína/litro de meio de cultura usado em cada expressão, caindo para 1,88 mg/L após a clivagem. Os valores específicos de cada evento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimentos em mg de proteína por litro de cultura de expressão em duas expressões realizadas

| Expressão | Rendimento (mg/L) com SUMO | Rendimento (mg/L) após clivagem |
|-----------|----------------------------|---------------------------------|
| 1 | 4,01 | 1,73 |
| 2 | 4,56 | 2,04 |

Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores de rendimento são aproximados e se baseiam nas quantificações realizadas a partir do *kit* fluorimétrico de *Qubit*[®], utilizado conforme recomendações do fabricante.

Como referencial, é relevante mencionar que os rendimentos obtidos nesse estudo se aproximam da média alcançada na expressão já padronizada de outros scFvs produzidos pelo nosso grupo de pesquisa.

Tal rendimento representa a quantidade de proteína solúvel obtida ao final do processo, sendo compatível com exemplos de expressão de scFvs observados na literatura (a partir de estratégias similares), tais como 2,7 mg/L obtidos por Sonoda *et al.* (2010), embora rendimentos variáveis e, muitas vezes, bastante superiores também sejam verificados (ZARSCHLER *et al.*, 2013; GACIARZ *et al.*, 2016), indicando, portanto, que a determinação dos melhores parâmetros depende de cada proteína, o que corrobora a necessidade de padronização de cada etapa para a otimização do processo. Diante do forte indício de grande parte da proteína estar sendo expressa em corpos de inclusão e, além disso, em virtude das perdas atreladas às etapas do processamento *downstream* constatadas ao longo de cada passo, permanecem em aberto múltiplos caminhos para a busca de melhores rendimentos, o que pode ser realizado a partir de ajustes em diferentes pontos do sistema ou ainda através da aplicação de protocolos para o recuperação e *refolding* das proteínas dos corpos de inclusão (SINGH *et al.*, 2005).

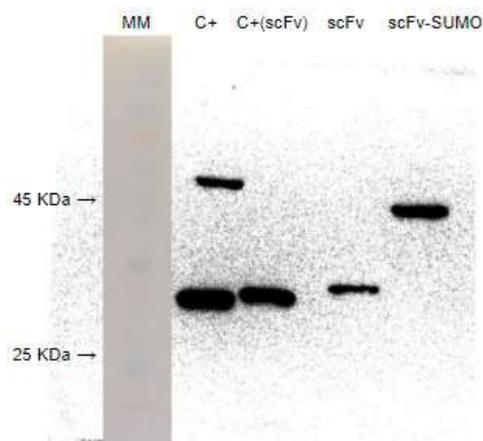
5.5 Western blot

Ensaio de *Western blot* foram realizados, a fim de se confirmar a presença do scFv (com e sem a cauda SUMO) nas bandas a ele atribuídas, obtidas no gel de eletroforese. A proteína L é uma proteína da parede celular de *Peptostreptococcus magnus* capaz de se ligar com alta afinidade às cadeias leve $\kappa 1$, $\kappa 3$ e $\kappa 4$ de anticorpos em geral (PALONI; CAVALLOTTI, 2017). Portanto, ela pode ser utilizada conjugada a uma enzima cuja atividade permita a detecção de um sinal (no caso, foi utilizado a peroxidase HRP), indicando

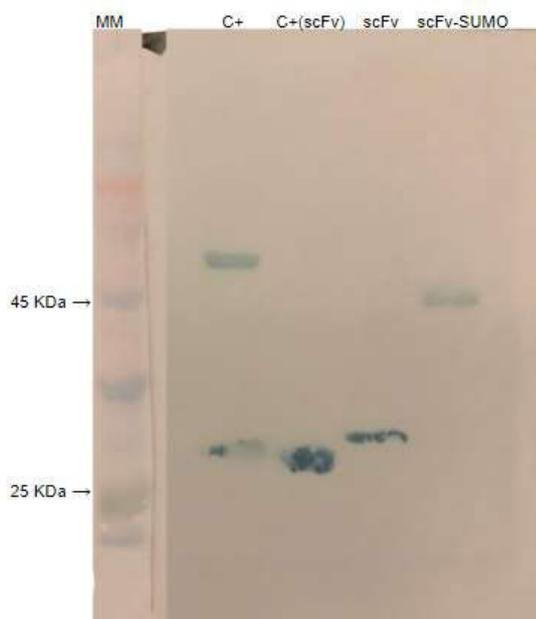
indiretamente a ligação da proteína L a uma cadeia leve de anticorpo, uma vez que, na ausência de seu ligante, a proteína L seria removida ao longo das lavagens da membrana. Desse modo, foi possível detectar a ligação da proteína L na região da membrana que corresponde à banda atribuída ao scFv do Ofatumumabe (~46KDa com a cauda SUMO e ~30 KDa sem a cauda SUMO). Como controle positivo, utilizou-se Rituximabe comercial (MabThera[®]) e o scFv do Rituximabe produzido previamente por nosso grupo. Por se tratar do mAb completo, o MabThera[®] se fragmenta sob as condições desnaturantes da eletroforese e aparece no gel em duas bandas, uma correspondente ao anticorpo completo e a outra provavelmente correspondente a uma cadeia pesada unida a uma cadeia leve. Dois diferentes ensaios de *Western blot* – dos quais as respectivas membranas foram reveladas por métodos distintos, quimioluminescência e incubação com substrato cromogênico – são apresentados a seguir. Dado que o marcador de peso molecular utilizado na eletroforese e transferido para a membrana de nitrocelulose não é facilmente visualizável na imagem obtida sob o filtro de captação de quimioluminescência no fotodocumentador (figura 14-A), uma fotografia sob luz branca foi feita da membrana separadamente para sua captura, sendo, portanto, sobreposta à imagem para facilitar sua visualização, indicando aproximadamente as alturas das bandas detectadas. Na figura 14-B, apresenta-se imagem da membrana de nitrocelulose correspondente à repetição do ensaio de *Western blot* realizado sob as mesmas condições do primeiro, tendo-se feito, neste caso, a revelação pela incubação da membrana com o substrato cromogênico da enzima HRP, verificando-se as mesmas bandas detectadas anteriormente. A cor azul é correspondente ao substrato, TMB, oxidado.

Figura 14 – Western blot: membranas de nitrocelulose reveladas por quimioluminescência e por método cromogênico

A



B



Fonte: elaborado pelo autor. Membranas de nitrocelulose após transferência de 1 µg de cada amostra. C+: controle positivo (MabThera®); C+ (scFv): controle positivo de scFv (scFv Rituximabe); scFv: scFv do Ofatumumabe; e scFv-SUMO: scFv do Ofatumumabe com a cauda SUMO; MM: Marcadores de peso molecular (TrueColor High Range P M Sinapse), oriundos das mesmas eletroforeses das amostras e transferidos para as membranas, foram captadas sob luz branca e associadas à imagem. (A) Revelação por quimioluminescência. (B) Revelação por método cromogênico.

Em ambos os casos, o scFv com e sem a cauda SUMO pôde ser detectado pela proteína L, atestando-se tanto a expressão do scFv como indicando-se a possibilidade de projeção de ensaios com base em imunodeteção por proteína L para se testar qualitativamente a capacidade de ligação do scFv. A menor intensidade no sinal do scFv do Ofatumumabe sem a cauda pode ser devida a vários motivos desde uma superestimação da quantidade aplicada, decorrente de perdas durante o processo de armazenamento a -80 °C do scFv até a possíveis desvios estruturais que pudessem atrapalhar a interação da proteína L com seu substrato.

5.6 Citometria de fluxo para análise da expressão do antígeno nas linhagens K562

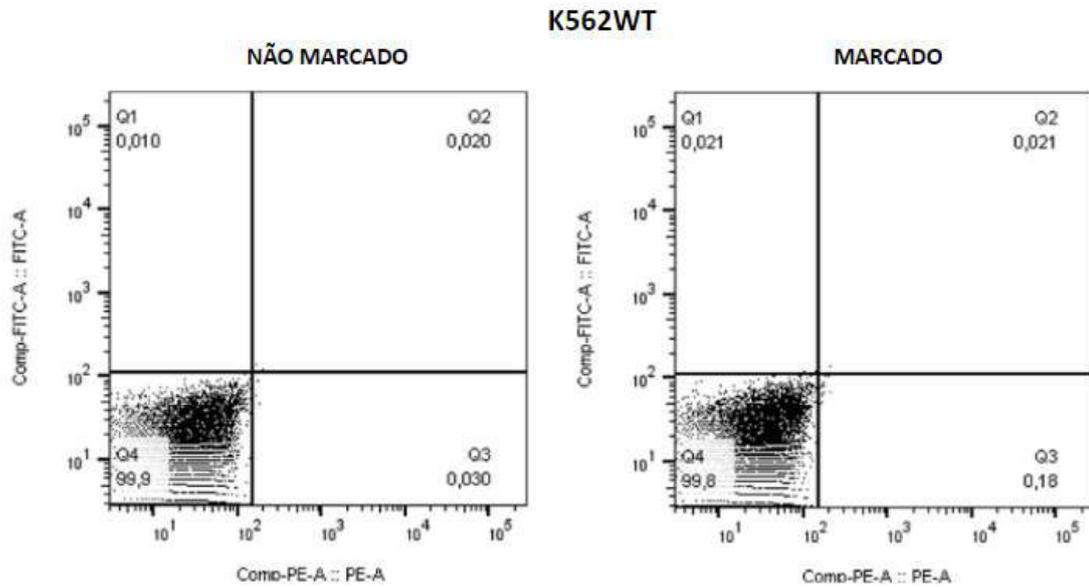
A confirmação da ausência da molécula de CD20 na membrana das células K562WT bem como a constatação de sua expressão na membrana das células transformadas para essa finalidade (linhagem cisgênica K562CD20⁺) foram obtidas através de citometria de fluxo, realizada por nosso grupo de pesquisa, estabelecendo-se como um importante requisito de validação dos ensaios rotineiramente realizados no contexto da avaliação da capacidade de ligação dos fragmentos de anticorpos produzidos e desafiados contra tais células. Pela figura

15-A, verifica-se que as células k562WT tratadas com um anticorpo anti-CD20 marcado com o fluorocromo FITC não apresentaram a fluorescência correspondente para além do limite estabelecido previamente a partir de células não tratadas (referencial demarcando a barra horizontal do gráfico representativo do sinal máximo emitido por essas células sem a presença do fluorocromo), o que indica que não houve ligação do anticorpo na membrana das células analisadas. Na figura 15-B, verifica-se a detecção de fluorescência de 41,5% das células analisadas (total de 10000 eventos), o que indica a expressão da proteína CD20 na membrana dessas células. O fato de haver uma parte da população não emitindo sinal da ligação do anticorpo marcado na molécula de CD20 (eventos contidos no quarto quadrante) pode representar uma perda ou uma redução da expressão da proteína por parte dessas células recombinantes ao longo dos subcultivos. É possível especular ainda a chance de internalização do anticorpo quando este se liga ao seu alvo na superfície da célula em parte dos eventos (LIM *et al.*, 2011).

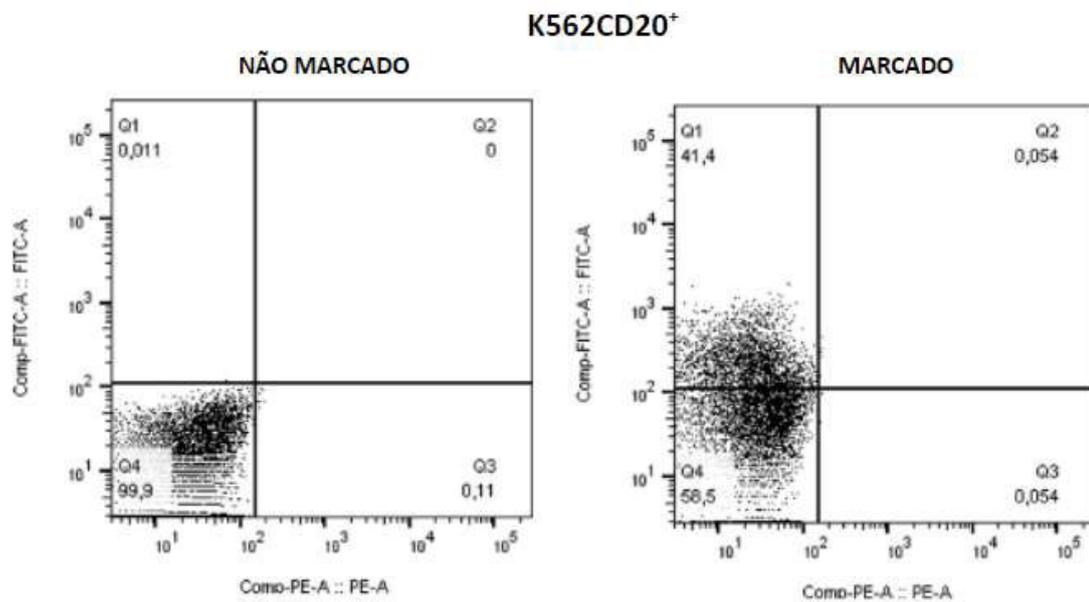
O estabelecimento do fluorocromo PE no eixo das abscissas se deve ao fato de as células terem sido testadas adicionalmente quanto à expressão da proteína CD19 – um outro marcador específico de linfócitos B também investigado por nosso grupo de pesquisa – havendo entre as células avaliadas, no mesmo contexto, uma linhagem K562CD19⁺ (dados não mostrados). As linhagens K562WT e K562CD20⁺ foram, portanto, também tratadas com anticorpo anti-CD19 marcado com PE, não havendo detecção do sinal para além do limite estabelecido a partir de células não tratadas (barra vertical) correspondente a esse fluorocromo, indicando-se, assim, evidência da ausência da expressão da proteína CD19 na membrana dessas células.

Figura 15 – Citometria de fluxo - análise da expressão de CD20 na membrana das células K562

A



B



Fonte: elaborado pelo grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas (Fiocruz-CE) através do *software FlowJo*. (A) K562WT marcado: tratada com anti-CD20 marcado com FITC e anti-CD19 marcado com PE; K562WT não marcado: não tratada com nenhum anticorpo. (B) K562CD20⁺ marcado: tratada com anti-CD20 marcado com FITC e anti-CD19 marcado com PE; K562CD20⁺ não marcado: não tratada com nenhum anticorpo.

A citometria de fluxo representa uma alternativa importante para a avaliação mais precisa da capacidade de ligação das proteínas investigadas a seus alvos moleculares presentes nas membranas das células de trabalho. A inclusão e manutenção de *tags* nos fragmentos de anticorpos expressos na forma de proteínas de fusão pode auxiliar nesse sentido, permitindo o uso de anticorpos específicos para reconhecerem tais *tags* marcados com um fluorocromo de escolha e disponíveis comercialmente. As células são incubadas inicialmente com a proteína cuja capacidade de ligação se deseja testar; em seguida, após lavagens, as células são incubadas com o anti-*tag* marcado com o fluorocromo. A avaliação por citometria de fluxo indicaria, portanto, se há sinal correspondente à presença do fluorocromo, podendo-se, ainda, quantificar os eventos positivos e negativos, indiretamente representativos da capacidade de ligação da proteína avaliada.

5.7 Ensaios de ligação

5.7.1 *Western blot*

A característica peculiar do epítipo do Ofatumumabe de estar distribuído de forma descontínua em duas regiões distintas das porções extracelulares da molécula de CD20 (figura 1) estabelece restrições para a reprodutibilidade experimental da interação entre o anticorpo e um peptídeo sintético que contivesse tais resíduos epitópicos. Embora peptídeos contendo todas as regiões potencialmente epitópicas das porções extracelulares da proteína CD20 tenham sido produzidas a partir de análises *in silico* (FASIHI-RAMANDI et al, 2016) com a finalidade de servir como ferramenta de prospecção de novos anti-CD20, a estrutura tridimensional e a conformação entre as duas alças extracelulares no peptídeo precisariam, provavelmente, estar conservadas na molécula de modo a permitir sua aplicação como antígeno em estudos de investigação da interação do Ofatumumabe. Nesse sentido, o uso de células expressando o alvo íntegro em sua membrana se estabeleceu como caminho na busca de um indício qualitativo de que o scFv do Ofatumumabe obtido apresenta a capacidade de se ligar ao seu antígeno.

Diante dos resultados da citometria de fluxo que avaliou as linhagens K562 quanto à ocorrência da proteína CD20 em suas membranas, delineou-se uma estratégia baseada na incubação das células com o scFv e posterior ensaio de imunodeteção do fragmento no extrato total dessas células por *Western blot* (conforme descrito na seção 4.10.1). Nesses ensaios, além da K562CD20⁺, utilizaram-se células Raji, que, embora não tenham sido analisadas no contexto da citometria de fluxo apresentada na seção anterior, representam uma linhagem proveniente

de linfoma de células B, superexpressando, portanto, a proteína CD20 (AHMADZADEH *et al*, 2014).

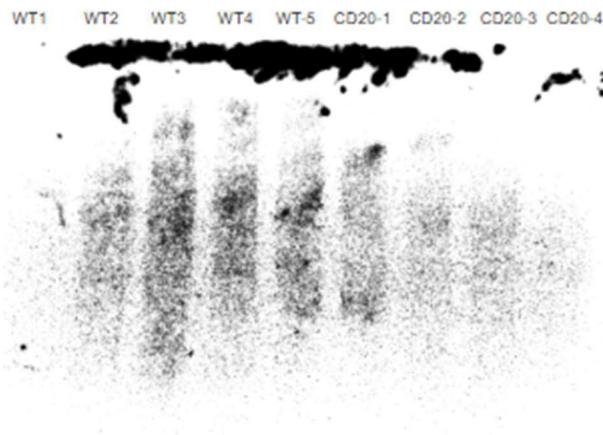
Em uma primeira tentativa, após revelação das membranas por quimioluminescência demonstradas na figura 16, não foi possível detectar bandas específicas nas alturas esperadas para o scFv do Ofatumumabe (com ou sem a cauda SUMO) incubado com as células das três linhagens. Embora seja possível visualizar bandas correspondentes às alturas esperadas dos controles positivos (MabThera® e scFv do Rituximabe) nos tratamentos com as células Raji (figura 16-B), a ausência de bandas de tais controles positivos da linhagem K562CD20⁺ (figura 16-A) e a ocorrência de muitas marcações inespecíficas ao longo de ambas as membranas, além da presença de bandas não esperadas de grande peso molecular aparente, tornam a avaliação imprecisa, indicando defeitos ou limitações na estratégia utilizada, havendo a necessidade de possíveis ajustes no método. Dentre as possíveis explicações para os problemas encontrados, inclui-se a aplicação do extrato total do *pellet* celular obtido em cada ensaio no gel de poliacrilamida, o que determina um excesso de proteínas e a presença de outras macromoléculas que compõem essas células, comprometendo a qualidade da separação e, sobretudo, da transferência para a membrana de nitrocelulose. Especula-se que parte das amostras aplicadas resistiu à entrada no gel principal, ficando, assim, retida em cada poço aplicado e, possivelmente, tendo frações migrando atrasadamente ao longo de toda a eletroforese, gerando bandas inespecíficas. Outro fator limitante da avaliação deste experimento deveu-se ao fato de as bandas correspondentes aos marcadores de peso molecular utilizados não terem sido previamente cortadas para posterior registro fotográfico, apagando-se ao longo das etapas e, assim, não podendo ser capturadas como referencial para a altura de outras bandas. Diante do exposto, uma repetição da eletroforese e da transferência foi realizada, diluindo-se 10X as amostras que sobraram da primeira tentativa (tratamentos com células K562WT e Raji) com a finalidade de se testar a hipótese para a ocorrência do alto teor de inespecificidades anteriormente verificado. Além disso, optou-se, dessa vez, pelo método cromogênico para revelação da membrana e destacamento prévio da região contendo os marcadores de peso molecular logo após a transferência. Pela figura 16-B, verifica-se apenas uma leve detecção de banda na altura esperada para um dos controles positivos (scFv do Rituximabe) no tratamento de células Raji. Apesar de não ter havido qualquer sinal nas bandas esperadas para o scFv do Ofatumumabe (com e sem cauda SUMO) – indicando a provável não retenção da capacidade de ligação do fragmento produzido – a ausência de detecção do controle positivo MabThera® no tratamento com células CD20⁺ compromete, no entanto, a

confiabilidade das inferências feitas a partir deste ensaio. É provável que a diluição das amostras, somada à utilização de um método menos sensível de revelação da membrana e uma possível transferência incompleta tenham sido fatores determinantes para a não detecção adequada das proteínas.

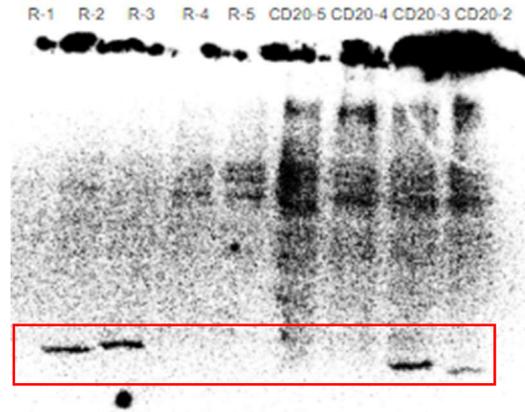
Portanto, apesar dos indícios iniciais de uma possível incapacidade de ligação do scFv do Ofatumumabe produzido ao seu antígeno, os resultados obtidos com essa estratégia foram inconclusivos e uma padronização deste protocolo bem como a aplicação de métodos alternativos de avaliação da capacidade de ligação – tais como a marcação de moléculas por fluorocromos detectáveis por citometria de fluxo, ressonância plasmônica, espectroscopia de força atômica, variações de ELISA, entre outros - permanecem necessários.

Figura 16 – *Western blot* do ensaio de ligação (membranas reveladas por quimioluminescência)

A



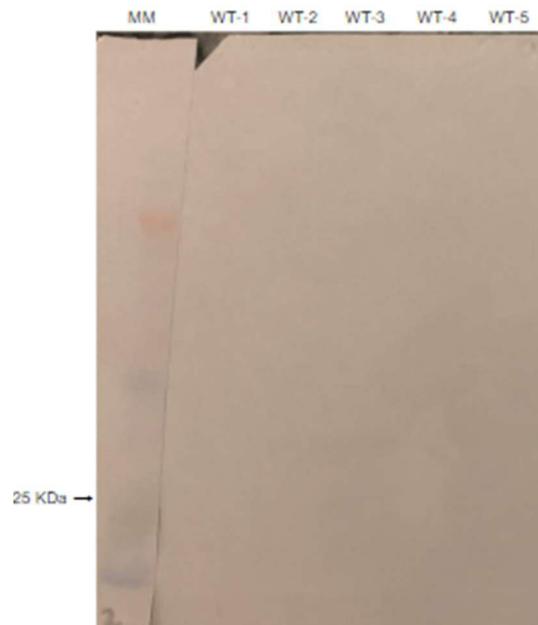
B



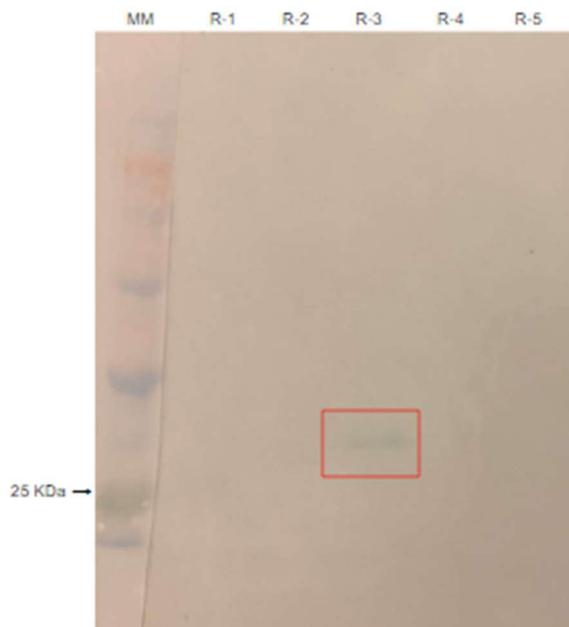
Fonte: elaborado pelo autor. WT: células K562WT; CD20: células K562CD20⁺; R: células Raji; 1: nenhum tratamento (branco); 2: tratamento com MabThera[®] (controle positivo); 3: tratamento com scFv do Rituximabe (controle positivo de scFv); 4: tratamento com scFv do Ofatumumabe; 5: tratamento com o scFv do Ofatumumabe com a cauda SUMO. (A) Células K562WT (todos os tratamentos) e K562D20⁺ (tratamentos 1-4), os controles positivos não foram detectados, indicando problemas no experimento. (B) Células Raji (todos os tratamentos) e K562CD20⁺ (tratamentos 2-5), detecção de possíveis bandas correspondentes aos controles positivos. Obs.: as bandas dos marcadores de peso molecular de ambas as membranas acabaram sendo removidas ao longo das etapas e não puderam ser capturadas para as imagens, comprometendo a acurácia da análise.

Figura 17 – Repetição *Western blot* do ensaio de ligação (membranas reveladas por método cromogênico)

A



B



Fonte: elaborado pelo autor. MM: Marcadores de peso molecular (TrueColor High Range P M Sinapse), oriundos das mesmas eletroforeses das amostras e transferidos para as membranas, foram inicialmente cortados, em seguida reassociados às membranas e capturados sob luz branca; WT: células K562WT; R: células Raji; 1: nenhum tratamento (branco); 2: tratamento com MabThera® (controle positivo); 3: tratamento com scFv do Rituximabe (controle positivo de scFv); 4: tratamento com scFv do Ofatumumabe; 5: tratamento com o scFv do Ofatumumabe com a cauda SUMO. (A) Células K562WT (todos os tratamentos). (B) Células Raji (todos os tratamentos), detecção apenas de banda correspondente ao controle positivo do scFv.

5.7.2 ELISA

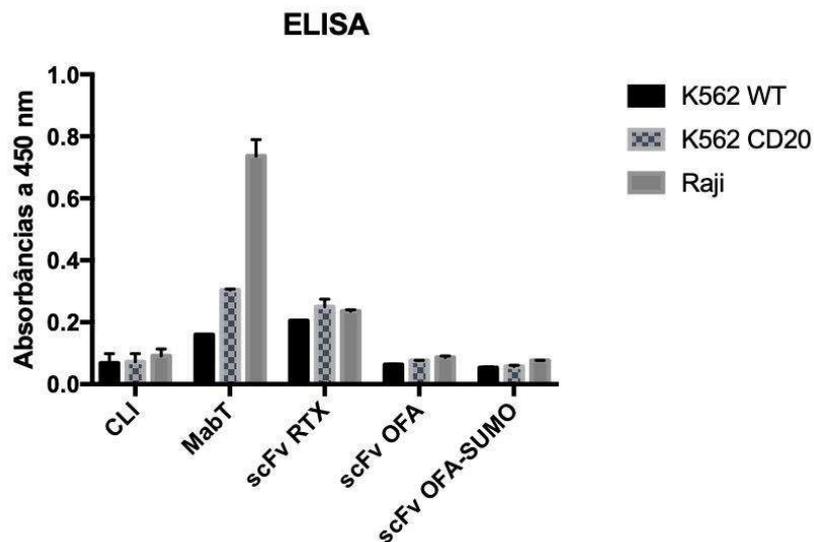
Em continuidade à investigação da capacidade de ligação do scFv obtido ao antígeno CD20, e com base em trabalhos em que se executaram variações deste ensaio para a determinação da capacidade de interação (CRAGG *et al.*, 2004; HAMPSON *et al.*, 2010; SANCHEZ *et al.*, 2010; AHMADZADEH *et al.*, 2014), realizou-se um ELISA indireto, a partir do uso das mesmas linhagens celulares aplicadas no ensaio anterior (K562WT, K562CD20⁺ e Raji), sendo cada uma delas submetidas aos mesmos tratamentos (MabThera® e scFv do Rituximabe, como controles positivos, e scFv do Ofatumumabe – com e sem a cauda SUMO). As linhagens utilizadas não são aderentes, crescendo, portanto, em suspensão e tendendo à agregação em cachos, o que pode representar um obstáculo para a realização do ELISA com essas células como os elementos responsáveis por apresentarem o antígeno íntegro em suas membranas, o qual deve estar aderido ao fundo da placa para que o ensaio possa proceder adequadamente. Diante disso, realizou-se previamente, por nosso grupo, a padronização de um protocolo de fixação dessas células na placa, constatando-se um melhor

desempenho do paraformaldeído 4% como fixador em relação ao glutaraldeído 2%, gerando menores ligações inespecíficas (dados não mostrados). O uso desses fixadores foi baseado em protocolos descritos na literatura (SINGH; KWONG, 1984; SCHMIDT *et.al*, 1999).

Conforme verifica-se no gráfico 1, o ELISA revelou que o scFv do Ofatumumabe obtido neste trabalho (com ou sem a cauda SUMO) não foi capaz de se ligar ao antígeno CD20 representado pelas células aplicadas neste ensaio. Dificuldades associadas à detecção de ligação de scFvs a seus antígenos por meio do uso de células no ELISA já foi previamente verificada em estudos anteriores de avaliação de outros scFvs. A ausência de diferenças significativas entre os tratamentos do scFv do Rituximabe com células CD20⁺ e K562WT, indicando que também não houve ligação desse scFv no presente experimento, levanta novamente o questionamento da adequabilidade das condições desse ensaio para a aplicação desse tipo de fragmento. A eficiência de ligação do MabThera[®] às células CD20⁺ pode ser, por sua vez, explicada pelo fato de se tratar do anticorpo completo, apresentando, portanto, dois pontos de ligação, logo, avidez quando comparado ao fragmento de cadeia única. A intensa ligação à linhagem Raji em comparação à K562CD20⁺ pode estar associada a uma maior expressão do antígeno por parte da primeira, originalmente portadora de CD20.

As mesmas dificuldades especificamente associadas às características do epítipo do Ofatumumabe abordadas anteriormente reafirmam a necessidade de busca por estratégias mais sensíveis e eficientes de avaliação da capacidade de ligação desse scFv ao seu antígeno. A possibilidade de ausência de função do scFv devido a uma expressão estruturalmente comprometida é uma hipótese a ser confirmada por outros métodos, tais como o Dicroísmo Circular (GREENFIELD, 2006, 2007). Avaliações por citometria de fluxo pelo uso de um anticorpo anti-Histag marcado com um fluorocromo (HERRMANN *et al*, 2018) se estabelece como uma possível alternativa para os próximos passos.

Gráfico 1 – ELISA com células para avaliação da capacidade de ligação do scFv



Fonte: Elaborado pelo autor. CLI: controle de ligação inespecífica (células sem adição das amostras proteicas) utilizam-se apenas o diluente e o anticorpo secundário (proteína L-HRP) no ensaio.; MabT: MabThera[®] (controle positivo); scFv RTX: scFv do Rituximabe; scFv OFA: scFv do Ofatumumabe; scFv OFA-SUMO: scFv do Ofatumumabe com a cauda SUMO. Cada linhagem celular imobilizada na placa de ELISA de 96 poços está representada conforme legenda.

6 CONCLUSÃO

A partir do sistema heterólogo proposto, executou-se com sucesso a expressão e purificação do scFv do Ofatumumabe, obtendo-se a proteína parcialmente na fração solúvel e purificada, detectando-se por *Western blot* a presença do scFv na banda correspondente ao seu peso molecular aparente. Apesar dos avanços alcançados, melhorias no processo ainda precisam ser empreendidas a fim de se otimizar a obtenção de um rendimento mais expressivo na fração solúvel, bem como de uma purificação mais eficiente e com menores perdas. A padronização da expressão e purificação do scFv nativo do Ofatumumabe é importante, pois servirá de referência para estudos de engenharia de proteína que visam à construção de proteínas mutantes com propriedades terapêuticas aumentadas, conhecidas como *Biobetters*, bem como no estudo dos mecanismos de ação e mapeamento de aminoácidos importantes para a interação antígeno-anticorpo. A busca por estratégias experimentais de avaliação adequada da capacidade de ligação para o scFv permanece como desafio. As restrições associadas ao uso de células que devem manter o antígeno alvo íntegro em suas membranas e que exponham adequadamente a dupla região do epítipo para interação com o fragmento em questão, bem como as possíveis limitações do próprio tipo de fragmento para aplicação nesses testes – além de prováveis alterações estruturais do scFv – podem estar na base da dificuldade de detecção da capacidade de ligação do scFv obtido.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 7ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, [s. l.: s. n.], 2010.
- AHMADZADEH, V.; FARAJNIA, S.; HOSSEINPOUR FEIZI, M. A.; KHAVARINEJAD, R. A. Design, expression and characterization of a single chain anti-CD20 antibody; A germline humanized antibody derived from Rituximab. **Protein Expression and Purification**, [s. l.: s. n.], 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada Nº 55, de 16 de dezembro de 2010, dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, dezembro 2010.
- ANDRADE, V.; SAWADA, N. O.; BARICHELLO, E. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Rev Esc Enferm., USP**. v. 47, n. 2, p. 355–61. 2013.
- BANTA, S.; DOOLEY, K.; SHUR, O. Replacing antibodies: engineering new binding proteins. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 15, p. 93–113, 2013.
- BEUM, P. V.; LINDORFER, M. A.; BEURSKENS, F.; STUKENBERG, P. T.; LOKHORST, H. M.; PAWLUCZKOWYCZ, A. W.; PARREN, P. W.; VAN DE WINKEL, J. G.; TAYLOR, R. P. Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. **J Immunol.**, v. 181, p. 822–832, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Oncologia: avanços e desafios para o SUS**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/11/Forum-Estadao-Oncologia.pdf>>. Acesso em: 6 mai 2019.
- BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221–1229. 2000.
- CAMBRICOLI, F. **Em cinco anos, gasto com tratamento contra câncer cresceu 66%**. Ago 2016. Disponível em: <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,em-cinco-anos-gastocomtratamento-contracancer-cresceu-66,10000069529>. Acesso em: 27 out. 2019.
- CARTRON, G.; WATIER, H.; GOLAY, J. *et al.* From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. **Blood**, v. 104, p. 2635–2642, 2004.
- CHAMES, P.; REGENMORTEL, M. VAN; WEISS, E.; BATY, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 220–233, 2009.
- CRAGG, M. S.; BAYNE, M. B.; TUTT, A. L.; FRENCH; R. R.; BEERS, S.; GLENNIE, M. J.; ILLIDGE, T.M. A new anti-idiotypic antibody capable of binding rituximab on the surface of lymphoma cells. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2540–2543, 2004.

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

DUBENDORFF J.W.; STUDIER F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. **J Mol Biol.**, v. 219, n. 1, p. 45–59, 1991.

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

EBRAHIMIYAN, H.; ASLANI, S.; REZAEI, N.; JAMSHIDI, A.; MAHMOUDI, M. Survivin and autoimmunity; the ins and outs. **Immunology Letters**, v. 193, p. 14– 24. 2018

EINSTEIN, A. Old Man's Advice to Youth: Never Lose a Holy Curiosity. **LIFE Magazine**, p. 64, 1955.

FASIHI-RAMANDI; JAFAR AMANI; ALI-HATEF SALMANIAN; SEYED MOHAMMAD MOAZZENI; KAZEM AHMADI. In silico designing, cloning, and heterologous expression of novel chimeric human B lymphocyte CD20 extra loop. **Tumor Biol.**, v. 37, p. 12547–12553, 2016.

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

GALANINA, N.; JAGODA JASIELEC; PEACE, D.; SONALI M; SMITH & CHADI NABHAN. **Ofatumumab monotherapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma, Leukemia & Lymphoma**. v. 58, n. 3, p. 752–753, 2017.

GACIARZ, A.; VEIJOLA, J.; UCHIDA, Y.; SAARANEN, M. J.; WANG C.; HÖRKKÖ S.; RUDDOCK, L. W. 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.

GON, S.; FAULKNER, M. J.; BECKWITH, J. In vivo requirement for glutaredoxins and thioredoxins in the reduction of the ribonucleotide reductases of *Escherichia coli*. **Antioxid. Redox Curr.**, v. 8, p. 735-742. 2006.

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, 2007.

HERRMANN A.C., IM J.S., PAREEK S., RUIZ-VASQUEZ W., LU S., SERGEEVA A., MEHRENS J., HE H., ALATRASH G., SUKHUMALCHANDRA P., *et al.* A Novel T-Cell Engaging Bi-specific Antibody Targeting the Leukemia Antigen PR1/HLA-A2. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 3153, 2018.

HAMMADI, M.; PERS, J. O.; BERTHOU, C.; YOUINOU, P.; BORDRON, A. A new approach to comparing anti-CD20 antibodies: importance of the lipid rafts in their lytic efficiency, **Onco Targets and Therapy**, v. 3 p. 99–109, 2010.

HAMPSON, G.; WARD, T. H.; CUMMINGS, J.; BAYNE, M.; TUTT, A.; CRAGG, M.; DIVE, C. 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.

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

HU X.; O'HARA L.; WHITE, S.; MAGNER, E.; KANE, M.; WALL, J. G. Optimisation of production of a domoic acid-binding scFv antibody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support. **Protein Expr. Purif.**, v. 52 n.1, p. 194–201, 2007.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/2396>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

INCA. **Tipos de câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/linfoma_hodgkin>. Acesso em: 6 mai. 2019.

KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2019, **mAbs**, v. 11, n. 2, p. 219–238, 2019.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.

KINTZING J.R.; FILSINGER INTERRANTE, M.V.; COCHRAN, J.R. Emerging strategies for developing next generation protein therapeutics for cancer treatment. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 37 n. 12, p. 993–1008, 2016.

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

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

LIN, Ofatumumab: a novel monoclonal anti-CD20 antibody. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. v. 3. p. 51–59, 2010.

LOBSTEIN, J.; EMRICH, C. A.; JEANS, C.; FAULKNER, M.; RIGGS, P.; BERKME, M. 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. 1–16, 2012.

LIU, Z.; ZHANG, J.; FAN, H.; YIN, R.; ZHENG, Z.; XU, Q.; LIU, K.; HE, H.; PENG, X.; WANG, X.; LI, X.; XIAO, Y. Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in *Escherichia coli*. *China. Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18. p. 302–306, 2015.

MAYNARD, J.; GEORGIU, G. Antibody engineering. *Annu Rev. Biomed. Eng.*, v. 2, p. 339–376, 2000.

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

MSR. **Doenças Autoimunes**. 2019. Disponível em: <<https://muitossomosraros.com.br/doencas-raras/nao-geneticas/autoimunes/>>. Acesso em: 12 nov. 2019

MULLER P.Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov.*, v. 11, p. 751–61, 2012.

MULTIPLE SCLEROSIS SOCIETY. **Ofatumumab (also known as Arzerra) is an injection or infusion being developed for relapsing MS**. Disponível em: <<https://www.msociety.org.uk/research/explore-our-research/emerging-research-and-treatments/explore-treatments-in-trials/ofatumumab#>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

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

NEW ENGLAND BIOLABS. **C3032 Shuffle Samples Pack**. 2019. Disponível em: <<https://www.neb.com/products/c3032-shuffle-sampler-pack>>. Acesso em: 23. jun. 2019.

ORDIKHANI, F.; ARSLAN, M. E.; MERCELO, R.; SAHIN, I.; GRIGSBY, P.; SCHAWARZ, J. K.; AZAB, A. K. Drug Delivery Approaches for the Treatment of Cervical Cancer. *Pharmaceutics*, v. 8, n. 23, 2016.

PACKER, M.; LIU, D. Methods for the directed evolution of proteins. *Nat Rev Genet.*, v. 16, p. 379–394, 2015.

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

PEPSCAN. **CLIPS Discontinuous Epitope Mapping**. 2015. Disponível em: <<https://www.pepscan.com/precision-epitope-mapping/clips-discontinuous-epitope-mapping>>. Acesso em: 23. jun. 2019.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica**. 1 ed. Revinter Ltda. 2005.

RASTETTER, W.; MOLINA, A.; WHITE, C. A. Rituximab: Expanding Role in Therapy for

Lymphomas and Autoimmune Diseases. **Annu Rev. Med.**, v. 55, p. 477–503, 2004

REN, G.; KE, N.; BERKMEN, M. Use of the SHuffle strains in production of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, n. 26, p.1–5, 2016.

ROCHE. **A imunoterapia do câncer**. Disponível em: <<https://www.roche.com.br>>. Acesso em: 6 mai. 2019.

RODRIGUES, A.; CARNEIRO, L.; ZAGO, S.; NAI, G. Os Anticorpos e seus Fragmentos na Imunoterapia Contra o Câncer. **FACIDER - Revista Científica**, São Paulo, 2012.

RÜGER, R.; MÜLLER, D.; FAHR, A.; KONTERMAN, R. E. Generation of immunoliposomes using recombinant single-chain Fv fragments bound to Ni NTA-liposomes. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, p. 399–406, 2005.

SAFDARI, Y.; AHMANDZADEH, V.; KHALILI, M.; JALIANI, H. Z.; ZAREI, V.; MOGHADAM, V.E. Use of Single-Chain Antibody Derivatives for Targeted Drug Delivery. **Molecular Medicine**. 2016.

SANCHEZ, A. B.; NGUYEN, T.; DEMA-ALA, R.; KUMMEL, A. C.; KIPPS, T. J.; MESSMER, B.T. 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.

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

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

SINGH, V. K.; KWONG, L. C. Quantitation of soluble immune complexes by a microplate raji cell-elisa method. **Immunology Letters**, v. 8, p. 319–323, 1984.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 303–10, 2005.

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

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

STUDIER, F.W. ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymology**, v.185 p.60–89, 1990.

TEELING, J. L.; MACKUS, W. J.; WIEGMAN, L. J.; *et al.* The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. **J Immunol**, v.177, p. 362–371, 2006.

TEELING, J. L.; FRENCH, R. R.; CRAGG, M. S.; *et al.* Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. **Blood**, v. 104, p. 1793–1800, 2004.

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

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. **Nature Biotechnology**, v. 32, p. 992–1000, 2014.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 2018.

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

WIERDA, W. G.; KIPPS, T. J.; MAYER, K. J.; *et al.* Ofatumumab As Single-Agent CD20 Immunotherapy in Fludarabine-Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. **Journal of Clinical Oncology**. v. 28, n. 10, 2010.

WINTHROP, M. D.; DENARDO, S. J.; ALBRECHT, H. *et al.* Selection and characterization of anti-MUC-1 scFvs intended for targeted therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 10, p. 3845S–3853S, 2003.

WOLVERTON, S. E.; ARLOOK, T. **Terapêutica Dermatológica**. 3^o Edição. Rio de Janeiro. Elsevier. 2015.

YOKOTA, T.; MILENIC, D. E.; WHITLOW, M.; SCHLOM, J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. **Cancer Research**, v. 52, n. 12, p. 3402–3408, 1992.

YOUSEFI, M.; FARAJNIA, S.; MOKHTARZADEH, A.; AKBARIET, B.; KHOSROSHAHI, S. A.; MAMIPOUR, M.; DARIUSHNEJAD, H.; AHMADZADEH, V. 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. Highyield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 97, 2013.