



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

**LARISSA QUEIROZ PONTES**

**PROPOSIÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE DOMÍNIO VARIÁVEL  
(scFv) ANTI-CD20 PARA O DESENVOLVIMENTO DE BISPECÍFICOS *T-CELL*  
*ENGAGER* (BiTE)**

**FORTALEZA**

**2023**

LARISSA QUEIROZ PONTES

PROPOSIÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE DOMÍNIO VARIÁVEL (scFv)  
ANTI-CD20 PARA O DESENVOLVIMENTO DE BISPECÍFICOS *T-CELL ENGAGER*  
(BiTE)

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

Orientador: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

FORTALEZA

2023

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

---

P858p Pontes, Larissa Queiroz.  
Proposição de fragmentos de anticorpo de domínio variável (scFv) anti-CD20 para o desenvolvimento de bispecíficos t-cell engager (BiTE) / Larissa Queiroz Pontes. – 2023.  
84 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. Bispecíficos. 2. Engenharia de Anticorpos. 3. scFv. 4. Rituximabe. I. Título.

CDD 660.6

---

LARISSA QUEIROZ PONTES

PROPOSIÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO DE DOMÍNIO VARIÁVEL (scFv)  
ANTI-CD20 PARA O DESENVOLVIMENTO DE BISPECÍFICOS *T-CELL ENGAGER*  
(BiTE)

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

Aprovada em: 4/5/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

Prof. Dr. Clarissa Romero Teixeira  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

---

Profa. Dra. Soraya dos Santos Pereira  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

---

Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi  
Universidade de São Paulo (USP)



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

## AGRADECIMENTOS

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

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

À minha esposa Priscila Sales, por todo o companheirismo nesta caminhada, por me fazer enxergar e crer no meu potencial quando eu não acreditava, por fazer parte dos meus sonhos e me deixar fazer parte dos seus, por estar sempre pronta a me ajudar, não importa a hora nem o momento, por sempre ter uma palavra amiga e amável e por todo o amor, carinho e compreensão. À minha amiga de quatro patas Fifi, por ser companhia fiel durante tantos momentos, até os difíceis, principalmente na pandemia de COVID-19.

Aos amigos que a Biotecnologia me deu para a vida e tantos outros que a escalada acadêmica me fez encontrar. À Lia Pinho, pelo entusiasmo constante em nos fazer crescer, pelas palavras de incentivo no momento certo, pelos momentos de prontidão em ajudar.

Aos meus irmãos empreendedores, Marcus Rafael Lobo Bezerra, pelo compartilhamento diário de conhecimento e inspiração, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela parceria empreendedora de muitos anos. Ao Wallady da Silva Barroso, pela amizade sempre pronta a ouvir, pelo sorriso fácil em dias difíceis, pela ajuda constante na empresa. À Talita Abrante, pela amizade que nasceu em meio à rotina empreendedora. À Giovanna Souza, pela oportunidade de pleno aprendizado e pelas suas contribuições dentro e fora da empresa.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela orientação, pelo empenho em ensinar e me fazer crescer, por ter me instigando a ter senso crítico, proporcionando, assim, meu crescimento profissional e pelo aconselhamento diário. Ao meu colega de laboratório Igor Cabral, sempre tão solícito e à colega Larisse Cadeira. Às minhas irmãs que a Fiocruz me deu: Bruni Lima, Lívia Coelho, Vania Sousa, que sempre apresentam uma palavra amiga, um momento de

pensamento crítico em meio a um café da tarde. A todas as pessoas que trabalham na Fiocruz e que contribuíram de alguma forma com trabalhos de bancada, como a aluna de iniciação científica Julia Nogueira, as técnicas de laboratório, dentre tantas outras.

Aos meus colegas de Prêmio Jovem Pesquisador Promega: Josiane Trevisol, Noemia Parteli, Luiza Abdo, Rebeqa Fanti, Douglas Monteiro, Marcos Regueira, Dominique Rubenich e Thaís Silva por terem vivido essa experiência única de forma intensa e prazerosa. Ao Frederico Almeida e Pedro Esmeraldo, pela disponibilidade, solicitude e disposição em nos proporcionar uma experiência sensacional nos EUA e nas instalações da Promega em Madison.

À Funcap, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. À Fiocruz Ceará por ser a instituição que de fato me formou como profissional, que me fez ter ainda mais amor à profissão, me permitindo exercer a Biotecnologia de forma plena, aplicada e com a finalidade de ajudar ao próximo e me introduziu no universo da engenharia de proteínas e da biologia molecular. À Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo aprendizado acadêmico e não acadêmico e por me fazer enxergar e respeitar as diferenças.

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

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade

*Curie (1902)*

## RESUMO

O câncer é uma patologia caracterizada pela proliferação descontrolada de células que pode ocorrer em diferentes tecidos. É urgente o desenvolvimento de medicamentos capazes de remediar, reduzir os sintomas ou evitar metástases. Nesse contexto, a imunoterapia surge como uma das estratégias mais direcionadas para o tratamento das neoplasias. O Rituximabe é um anticorpo monoclonal utilizado no tratamento de linfomas. Seu mecanismo de ação se baseia na capacidade de ligação à proteína CD20 expressa em linfócitos B, levando à depleção destas. Uma das alternativas para fortalecer o sistema imunológico no tratamento de tumores é o uso de bispecíficos (BsAbs), anticorpos que se ligam a dois epítomos diferentes. Os bispecíficos do tipo *T-Cell Engager* (BiTEs), formado por dois scFv's unidos por um linker, são capazes de promover a aproximação de células T às células tumorais sem a necessidade de apresentação via MHC. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de novos BiTEs anti-CD20xCD3 com maior capacidade apoptótica. Foram obtidas 7 sequências mutantes de scFv do Rituximabe, além da sequência nativa, a partir de trabalho prévio do grupo. Houve uma investigação quanto à influência da cauda SUMO na interação dos scFv's, bem como foi avaliada a qualidade dos fragmentos de anticorpo expressos em vetor pET28a, onde comprovou-se a importância da cauda SUMO no *folding* mais adequado das proteínas. Realizou-se a citometria de fluxo com o objetivo de comprovar ligação das moléculas (scFv e BsAbs) com o CD20 expresso na membrana de células Raji, obtendo-se ligação apenas dos fragmentos NHA, JHA e CicHA. Realizou-se um ensaio de interferometria para quantificar a cinética de interação, onde constatou-se o  $K_D$  de 7,23  $\mu\text{M}$  para o MabThera (Rituximabe comercial); 1,46  $\mu\text{M}$  para NHA; para 0,57  $\mu\text{M}$  JHA e 0,43  $\mu\text{M}$  para CicHA, corroborando com os dados obtidos na citometria de fluxo. Assim, a sequência nativa do BiTE anti-CD20xCD3 foi adquirida comercialmente e as sequências mutantes, clonadas em vetor pETSUMO, foram expressas em *E.coli* SHUFFLE T7 e purificadas em colunas IMAC. As proteínas foram identificadas através da técnica de *Western Blot* usando anticorpo anti-HA-AP, o qual revelou a presença dos scFv's e dos bispecíficos. Dessa forma, conclui-se que o mutante CicHA apresentou afinidade 3x maior que a sequência nativa do Rituximabe em formato scFv, sendo um bom alvo para o desenvolvimento de BiTEs a serem utilizados no combate a tumores hematológicos.

**Palavras-chave:** Bispecíficos; Engenharia de Anticorpos; scFv; Rituximabe.

## ABSTRACT

Cancer is a pathology characterized by uncontrolled proliferation of cells that can occur in different tissues. It is urgent that drug development should be capable of mitigate, reduce symptoms or prevent metastasis. Thereby the aforementioned, immunotherapy happens to be one of the most successful strategies on cancer treatment. Rituximab is a monoclonal antibody used on lymphoma treatment. Its mechanism of action relies on binding capacity on CD20 protein, expressed on B lymphocytes, leading to depletion. One of the alternatives to strengthen immune system on tumor treatment is bispecifics, which are antibodies that bind to two different epitopes. Bispecific T-Cell Engager (BiTEs) are composed by two scFv's gathered by a polypeptide linker and they are able to bring together T cells and tumor cells without MHC presentation. The present work proposes higher affinity-antibody fragments in order to develop new anti-CD20 BiTEs. 7 mutant sequences were acquired previously, besides the Rituximab's wild-type scFv sequence. There was performed an investigation about SUMO tag influence on binding activity and the antibody fragments folding in pET28a vector have been evaluated, where it was observed that SUMO tag was indeed essential to correct folding. Flow cytometry was performed to analyze binding among mutant antibody fragments, BsAbs and CD20 molecule expressed in Raji cells membrane, where it was possible to observe binding only for the entitled fragments NHA, JHA and CicHA. An interferometry assay was performed to quantify kinetic interaction of proteins. The affinity constant obtained was 7,23  $\mu\text{M}$  for MabThera; 1,46  $\mu\text{M}$  for NHA; 0,57  $\mu\text{M}$  for JHA and 0,43  $\mu\text{M}$  for CicHA, confirming flow cytometry data. Thereby, wild-type sequence in anti-CD20xCD3 BiTE format was acquired and the mutant sequences were cloned into pETSUMO vector, expressed in *E.coli* SHUFFLE T7 and purified automatically in AKTA chromatographer. Protein immunodetection was performed by Western Blot technique using anti-HA-AP as the secondary antibody. This assay revealed scFv's and bispecifics presence. Therefore, we conclude that CiCHA mutante presented 3-fold affinity higher than wild-type Rituximab's sequence in scFv format. In this sense, it is a good target for development of BiTEs which can be used to treat blood cancers.

**Keywords:** Bispecifics; Antibody Engineering; scFv; Rituximab.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura de um anticorpo IgG1 .....	20
Figura 2	– Exemplos de fragmentos obtidos por engenharia de anticorpos .....	21
Figura 3	– Esquema elucidativo das abordagens mais comuns de engenharia de proteínas .....	22
Figura 4	– Mecanismos de ação do Rituximabe .....	25
Figura 5	– Breve histórico dos anticorpos bispecíficos .....	27
Figura 6	– Blocos construtores de anticorpos bispecíficos .....	30
Figura 7	– Receptor de Célula T (TCR) .....	31
Figura 8	– Mecanismo de ação dos BiTEs .....	32
Figura 9	– Vias de indução de apoptose desencadeadas por bispecíficos .....	34
Figura 10	– Resumo gráfico das atividades .....	38
Figura 11	– BiTE clonado em vetor pETSUMO .....	42
Figura 12	– Representação da estratégia utilizada para selecionar a população de células de linfócitos B .....	48
Figura 13	– Análise óptica realizada na interferometria .....	49
Figura 14	– <i>Plots</i> de interação dos scFv's com e sem cauda SUMO ao alvo CD20 expresso na membrana de células Raji .....	56
Figura 15	– Análise eletroforética e <i>Western Blot</i> dos scFv's expressos em vetor pETSUMO .....	57
Figura 16	– Representação esquemática da cobertura aminoacídica de NatS .....	59
Figura 17	– Representação esquemática da cobertura aminoacídica da banda SUMO ...	60
Figura 18	– Análise eletroforética em gel de agarose 1% da PCR de colônias confirmatória da clonagem .....	61
Figura 19	– Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos scFv's .....	61
Figura 20	– Histograma do scFv pNat clonado em vetor pET28a .....	62

Figura 21	– Representação esquemática da cobertura aminoacídica de pNat .....	63
Figura 22	– Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas para obtenção dos bispecíficos mutantes .....	64
Figura 23	– Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5% dos fragmentos de anticorpos após a purificação por cromatografia de afinidade .....	65
Figura 24	– Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 10% dos bispecíficos após a purificação por cromatografia de afinidade .....	66
Figura 25	– <i>Western blot</i> dos scFv's nativo e mutantes .....	67
Figura 26	– <i>Western blot</i> dos bispecíficos .....	68
Figura 27	– Histogramas obtidos na citometria de fluxo dos BiTEs .....	73
Figura 28	– Sensorgrama de análises de cinética de interação dos fragmentos de anticorpos de sequências nativa e mutantes .....	75



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação do deslocamento de fluorescência observada da intensidade de mediana de fluorescência entre NHA, JHA e CicHA .....	73
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Bispecíficos no mercado oncológico .....	28
Quadro 2 – Histogramas obtidos na citometria de fluxo de única marcação com as células Raji e K562 com scFv sequência nativa e mutantes .....	69
Quadro 3 – Parâmetros cinéticos obtidos com a técnica de interferometria .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACI	Imunoterapia de células adotivas
Abs	Anticorpos
ADCC	Citotoxicidade mediada por Células Anticorpo-dependentes
AP	Fosfatase Alcalina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BiTE	<i>Bispecific T-cell Engager</i>
BLI	Interferometria em Bio-camada
BSA	Albumina Sérica Bovina
BsAbs	Bispecíficos
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CDC	Citotoxicidade dependente de Complemento
CDR	Região Determinante de Complementariedade
CiTE	<i>Checkpoint-inhibitory T cell Engager</i>
CQB	Certificado de Qualidade em Biossegurança
DD	Domínio de Morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	<i>Forward Scatter</i>
ICAD	DNases ativadas por caspases
Ig	Imunoglobulina
IMAC	Cromatografia de afinidade com metal imobilizado
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosose
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based Activation Motif</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
$K_a$	Constante de Associação
$K_D$	Constante de afinidade
$K_{dis}$	Constante de Dissociação
LB	Luria Bertani

LH	Linfoma Hodgkin
LNH	Linfoma Não-Hodgkin
mAb	Anticorpo Monoclonal
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PBST	PBS + 0,05% Tween 20
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Fluoreto de Fenilmetano Sulfonil
scFv	<i>Single-chain fragment variable</i>
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície
SSC	<i>Side Scatter</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TCR	Receptor de Célula T
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TriKE	<i>Trispecific Killer Engager</i>
V <sub>H</sub>	Domínio variável da cadeia pesada
V <sub>L</sub>	Domínio variável da cadeia leve

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\chi$	<i>Chi</i>
Da	Daltons
\$	Dólar
$\delta$	Delta
$\varepsilon$	Epsilon
$\gamma$	Gama
K	Quilo
®	Marca Registrada
$\mu$	Micro
m	Mili
n	Nano
%	Porcentagem
R <sup>2</sup>	Regressão Linear
U	Unidade Enzimática
$\zeta$	Zeta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1</b>	<b>O papel dos anticorpos nas imunoterapias</b> .....	19
<b>1.2</b>	<b>CD20 e Rituximabe: exemplo de imunoterapia oncológica</b> .....	23
<b>1.3</b>	<b>Os anticorpos bispecíficos</b> .....	26
1.3.1	<i>Mercado dos BsAbs</i> .....	27
1.3.2	<i>BiTEs – Bispecific T cell Engagers</i> .....	31
1.3.3	<i>Sinapse Imunológica e o mecanismo de ação dos BiTEs</i> .....	32
1.3.4	<i>Produção dos BiTES</i> .....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	37
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	37
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	38
<b>3.1</b>	<b>Preparo de cepas bacterianas e aquisição de vetores utilizados no trabalho</b> .....	40
<b>3.2</b>	<b>Obtenção dos bispecíficos</b> .....	41
3.2.1	<i>Obtenção de mutantes no formato de bispecíficos</i> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Sequenciamento Sanger</b> .....	43
<b>3.4</b>	<b>Expressão de proteínas em sistema procarioto</b> .....	44
<b>3.5</b>	<b>Purificação de proteínas</b> .....	44
<b>3.6</b>	<i>Western Blot</i> .....	45
<b>3.7</b>	<b>Cultura de células eucarióticas</b> .....	46
<b>3.8</b>	<b>Citometria de fluxo</b> .....	47
<b>3.9</b>	<b>Cinética de interação dos scFv's com o antígeno por interferometria</b> .....	48
<b>3.10</b>	<b>Investigação de proteínas mal formadas durante a expressão recombinante dos scFv's</b> .....	50
3.10.1	<i>Citometria de fluxo dos fragmentos de anticorpo com cauda SUMO</i> .....	50
3.10.2	<i>Western Blot dos picos cromatográficos</i> .....	50
3.10.3	<i>Espectrometria de massas a partir da excisão de spots em gel de SDS-PAGE</i> ...	51
3.10.4	<i>Espectrometria de massas do scFv sequência nativa expressa em vetor pET28a</i>	53
3.10.5	<i>Clonagem em vetor pET28a</i> .....	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56

<b>4.1</b>	<b>Investigação de proteínas mal formadas durante a expressão recombinante dos scFv's</b> .....	56
4.1.1	<i>Citometria de fluxo dos fragmentos de anticorpo com cauda SUMO</i> .....	56
4.1.2	<i>Imunodeteção dos scFv's com cauda SUMO</i> .....	57
4.1.3	<i>Espectrometria de massas a partir da excisão de spots em gel de SDS-PAGE</i> ..	58
4.1.4	<i>Clonagem em vetor pET28a</i> .....	60
4.1.5	<i>Espectrometria de massas do scFv sequência nativa expressa em vetor pET28a</i> .....	63
<b>4.2</b>	<b>Clonagem dos mutantes em formato BiTE</b> .....	64
<b>4.3</b>	<b>Expressão e purificação das proteínas recombinantes</b> .....	65
<b>4.4</b>	<b>Western Blot</b> .....	67
<b>4.5</b>	<b>Citometria de Fluxo</b> .....	68
<b>4.6</b>	<b>Interferometria</b> .....	74
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

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

O câncer hematológico se caracteriza como várias doenças heterogêneas que diferem de outros tipos de tumores sólidos pela presença de sintomas relacionados com falhas na produção de células sanguíneas pela medula óssea ou até mesmo a supressão dessa atividade em outros órgãos do sistema linfático (BUTTON *et al.*, 2017). Os linfomas são enfermidades que acometem os linfonodos, sendo morfológicamente divididos em linfomas do tipo Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH). No Brasil, observou-se 10.000 novos casos por ano de LNH entre os anos de 2020-2022 em homens e mulheres. No Ceará, os casos de LNH figuram entre os 10 mais incidentes, tendo apresentando em 2020 uma taxa de cerca de 5 novos casos para cada 100 mil habitantes (INCA, 2020).

Nos últimos anos, as pesquisas sobre a tumorigênese e progressão tumoral tem sido aceleradas após descobertas sobre o microambiente tumoral no tangente a aspectos moleculares e celulares que o caracterizam, os chamados “*Hallmarks* do câncer”, como a capacidade de habilitar uma certa plasticidade celular no ambiente pro-inflamatório tumoral, além de regular a expressão gênica de genes não-essenciais e também sofrer silenciamento epigenético (HANAHAN, 2022). Uma vez que as moléculas do complexo de histocompatibilidade maior ou MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) do tipo I entre outras moléculas da via de apresentação de antígenos não são essenciais para a viabilidade e o crescimento celular, as células tumorais são capazes de reduzir a expressão ou até mesmo perder a apresentação de antígenos por esta via, sendo assim menos estimulante à ação das células T CD8 (citotóxicas), ocorrendo, assim, o mecanismo de evasão do sistema imune por parte das células cancerosas (CERVANTES-VILLAGRANA *et al.*, 2020; DHATCHINAMOORTHY; COLBERT; ROCK, 2021).

A abordagem das imunoterapias, isto é, o uso de anticorpos no tratamento oncológico, tem sido um sucesso na resposta clínica, pois é mais específica e direcionada ao alvo do que as terapêuticas tradicionais, como a quimioterapia. Com os avanços nos estudos de características intrínsecas das células tumorais e do microambiente que as cerca, novas alternativas surgem a fim de mitigar a ação sistêmica das células malignas usando o sistema



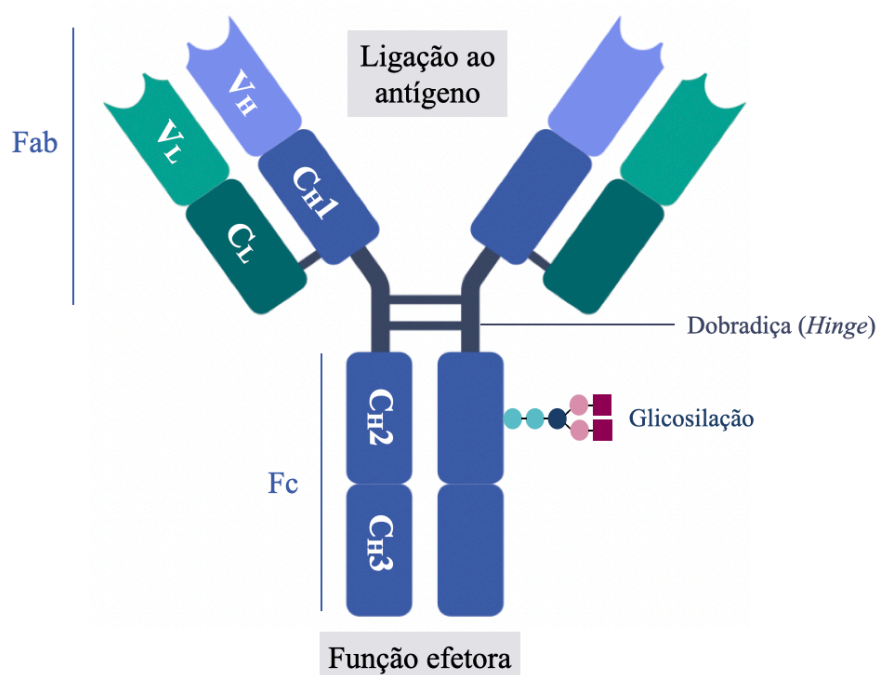
imune para contornar os mecanismos impostos e combater essas células defeituosas (ESFAHANI *et al.*, 2020). Estratégias como o uso combinado de anticorpos contra inibidores de checkpoint imunológico (CTLA-4 e PD-1/PD-L1), a modificação de receptores nas células T para uma ação mais específica nas células tumorais (Células CAR-T) e o tratamento com anticorpos com dupla especificidade, os chamados bispecíficos, figuram como as mais promissoras e inovadoras dentro da clínica, são as que movimentam mais investimentos e detém maior atenção da indústria farmacêutica atualmente (BRINKMANN; KONTERMANN, 2017; LEE; LEE; HEO, 2019; SCHMIDT; OTONI, 2022).

### 1.1 O papel dos anticorpos nas imunoterapias

Os anticorpos (Abs, do inglês *antibodies*), também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas circulantes produzidas em resposta à exposição a estruturas estranhas ao organismo, conhecidas como antígenos. Possuem, como característica primordial, a alta especificidade no reconhecimento desses antígenos, sendo esta uma consequência da estrutura dos Abs (KENNEDY *et al.*, 2018). Um esquema ilustrativo da estrutura de um anticorpo é mostrado na figura 1, onde se observam duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Cada cadeia é formada por domínios diferentes, com função definida. A cadeia leve é composta por um domínio variável ( $V_L$ ), ou (domínio variável da cadeia leve) e um domínio constante ( $C_L$ ). A cadeia pesada é formada por um domínio variável ( $V_H$ ) e três domínios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  e  $C_{H3}$ ). A região composta pelas cadeias variáveis e  $C_L$  e  $C_{H1}$  das cadeias constantes também é conhecida por fragmento de ligação ao antígeno (Fab, do inglês *Antigen Binding Fragment*) devido à presença de regiões determinantes de complementariedade (CDRs, do inglês *Complementarity Determining Regions*), as quais são hipervariáveis entre os anticorpos, sendo responsáveis pela interação com os diferentes antígenos. Cada região variável ( $V_H$  e  $V_L$ ) possui 3 CDRs e são nessas regiões onde se observa, de fato, a especificidade da interação antígeno-anticorpo, sendo possível, ainda, realizar estudos de cinética nesta ligação, pois ela determina a intensidade e a afinidade com que um anticorpo se liga ao seu antígeno. O local, a nível molecular, no anticorpo onde ocorre a interação é chamado de paratopo e essa região no antígeno é chamada de epítipo (MINISTRO; MANUEL; GONCALVES, 2019). A porção Fc (do inglês, *fragment crystallizable*) é responsável pelo recrutamento de células do sistema imune, iniciando respostas de função efetora nos alvos. Ainda nessa região, é possível observar a presença de glicosilações, as quais são responsáveis por promover conformações na cadeia proteica, bem como por modular a interação com

receptores de Fc (Fc $\gamma$ R), importantes desencadeadores de mecanismos efetores (FONSECA *et al.*, 2018). As glicosilações, ainda, apresentam papel importante na proteção proteolítica da molécula, influenciando na farmacocinética e farmacodinâmica do anticorpo, promovendo aumento no tempo de meia-vida em circulação. A região localizada entre a Fab e a Fc é chamada de dobradiça e confere flexibilidade à molécula de anticorpo (KENNEDY *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura de anticorpo IgG1

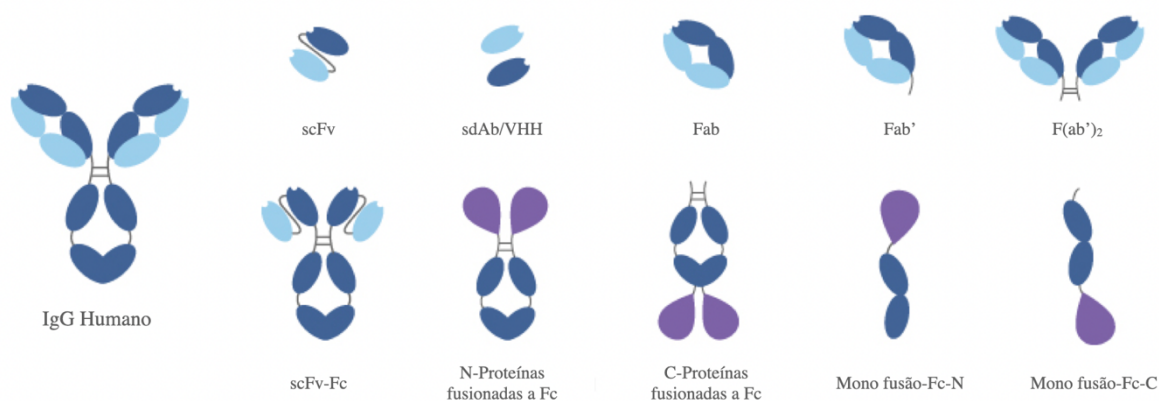


Fonte: Elaborado pela autora. As principais regiões de um anticorpo IgG1 estão ilustradas na figura acima. As duas cadeias maiores de cada lado do anticorpo, compostas por regiões variáveis e constantes, são unidas por ligações dissulfeto na dobradiça, que confere flexibilidade à molécula. Fab: Fragmento de ligação ao antígeno; Fc: Fragmento cristalizável. As cadeias CH2 e CH3 são responsáveis por recrutar células do sistema imune, realizando a função efetora desses anticorpos.

A engenharia de anticorpos é uma área da ciência que visa o estudo, a descoberta e a manipulação de fragmentos de anticorpos que podem ser utilizados em tratamentos e diagnósticos de doenças (STROHL, 2018). A partir dessa área, é possível entender a importância dos domínios de uma Ig e, assim, utilizá-los para estudar características próprias, tais como especificidade, afinidade com o alvo, termoestabilidade, etc (CHIU *et al.*, 2019). A figura 2 ilustra alguns dos fragmentos obtidos a partir de técnicas de engenharia de anticorpos, dentre eles o scFv (do inglês, *single chain fragmente variable*), que compreende um VH e um VL, unidos por um *linker* polipeptídico que confere flexibilidade à molécula. Outro fragmento comumente utilizado em engenharia de anticorpos é o Fab, que compreende as cadeias leve e

$V_H$  e  $C_{H1}$ . Esses dois fragmentos são possíveis de expressão em sistemas procariotos, o que reduz os custos do processo, devido à ausência de região Fc (glicosilada) e seu menor tamanho (TILLER; TESSIER, 2015). Muitas vezes é importante o uso de fragmentos devido à sua maior facilidade de manipulação em laboratórios, porém, após as análises e modificações necessárias, é comum remontar esses fragmentos em formatos maiores, como um IgG completo, os quais podem possuir maior tempo de meia vida em circulação, modificações pós-traducionais, elicitar o recrutamento de células do sistema imune, etc.

Figura 2 – Exemplos de fragmentos obtidos por engenharia de anticorpos



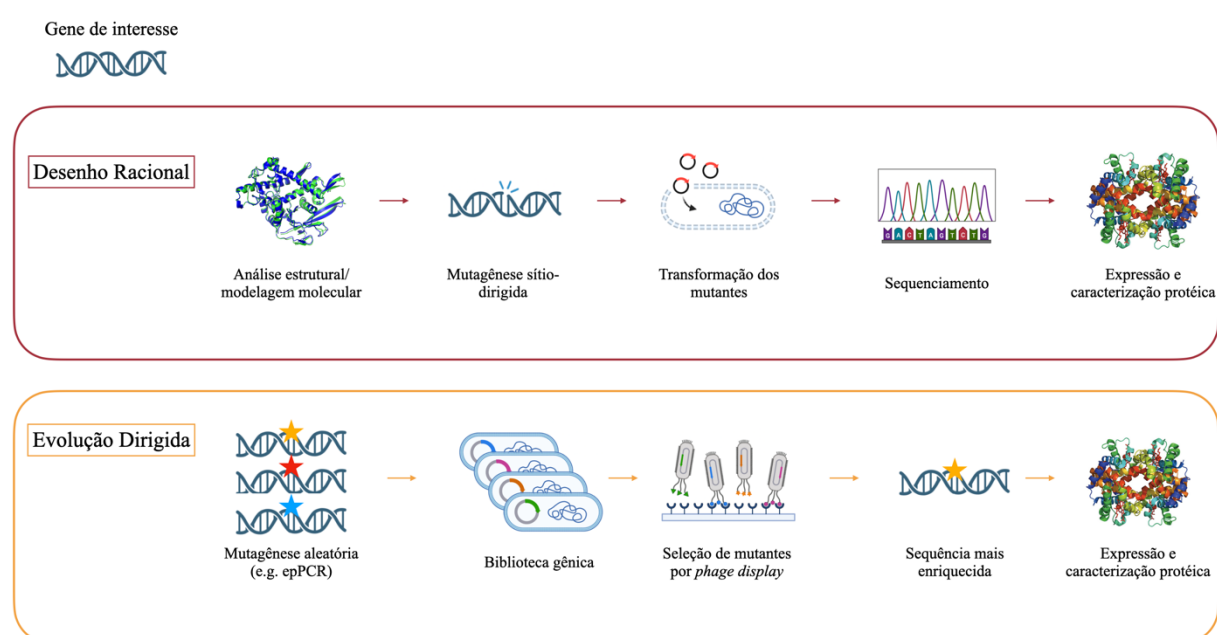
Fonte: Adaptado de Biologics International Corp (<https://www.biologicscorp.com/recombinant-antibody-service/#.Yyl82i-B1pQ>). A partir de um IgG1 completo, pode-se obter inúmeros fragmentos, como os monovalentes, que apresentam apenas um sítio de ligação ao antígeno, como os scFv's; os bivalentes, como o formato  $F(ab')_2$ ; os monospecíficos, que se ligam a apenas um alvo; e os bispecíficos, que se ligam a dois alvos diferentes. scFv: *single-chain fragment variable*.

A partir de 1975, com a descoberta da técnica de hibridoma para o surgimento de novos anticorpos monoclonais, deu-se o desenvolvimento de outras abordagens, a fim de obter Abs menos imunogênicos, de maior afinidade, que pudessem ser produzidos em escala produtiva com maior facilidade. As duas abordagens mais difundidas de engenharia de anticorpos são o desenho racional e a evolução dirigida e, em ambas, inúmeras ferramentas de biologia molecular são utilizadas para obtenção de novos anticorpos contra determinado alvo (CHIU *et al.*, 2019).

No desenho racional, através de ferramentas de bioinformática, a estrutura das moléculas depositadas em bancos de dados é utilizada para formular um modelo estrutural, compreender a interação com o alvo e realizar simulações, por curtos períodos de tempo, assim como ocorre nas ligações, como essas moléculas se comportam em um ambiente que simula

condições fisiológicas *in silico*, como o que acontece nas dinâmicas moleculares (SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Portanto, é comum no desenho racional que as análises de bioinformática forneçam sugestões de mutações, que podem ser executadas na bancada por técnicas de biologia molecular, como a mutagênese sítio-dirigida para melhorias em características específicas dos anticorpos, como afinidade, termoestabilidade, entre outras (GOLLIHAR JR, 2017), conforme ilustrado na figura 3. Já a abordagem de evolução dirigida promove a descoberta de novos anticorpos através da técnica de *phage display*, onde uma biblioteca gênica contendo determinados repertórios de fragmentos de anticorpos (bibliotecas naives, imunes e de maturação de afinidade) é exposta, na superfície de bacteriófagos, a diferentes rodadas de seleção contra o alvo, obtendo-se, assim, moléculas com realce de características, como afinidade e termoestabilidade (SAEED *et al.*, 2017), conforme também pode ser observado na figura 3. A sequência que melhor se encaixa nos parâmetros desejados é obtida, geralmente, através de sequenciamento de nova geração aliado a ferramentas de bioinformática próprias para análise de grandes volumes de dados gerados no NGS (MARANHÃO *et al.*, 2020). Uma vez obtida a sequência nucleotídica enriquecida, é possível utilizá-la em diferentes formatos de anticorpos para uso em ensaios que comprovem a melhoria na propriedade desejada.

Figura 3 – Esquema elucidativo das abordagens mais comuns de engenharia de proteínas



Fonte: Elaborado pela autora. A partir de um gene de interesse, pode-se melhorar propriedades das moléculas, como afinidade e estabilidade de anticorpos através da engenharia de proteínas. O desenho racional necessita que a proteína de interesse tenha sido cristalizada, pois a partir das coordenadas cristalográficas é possível analisar a

estrutura e, através de ferramentas computacionais, sugerir mutações. Na evolução dirigida, mutações podem ser inseridas de forma aleatória na sequência, porém a construção de uma biblioteca gênica não é algo trivial, sendo laborioso e necessitando de pessoal capacitado. Rodadas de seleção chamadas de *biopanning* são comumente utilizadas a fim de obter sequência cujas propriedades possam ser realçadas. Qualquer que seja a abordagem selecionada, ao final do processo, deve-se expressar e caracterizar as moléculas enriquecidas no processo.

O entendimento da cinética de ligação entre antígeno e anticorpo é fundamental para o sucesso da engenharia de proteínas, bem como de imunoenaios (DINH *et al.*, 2016; HUNTER; COCHRAN, 2018). A análise de afinidade ocorre através da medida das constantes de associação ( $K_a$ ) e de dissociação ( $K_{dis}$ ) entre epítipo e parátipo, originando assim a razão  $K_{dis}/K_a$ , também conhecida como  $K_D$ , fornecendo informações quantitativas a cerca da afinidade com que o anticorpo se liga e desliga do antígeno. Quanto maior o valor de  $K_a$  (consequentemente, menor o valor de  $K_D$ ), maior a afinidade do mAb (MURPHY, 2014).

Existem diversas tecnologias que permitem a obtenção dos valores destas constantes, como a Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR, do inglês *Surface Plasmon Resonance*), a Termoforese e a Interferometria. Na técnica de SPR, é feita uma análise com o ligante imobilizado em um chip, onde o analito passa em solução, em fluxo contínuo. Essa interação modifica o índice de refração do meio na superfície do sensor de leitura, proporcionando mudanças que são calculadas e traduzidas para constante de afinidade (WANG; THIEMANN; CHEN, 2022). A interferometria utiliza a diferença entre o comprimento de onda da luz antes e após a interação do ligante com o analito como base para os cálculos de constante de afinidade. O ligante é carregado no biosensor e, logo após, há a interação com o alvo. Dessa forma, é possível obter matematicamente os valores das constantes de associação e dissociação, as quais indicam como ocorre a interação do anticorpo com o antígeno (YANG *et al.*, 2017).

## 1.2 CD20 e Rituximabe: exemplo de imunoterapia oncológica

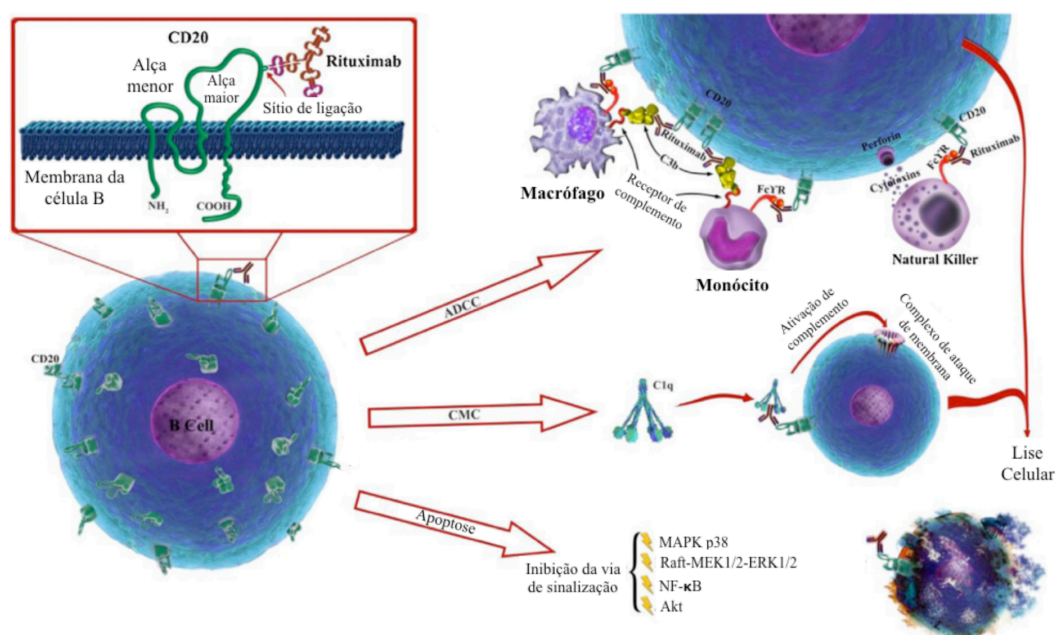
O Rituximabe (MabThera<sup>®</sup>, Rituxan<sup>®</sup>) é um anticorpo monoclonal quimérico (tipo I), o qual possui uma região Fc IgG1 humana e uma região variável murina, a qual reconhece o antígeno CD20. É utilizado no tratamento de linfoma não-Hodgkin, linfoma difuso de grandes células B, leucemia linfocítica crônica, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico. Pode ser administrado com outros fármacos, como ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (R-CHOP), mas também em combinação com alguns quimioterápicos, associado e conjugado a outras pequenas moléculas ou até mesmo como uma monoterapia (PIERPONT; LIMPER; RICHARDS, 2018).

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

O Rituximabe foi o primeiro anticorpo monoclonal a ser aprovado, pelo FDA, em 1997, sendo seu uso voltado ao tratamento de LNH. Segundo Du *et al.* (2007), após estudos de cristalografia com a porção Fab do anticorpo co-cristalizada com a alça maior do CD20, o epítipo do Rituximabe corresponde aos resíduos 163-187 do loop extracelular maior do CD20. Esta região contém duas porções essenciais para o sucesso na interação entre o anticorpo e o antígeno: os resíduos 170ANPSE174, os quais estão intrinsecamente relacionados à ligação com mAb e a ligação dissulfeto formada entre os resíduos de cisteína nas extremidades do epítipo, sem a qual, observou-se a incapacidade de ligação do anticorpo (ROUGÉ *et al.*, 2020).

Os mecanismos de ação pelos quais o Rituximabe age são diversos, incluindo Citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC, do inglês *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*) (majoritária), citotoxicidade dependente de complemento (CDC, do inglês *Complement-dependent Cytotoxicity*) e, em menor intensidade, apoptose, conforme ilustrado na figura 4 (JAIN; O'BRIEN, 2013; SEYFIZADEH *et al.*, 2016). A ADCC é desencadeada através da ligação da região Fc do anticorpo com o receptor FcγR presente nas células efetoras do sistema imune, como células NK, macrófagos e granulócitos. CDC é estimulada a partir do recrutamento de moléculas do complemento pelo reconhecimento via porção Fc do anticorpo ligado ao CD20, promovendo a lise da célula tumoral. A via de toxicidade direta, ou apoptótica, provém da afinidade de ligação entre o anticorpo e o epítipo. Em geral, as vias de sinalização que levam a célula cancerosa à apoptose são complexas e envolvem diversas moléculas sinalizadoras, fatores de transcrição e proteínas intermediárias. Algumas rotas de sinalização estudadas são a via de inibição de MAPK, de NF-κB e Akt (BAGACEAN *et al.*, 2016; SEYFIZADEH *et al.*, 2016). O Rituximabe apresenta constante de afinidade na ordem de  $10^{-9}$  M, propriedade que pode ser melhorada para o aumento da morte celular por apoptose. Essa afinidade pelo antígeno é crítica para sua aplicação terapêutica e advém de diversas interações, como as eletrostáticas, hidrofóbicas, salinas, entre outras em resíduos específicos nas CDRs (FUKUNAGA; TSUMOTO, 2013).

Figura 4 – Mecanismos de ação do Rituximabe



Fonte: Adaptado de SEYFIZADEH *et al.*, 2016. Mecanismos de ação apresentados pelo mAb Rituximabe: ADCC (Citotoxicidade dependente de anticorpos), CMC (Citotoxicidade mediada por complemento) e apoptose (representada a nível molecular pelas vias de sinalização desencadeadas pelo anticorpo), sendo este o mecanismo menos prevalente dos três citados.

A imunoterapia refere-se ao tratamento que modula o sistema imune do paciente de forma dinâmica para eliminar tumores em diversos alvos e por diferentes estratégias (TAN; LI; ZHU, 2020). O objetivo final desse tipo de tratamento é fortalecer a imunidade para que o sistema imune regule o microambiente tumoral, promovendo, assim, o recrutamento de células citotóxicas e a eliminação das células tumorais (ESFAHANI *et al.*, 2020).

Dentre as inúmeras alternativas nesta área, destacam-se, nos últimos anos, as terapias contra inibidores de *checkpoint* imunológico, que regulam a inibição das células imunes (ESFAHANI *et al.*, 2020), a imunoterapia de células adotivas (ACI, do inglês *adoptive cellular immunotherapy*), que consiste em uma modificação genética de receptores celulares do próprio paciente, como o das células T, produzindo-se as chamados *CAR-T Cells* (do inglês *Chimeric Antigen Receptor*), as quais estão obtendo sucesso na resposta clínica de tumores hematológicos (SWIECH *et al.*, 2020). Outra abordagem que tem ganhado bastante destaque é o uso de anticorpos de múltipla especificidade, como os bispecíficos. Os anticorpos chamados de bispecíficos (BsAbs, do inglês *bispecific antibodies*) apresentam duas especificidades diferentes, incluindo duas diferentes regiões variáveis de anticorpos monoclonais, sendo essas responsáveis pela interação do anticorpo com o antígeno (VIARDOT; BARGOU, 2018). Dessa

forma, os BsAbs são capazes de se ligar a dois antígenos diferentes ou dois epítomos no mesmo antígeno.

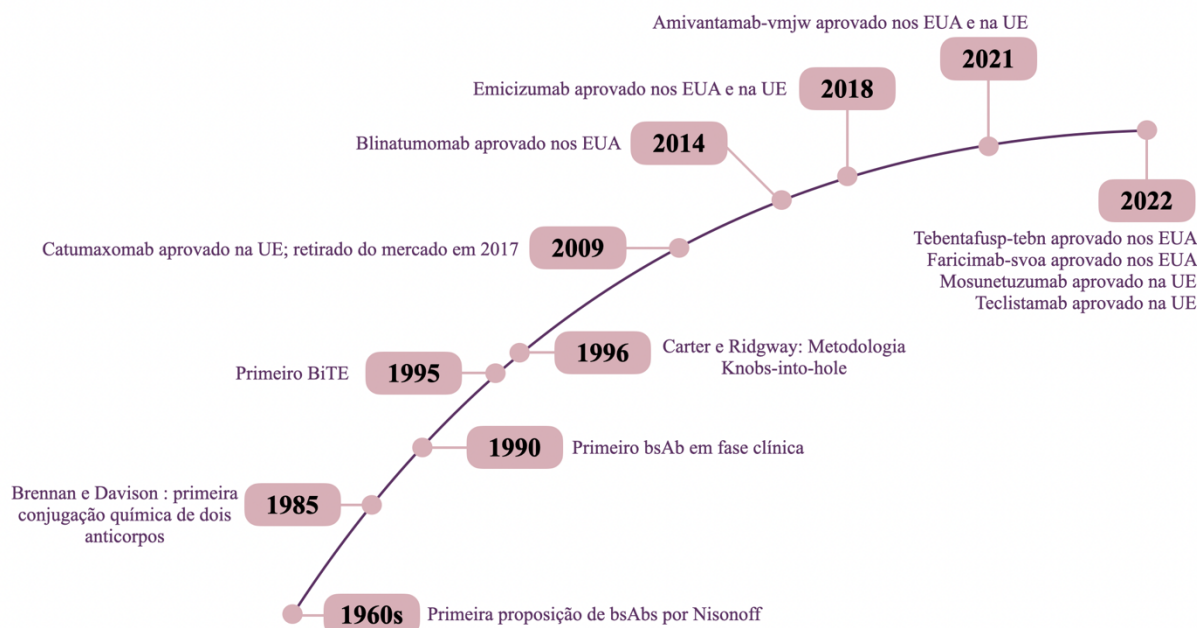
### 1.3 Os anticorpos bispecíficos

O conceito original de bispecífico refere-se a um anticorpo que possui dois pontos de ligação diferentes com o alvo. Os primeiros relatos sobre o termo bispecífico para esse tipo de molécula surgiram nos anos 1960, por Nisonoff, que liderava um grupo de pesquisa que estudava a arquitetura dos anticorpos (LABRIJN *et al.*, 2019).

A figura 5 relata um breve histórico sobre os BsAbs, incluindo alguns do mercado. Os conceitos e o entendimento estrutural/funcional dessas moléculas evoluíram a partir de estudos sobre a conjugação química de dois anticorpos, proposto por Brennan e Davison. Em 1990, houve a entrada do primeiro BsAb em fase clínica, resultando, alguns anos mais tarde, no primeiro BiTE (do inglês, *Bispecific T-cell Engager*) anti-CD3x17-1A, composto por dois scFv's unidos por um pequeno *linker* peptídico, expresso em sistema procarioto. Em 1996, Carter e Ridway desenvolveram, através de análises de modelos estruturais e interações eletrostáticas, a metodologia "*Knobs-into-Holes*", visando aumentar a taxa de sucesso na heterodimerização dos bispecíficos, isto é, aumentando a proporção de moléculas heterodiméricas (uma cadeia variável para cada alvo diferente) em detrimento às moléculas homodiméricas (anticorpo completo contra um único alvo). Isso tornou possível a comercialização em larga escala de produtos bispecíficos (LI; ER SAW; SONG, 2020). Em 2009, foi aprovado, por órgãos regulatórios europeus, o primeiro bispecífico do mercado, o Catumaxomab, um bispecífico IgG anti-CD3xEPCAM, que foi retirado do mercado devido a problemas na comercialização (CARTER; LAZAR, 2018). Em 2014, foi aprovado o Blinatumomab, um BiTE anti-CD3xCD19, usado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (SEDYKH *et al.*, 2018). Em 2018, Emicizumab foi aprovado para uso em pacientes hemofílicos, sendo o primeiro para tratamento em doenças não-oncológicas. Após a pandemia de COVID-19, decretada em 2020, houve uma mobilização da indústria farmacêutica para a produção de vacinas, o que retardou o avanço na produção de BsAbs. Já em 2021, houve a aprovação do bispecífico Amivantamab-vmjw, utilizado no tratamento de câncer de pulmão, e, em 2022, o surgimento de Tebentafusp-tebn, Faricimab-svoa, Mosenutuzumab e Teclistamab.



Figura 5 – Breve histórico dos anticorpos bispecíficos



Fonte: Elaborada pela autora. UE: União Europeia. BiTE: *Bispecific T-cell Engager*. Catumaxomab foi primeiramente indicado para o tratamento de pacientes com ascite maligna como consequência de carcinoma epitelial. No entanto, devido a dificuldades na produção em larga escala de uma molécula heterodimérica, este produto foi retirado do mercado. Emicizumab é indicado para uso no tratamento de hemofílias. Os demais bispecíficos citados são melhor descritos na seção posterior.




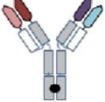

Ao longo desses anos, os bispecíficos foram estudados e caracterizados quanto a estrutura e função. No tocante à funcionalidade dos bispecíficos, tem-se duas grandes divisões – meramente didáticas –: BsAbs combinatoriais e os chamados BsAbs “*obligate*”. Os BsAbs combinatoriais apresentam atividade ou funcionalidade que também podem ser obtidas ao se usar os anticorpos de forma separada, como se a terapia fosse utilizada com dois anticorpos separados. A abordagem dos BsAbs “*obligate*” refere-se às moléculas que apresentam atividade ou funcionalidade dependente da ligação física entre as duas especificidades e que não podem ser obtidas utilizando os anticorpos de forma separada (LABRIJN *et al.*, 2019).

### 1.3.1 Mercado dos BsAbs

Em 2020, o mercado de anticorpos bispecíficos movimentou cerca de US\$ 490 milhões e espera-se que em 2027, esses valores cheguem em US\$810 milhões. O número crescente de pessoas com câncer e doenças infecciosas, especialmente COVID-19, impulsionou esse mercado a aumentar a produção e direcioná-la para esses tratamentos (BRANDESSENCE REPORT, 2021). Grandes farmacêuticas, como Roche, AbbVie, Amgen e OncoMed são as

predominantes em lançamento dessas moléculas terapêuticas no mercado. O quadro 1 ilustra os anticorpos já em uso por pacientes em tratamentos direcionados. Vale ressaltar que há mais de uma centena de estudos clínicos, em diferentes fases, buscando novos anticorpos bispecíficos.

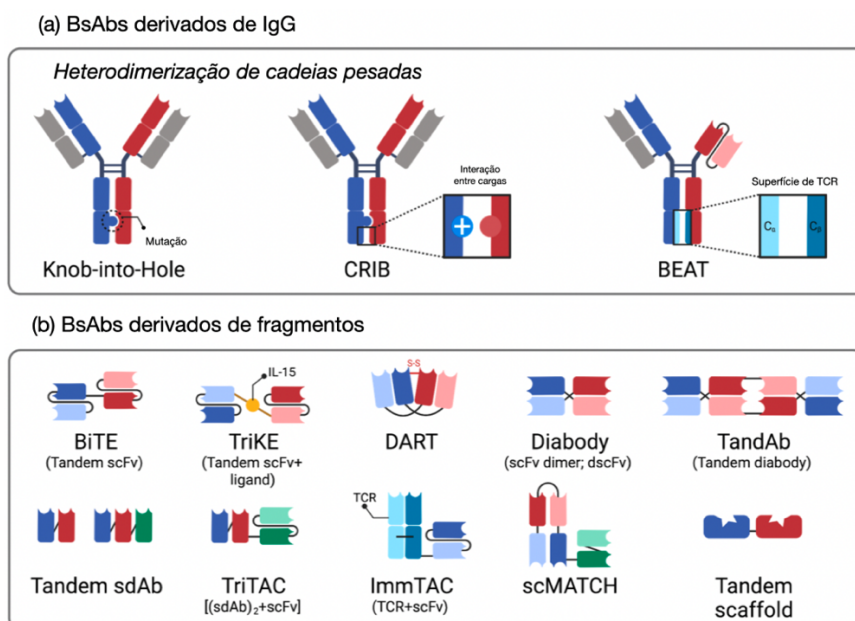
Quadro 1 – Bispecíficos no mercado oncológico

<b>Nome do BsAb</b>	<b>Empresa</b>	<b>Indicação clínica</b>	<b>Alvo</b>	<b>Formato</b>
Blinatumomabe (Blincyto®)	Amgen	Leucemia Linfocítica Aguda	CD19xCD3	BiTE 
Amivantamabe- vmjw (Rybrevant®)	Janssen Biotech	Câncer de pulmão de grandes células	EGFRxMET	<i>IgG-like</i> “DuoBody” 
Tebentafuspe- tebn (Kimmtrak®)	Immunocore	Melanoma uveal metastático	gp100xCD3	TCR solúvel 
Mosunetuzumabe (Lunsumio®)	Roche	Linfoma Folicular	CD20xCD3	<i>IgG-like</i> “Knobs-into- Holes” 
Teclistamab (Tecvayli®)	Janssen Biotech	Mieloma Múltiplo	BCMAxCD3	<i>IgG-like</i> 

Fonte: Elaborada pela autora. BiTE: *Bispecific T-Cell Engager*; DuoBody: Construção que contém cadeias pesadas e leves oriundas de dois anticorpos distintos. *IgG-like*: molécula cujo formato mais se assemelha ao de um IgG completo. “*Knobs-into-holes*”: estratégia de heterodimerização onde mutações são realizadas nas cadeias C<sub>H</sub>3 da porção Fc, favorecendo ligações eletrostáticas entre as duas cadeias, promovendo a formação de heterodímeros.

No que tange à estrutura ou à arquitetura dos bispecíficos, tem-se duas grandes classes para divisão didática: os BsAbs derivados de IgG e os derivados de fragmentos de anticorpos. Os BSAbs derivados de IgG (*IgG-like*) são aqueles que possuem região Fc, podendo, ainda, apresentar uma estrutura simétrica ou assimétrica. Também é comum observar proteínas fusionadas à estrutura do anticorpo, como moléculas de PEG, caudas de serpentina ou outras moléculas que causam melhor enovelamento, solubilidade, aumentam a meia-vida em circulação ou proporcionam maior recrutamento de células imunes (BRINKMANN; KONTERMANN, 2017). A produção de bispecíficos não é trivial, especialmente os que possuem região Fc, geralmente proveniente de um IgG1, pois a heterodimerização é difícil e trabalhosa por parte das células que os expressam, além da padronização da proporção entre cadeia leve e pesada ser uma dificuldade na expressão heteróloga de anticorpos. Por isso, estratégias de heterodimerização foram estudadas, a fim de aumentar o sucesso nesse processo. A primeira delas, denominada “*Knobs-into-Holes*” foi descoberta em 1996, por Ridgway, Presta, Carter, onde foram propostas mutações, através do desenho racional do domínio  $C_{H3}$ , executadas através de mutagênese sítio-dirigida, em que a formação de homodímeros era reduzida e a proporção de heterodímeros era superior. Nessa estratégia, uma das cadeias de Fc ( $C_{H3} - 1$ ) sofre a mutação T366Y (“*Knob*”), onde um resíduo de treonina da posição 366 da cadeia é substituído por uma tirosina. Na outra cadeia ( $C_{H3} - 2$ ), as mutações sugeridas foram T366S, L368A e Y407V (“*Hole*”) (LI; ER SAW; SONG, 2020; RIDGWAY; PRESTA; CARTER, 1996). A troca desses resíduos, analisados a partir de modelos estruturais, proporciona um encaixe eletrostático que favorece a junção dessas duas cadeias. Considerando que unida à cada cadeia Fc existe, pelo menos, uma região variável que se liga a um alvo diferente, essa estratégia estimula a interação entre as duas cadeias diferentes e o resultado é um BsAbs. Embora essa estratégia seja capaz de unir as cadeias pesadas, ela pode não unir as cadeias leves, sendo necessário o uso de outras estratégias próprias para tal finalidade. No entanto, a engenharia de anticorpos propõe diversas alternativas moleculares a essas dificuldades (YANG; WEN; QIN, 2017; YOU *et al.*, 2021). A figura 6 (b) ilustra alguns formatos de bispecíficos.

Figura 6 – Blocos construtores de anticorpos bispecíficos



Fonte: Adaptado de YOU *et al.*, 2021. (a) ilustra alguns formatos de BsAbs *IgG-like* mostrando estratégias de heterodimerização, dentre elas, a mais conhecida, “*Knobs-into-Holes*”, onde resíduos de aminoácidos são mutados na cadeia CH<sub>3</sub>, proporcionando melhoria no rendimento dos bispecíficos por aumento da interação eletrostática. (b) ilustra alguns formatos derivados de fragmentos, como o scFv, o qual dá origem aos BiTEs, TriKEs, entre outros. Esses formatos podem apresentar facilidades quanto ao sistema de expressão e manipulação *in vitro*.

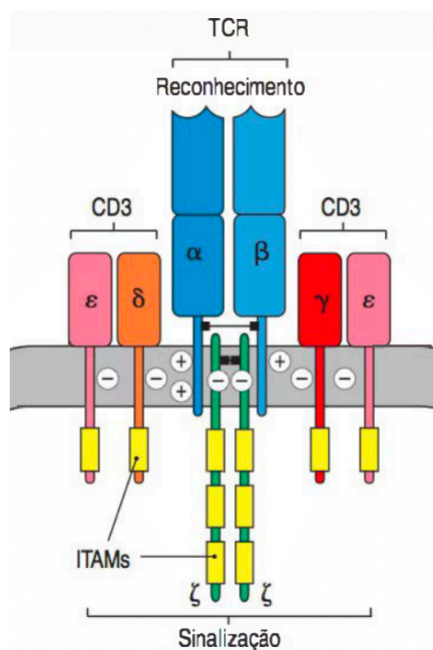
Os BsAbs derivados de fragmentos (*fragment-based*) são aqueles constituídos, geralmente, apenas de cadeias variáveis, sendo comum a união de scFv’s distintos contra diferentes alvos (YOU *et al.*, 2021). Um formato bem consolidado na literatura e no mercado chama-se BiTE (do inglês, *Bispecific T cell Engager*), o qual faz parte de uma categoria de bispecíficos com capacidade de aproximar as células T do antígeno tumoral. Outras moléculas também são estudadas, como TriKEs (do inglês, *Trispecific Killer Engager*), as quais recrutam células NK; CiTEs (do inglês, *checkpoint-inhibitory T cell Engagers*), os quais combinam inibidores de *checkpoint* imunológico com receptores de células T, dentre outras (GOEBELER; BARGOU, 2020). A versatilidade de formatos estruturais confere vantagens laboratoriais de algumas moléculas, como os BiTEs, as quais podem ser manipuladas em sistema procarioto para expressão e posterior caracterização. Existem desvantagens desses formatos baseados em fragmentos, como a meia-vida curta quando comparados às moléculas completas, bem como a ausência de cadeia Fc, o que impede o desenvolvimento de funções efetoras no sistema imune, como a CDC e a ADCC (VIARDOT; BARGOU, 2018).

### 1.3.2 BiTEs – Bispecific T cell Engagers

Os chamados BiTEs (do inglês, *Bispecific T cell Engagers*) são compostos por dois scFv's unidos por um pequeno *linker* peptídico, geralmente curto, mas que confere certa flexibilidade (GGGGS), com função de manter próximos os fragmentos de anticorpos (WANG *et al.*, 2019). Um dos scFv é direcionado ao antígeno tumoral e o outro, a uma cadeia do receptor de células T (TCR $\epsilon$ ).

O receptor de células T (Figura 7) apresenta estrutura peculiar, formada por um heterodímero TCR $\alpha$ : $\beta$ , responsável pelo reconhecimento e ligação ao antígeno, associado a quatro outras cadeias sinalizadoras (coletivamente chamadas de CD3), compostas por duas cadeias  $\epsilon$ , uma  $\delta$  e uma  $\gamma$ . Há, ainda, duas cadeias homodiméricas  $\zeta$  associadas ao receptor de superfície. Cada cadeia do CD3 apresenta um motivo de ativação do receptor baseado em tirosina (do inglês, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* - ITAMs) – as cadeias homodiméricas  $\zeta$  apresentam 3 motivos – os quais são ativadas via fosforilação promovida por tirosina quinases (MURPHY, 2014).

Figura 7 – Receptor de Célula T (TCR)

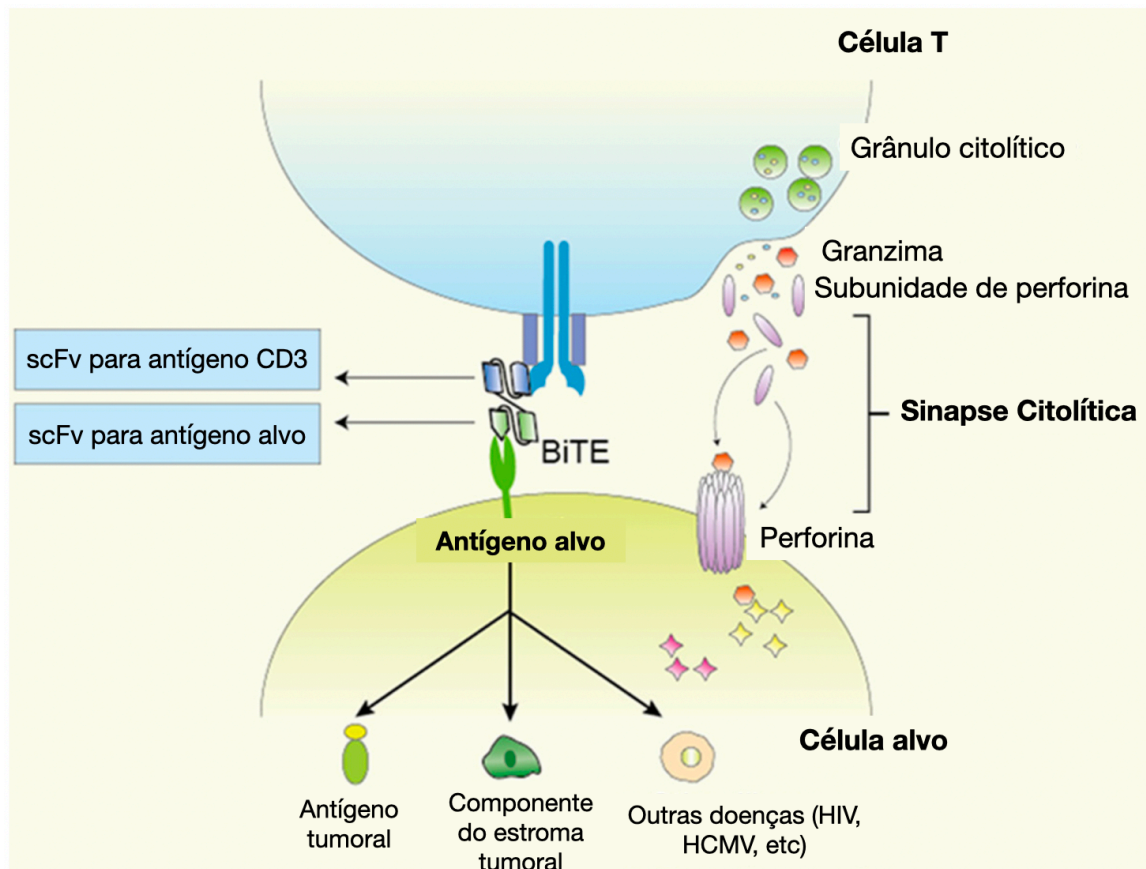


Fonte: Adaptado de MURPHY (2014). O receptor de TCR é composto pela cadeia de reconhecimento TCR $\alpha$ : $\beta$  e CD3, composto pelas cadeias  $\epsilon$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ . As porções intracelulares do receptor possuem domínios tirosinaquinases que são ativados através de fosforilação, as cadeias  $\zeta$ .

### 1.3.3 Sinapse Imunológica e o mecanismo de ação dos BiTEs

A figura 8 ilustra o mecanismo de ação de um BiTE. Na molécula de fragmento de anticorpo, o scFv primeiramente identifica o antígeno tumoral (devido a maior afinidade), se liga a ele e, em seguida, o scFv anti-CD3 recruta células T linfocíticas (citotóxicas e auxiliaadoras), que irão promover a morte celular via liberação de granzimas e perforinas em uma região de sinapse citolítica (imunológica). O mecanismo dominante (e mais imediato) é a liberação desses grânulos de secreção da célula T por exocitose, o que envolve um redirecionamento dos microtubulos do citoesqueleto e a mobilização de receptores TCR para o local da sinapse (DE LA ROCHE; ASANO; GRIFFITHS, 2016). O segundo mecanismo, mais lento e dependente do primeiro para acontecer, envolve a estímulo de receptores ou domínios de morte (DD, *Death Domains*) nas células tumorais, através dos ligantes dos domínios de morte localizados nas células T (ROSS *et al.*, 2017).

Figura 8 – Mecanismo de ação dos BiTEs



Fonte: Adaptado de HUANG *et al.*, 2021. A figura ilustra a formação da sinapse imunológica ou sinapse citolítica, mecanismo pelo qual os BiTEs eliminam as células tumorais. Os BiTEs aproximam a célula T da célula tumoral, proporcionando o aparecimento desse espaço, onde há a liberação de perforinas pelas células citotóxicas, que

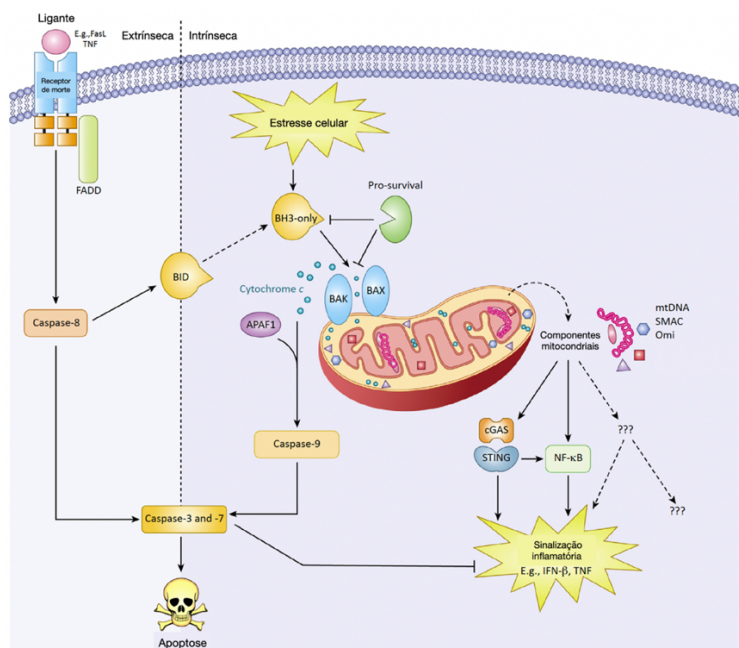
promovem a formação de poros na membrana tumoral, permitindo a entrada de granzimas e outras moléculas promotoras de apoptose por vias independentes de caspases.

Uma vez que a sinapse é formada, proteínas citolíticas, como as granzimas e perforinas são exocitadas das células T, o que leva à formação de poros nas células tumorais, induzindo cascatas de apoptose que culminam na morte das células alvo. Na via do receptor de morte, a reunião dos TCRs induz a expressão de ligantes da superfamília de TNF na superfície da célula T que se ligam e realizam uma ligação cruzada com os receptores de morte expressos nas células alvo. Dessa forma, também há a indução de apoptose mediada por caspases (ROSS *et al.*, 2017).

A morte celular por apoptose mediada por bispecíficos é baseada na via de granzimas e perforinas. Perforinas são proteínas que formam poros na membrana pós-sináptica (nas células alvo), permitindo a difusão de granzimas B, responsáveis pela rápida indução de apoptose dependente de caspases e esse processo é, em parte, também mediado por mitocôndrias (VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015). A figura 9 ilustra o mecanismo de indução de apoptose mediada por essas moléculas. Uma vez que as granzimas entram nas células tumorais, elas promovem a clivagem de proteínas pró-apoptóticas, como caspase-3 e pró-caspase-8 que se autocliva, permitindo sua ativação. Há uma integração entre as vias intrínseca e extrínseca da apoptose através da molécula Bid, um membro pró-apoptótico que estimula a abertura do poro mitocondrial, contribuindo para o aumento de permeabilidade dessa organela, além de favorecer a saída do citocromo c da mitocôndria, o qual ao se unir a Apaf-1 e a pró-caspase-9 presentes no citoplasma, forma o apoptossomo, que segue ativando caspases e promovendo fenômenos fenotípicos próprios da apoptose (MCARTHUR; KILE, 2018). Como características das células em apoptose, observa-se a exposição de fosfatidilserina na camada externa da membrana plasmática, há a fragmentação da cromatina, através da destruição das iCAD (inibidores de DNases ativadas por caspases), é possível perceber a condensação da cromatina, por destruição da lâmina nuclear e há a formação de bolhas, os chamados “*blebs*” de membrana, referentes à degradação de gelsolina e actina das membranas e fosforilação de miosina (HEITZER; AUINGER; SPEICHER, 2020).



Figura 9 – Vias de indução de apoptose desencadeadas por bispecíficos



Fonte: Adaptado de MCARTHUR; KILE, 2018. Os mecanismos de apoptose são importantes vias de sinalização de morte celular dos bispecíficos utilizados no tratamento oncológico.

Essa característica de aproximação da célula tumoral com a célula efetora e promoção da sinapse citolítica é o mecanismo mais bem sucedido de morte celular que ocorre nos bispecíficos, uma vez que ela é responsável pelo sucesso terapêutico dessas moléculas, tanto em testes clínicos, como as já utilizadas em tratamento oncológico atualmente (TRABOLSI; ARUMOV; SCHATZ, 2019).

Os BiTEs possuem algumas características farmacológicas peculiares, como parâmetros farmacocinéticos diferenciados, capacidade de redirecionamento da imunidade antitumoral; e o mecanismo de ação local dentro dos tecidos tumorais. A primeira característica refere-se à farmacocinética dos bispecíficos, que é dependente de uma série de fatores, tais como tamanho da molécula, afinidade ao antígeno tumoral e ao CD3, concentração e presença de células T no microambiente tumoral (KAMAKURA; ASANO; YASUNAGA, 2021). A molécula de BiTE não apresenta região Fc, sendo formada apenas por scFv, conforme citado anteriormente. Esse formato foi originalmente pensado para evitar interações inespecíficas de ativação de células T através da ligação cruzada dessas células com células que apresentam receptor neonatal de Fc. No entanto, o tamanho reduzido, cerca de 55 kDa, permite ao BiTE ser eliminado pelo *clearance* renal, resultando em meia-vida circulatória curta e exigindo que essa molécula seja administrada frequentemente em pacientes (BRINKMANN; KONTERMANN, 2017; KAMAKURA; ASANO; YASUNAGA, 2021). Outro fator



importante no estudo desses bispecíficos é a afinidade de ligação tanto ao antígeno tumoral quanto ao CD3 (marcadores moleculares de células T). A afinidade do scFv direcionado ao antígeno tumoral, expressa através da constante de dissociação  $K_D$ , deve ser maior (na faixa de nM) do que a afinidade do scFv direcionado às células T (na faixa de  $\mu\text{M}$ ). Assim, tem-se maior circulação do BiTE a nível sistêmico (e não linfático), além de contribuir para a formação da sinapse imunológica de forma mais eficaz (KAMAKURA; ASANO; YASUNAGA, 2021; VAFA; TRINKLEIN, 2020).

O único BiTE no mercado indicado para uso oncológico até o momento chama-se Blinatumomabe (Blinicyto<sup>®</sup>), o qual tem como alvos a molécula de CD19, presente em células B em todos os estágios de desenvolvimento (tanto em células normais como em cancerosas) e o receptor CD3 $\epsilon$ , presente em células T (Quadro 1), sendo utilizado no tratamento de leucemia linfocítica. A afinidade desse medicamento pelos seus alvos é em torno de  $10^{-7}$  (CD3) e  $10^{-9}$  M (CD19), se aproximando das interações de baixa afinidade que ocorrem naturalmente entre os receptores de células T e os peptídeos apresentados pelo MHC de classe I. Blinicyto<sup>®</sup> possui meia-vida de poucas horas (~2h) devido ao seu tamanho reduzido, o que requer constantes infusões nos pacientes e apresenta potente toxicidade (doses de 10 pg/mL) (YURASZECK; KASICHAYANULA; BENJAMIN, 2017).

#### 1.3.4 Produção dos BiTES

A expressão dos anticorpos bispecíficos tem sido tema de debate, inclusive dentro da indústria, pois há algumas dificuldades de produzir em larga escala os heterodímeros (no caso dos BsAbs que possuem região Fc), bem como a expressão, muitas vezes, resulta em agregados protéicos (UNDERWOOD; BETTENCOURT; JAWAD, 2022). Algumas tentativas de introdução no mercado de bispecíficos foram infrutíferas devido a dificuldades na produção dessas moléculas, como o que ocorreu com o Catumaxomabe (Removab<sup>®</sup>), o qual foi lançado em 2009 e retirado do mercado em 2014 por incapacidade de produzir quantidades necessárias para o mercado (KRISHNAMURTHY; JIMENO, 2018).

Os BiTES trazem algumas vantagens quando comparados aos *IgG-like*, como o fato de serem moléculas pequenas (~55kDa), com modificações pós-traducionais mais simples (ligações dissulfeto). Isso os permite serem expressos tanto em sistema procarioto, como em eucarioto. A expressão de BiTES em bactérias tem se mostrado eficaz e de rendimento satisfatório, mesmo quando comparado à expressão em células de mamíferos, como observado no trabalho de MOAZZAMI *et al.*, 2021 onde se obteve praticamente a mesma recuperação de

proteínas expressas em bactérias e em células de mamíferos (MOAZZAMI *et al.*, 2021), com custos inferiores nos sistemas procariotos. A expressão de bispecíficos em bactérias também apresenta desvantagens, como a contaminação com endotoxinas bacterianas, sendo necessária a retirada dos lipopolissacarídeos antes de ensaios citotóxicos e *in vivo*.

### **Justificativa**

Diante do exposto, o presente trabalho vem propor o desenvolvimento de novos bispecíficos do tipo BiTE anti-CD20xCD3. O scFv contra antígeno tumoral é um mutante da sequência original do Rituximabe, obtido através de um trabalho prévio de desenho racional e por mutagênese sítio-dirigida, já caracterizado anteriormente e que apresentou alta capacidade de ligação com o antígeno, sugerindo alta afinidade pelo CD20 (dados apresentados na dissertação de Mestrado). Ademais, a sequência do scFv anti-CD3 foi humanizada por um grupo parceiro (Grupo de Imunologia Molecular, Universidade de Brasília), possuindo, portanto, menor imunogenicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é desenvolver novos bispecíficos do tipo BiTE anti-CD20xCD3 com maior capacidade apoptótica, proveniente da maior afinidade do scFv anti-CD20 pelo epítipo, oriundos de trabalho prévio de desenvolvimento de mutantes por desenho racional.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar proteínas mal formadas durante a expressão recombinante dos scFv's;
- Realizar a imunodeteção dos fragmentos de anticorpos e dos bispecíficos;
- Mensurar afinidade dos scFv's após expressão, purificação e excisão da *tag* SUMO;
- Realizar ensaio de ligação com o alvo na superfície celular dos scFv's e dos bispecíficos;
- Clonar, expressar e purificar os bispecíficos (sequência nativa e mutantes).

### 3 METODOLOGIA

Este trabalho é uma continuação das atividades desenvolvidas durante o mestrado (PONTES, 2019). Um resumo gráfico das principais atividades realizadas previamente, bem como das apresentadas neste trabalho, é mostrado da figura 10.

Figura 10 - Resumo gráfico das atividades

#### TRABALHO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

A

#### Desenho Racional e Mutagênese sítio-dirigida

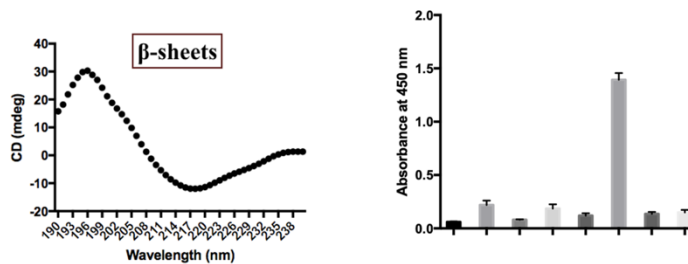


B

Mutante	Mutação	Cadeia
THA	D105N	Pesada
MHA	W106R	Pesada
FHA	105+106	Pesada
JHA	D57E/Y102K/ N93R	Pesada + Leve
WHA	57+102+106+93	Pesada + Leve
XHA	57+102+105+106 +93	Pesada + Leve
CicHA	*	Leve

C

#### Caracterização estrutural e funcional inicial



#### NESTE TRABALHO:

D

#### Investigação de proteínas mal formadas

Influência da cauda SUMO na interação

Identificação de proteínas mal formadas

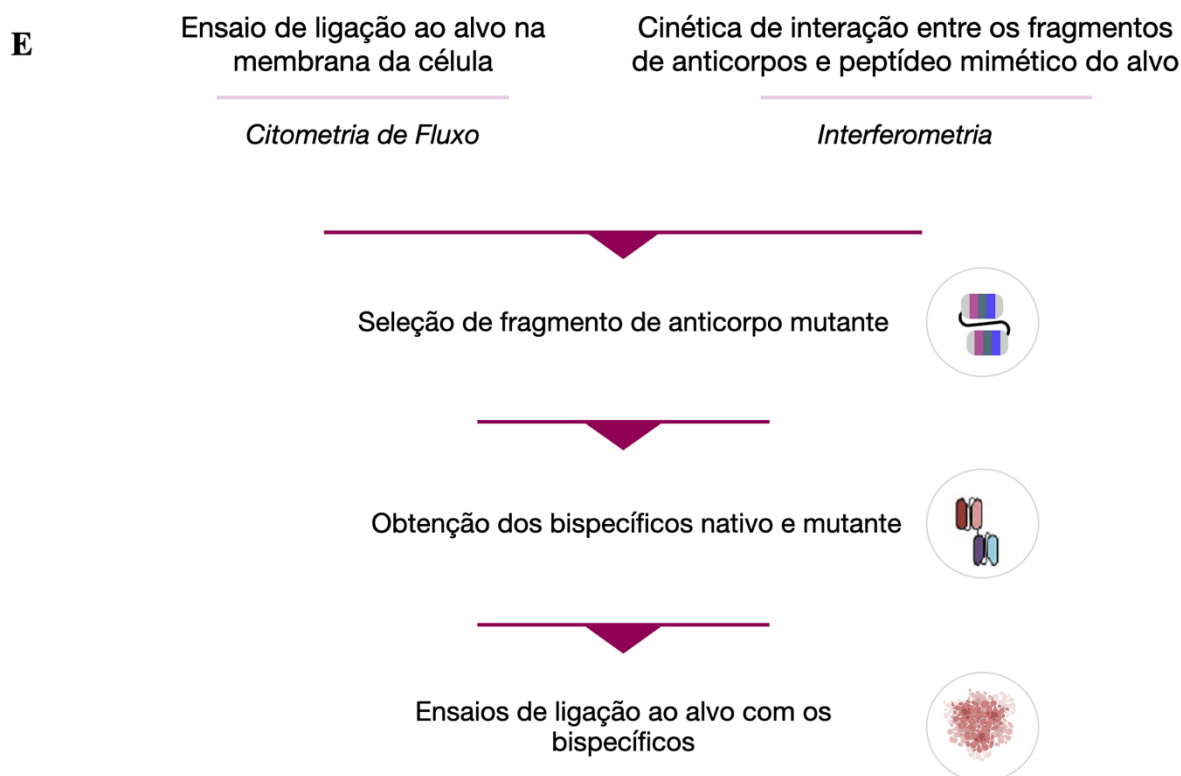
Clonagem em vetor pET28a

Citometria de Fluxo

Western Blot

Citometria de Fluxo

Espectrometria de massas



Fonte: Elaborada pela autora. A: Obtenção da sequência nativa do Rituximabe no formato de scFv, bem como 7 mutantes originados através de desenho racional e mutagênese sítio-dirigida; B: Nomenclatura e identificação dos mutantes utilizados no trabalho, todos em formato scFv. A mutação que originou o mutante CicHA não será revelada, pois é alvo de propriedade intelectual do grupo. C: Caracterização estrutural inicial dos fragmentos de anticorpo através da técnica de difração circular, onde confirmou-se a estrutura secundária em folha  $\beta$ . A caracterização funcional foi realizada através de ELISA de peptídeo mimético do epítipo do CD20 imobilizado em placa. D: investigação de proteínas mal formadas, onde utilizou-se diferentes técnicas para estudar a influência da cauda SUMO na interação e na solubilidade das proteínas. E: Ensaio realizados com as proteínas expressas com cauda SUMO após otimização da purificação.

No trabalho de dissertação de mestrado, foi possível realizar a síntese do gene em formato de scFv com a sequência nativa do Rituximabe. Através de desenho racional e mutagênese sítio-dirigida, 7 mutantes foram obtidos (mutantes simples, duplo, triplo, quádruplo e quádruplo), onde as mutações foram combinadas a fim de se observar algum efeito aditivo delas sobre a afinidade das moléculas. Também foi reproduzido a sequência do mutante triplo observado no trabalho de Li *et al.* (2009), aqui denominado JHA, cuja sequência está ilustrada na figura 10B. Foi realizado um ensaio de caracterização estrutural por difração circular, onde foi confirmada a estrutura secundária das moléculas com predominância de folhas- $\beta$ . Foi realizado um ELISA, onde o peptídeo biotinilado que mimetiza parte da alça de CD20 responsável pela interação com o Rituximabe foi imobilizado em placa, obtendo-se como

resultado que o mutante (WHA) apresentava indícios de melhor interação com o peptídeo (Figura 10 C).

A partir desses resultados, realizou-se a investigação da influência da cauda SUMO na expressão e enovelamento correto das proteínas, bem como análise de proteínas possivelmente mal formadas, cuja sequência poderia apresentar-se truncada (Figura 10D). Após a otimização das condições de purificação dos scFv com cauda SUMO, foram propostos alguns ensaios para análise da interação com o alvo na superfície celular, através da citometria de fluxo, bem como foram realizados ensaios de cinética de interação, onde obteve-se as constantes de afinidade para cada uma das moléculas em estudo. Algumas das sequências dos scFv's foram clonadas no formato de BiTE para posterior expressão, imunodeteção e ensaios de ligação ao alvo (Figura 10 E). As atividades foram realizadas nos laboratórios da Fiocruz Ceará, que possuem Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB 526/20).

### 3.1 Preparo de cepas bacterianas e aquisição de vetores utilizados no trabalho

O vetor pETSUMO e o vetor pET-ULP foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) da Universidade de São Paulo (USP). O pETSUMO foi produzido em laboratório, onde, através de biologia molecular, adicionou-se a *tag* SUMO em um vetor pET28a, além de alguns sítios de restrição de endonucleases. Tais vetores possuem o promotor Lac, o qual possibilita a expressão heteróloga de proteínas através do mecanismo de repressão do Lac repressor, realizada pelo indutor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosose). O vetor pET-ULP foi cedido em um estoque (500  $\mu$ L de pET-ULP em BL21 e 500  $\mu$ L de glicerol 50%) transformado em cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21.

As cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas no trabalho foram: TG1 (clonagem) e SHUFFLE T7 (expressão). A TG1 foi gentilmente cedida pelo Dr. Richard Ward, da Universidade de São Paulo, e a SHUFFLE T7 foi adquirida comercialmente (New England Biolabs®).

Uma colônia isolada TG1, foi inoculada em 5 mL de meio SB (Peptona de caseína 3,0% (p/v), Extrato de levedura 2,0% (p/v), MOPS 1,0% (p/v), pH 7,0). O pré-inóculo foi crescido sob agitação de 250 rpm (Agitador Orbital Innova S44i, Eppendorf®) a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, inoculou-se 1 mL do pré-inóculo em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL da solução estoque de glicose 2 M e 2,5 mL da solução estoque de Mg 2 M (MgCl<sub>2</sub> 1 M, MgSO<sub>4</sub> 1 M). O inóculo foi incubado a 37 °C a 250 rpm até a cultura atingir uma D.O<sub>600nm</sub> de

0,7 a 0,9. Depois de atingir a D.O. desejada, o frasco foi resfriado em gelo por 15 min, antes de centrifugar.

As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado cuidadosamente em 25 mL de glicerol 10%, estéril e gelado, e a seguir adicionou-se mais 75 mL de glicerol 10% gelado. Em seguida, foi feita outra centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C, repetindo a etapa anterior 2 vezes mais. O precipitado foi então ressuscitado em 25 mL de glicerol 10%, estéril e gelado, e submetido a uma última centrifugação a 3.000 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado final foi ressuscitado em 1 a 2 mL de glicerol 10% gelado, para ficar numa D.O.  $_{600\text{nm}}$  de 200 a 250. As células foram aliqüotadas, congeladas em banho de gelo seco com etanol e armazenadas imediatamente a -80 °C (Adaptado de MARANHÃO, A. Q., 2016).

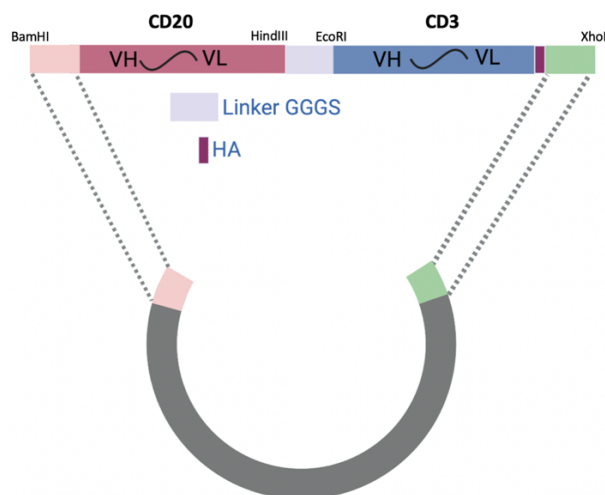
A cepa SHUFFLE T7 utilizada passou por processo de quimio-competência. Fez-se um pré-inóculo com colônias isoladas em 5 mL de meio Luria Bertani (LB). Deixou-se crescer a 37 °C por 16 horas. Inoculou-se 100 mL de meio LB com 1 mL de pré-inóculo crescido anteriormente. Deixou-se crescer a 250 rpm (Agitador Orbital Innova S44i, Eppendorf®), 37 °C até atingir a D.O.  $_{600\text{nm}}$  entre 0,4 – 0,6. Ao atingir a D.O., centrifugou-se o meio de cultivo por 10 min a 5.000 xg a 4 °C, e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante, ressuscitando-se as células gentilmente com 40 mL de MgCl<sub>2</sub> (0,1 M) gelado, previamente preparado. Seguiu-se nova centrifugação a 4 °C, 3.000 xg durante 10 min e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante. Descartou-se o sobrenadante e as células forma gentilmente ressuscitadas em 20 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) gelado. Seguiu-se novamente a centrifugação a 4 °C, 3.000 x g durante 10 min e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante. Ressuscitou-se novamente o pellet com 2 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) gelado. As células foram incubadas por 20 min no gelo, e, em seguida, foram adicionados 1 mL de glicerol 50%. A amostra foi dividida em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL previamente gelados e, seguiu-se o congelamento a -80 °C (Adaptado de GREEN, M.R., SAMBROOK, J., 2012).

### 3.2 Obtenção dos bispecíficos

O bispecífico, aqui chamado de BiTENatS, possui sequência nativa do Rituximabe (MabThera®), onde o scFv contra o antígeno tumoral corresponde ao do anticorpo comercial anti-CD20 acima citado e a sequência do scFv anti-CD3 é proveniente do anticorpo monoclonal Orthoclone (OKT3®), o qual foi humanizado por *CDR grafting* e gentilmente cedido pela Dr. Andrea Maranhão, do grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (SILVA,

2008). O BiTENat foi adquirido comercialmente pela empresa GenScript no vetor de expressão em bactérias pETSUMO (Figura 11).

Figura 11 – BiTE clonado em vetor pETSUMO



Fonte: Elaborado pela autora. O vetor molde para essa construção é um vetor pETSUMO, o qual possui resistência ao antibiótico Canamicina, além apresentar uma *tag* SUMO na região N-terminal (HIS-SUMO), que proporciona melhor enovelamento da proteína e uma *tag* HA na região C-terminal.

### 3.2.1 Obtenção de mutantes no formato de bispecíficos

Os mutantes de anti-CD20 selecionados para compor os bispecíficos foram obtidos a partir de clonagem das sequências de scFv que apresentaram ligação ao alvo, observando o ensaio de citometria de fluxo descrito no item 3.8 deste trabalho. Uma vez determinados quais seriam esses mutantes (JHA e CicHA), essas sequências foram amplificadas em uma PCR para retirada da *tag* HA e do *stop* códon ao final das proteínas. Para amplificação do fragmento e inserção dos sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, utilizou-se tampão HF 5x, mix de dNTPs (200 mM de concentração final), 200 nM final de cada um dos *primers* (pSUMOFw – 5'ATCGGATCCCAAGTGCAACTGCAACAAC3' e pBiTECD20Rv – 5'ATCAAGCTTTTTGATTTCCAGTTTGGTACC3'), 1,5 µL de DMSO e 1U da DNA polimerase Phusion de alta fidelidade, além de 20 ng de molde de scFv, com ciclagem realizada conforme recomendações do fabricante, além de Tm de 60 °C para os *primers*. Logo após, os fragmentos foram purificados, digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Promega) juntamente com o vetor (BiTENatS) por 3 h a 37 °C, após esse período as enzimas foram inativadas a 60 °C por 15 min. Após purificação do vetor excisado de gel e dos insertos de solução, realizou-se a ligação que deu origem aos mutantes BCS e BJS, utilizando-se a enzima



T4 DNA Ligase (Promega) seguindo recomendações do fabricante e usando razão inserto/vetor 1:5 (v/v). 1 µL de ligação foi transformado em 100 µL de TG1 eletrocompetente em cubeta de 2 mm. A eletroporação foi feita seguindo os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, no aparelho Gene Pulser com Pulser Controller da BioRad. O tempo esperado nessas condições é de 4,0 a 5,0 ms. Após crescimento das colônias, foi realizada uma PCR para confirmação da clonagem, utilizando-se os *primers* universais T7Pro (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e T7Ter (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3') na concentração 200 nM final, tampão 10x, mix de dNTPs (200 µM de concentração final), 1,25 U de Taq polimerase (Sinapse Biotecnologia) e DNA proveniente de esfregaço de colônias isoladas, com ciclagem realizada conforme recomendações do fabricante e  $T_m = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$  para os *primers*. Após confirmação da clonagem, as colônias foram crescidas em 5 mL de meio LB suplementado com 40 µg/mL de canamicina por 16 h a 37 °C, seguidas de reação de extração de DNA plasmidial, seguindo protocolo do fabricante (Kit PureYield Promega®).

### 3.3 Sequenciamento Sanger

O DNA plasmidial das sequências clonadas (scFv's em vetor pET28a e bispecíficos mutantes) extraído foi submetido ao sequenciamento de Sanger. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se 1 µL de *Big Dye Terminator* v3.1, 1,5 µL de *Sequencing Buffer*, 1 µL de *primer* a 3,2 µM, 250-300 ng de DNA por reação, completando-se com água ultrapura o volume de reação final de 10 µL. Essas reações seguiram para o termociclador com a seguinte ciclagem: 30 ciclos de 96 °C por 1 min, 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min com rampa de temperatura de 1 °C/s.

Para precipitação do DNA, foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM homogeneizando bem, em seguida adicionou-se 30 µL de etanol 100%. A placa foi incubada por 15 min em temperatura ambiente e, em seguida, foi centrifugada a 2000 xg por 36 min a 4 °C. Após a secagem da placa, 30 µL de etanol 70% foram adicionados à placa, que novamente foi centrifugada 2000 xg por 15 min a 4 °C. Após secagem da placa, 10 µL de formamida Hi-Di foram adicionados às amostras, que seguiram para eletroforese capilar no sequenciador SeqStudio.

### 3.4 Expressão de proteínas em sistema procarioto

Os inóculos de pETSUMO (nativo e mutantes), pET28a (nativo e mutantes) e os BsAbs em SHUFFLE T7 foram preparados, separadamente, com 450 mL de meio Terrific Broth (TB – Extrato de levedura 24% (p/v), Triptona 20% (p/v) e 0,4% (v/v) de Glicerol), 50 mL de tampão fosfato filtrado em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (0,17 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) com antibiótico canamicina (40  $\mu\text{g}$  /mL) em frasco tipo erlenmeyer de 2 L estéril. Adicionou-se 5 mL de bactérias crescidas provenientes de colônias de um pré-inóculo também em meio TB. Essa cultura foi incubada em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm (Innova S44i, Eppendorf<sup>®</sup>), medindo-se a D.O.<sub>600nm</sub> até que esta atingisse 0.6-0.8. Induziu-se a expressão com Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosose (IPTG, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) na concentração final de 0,5 mM *overnight*, a 16 °C, em agitador orbital a 250 rpm (Innova S44i, Eppendorf<sup>®</sup>). Após esse período, o restante da cultura seguiu para centrifugação a 8.000 x g por 10 min e 4 °C. O *pellet* foi armazenado em -20 °C para posterior purificação.

A enzima ULP SUMO Protease foi expressa de forma heteróloga pelo grupo. Os inóculos de pETULP (em vetor pET28a) em SHUFFLE T7 foram preparados com 500 mL de meio LB com antibiótico canamicina (40  $\mu\text{g}$  /mL) em erlenmeyer de 2 L estéril. Adicionou-se 5 mL de bactérias crescidas provenientes de colônias de um pré-inóculo também em meio LB. Essa cultura foi incubada em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm (Innova S44i, Eppendorf<sup>®</sup>), medindo-se a D.O.<sub>600nm</sub> até que esta atingisse 0.5- 0.6. Induziu-se a expressão com IPTG (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) na concentração final de 0,5 mM por 4 h, a 30 °C, em agitador orbital a 250 rpm (Innova S44i, Eppendorf<sup>®</sup>). Após esse período, o restante da cultura seguiu para centrifugação a 8.000 x g por 10 min e 4 °C. O *pellet* foi armazenado em -20 °C para posterior purificação.

### 3.5 Purificação de proteínas

A purificação de proteínas foi realizada através da técnica de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) em cromatógrafo automatizado ÄKTA Pure (Cytiva<sup>®</sup>) e coluna imobilizada com níquel HisTrap HP 1 mL (Cytiva<sup>®</sup>). A ULP SUMO Protease, os BsAbs e os scFv's expressos em vetor pETSUMO e em vetor pET28a possuem uma *tag* de Histidina (6xHis), a qual interage com o níquel presente na matriz cromatográfica, permitindo assim a purificação. O *pellet* referente a 250 mL de cultura foi ressuspendido em 20 mL de tampão A (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) com 5 mM de imidazol, 1% de triton X-

100 e 1% de PMSF (Fluoreto de fenilmetano sulfonil) 100 mM, um inibidor de proteases. Em seguida, as células foram rompidas por sonicação (Ultrassonicador QSonica Q700) com microsonda por 30 min com pulsos de 5 s e descanso de 15 s em gelo com amplitude de 25 %. Após a sonicação, o conteúdo foi centrifugado por 30 min, 10.000 xg, 4 °C, onde foi possível separar as proteínas solúveis das insolúveis e dos *debris* celulares. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm assim como todos os tampões utilizados no ÄKTA Pure. No cromatógrafo, a amostra foi equilibrada com a coluna e lavada com tampão A (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8.0) com 5 mM de imidazol, lavada com 5% de tampão B (Tampão B: Tris 50 mM, NaCl 300 mM, 500 mM de imidazol, pH 8.0) e eluída com gradiente linear de concentração de imidazol. Após a eluição, as alíquotas contendo os picos referentes às proteínas obtidas no processo de cromatografia foram submetidos à eletroforese redutora e desnaturante em gel de poliacrilamida 12,5 % (SDS-PAGE) para os scFv's e 10 % para os bispecíficos. Após a corrida, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250* para revelação das bandas protéicas.

Após a expressão das proteínas em pETSUMO, é conveniente a excisão da cauda, procedimento realizado através da enzima ULP SUMO Protease, que cliva a cauda SUMO expressa nos scFv-SUMO e seus mutantes, além dos BsAbs, levando consigo a cauda de histidina (HisTag). Após purificação das proteínas, o imidazol foi retirado através de dialofiltração (Amicon®) e, então, elas foram quantificadas por fluorimetria em Qubit (Thermo Fischer Scientific®), conforme especificações do fabricante. A reação de clivagem da ULP SUMO Protease se dá através da incubação *overnight* a 4 °C da proteína fusionada com a ULP, em uma proporção de 20:1 m/m (20 mg de proteína de interesse para 1 mg de ULP). O conteúdo da digestão passa por incubação com 1 mL de coluna *His-Link* (Promega®), previamente lavada com água e, em seguida, equilibrada com tampão (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) por 1 hora em banho de gelo, sob agitação. Após esse período, as proteínas heterólogas clivadas são coletadas como pico não retido, monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm (cubeta de quartzo) até a linha de base, uma vez que elas não possuem mais nenhuma cauda que as façam interagir com a matriz cromatográfica. Uma corrida eletroforética em gel SDS-PAGE (12,5 % e 10 %) permite a visualização do progresso da digestão e da purificação.

### 3.6 Western Blot

Para realização do western blot, correu-se um gel de poliacrilamida 12,5 % em condições desnaturantes e redutoras para os fragmentos de anticorpos e 10 % para os bispecíficos.

Após a corrida em gel de poliacrilamida a 120 V, foi realizada a eletrotransferência de todos os scFv's expressos em vetor pETSUMO (após a clivagem da causa SUMO) e dos BsAbs para membrana de nitrocelulose em equipamento de eletrotransferência do tipo *Semi-dry TransBlot Turbo Transfer System* (Biorad®). A membrana foi corada com Ponceau para confirmar a transferência das proteínas. Seguiu-se o bloqueio com 5 % de leite desnatado diluído em PBST (PBS + 0,05% Tween 20) *overnight*, a 4 °C. Logo após 3 lavagens de 10 min cada sob agitação em temperatura ambiente, incubou-se a membrana com anticorpo Anti-HA-AP 1:5000 (v/v) (Sigma Aldrich®) diluído em PBST, por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, 3 lavagens de 10 min cada e a membrana seguiu para revelação com o substrato *Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* (Promega®).

### 3.7 Cultura de células eucarióticas

As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram Raji, linhagem de linfócito B adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ); K562, linhagem de células linfoblásticas, gentilmente cedida pelo grupo parceiro liderado pelo Dr. Martin Bonamino (INCA/Fiocruz-RJ).

As linhagens foram descongeladas da seguinte forma: um criotubo contendo 1 mL de células previamente congeladas em meio RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®) e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma Aldrich®) foi aquecido a 37 °C até descongelar. Logo após, o conteúdo foi adicionado a 9 mL de meio RPMI 1640 suplementado e seguiu para centrifugação 300 xg, 5 min, 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuscitado em meio RPMI suplementado sendo adicionado a 9 mL de meio em uma garrafa de cultura de 75 cm<sup>2</sup>.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas em incubadora (HERACell Vios 160i, ThermoFisher Scientific®) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, sendo constantemente monitoradas quanto à sua confluência.

Para o congelamento de células, a cultura celular da garrafa foi centrifugada 300 xg, 5 min, 20 °C. Em seguida, 10 µL das células foram diluídos 1:1 (v/v) em Azul de Tripano 0,4% para contagem e avaliação de viabilidade celular. As células coradas foram aplicadas em Câmara de Neubauer e visualizadas em microscópio óptico com aumento de 40x. Após checagem da viabilidade e contagem das células, o pellet celular foi diluído para atingir  $\sim 1.10^6$

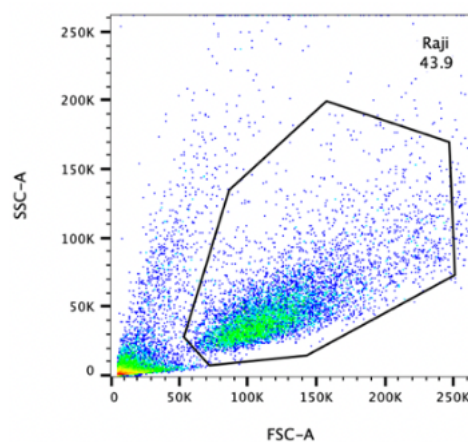
células/mL. Adicionou-se 100 µL de DMSO estéril aos 900 µL de cultura celular em meio RPMI 1640 suplementado. Imediatamente após, o criotubo seguiu para congelamento a -80 °C.

### 3.8 Citometria de fluxo

As células cultivadas em meio RPMI 1640 foram contadas em câmara de Neubauer e  $0,5 \times 10^6$  células (K562 e Raji) foram centrifugadas, em tubo de 0,5 mL, com tampão FACS (PBS + 2% SFB) com 400 xg por 5 min a 20 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1 µg dos fragmentos de anticorpo scFv-HA (sequência nativa do Rituximabe e mutantes) e cerca de 5 µg dos bispecíficos foram incubados com as células por 30 min em temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se 400 µL de tampão FACS e centrifugou-se com 400 xg por 5 min a 20 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL do anticorpo Anti-HA-FITC (1:500 v/v) diluído em tampão FACS foram adicionados e seguiram para incubação por 30 min em temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se 400 µL de tampão FACS e centrifugou-se com 400 xg por 5 min a 20 °C, descartando o sobrenadante e repetiu-se esse procedimento por mais uma vez. Após esse preparo, as células seguiram para citometria em FACSCelesta (BD Biosciences), onde foi setada a passagem de 10.000 eventos e os dados foram analisados com o *software FlowJo*.

A estratégia utilizada para selecionar a população (“gates”) está demonstrada na figura 12. Essa abordagem foi utilizada em todas as análises de todos os fragmentos de anticorpo e bispecíficos utilizados no experimento. Esse tipo de representação é capaz de delimitar o tamanho (representado pelo eixo x, FSC, do inglês *Forward Scatter*) e a complexidade interna (representada pelo eixo y, SSC, do inglês *Side Scatter*) da célula, fornecendo informações que permitem a caracterização inicial da população em estudo.

Figura 12 – Representação da estratégia utilizada para seleccionar a população de células de linfócitos B

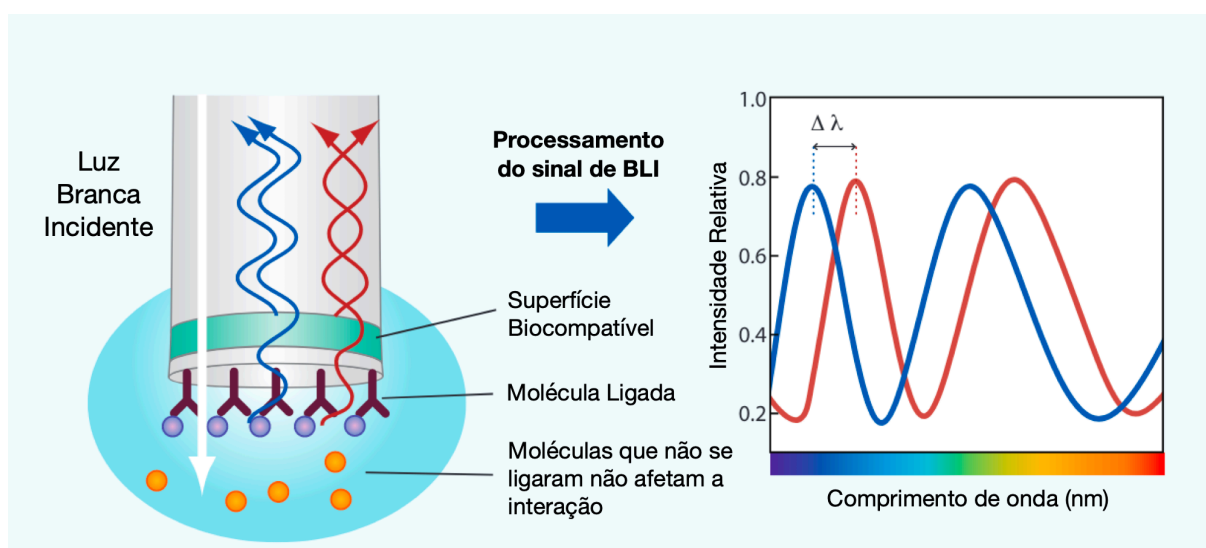


Fonte: Elaborada pela autora. A figura ilustra a delimitação da população de linfócitos B que expressam CD20 na membrana, em linhagem celular Raji.

### 3.9 Cinética de interação dos scFv's com o antígeno por interferometria

A interferometria em bio-camada (BLI, do inglês Bio-Layer Interferometry) refere-se à uma técnica analítica óptica que mensura diferentes padrões de interferência luminosa entre as ondas de luz. Um feixe de luz branca é direcionado na ponta do sensor onde ocorre a ligação do chamado ligante. Essa interação gera um determinado comprimento de onda captado pelo equipamento. Esse ligante, ao interagir com o seu alvo, aqui chamado de analito, gera outro comprimento de onda, diferente do anterior, o qual é detectado pelo equipamento. Essa diferença no comprimento das duas ondas é traduzida em tempo real em dados de cinética de interação molecular (FORTÉBIO, [s.d.]), conforme ilustra a figura 13.

Figura 13 – Análise óptica realizada na interferometria



Fonte: Adaptado de FORTÉBIO. A figura acima ilustra a física óptica que ocorre no processo de interferometria, sendo convertido em cinética de interação pelos softwares de análises.

Para os ensaios de cinética de ligação, foram usados sensores de estreptavidina, pois o grupo possui um peptídeo biotilado (Biomatika<sup>®</sup>) mimético da alça extracelular maior do CD20 de, aproximadamente 3 KDa, de sequência NIYNCEPANPSEKNSPSTQYCYSIQ. Em vermelho, estão representados os resíduos de cisteína, que promovem a ligação dissulfeto essencial à interação antígeno-anticorpo.

Os biosensores foram hidratados com 200  $\mu$ L de tampão 1x *Kinetics Buffer*, composto por PBS + 0.02% Tween20 + 0.1% BSA + 0.05% azida sódica, por 10 min em temperatura ambiente para retirada da sacarose que os preserva. Em seguida, 0,2  $\mu$ g/mL de peptídeo foi carregado por 180 s em uma etapa chamada *loading*, seguido de etapa de *baseline* para retirada do excesso de peptídeo em tampão *Kinetics Buffer*. Após essa lavagem, houve a interação de 200  $\mu$ L de scFv (analito), em uma curva de concentração iniciando com 4000 nM e reduzindo com diluições seriadas de 2x, com o peptídeo por 600 s de associação e 600 s de dissociação. (Adaptado de NOY-PORAT *et al.*, 2021). Todas as etapas foram realizadas a 30 °C com agitação de 1000 rpm. Para o processamento e análise dos dados, foi utilizado o *software Octet Analysis Studio 12.2.2.*, curva de *fitting 1:1*.

Esses ensaios foram realizados no equipamento Octet RED96 (FORTÉBIO) da Fiocruz-CE.

### 3.10 Investigação de proteínas mal formadas durante a expressão recombinante dos scFv's

Ainda durante o período de mestrado, algumas indagações surgiram quanto à influência da cauda SUMO no enovelamento e necessidade da clivagem da cauda nos scFv's, uma vez que a adição de mais essa etapa cromatográfica reduz o rendimento final das proteínas. Então, foram realizados alguns ensaios com os scFv's ainda com a cauda para comparação.

#### 3.10.1 Citometria de fluxo dos fragmentos de anticorpo com cauda SUMO

O ensaio de ligação ao alvo na superfície da célula foi realizado com a linhagem Raji (CD20+), utilizando-se o protocolo descrito no item 3.8, com as seguintes alterações: o anticorpo de marcação utilizado foi o anti-His-FITC (ThermoFisher Scientific) na proporção 1:1000 (v/v) para o scFv nativo com a cauda SUMO e anti-HA-FITC na proporção 1:1000 (v/v) para o scFv sem a cauda SUMO, as imagens foram adquiridas no citômetro BD Accuri. Esses ensaios foram realizados em parceria com o Grupo de Imunologia Molecular, da Universidade de Brasília (UnB).

#### 3.10.2 Western Blot dos picos cromatográficos

Os scFv's provenientes do trabalho de mestrado (7 mutantes da sequência nativa do Rituximabe, obtidos por desenho racional) foram anteriormente clonados em vetor pETSUMO, o qual adiciona uma cauda SUMO que auxilia no correto enovelamento protéico. Por algum tempo, foi possível a obtenção de rendimento satisfatório de proteína completa, o que tornou possível alguns ensaios de caracterização realizados no trabalho de dissertação, sem que fosse observada qualquer degradação da proteína recém-expressa. No entanto, após algumas tentativas de otimizar a expressão e posterior purificação e após a mudança de laboratório ocorrida, observou-se que a maquinaria celular passou a ser desviada para obtenção de grandes quantidades de proteína truncada, onde a expressão do fragmento completo (SUMO+scFv) foi preterida quando comparada à expressão da proteína truncada, nas novas condições de expressão e purificação testadas. A confirmação dessa hipótese ocorreu inicialmente através de imunodeteção por *Western Blot*, onde o scFv foi sondado com o anticorpo secundário anti-His-AP (Protocolo conforme item 3.6).



### 3.10.3 Espectrometria de massas a partir da excisão de spots em gel de SDS-PAGE

As análises proteômicas foram realizadas na Plataforma de Proteômica da Fundação Oswaldo Cruz – Ceará, por nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (nanoLC-MS) com uma interface de ionização por *electrospray* (fonte de íons *EASY-spray*). As caracterizações estruturais foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-orbitrap, *Q Exactive™ Plus Biopharma* (ThermoFisher Scientific™), utilizando MS1 de alta resolução no analisador de massas do tipo Orbitrap, seguido de fragmentação por HCD e análise de espectros MS2 em alta resolução no mesmo analisador. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau LC-MS (LiChrosolv®, Merck, Millipore). Todas as vidrarias e materiais utilizados no ensaio foram previamente rinsados com metanol grau LC-MS.

Inicialmente, as amostras foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida numa concentração de 12,5 % e, em seguida, o gel foi corado com *Coomassie Blue Brilliant G250*. Como controle positivo, foram aplicados 14 µg de albumina sérica bovina no gel e como controle negativo, foi excisada uma parte do gel, sem corante. Cuidadosamente, duas bandas de cada amostra, com exceção dos controles, foram excisadas com auxílio de uma espátula e transferidas para microtubos novos contendo 500 µL de água LC-MS, e então, armazenados a 4 °C até iniciar protocolo de hidrólise trípica em gel. O protocolo de hidrólise trípica em gel foi iniciado pela descoloração das bandas. Inicialmente as bandas foram picotadas com auxílio de ponteiras e os pedaços de gel foram lavados com 500 µL de uma solução de lavagem, composta por 50 mM de tampão bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) / 50% de acetonitrila (ACN), durante 15 min em agitação leve. Este passo foi repetido por mais duas vezes. Logo após, os pedaços de gel foram rinsados com 500 µL de ACN 100 % e desidratados com 500 µL de ACN 100 % por 20 min a temperatura ambiente sob agitação leve. A ACN foi descartada e os pedaços de gel foram secos em *speed-vac* a 40 °C por 10 min.

A redução das proteínas foi realizada por 150 µL de 10 mM de ditioneitol em 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 30 min a 56 °C, seguida de alquilação com 100 µL de 50 mM de iodoacetamida em 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. Os pedaços de gel foram novamente lavados com 500 µL de 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/50% de ACN por 15 min e desidratados com 500 µL de ACN 100% por 20 min a temperatura ambiente, sob lenta agitação em ambos. Em seguida, os fragmentos de gel foram reidratados por 2 h a 4°C (no gelo) e hidrolisados com 40 µL de tripsina de grau de sequenciamento (Promega), a 0,02 µg/µL em 50 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> e incubando-os a 37 °C por 16h (*overnight*). As reações foram

interrompidas acidificando o meio com a adição de 8  $\mu\text{L}$  de solução de extração (60 % ACN/ 40 % ácido trifluoroacético (TFA) 1 % (v/v) em água grau LC-MS às misturas de reação. Sobrenadante foi transferido para novo microtubo. A lavagem dos pedaços de gel com solução de extração foi repetida com 25  $\mu\text{L}$  de solução de extração adicional sob agitação lenta.

Os peptídeos hidrolisados foram então dessalinizados, concentrados e purificados em ZipTip C18 *Pipette Tips* (Merck, Millipore) seguindo instruções do fabricante e, por fim, foram ressuspendidos em 20  $\mu\text{L}$  de 0,1% ácido fórmico em água grau LC-MS (LiChrosolv, Merck) cada e quantificados novamente por fluorimetria em Qubit 4.

Os peptídeos foram separados em cromatografia de fase reversa usando um *Dionex Ultimate 3000 RSLCnano System* (ThermoFisher Scientific) equipado com uma coluna trap C18 PepMap P100 C18 5  $\mu\text{m}$ , 0.3 x 5mm e uma coluna analítica Acclaim PepMap RSLC C18 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{Å}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 50 cm, E803A rev2 (ThermoFisher Scientific). Foi injetado 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra (*full loop*) com uma taxa de fluxo ajustada para 400 nL/min usando uma mistura de concentração gradiente de solvente A (0,1 % de ácido fórmico em água) e solvente B (Acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) ao longo de 180 min. Diferentes gradientes foram explorados e otimizados entre 5-98 % de A para uma ótima separação de peptídeos. Ao final da corrida, o gradiente foi aumentado para 95 % B ao longo de 3,5 min para eluir possíveis peptídeos hidrofóbicos. A tensão de pulverização NSI foi ajustada para 1,8 kV e a fonte nano a 40  $^{\circ}\text{C}$ . A massa do precursor foi medida por um analisador de massas Orbitrap na resolução de 70.000, faixa de massa 375-1500  $m/z$ , controle de ganho automático (AGC *target*) foi definido como  $3 \times 10^6$ , tempo máximo de injeção de íons de 100 ms, no modo positivo. Simultaneamente, foi realizada uma análise por *data dependent acquisition* com os 5 íons precursores mais abundantes selecionados para uma fragmentação de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD – *high energy collision-induced dissociation*) com a janela de isolamento de 4  $m/z$  e aplicando uma energia de colisão normalizada de 30. Os íons fragmentados foram escaneados com uma resolução de 17.500, o AGC foi ajustado para  $1 \times 10^5$ , IT de 50 ms e exclusão dinâmica de 10 s.

O software Thermo Xcalibur 2.2 foi usado para todas as aquisições de dados. Para fornecer identificação e quantificação sistemática de peptídeos e proteínas usando íons MS/MS, os espectros de massas foram confrontados com banco de dados de proteínas de *Escherichia coli* BL21-DE3 disponível no *UniProt KnowledgeBase* sob número de acesso UP000002032, usando softwares PatternLab 5.0 e Peaks X Studio 10.6. A carbamidometilação foi especificada como uma modificação fixa e como modificação variável oxidação de metionina. O controle de qualidade da análise de espectrometria de massas foi realizado injetando como amostra de

referência o hidrolisado proteico *Pierce HeLa Protein Digest* (ThermoFisher Scientific) derivado de uma linhagem de células HeLa S3d referência de adenocarcinoma bem estabelecida. O equipamento foi calibrado com padrão externo em modo positivo constituído de uma mistura de cafeína, peptídeo MRFA (Met-Arg-Phe-Ala) e Ultramark 1621.

#### *3.10.4 Espectrometria de massas do scFv sequência nativa expressa em vetor pET28a*

A determinação da massa molecular foi realizada utilizando-se um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-orbitrap, Q Exactive™ Plus Biopharma (ThermoFisher Scientific™), utilizando MS1 de alta resolução no analisador de massas do tipo Orbitrap, seguido de fragmentação por HCD e análise de espectros MS2 em alta resolução no mesmo analisador. Todos os reagentes utilizados nas análises foram de grau LC-MS (LiChrosolv®, Merck, Millipore).

Inicialmente, a amostra foi dessalinizada e concentrada por meio de unidades de ultrafiltração Microcon® Centrifugal Filters com um cut-off de 10 KDa (Merck, Millipore), substituindo o tampão fosfato-salino (PBS) para tampão bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 50 mM, pH 8,5. Ao final deste passo, foram recuperados 150 µL de amostra em uma concentração de 1,10 mg/mL, quantificada por fluorimetria em Qubit™ 4 (Invitrogen™/ThermoFisher Scientific™) seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida, 50 µL de pNat a 1,0 mg/mL foram incubados com 0,2 % de RapiGest SF (Waters™) por 15 min a 80 °C. A redução das proteínas foi realizada por 2,5 µL de 100 mM de ditioneitol em 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 30 min a 60 °C, seguida de alquilação com 2,5 µL de 300 mM de iodoacetamida em 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 30 min em temperatura ambiente no escuro.

Logo após, a hidrólise triptica foi realizada adicionando tripsina de grau de sequenciamento (Promega Corporation), a 0,05 µg/µL em 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> à amostra em uma proporção de massa de 1:100 (enzima:proteína), e incubando a 37 °C por 16h (*overnight*). A reação foi interrompida acidificando o meio com a adição de 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) em água grau LC-MS à mistura de reação. Os peptídeos hidrolisados foram então dessalinizados, concentrados e purificados em ZipTip®C18 Pipette Tips (Merck, Millipore) seguindo instruções do fabricante e, por fim, foram ressuspensos em 20 µL de 0,1% ácido fórmico em água grau LC-MS (LiChrosolv®, Merck, Millipore) e quantificados novamente por fluorimetria em Qubit™ 4.

Os peptídeos foram separados em cromatografia de fase reversa usando um Dionex Ultimate™ 3000 RSLCnano System (ThermoFisher Scientific™) equipado com uma coluna trap C18 PepMap P100 C18 5 µm, 0.3 x 5mm e uma coluna analítica Acclaim™ PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm x 50 cm, E803A rev2, (ThermoFisher Scientific™). Foi injetado 1 µL de amostra (full loop) a 0,273 µg/µL com uma taxa de fluxo ajustada para 400 nL/min usando uma mistura de concentração gradiente de solvente A (0,1 % de ácido fórmico em água) e solvente B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) ao longo de 180 min. Diferentes gradientes foram explorados e otimizados entre 5-98 % de A para uma ótima separação de peptídeos. Ao final da corrida, o gradiente foi aumentado para 95 % B ao longo de 3,5 min para eluir possíveis peptídeos hidrofóbicos. A tensão de pulverização NSI foi ajustada para 1,8 kV e a fonte nano a 40 °C. A massa do precursor foi medida por um analisador de massa Orbitrap na resolução de 70.000, faixa de massa de 375-1500 m/z, controle de ganho automático (AGC target) foi definido como  $3 \times 10^6$ , tempo máximo de injeção de íons em 100 ms, no modo positivo. Simultaneamente, foi realizada análise por data dependent acquisition com os 5 íons precursores mais abundantes selecionados para uma fragmentação de dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD - high energy collision-induced dissociation) com a janela de isolamento de 4,0 m/z e aplicando uma energia de colisão normalizada de 30. Os íons fragmentados foram escaneados com uma resolução de 17.500, o AGC foi ajustado para  $1 \times 10^5$ , IT de 50 ms e exclusão dinâmica de 10 s.

O *software Thermo Xcalibur 2.2* foi usado para todas as aquisições de dados. Para fornecer identificação e quantificação sistemática de peptídeos e proteínas usando íons MS/MS, os espectros de massas foram confrontados com banco de dados de proteínas de *Escherichia coli* BL21-DE3 disponível no *UniProt KnowledgeBase* sob número de acesso UP000002032, usando *softwares PatternLab 5.0* e *Peaks X Studio 10.6*. A carbamidometilação foi especificada como uma modificação fixa e como modificação variável oxidação de metionina. O controle de qualidade da análise de espectrometria de massas foi realizado injetando como amostra de referência o hidrolisado proteico *Pierce HeLa Protein Digest* (ThermoFisher Scientific) derivado de uma linhagem de células HeLa S3d referência de adenocarcinoma bem estabelecida. O equipamento foi calibrado com padrão externo em modo positivo constituído de uma mistura de cafeína, peptídeo MRFA (Met-Arg-Phe-Ala) e Ultramark 1621.

### 3.10.5 Clonagem em vetor pET28a

A clonagem dos fragmentos de anticorpos em vetor pET28a ocorreu através PCR, com primers para inserção dos sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *BamHI*, utilizando-se a enzima de alta fidelidade Phusion (ThermoFisher Scientific), seguindo orientações de reação e ciclagem conforme o fabricante. Logo após, o produto de PCR purificado e o vetor pET28a foram digeridos com as enzimas *NheI* e *BamHI* (Promega), conforme o fabricante. Em seguida, a reação de ligação entre inserto e vetor, ambos digeridos, ocorreu com a enzima T4 DNA ligase (Promega), na razão molar 1:5 inserto/vetor. Reação foi incubada overnight, a 4 °C e inativada no dia seguinte com 70 °C por 10 min. 1 µL da reação de ligação foi transformado em cepa de *E. coli* TG1, conforme protocolo descrito no item 3.2.1. A clonagem foi confirmada com PCR de colônias e sequenciamento Sanger, conforme descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2.

Os fragmentos de anticorpo (sequência nativa do Rituximabe e os 7 mutantes) foram expressos em *E. coli* SHUFFLE T7 e purificados em sistema automatizado AKTA, seguindo os mesmos protocolos já descritos nos itens 3.4 e 3.5.

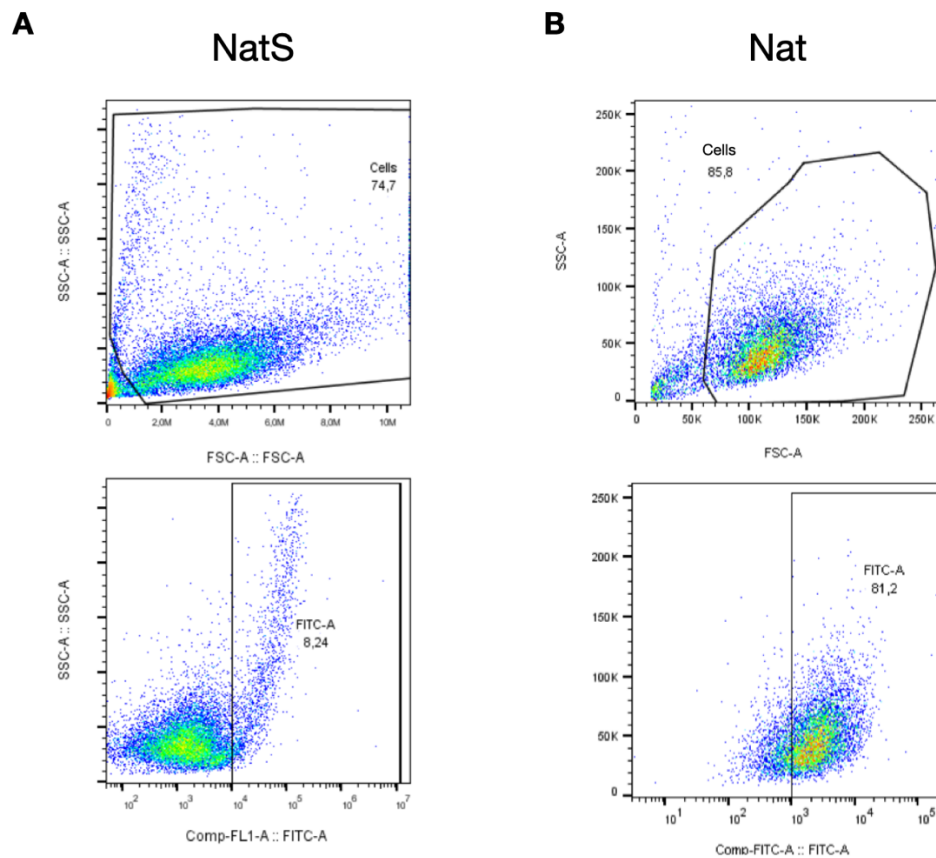
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Investigação de proteínas mal formadas durante a expressão recombinante dos scFv's

#### 4.1.1 Citometria de fluxo dos fragmentos de anticorpo com cauda SUMO

A citometria de fluxo da sequência nativa do Rituximabe no formato de scFv com cauda SUMO revelou uma baixa percentual de interação dessas moléculas com o alvo em superfície celular quando comparado à mesma molécula após a clivagem da cauda SUMO, conforme pode ser visto nas figuras 14. O plot de interação da sequência nativa do Rituximabe com a cauda SUMO (Figura 14A) revelou uma interação em apenas 8 % das células Raji, enquanto que essa interação aumentou para mais de 80 % quando a cauda SUMO foi excisada (Figura 14B).

Figura 14 – Plots de interação dos scFv com e sem cauda SUMO ao alvo CD20 expresso na membrana de células Raji.



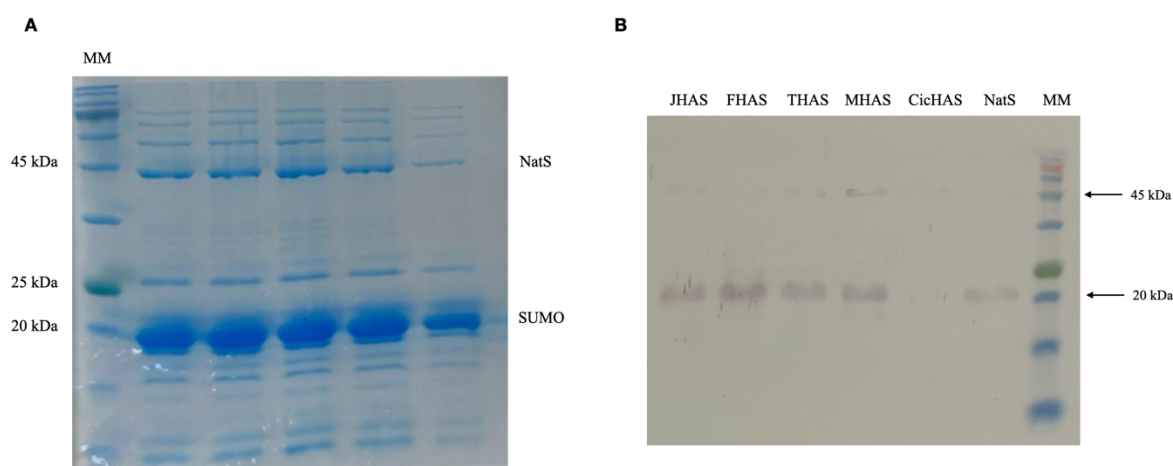
Fonte: Elaborada pela autora. Os *plots* SSCxFSC indicam características da morfologia celular, enquanto que os *plots* FSCxFITC indicam a intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo conjugado ao anticorpo secundário. A intensidade de fluorescência do fluorocromo FITC indica interação do scFv com a célula Raji, CD20+. A) scFv nativo com cauda SUMO - NatS; B) scFv nativo após a clivagem da cauda SUMO - Nat.

O resultado acima reforça a hipótese de que a cauda SUMO pode interferir na interação do alvo na superfície celular. Embora seja uma estratégia para promover o correto enovelamento da proteína, essa *tag*, devido à sua massa molecular aparente (~20 kDa), pode causar um impedimento estérico no domínio V<sub>H</sub> das moléculas em análise.

#### 4.1.2 Imunodeteção dos scFv's com cauda SUMO

O início da investigação de proteínas malformadas durante a expressão dos scFv's ocorreu através de um *western blot* realizado com proteínas provenientes de picos cromatográficos oriundos do cromatógrafo AKTA (figura 15A). Essas proteínas foram sondadas com anticorpos Anti-His-AP a fim de observar a presença de diferentes proteínas com cauda de 6xHis (Figura 14B). A *tag* SUMO apresenta em sua região N-terminal a *tag* de 6xHis, seguida da cauda SUMO e, ao final, a sequência de aminoácidos GGS indica o sítio de clivagem da ULP SUMO Protease e, logo após, tem-se o início do domínio V<sub>H</sub> dos scFv's.

Figura 15 – Análise eletroforética e *Western Blot* dos scFv's expressos em vetor pETSUMO



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular (*True Color High Range Protein Ladder*, Sinapse<sup>®</sup>), NatS: Nativo em vetor pETSUMO, CicHAS, MHAS, THAS, FHAS e JHAS: alguns mutantes em vetor pETSUMO. A) Gel SDS-PAGE 12,5% dos picos cromatográficos obtidos no sistema automatizado AKTA e que foram excisados para análises no espectrômetro de massas; B) *Western Blot* em membrana de nitrocelulose de picos cromatográficos de alguns scFv's em vetor pETSUMO

Como pode ser observado na figura acima, o western blot revelou que houve marcação de duas proteínas com anti-His-AP, o que reforça a evidência que, de fato, há a presença de diferentes proteínas sendo expressas com cauda de 6xHis. A intensidade de banda fornece indícios de que a maior parte das proteínas expressas estão sendo malformadas, uma vez que o tamanho esperado da proteína SUMO-scFv é cerca de 41 KDa e as bandas mais intensas são as próximas de 20 KDa. A *tag* SUMO confere aumento no tamanho da proteína de cerca de 14 KDa, sendo adicionada na região N-terminal da proteína em formação.

Há alguns relatos na literatura que buscam explicar o porquê de uma proteína ser malformada ou expressa de forma truncada. Uma hipótese é a de que um RNAm defeituoso não tenha sido degradado pelo controle de qualidade existente na maquinaria celular (KARAMYSHEV; KARAMYSHEVA, 2018). Isso pode acarretar a tradução de proteína malformada sem que haja o sinal de envio para degradação. A real razão do ocorrido no caso dos scFv's ainda necessita ser melhor investigada.

#### 4.1.3 Espectrometria de massas a partir da excisão de spots em gel de SDS-PAGE

Para melhor investigação do fenômeno relatado no tópico anterior, foi realizado experimento de espectrometria de massas, a fim de identificar a sequência das proteínas visualizadas em gel de eletroforese. Ao final do protocolo de hidrólise trípica *in-gel*, os peptídeos purificados foram quantificados via Qubit, porém a concentração ficou abaixo do limite de sensibilidade do método (12,5 µg/mL) e não foi possível estimar a concentração das amostras. Apesar da baixa concentração e devido à altíssima sensibilidade do espectrômetro de massas (500 fg) *Q Exactive Plus*, prosseguiu-se a análise.

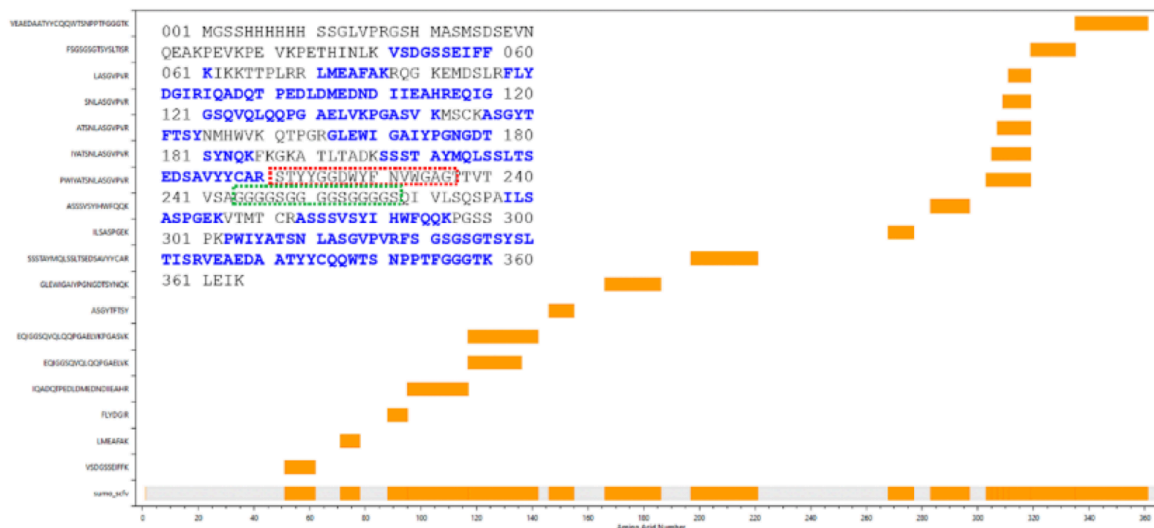
Com a análise de proteômica *bottom-up* da amostra NatS foi possível identificar apenas 2 proteínas pela máxima parsimônia. Na tentativa de realizar uma quantificação relativa das proteínas, as ocorrências foram classificadas pelo fator de abundância espectral normalizado (NSAF - *Normalized spectral abundance factors*) o que revelou que 98% dos peptídeos analisados correspondiam à proteína de interesse SUMO-scFv, com uma cobertura de cerca de 55% da sequência de aminoácidos.

O alinhamento dos peptídeos e a cobertura evidenciam que foi possível identificar partes do anticorpo de interesse: final da *tag* SUMO, parte da região variável de cadeia pesada (VH) e região variável de cadeia leve (VL) praticamente completa. Entretanto, pode-se observar na Figura 16, que não foram identificados peptídeos da região que contempla o *Linker* (em



verde) e da CDR3 do domínio variável pesado (em vermelho), componente importante da molécula de anticorpo no que tange à atividade de ligação e especificidade.

Figura 16 – Representação esquemática da cobertura aminoacídica de NatS



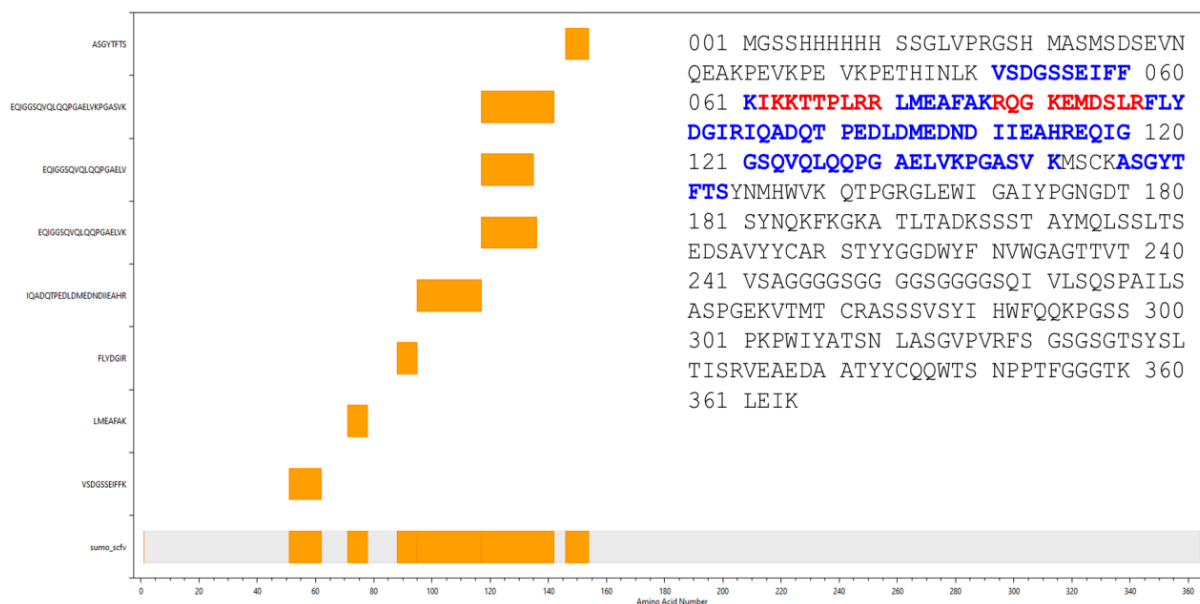
Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (2022). Peptídeos em azul foram detectados pela análise LC-MS; em destaque vermelho região CDR3 do final da porção VH e, em verde, a sequência de aminoácidos do Linker entre VH e VL. Início da VH é marcada pelos resíduos de aminoácidos QVQLQQ e início da VL é marcada pelos resíduos de aminoácidos QIVLSQ.

Todos os peptídeos analisados da amostra identificada como SUMO corresponderam a sequência da *tag* SUMO com uma cobertura de cerca de 40%, quando confrontada com sequência fasta somente da *tag* SUMO. Dos 112 aminoácidos que compõem a SUMO, foi possível identificar apenas a porção final (aminoácidos em azul na figura 17), com exceção dos trechos que contém muitas lisinas (K) e argininas (R), os quais são pontos de clivagem da tripsina, originando peptídeos tripticos muito pequenos, o que inviabiliza a detecção pelo espectrômetro de massas. Uma hipótese é que a tripsina talvez não seja a enzima mais adequada para promover a formação dos peptídeos dos scFv's para o espectrômetro de massas. Outras análises deverão ser realizadas a fim de investigar os motivos pelos quais a região CDR3 da cadeia pesada não ter sido detectada, uma vez que esta é a porção de maior interação com o alvo, conferindo alta especificidade.

Quando realizado o alinhamento da amostra investigativa SUMO + parte de scFv, obteve-se uma cobertura de 20%. É interessante notar que alinhando contra a sequência completa da proteína de interesse, peptídeos do início da cadeia variável pesada são identificados (Figura 17). Portanto, a banda excisada em torno de 20 KDa (chamada de SUMO,

figura 15A) parece conter partes do fragmento de scFv, embora seja composta apenas da porção final da cauda SUMO com o começo da região variável pesada do fragmento de anticorpo. As razões pelas quais a proteína ter sido expressa truncada ainda necessitam ser melhor elucidadas.

Figura 17 – Representação esquemática da cobertura aminoacídica da banda SUMO

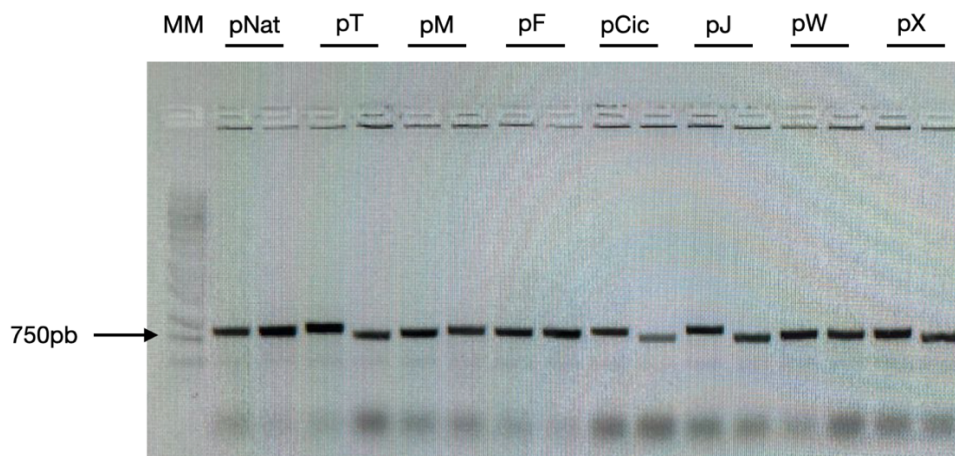


Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (2022). Em azul, peptídeos detectados pelo espectrômetro de massas.

#### 4.1.4 Clonagem em vetor pET28a

Uma vez comprovada a má formação de proteínas em vetor pETSUMO, fez-se uma clonagem e tentativa de expressão em outro vetor, o pET28a, pois as proteínas expressas nesse vetor apresentam uma *tag* 6xHis na região N-terminal, tornando válido o nosso método de purificação. A confirmação da clonagem foi feita através da PCR de colônias, cuja análise eletroforética está ilustrada na figura 18.

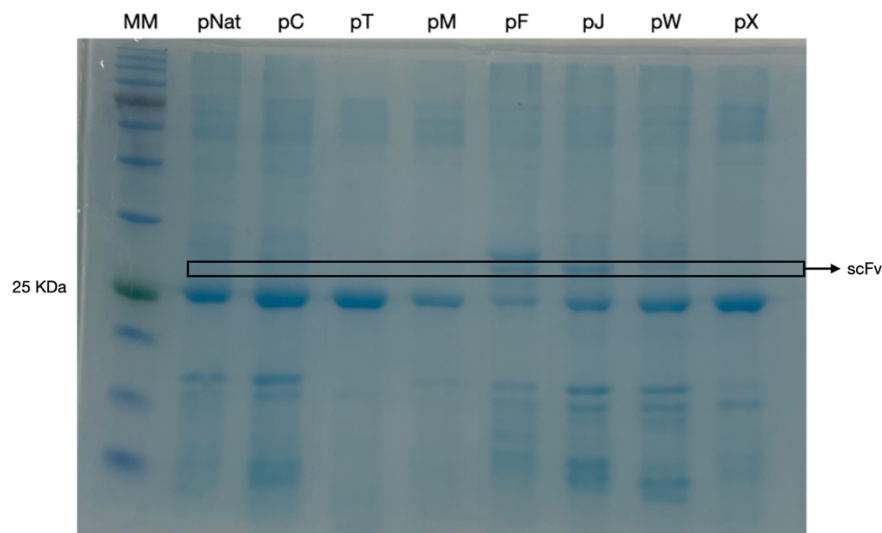
Figura 18 – Análise eletroforética em gel de agarose 1% da PCR de colônias confirmatória da clonagem



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA *Ladder* Sinapse); pNat: sequência nativa do Rituximabe em vetor pET28a; a denominação das sequências mutantes está indicada na figura 10B. A letra “p” antes do nome das proteínas indica a clonagem em vetor pET28a.

Os scFv's expressos em *E.coli* SHUFFLE no vetor pET28a apresentam massa molecular aparente de 27 KDa, contendo *tag* 6xHis na região N-terminal e *tag* HA (Hemaglutinina) na região C-terminal, conforme indicado na figura 19. No primeiro momento, achou-se que as bandas na altura de 25 KDa eram referentes aos scFv's, uma vez que uma pequena diferença (~2 KDa) poderia ser constatada apenas devido a migração no gel. Análises de citometria de fluxo e espectrometria de massas foram realizadas a fim de buscar entender qual a abundância dos fragmentos de anticorpo nos géis analisados.

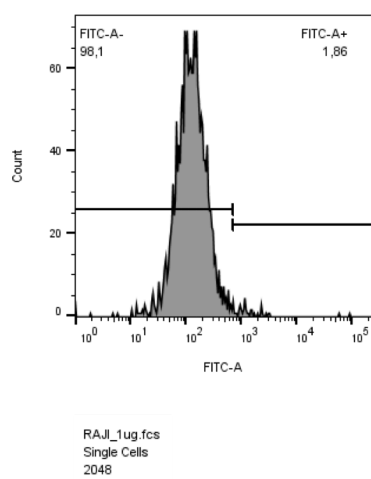
Figura 19 – Análise eletroforética em gel SDS-PAGE 12,5% dos scFv's



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular *True Color High Hange Protein Ladder* – Sinapse Biotecnologia.

De posse das proteínas expressas e purificadas, realizou-se um ensaio de citometria de fluxo, a fim de identificar a interação, inicialmente da sequência nativa, com o alvo CD20 na membrana da célula, cujo histograma está ilustrado na figura 20 abaixo.

Figura 20 – Histograma do scFv pNat clonado em vetor pET28a



Fonte: Elaborada pela autora. O histograma mostra que apenas 1,86% das células interagiram com o scFv pNat.

O histograma da figura 19 mostra marcação de apenas 1,86% das células CD20+, isto é, uma baixa porcentagem das células apresentou interação com o scFv, o que é indicado pelo deslocamento na fluorescência ilustrado na figura. Após esse resultado de citometria de fluxo, constatou-se a importância da expressão das proteínas heterólogas com cauda SUMO, uma vez que as proteínas expressas em outro vetor, por não apresentarem ligação com o CD20 na superfície celular e podem estar com o enovelamento comprometido, promovendo baixa solubilidade e formação de agregados do tipo corpos de inclusão.

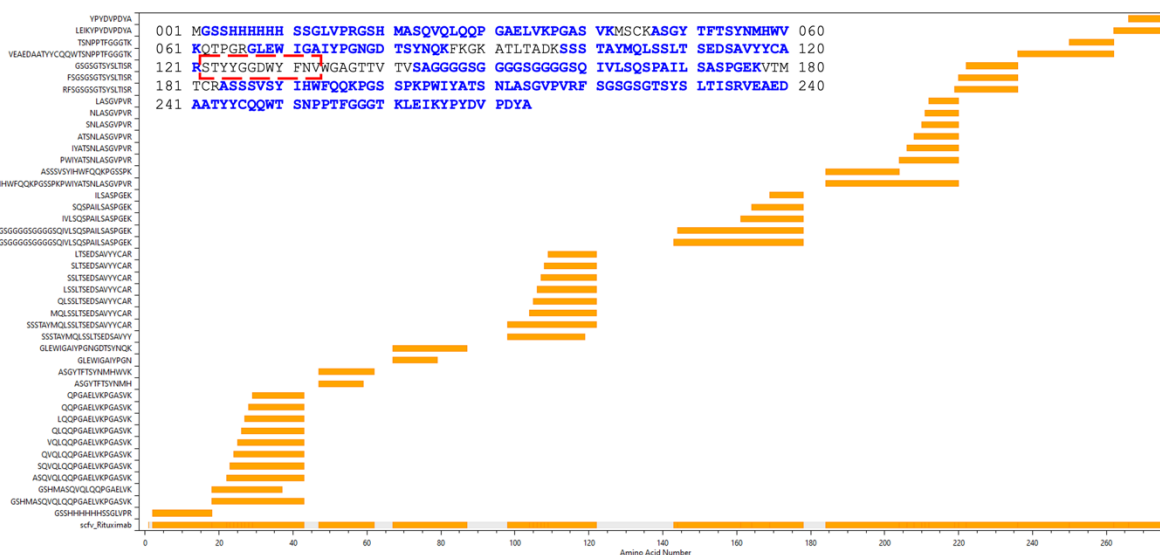
Há diversas estratégias que favorecem o enovelamento protéico. O uso de *tags* moleculares, como a SUMO, para auxiliar no *fold*ing das proteínas é recorrente. LIU *et al.* (2018) comparou as caudas de MBP, 6xHis e SUMO em nanocorpos de camelídeos, onde a cauda SUMO apresentou melhores níveis de solubilidade, rendimento e capacidade de ligação ao alvo (LIU *et al.*, 2018). O enovelamento protéico também foi questionado por AHMADZADEH *et al.* (2020) quando houve a comparação da mesma proteína expressa em duas diferentes cepas de *E.coli* (SHUFFLE e BL21 (DE3)), obtendo-se maior rendimento em

BL21 (DE3), porém não houve ligação do scFv anti-HER2 ao alvo na superfície celular, o que ocorreu com a cepa SHUFFLE apresentando 95 % de marcação (AHMADZADEH *et al.*, 2020).

#### 4.1.5 Espectrometria de massas do scFv sequência nativa expressa em vetor pET28a

Após a citometria de fluxo ter revelado uma baixa interação do pNat com o CD20 nas células Raji, foi realizado um ensaio de espectrometria de massas a fim de avaliar a abundância do pNat tal qual mostrado na análise eletroforética da figura 21.

Figura 21 – Representação esquemática da cobertura aminoacídica de pNat



Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (2022). Em azul, peptídeos detectados pelo espectrômetro de massas. Hachurado em vermelho, encontra-se a sequência referente à CDR3 da cadeia variável pesada. pNat: sequência nativa do Rituximabe clonado em vetor pET28a.

Quando realizado o alinhamento da sequência de scFv nativo em vetor pET28a, obteve-se uma cobertura de 82,5 %. No entanto, a sequência referente ao fragmento de anticorpo em análise apresentou uma abundância de apenas 1%. Portanto, a banda mais intensa observada na figura 18, próxima a 25 KDa não corresponde ao scFv, que apresenta massa molecular aparente de cerca de 28 KDa quando expresso em vetor pET28a. Um fator que pode ter sido determinante para que essa proteína não tenha se ligado ao CD20 foi a baixa expressão de scFv solúvel quando usado o vetor pET28a. Importante destacar que não foi possível identificar, pelo espectro de massas, a região CDR3 da cadeia pesada do scFv. FERNÁNDEZ-QUINTERO *et al.* (2019) discutiram a importância do arranjo conformacional da CDR-H3 na

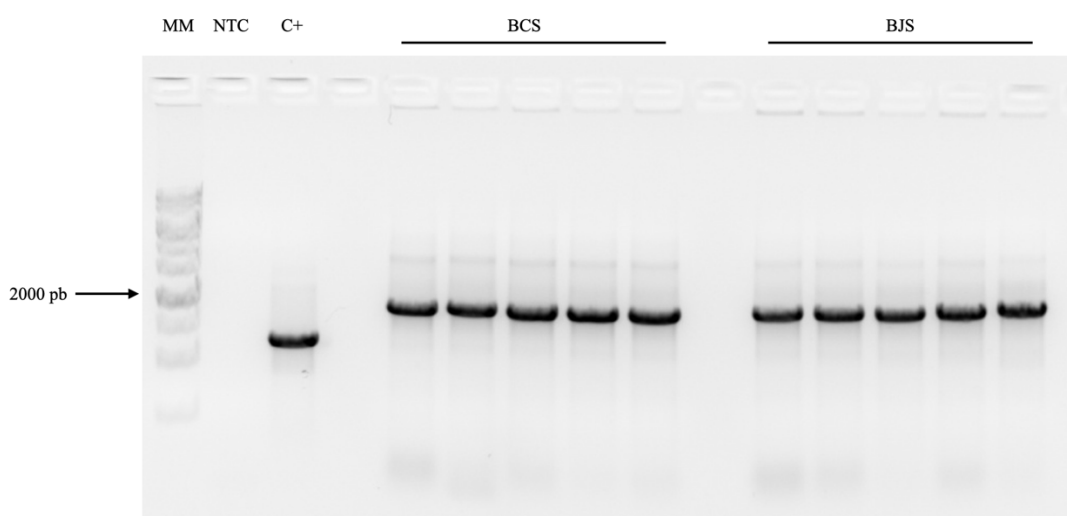
capacidade de ligação de anticorpos, onde foram avaliados perfis cinéticos, termodinâmicos, estruturais e espaciais, que devem ser levados em consideração para o arranjo da CDR-H3 (FERNÁNDEZ-QUINTERO *et al.*, 2019).

Após a investigação sobre a influência da cauda SUMO na interação do scFv com seu alvo, bem como a importância no enovelamento dos nossos fragmentos de anticorpo, resolveu-se retornar o uso do vetor pETSUMO e tentar otimizar as condições de purificação dos scFv's (nativo e mutantes) expressos nesse vetor, para obtenção de proteínas com maior rendimento e qualidade adequados para os ensaios funcionais.

#### 4.2 Clonagem dos mutantes em formato BiTE

A clonagem dos mutantes BCS e BJS (BCS é proveniente da clonagem do scFv CicHA em formato BiTE e BJS é proveniente da clonagem do scFv JHA em formato BiTE) foi confirmada através de PCR de colônias e sequenciamento Sanger. A sequência do scFv denominado de CicHA não será mostrada aqui, pois é alvo de propriedade intelectual do grupo. A figura 22 mostra a análise eletroforética do gel de agarose das colônias positivas, onde é possível observar fragmentos de cerca de 2000 pb referentes aos BsAbs mutantes clonados em vetor pETSUMO.

Figura 22 – Análise eletroforética da PCR de colônias transformadas para obtenção dos bispecíficos mutantes



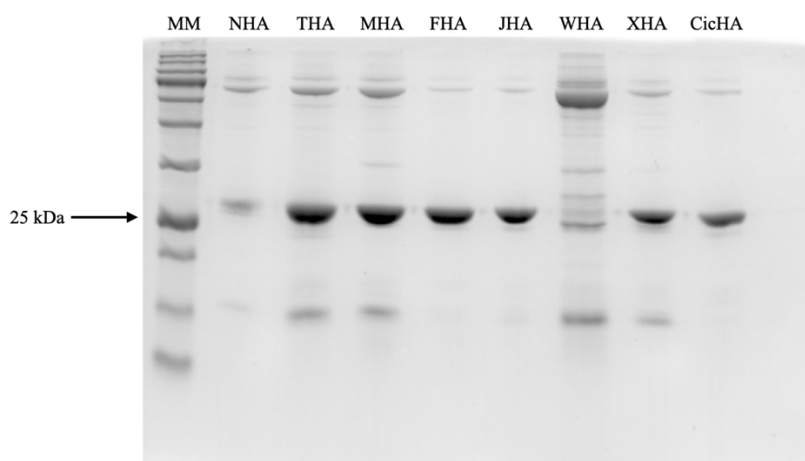
Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder Sinapse), NTC: Controle negativo, C+: Controle positivo para os primers utilizados (scFv clonado em pETSUMO).

### 4.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Otimizações na purificação foram realizadas nos SUMO-scFv's a fim de contornar a obtenção de proteínas mal formadas. A primeira otimização a ser realizada foi ajustar os parâmetros adequados da sonicação, pois esse método pode degradar proteínas quando há a liberação de calor. Duas diferentes sondas foram testadas, cada uma com diferentes intensidades e duração de pulsos. Após diversos testes, comprovou-se que o uso das microsondas, em amplitude moderada de 25% com pulsos de 5 s e 15 s de descaso em gelo são parâmetros adequados, que não causam degradação da proteína, após tentativas utilizando outras amplitudes e tempos de pulso. Outra otimização realizada foi quanto às concentrações de imidazol utilizadas na purificação. O uso de uma baixa concentração de imidazol (5 mM) no tampão de ligação, bem como padronização do método no cromatógrafo AKTA, com diferentes concentrações de imidazol nas etapas de lavagem e eluição, proporcionaram melhores rendimentos e qualidade dos scFv's sequência nativa e mutantes.

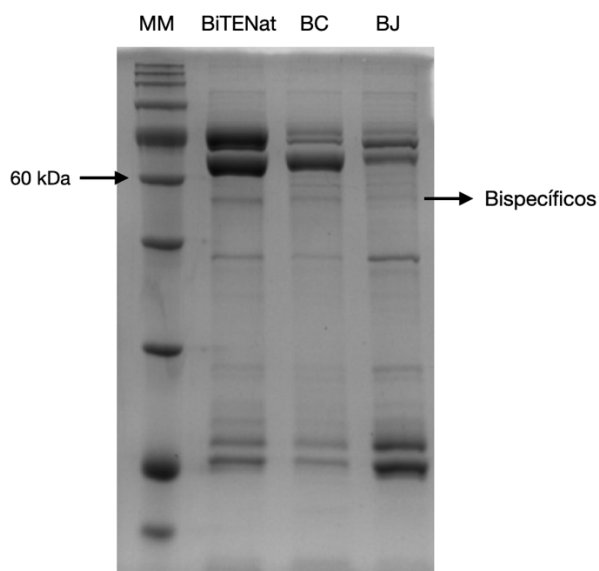
Os bispecíficos e os fragmentos de anticorpo clonados e transformados em cepa de *E. coli* SHUFFLE T7 foram purificados conforme protocolo descrito no item 3.5. Os scFv's, após a clivagem da cauda SUMO, possuem massa molecular aparente de, aproximadamente, 27 KDa (Figura 23) e os bispecíficos possuem massa molecular aparente de 55 KDa sem cauda sumo (Figura 24). As proteínas foram quantificadas por fluorimetria no Qubit, de acordo com o manual do fabricante, e cerca de 5 µg foram aplicados no gel das figuras 23 e 24. O rendimento da expressão de todos os fragmentos foi de, aproximadamente, 2 mg/L de cultura e dos bispecíficos, 0,3 mg/L, nas condições citadas no item 3.4.

Figura 23 – Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12,5 % dos fragmentos de anticorpos após a purificação por cromatografia de afinidade



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular *True Color High Hange Protein Ladder* – Sinapse Biotecnologia. A massa molecular aparente dos fragmentos de anticorpo é de 27 KDa.

Figura 24 – Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 10% dos bispecíficos após a purificação por cromatografia de afinidade



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular *True Color High Hange Protein Ladder* – Sinapse Biotecnologia; BiTENat: Sequência nativa em formato de bispecífico sem a cauda SUMO; BC e BJ: mutantes em formato de bispecífico sem a cauda SUMO. A massa molecular aparente dos BsAbs sem cauda sumo é de 55 KDa.

A cepa SHUFFLE T7 é uma cepa comercial engenheirada que apresenta dois genes nocauteados (*trxB* e *gor*), envolvidos nas vias da tioredoxina e da glutaredoxina, suprimindo rotas de sinalização de morte celular. Isso implica desvios metabólicos que favorecem a produção de uma redutase AhpC. Uma outra modificação é a expressão aumentada da proteína DsbC no citoplasma, o que confere a grande vantagem da SHUFFLE: favorecimento da formação de pontes dissulfeto no citoplasma da bactéria (REN; KE; BERKMEN, 2016). Essa formação de pontes dissulfeto é importante no correto enovelamento da proteína, uma vez que um scFv possui uma ponte intracadeia em  $V_H$  e uma em  $V_L$ . AHMADZADEH *et al.* (2020) realizaram duas expressões em sistema procarioto de um scFv anti-HER2, uma em BL21 (DE3) e outra em SHUFFLE T7. O rendimento obtido foi superior em BL21, no entanto, o scFv produzido não foi capaz de se ligar à superfície da célula em um ensaio de citometria, o que pode ser observado com a batelada de expressão em SHUFFLE T7, mostrando, assim, a importância da formação das pontes dissulfeto no enovelamento proteico (AHMADZADEH *et al.*, 2020). KOÇER *et al.* (2021) também observou uma melhoria no enovelamento de um scFv

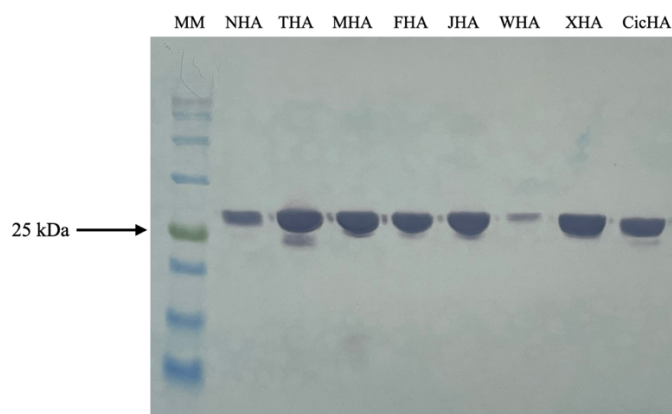


anti-HER2 quando expresso em SHUFFLE T7 comparado a BL21 (DE3). A capacidade de ligação nesse caso foi observada através de um ensaio de ELISA onde o antígeno HER2 foi imobilizado (KOÇER *et al.*, 2021).

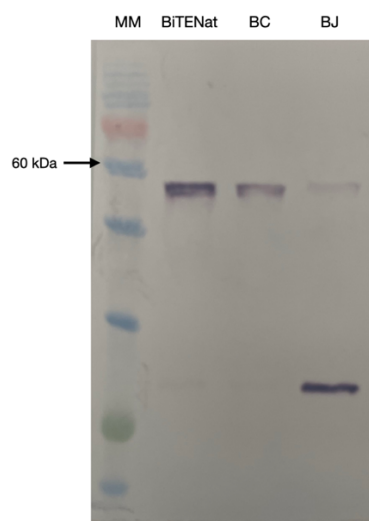
#### 4.4 Western Blot

A imunodeteção por Western Blot foi realizado a fim de confirmar a expressão das proteínas do estudo (Figura 25 e 26). O uso do anticorpo secundário Anti-HA-AP fornece uma outra forma de análise da presença de proteínas, pois a HA-tag encontra-se na região C-terminal das proteínas. Portanto, proteínas reveladas por este anticorpo apresentam suas sequências de aminoácidos completas. A marcação com este anticorpo também é um importante fator comprobatório de viabilidade de utilização dessas proteínas nos experimentos de citometria de fluxo, uma vez que se utiliza o anticorpo anti-HA-FITC.

Figura 25 – *Western Blot* dos scFv's nativo e mutantes



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular *True Color High Hange Protein Ladder* – Sinapse Biotecnologia.

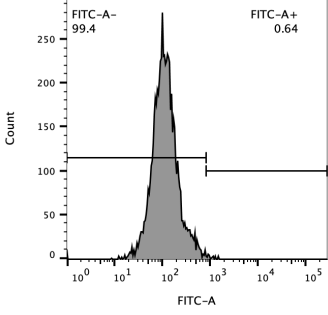
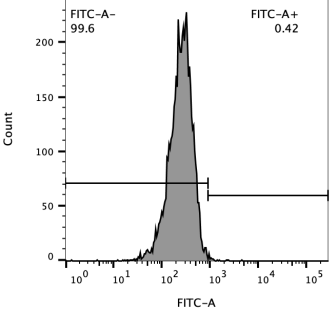
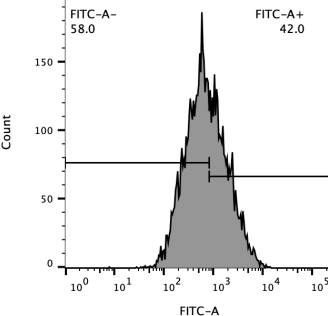
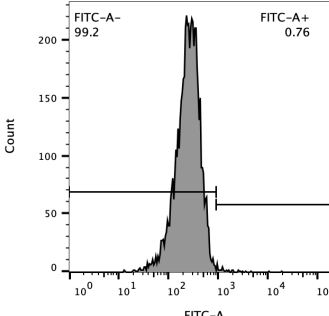
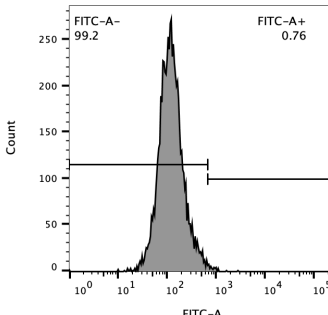
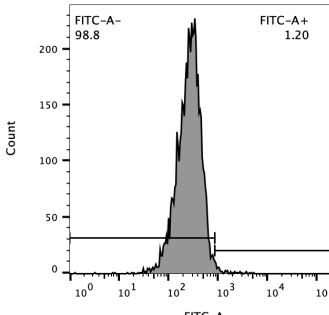
Figura 26 – *Western Blot* dos bispecíficos

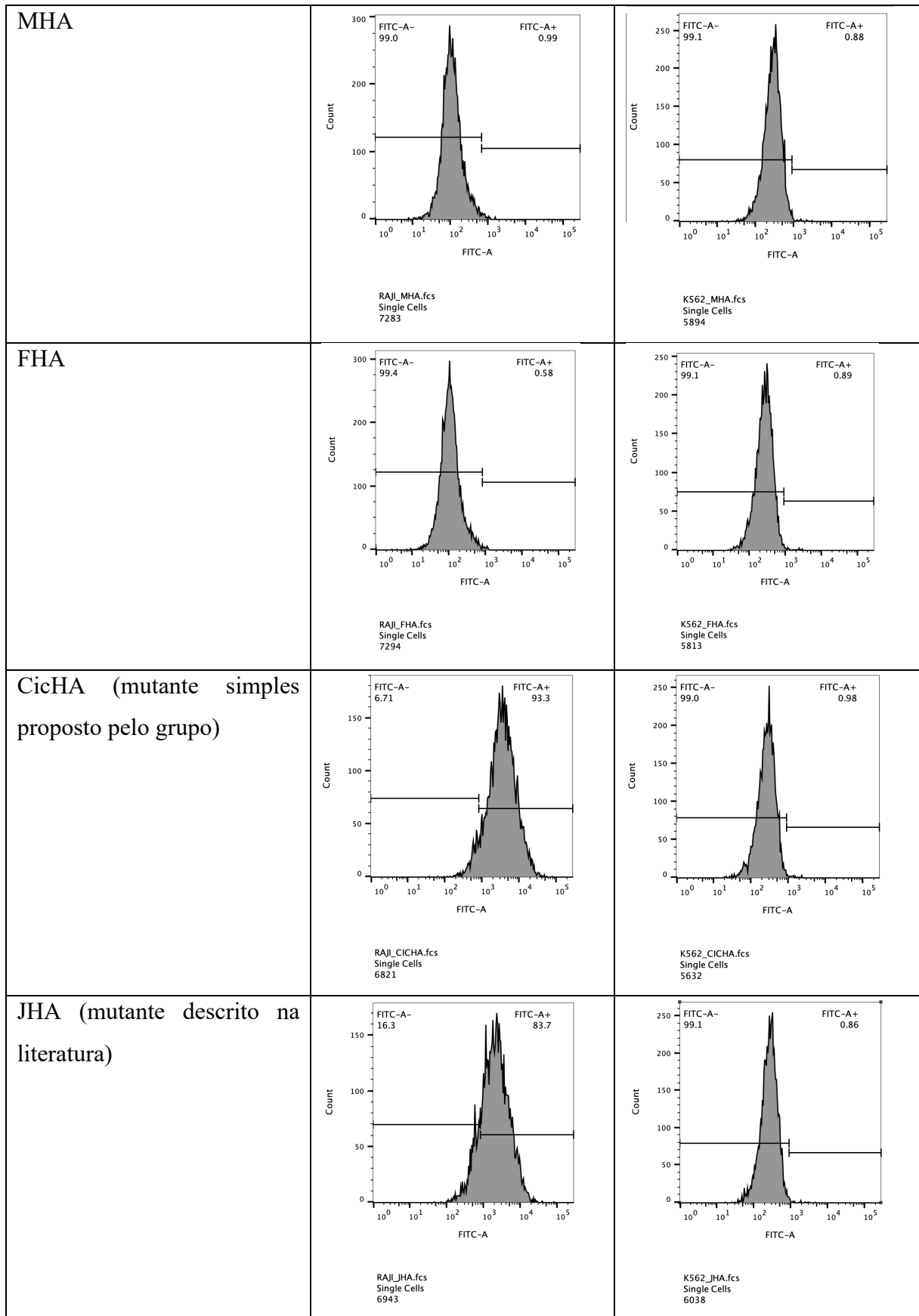
Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcadores de peso molecular *True Color High Hange Protein Ladder* – Sinapse Biotecnologia; BITENat: Sequência nativa em formato de bispecífico sem a cauda SUMO; BC e BJ: mutantes em formato de bispecífico sem a cauda SUMO.

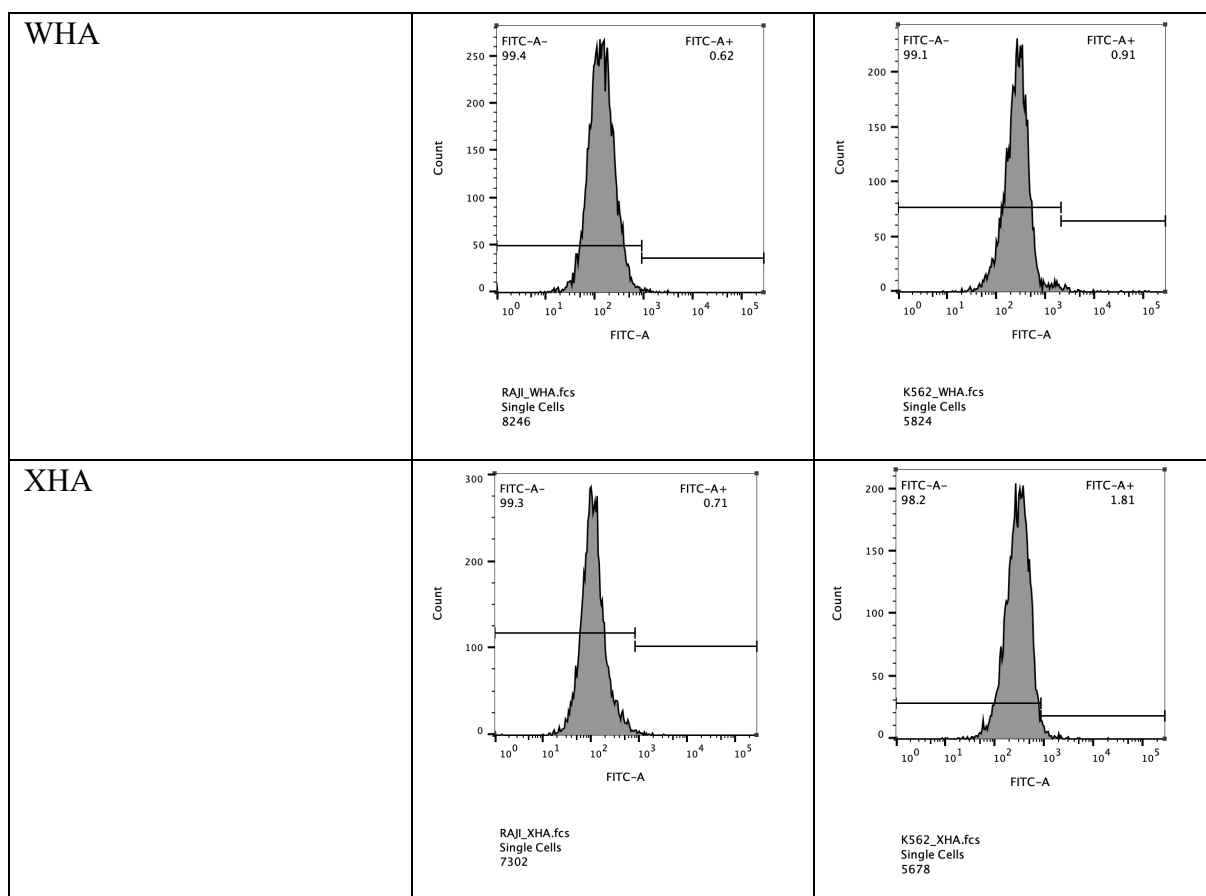
#### 4.5 Citometria de Fluxo

Ensaio funcionais da interação dos fragmentos de anticorpos com o alvo foram realizados pelo ensaio de citometria de fluxo, que revelou a capacidade de ligação ao marcador CD20 na superfície celular de apenas três das proteínas no formato scFv em estudo neste trabalho: NHA (sequência nativa do Rituximabe), JHA (triplo mutante já descrito na literatura) e CicHA (um dos mutantes simples proposto pelo grupo). O quadro 2 ilustra os histogramas obtidos na citometria de fluxo de todos os mutantes em células Raji (CD20+) e K562 (CD20-).

Quadro 2 – Histogramas obtidos na citometria de fluxo de única marcação com as células Raji e K562 com scFv sequência nativa e mutantes

Proteína	Raji (CD20+)	K562 (CD20-)
Controle de inespecificidade com marcação simples de Anti-HA-FITC	 <p data-bbox="715 801 820 853">RAJI_ANTI-HA.fcs Single Cells 6885</p>	 <p data-bbox="1114 801 1219 853">K562_ANTI-HA.fcs Single Cells 5738</p>
NHA (sequência nativa)	 <p data-bbox="715 1240 820 1292">RAJI_NHA.fcs Single Cells 7168</p>	 <p data-bbox="1114 1240 1219 1292">K562_NHA.fcs Single Cells 5883</p>
THA	 <p data-bbox="715 1682 820 1733">RAJI_THA.fcs Single Cells 6972</p>	 <p data-bbox="1114 1682 1219 1733">K562_THA.fcs Single Cells 5763</p>





Fonte: Elaborado pela autora. O controle de inespecificidade utilizado indica que a fluorescência observada não é apenas proveniente do anticorpo secundário usado nos ensaios.

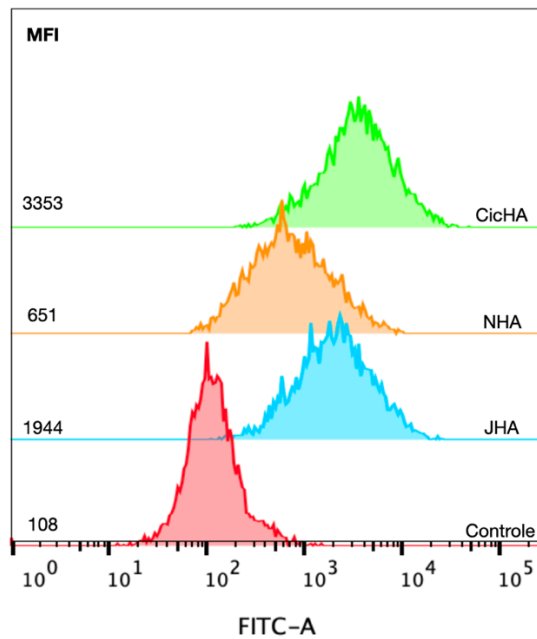
A mutação que originou o CicHA foi realizada em uma região de framework, portanto, fora das CDRs, na cadeia leve, sendo surpreendente o aumento da interação, especialmente quando comparado à sequência do scFv nativo. Resíduos fora das regiões de CDR são conhecidos por apresentarem um papel importante na afinidade da ligação, quer seja por proporcionar um contato direto com o antígeno, quer seja por influenciar a estabilidade e flexibilidade conformacional da molécula ou até mesmo com papel de estruturar o *loop* das CDRs (DONDELINGER *et al.*, 2018). Xiao *et al* comprovou a influencia da cadeia leve na modulação da conformação da cadeia pesada em anticorpos utilizados no combate à gripe, contribuindo para a capacidade de ligação e de neutralização dos vírus (HUANG *et al.*, 2021).

As demais mutações sugeridas (THA, MHA, FHA, WHA e XHA) ocorrem em regiões de CDRs, onde há maior interação e versatilidade com antígenos, especialmente em resíduos de cadeias laterais aromáticas, as quais contribuem para a especificidade na formação do complexo anticorpo-antígeno protéico (PENG *et al.*, 2022). A troca de resíduos proposta para o mutante MHA (cadeia variável pesada, W106R) teve a intenção de trocar um resíduo

aromático por um de cadeia lateral de carga positiva na região de CDR-H3, onde a energia livre de Gibbs fornecia indicativos de interações favoráveis para o mutante. No entanto, Bar *et al.* (2021) realizaram um estudo comparativo dos resíduos críticos do paratopo do Rituximabe entre a estrutura do cristal e a estrutura do CD20 dimérica obtida através da técnica de criomicroscopia eletrônica, a qual revelou que o resíduo W106 da cadeia variável pesada era crítico para a interação do Rituximabe com o CD20 (BAR *et al.*, 2021). A mutação de THA (cadeia variável pesada, D105N) sugeriu a troca de um resíduo de carga negativa por um de cadeia lateral de carga neutra. A expectativa era de aumento da afinidade, porém devido à proximidade com o resíduo crítico W106, a mutação sugerida possivelmente prejudicou a interação do scFv com o CD20 na superfície celular. O mutante FHA cuja mutação na cadeia variável pesada foi D105N + W106R teve o intuito de avaliar o efeito aditivo da combinação de mutações na afinidade, no entanto, como as mutações propostas não ofereciam interação com o alvo na célula, tal efeito aditivo não foi possível de ser avaliado. O mutante JHA, um comparativo com a literatura, é um triplo mutante com duas mutações na variável pesada (D57E e Y102K) e uma na variável leve (N93R). Buscando combinar mutações e avaliar o efeito aditivo das mesmas, foram propostos um mutante quádruplo (WHA - D57E, Y102K, W106R e N93R – leve) e um quádruplo (XHA - D57E, Y102K, D105N, W106R e N93R – leve).

O gráfico comparativo do deslocamento proporcionado pelos mutantes nas células Raji pode ser observado no gráfico 1. Em vermelho, tem-se a fluorescência equivalente ao anticorpo secundário anti-HA-FITC. É possível observar uma maior interação do mutante CicHA (em azul) dentre todas as moléculas testadas. Observa-se, ainda o deslocamento proporcionado por NHA e JHA, conforme ilustrado nos histogramas do quadro 2.

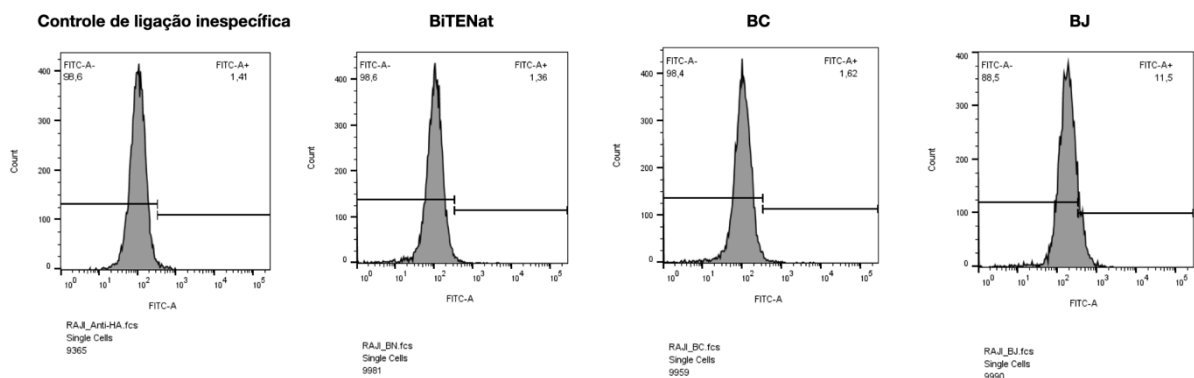
Gráfico 1 – Comparação do deslocamento de fluorescência observada da intensidade de mediana de fluorescência entre NHA, JHA e CicHA



Fonte: Elaborada pela autora. Em vermelho, tem-se o controle de inespecificidade correspondente à fluorescência emitida pelo anticorpo secundário anti-HA-FITC nas células Raji. Em laranja, sequência nativa do Rituximabe (NHA), em verde, CicHA e em azul, JHA.

A citometria de fluxo realizada com os bispecíficos revelou baixa capacidade de ligação do BiTE BJ, enquanto que os demais BiTEs não apresentaram ligação com o CD20 na membrana das células Raji (Figura 27). A marcação de apenas 11% das células com BJ pode ser um indicativo de interação dessa proteína com o alvo na superfície celular. Diante da presença de contaminantes nas amostras, a quantificação dos bispecíficos fica comprometida, portanto, não se tem a real quantidade de BsAbs disponível para interação.

Figura 27 – Histogramas obtidos na citometria de fluxo dos BiTEs



Fonte: Elaborada pela autora. O controle de ligação inespecífica é referente à fluorescência emitida pelo anticorpo secundário anti-HA-FITC.

Otimizações de expressão e purificação são necessárias para a obtenção de BiTEs de maior pureza, e assim, será possível realizar análises de interação ao alvo na superfície celular de forma mais fidedigna, onde contaminantes sejam minoritários frente à molécula de interesse. Uma alternativa também é a mudança do sistema de expressão, uma vez que a expressão dos BiTEs em sistema procatioto parece desafiador, pois são moléculas que possuem 4 ligações dissulfeto em sua estrutura, 12 regiões de CDRs que necessitam estar acessíveis para interação, além de a sequência anti-CD3 dos BiTEs ter sido humanizada, o que dificulta a expressão em bactérias. Sabe-se que esse sistema de expressão apresenta vantagens e desvantagens na produção de proteínas heterólogas. NADDAFI *et al.* (2018) realizou um estudo comparativo do BiTE Blinatumomabe<sup>®</sup> (anti-CD19xCD3) expresso em células CHO e em *E.coli* BL21 (DE3). Embora o rendimento obtido na expressão bacteriana tenha sido maior, a atividade de ligação dessas proteínas ao alvo só foi observada quando expressa em sistema eucarioto (NADDAFI *et al.*, 2018). MOAZZAMI *et al.* (2021) também realizaram estudos comparativos entre expressão em células Expi293F (expressão transiente) e em *E.coli* BL21 (DE3) com o BiTE Blinatumomabe<sup>®</sup>. Novamente, o rendimento obtido em bactéria foi superior ao obtido em células de mamíferos, no entanto, a qualidade da proteína, o enovelamento e a agregação favorecem a expressão em Expi293F, uma vez que as proteínas expressas em sistema eucarioto conservaram a capacidade de reconhecimento do antígeno imobilizado no ensaio de ELISA (NADDAFI *et al.*, 2018).

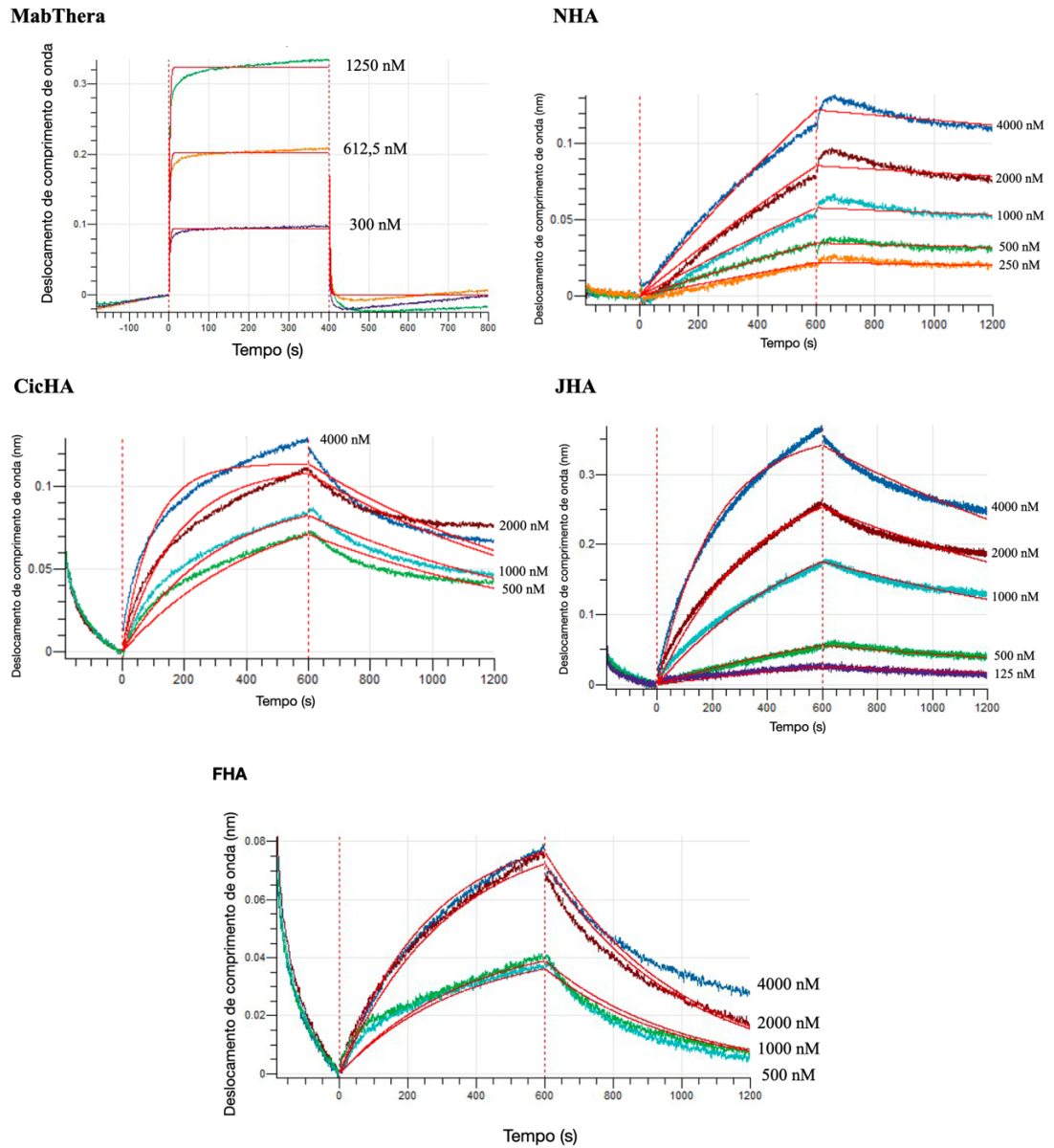
#### 4.6 Interferometria

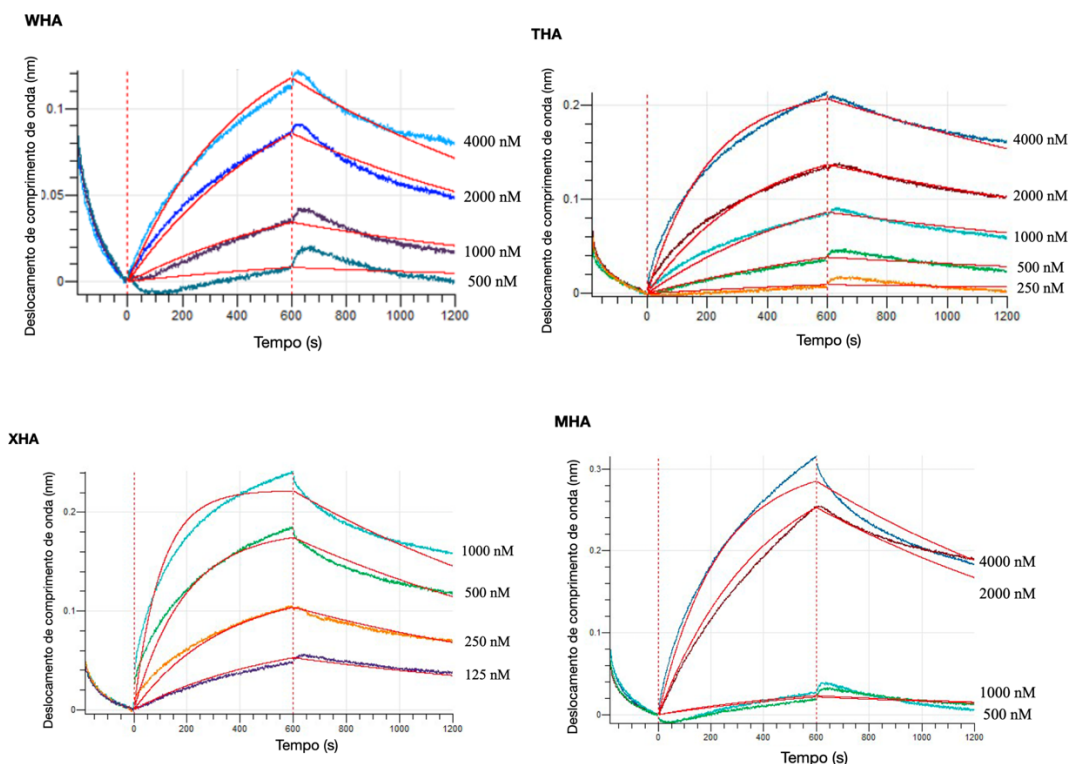
A análise da cinética de interação entre as moléculas testadas e o peptídeo biotinizado revelou valores de constante de afinidade ( $K_D$ ), que é definida como a concentração de analito no equilíbrio que ocupa 50% dos sítios de ligação disponíveis na superfície do biossensor. Matematicamente, a constante de afinidade é definida como a razão entre a constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) e a constante de associação ( $K_a$ ).

Nas condições analisadas, a interferometria revelou perfis de associação e dissociação dos fragmentos de anticorpos nativo e sequências mutantes, conforme pode ser observado na figura 28, bem como a quantificação da cinética de interação fornecendo a constante de afinidade, conforme observado no quadro 3.



Figura 28 – Sensorgrama de análises de cinética de interação dos fragmentos de anticorpos de sequências nativa e mutantes





Fonte: Elaborada pela autora. MabThera: Rituximabe comercial. Os sensorgramas ilustram as etapas de associação e dissociação de cada anticorpo, durante os 600 segundos de análise.

De acordo com documentos oficiais de rotulagem do anticorpo monoclonal comercial Rituximabe, o  $K_D$  deste IgG1 é 8 nM (GENENTECH, INC, 2006). No entanto, a técnica utilizada neste ensaio não foi descrita. Sabe-se que a metodologia utilizada confere diferenças de afinidade na mesma molécula analisada, bem como o formato da molécula também seja um fator que influencia nesta medida. Wang *et al.* (2022) realizaram Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) com o Rituximabe, no formato de IgG, e obteve  $K_D$  de 0,2 nM, utilizando vesículas extracelulares expressando CD20 (WANG *et al.*, 2022). A interferometria do MabThera (Rituximabe comercial) realizada pelo grupo obteve valores de  $K_D$  de 7,293  $\mu$ M, mostrando-se distinto dos obtidos por outras técnicas.

Li *et al.* (2009) realizou ensaios de afinidade de ligação no formato F(ab')<sub>2</sub> da molécula de Rituximabe e algumas sequências mutantes, onde esses fragmentos foram marcados com radioisótopos em um experimento realizado com células CD20+, obtendo valores de 4.96 nM e 0.27 nM do mutante, aqui chamado de JHA, cuja sequência foi replicada em formato de scFv para fins comparativos nesta tese (LI *et al.*, 2009). Já Bar *et al.* (2021) realizou ensaios de SPR com a porção Fab do Rituximabe utilizando um peptídeo sintético que mimetiza a região solúvel da alça maior do CD20, similar ao utilizado neste trabalho. No entanto, o trabalho apenas sugere que o  $K_D$  desta interação está na ordem de mM, uma vez que,

por uma limitação técnica, não foi possível utilizar valores nesta ordem de grandeza no experimento de SPR (BAR *et al.*, 2021).

Os scFv's obtidos neste trabalho apresentaram os parâmetros cinéticos mostrados no quadro 3. Valores de  $R^2$  maiores que 0,95 indicam boa relação com o modelo de *fit* de ligação sugerido (1:1), enquanto que valores de  $\chi^2$  abaixo de 3 indicam baixo erro entre os dados experimentais e o modelo *fit*. Observa-se, portanto, que todos os fragmentos de anticorpo apresentaram dados confiáveis no experimento, obtendo-se valores de afinidade apresentados no quadro 3. É importante notar que o NHA deve ser a molécula de referência na comparação com os demais fragmentos, uma vez que ele possui a mesma avidéz na afinidade, bem como o mesmo formato e moléculas produzidas de maneira heteróloga.

Quadro 3 – Parâmetros cinéticos obtidos com a técnica de interferometria

<b>Proteína</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>K<sub>D</sub> (μM)</b>	<b>k<sub>a</sub> (1/Ms)</b>	<b>k<sub>dis</sub> (1/s)</b>
MabThera	0,9926	1,4309	7,293 ± 1,26	5,881x10 <sup>4</sup> ± 1,02	4,289x10 <sup>-1</sup> ± 0,06
NHA	0,9910	0,3409	1,462 ± 0,04	9,597x10 ± 0,29	1,404x10 <sup>-4</sup> ± 0,01
THA	0,9954	0,5283	0,442 ± 0,01	1,115x10 <sup>3</sup> ± 3,00	4,933x10 <sup>-4</sup> ± 0,01
MHA	0,9918	2,1099	0,742 ± 0,04	9,310x10 <sup>2</sup> ± 4,65	2,521x10 <sup>-4</sup> ± 0,02
FHA	0,9636	0,3048	8,577 ± 0,19	3,00x10 <sup>2</sup> ± 6,62	2,574x10 <sup>-3</sup> ± 0,05
JHA	0,9968	0,9886	0,577 ± 0,01	1,066x10 <sup>3</sup> ± 2,50	6,163x10 <sup>-4</sup> ± 0,01
WHA	0,9856	0,4329	2,044 ± 0,02	4,095 x10 <sup>2</sup> ± 4,50	8,374 x10 <sup>-4</sup> ± 0,03
XHA	0,9875	1,1679	0,076 ± 0,03	9,190x10 <sup>3</sup> ± 30,12	7,022x10 <sup>-4</sup> ± 0,02
CicHA	0,9513	0,7336	0,439 ± 0,01	2,348x10 <sup>3</sup> ± 11,22	1,032x10 <sup>-3</sup> ± 0,001

Fonte: Elaborado pela autora. Os valores ilustrados no quadro são provenientes da análise dos dados de cinética a partir do software Octet Analysis Studio 12.2.2. É importante notar os valores da constante de associação e dissociação de maneira independentes, pois esses parâmetros relevam o quão rápido as moléculas se ligam e desfazem a interação.

As diferenças observadas entre as interações dos scFv's com o peptídeo mimético e o alvo na superfície celular revelam propriedades conformacionais nessas ligações. O peptídeo mimético utilizado não possui flexibilidade conformacional, o que pode, muitas vezes, modificar a afinidade de ligação entre moléculas através da redução da entalpia, tornando essa análise uma simulação mais distante da realidade do CD20 na membrana das células B (JWAD;

WEISSBERGER; HUNTER, 2020). O ambiente de interação proteína-proteína é fortemente influenciado pela conformação em que se encontram essas moléculas, onde fenômenos termodinâmicos devem ser analisados na comparação do mecanismo de ligação dos motivos envolvidos (ZHOU *et al.*, 2019).

Recentemente, através de dados de criomicroscopia eletrônica, houve uma melhor elucidação da estrutura dimérica do CD20 na membrana de células B e da dinâmica de ligação com anticorpos, onde foi possível identificar um segundo ponto de interação do Rituximabe com o alvo, através da CDR1 da cadeia leve desse anticorpo, que contribui substancialmente para a afinidade do anticorpo ao alvo (ROUGÉ *et al.*, 2020). Dessa forma, a hipótese de que alguns scFv's não interagiram na citometria de fluxo, mas apresentaram interação com o peptídeo pode ser explicada através da estrutura tridimensional do alvo, o qual necessita estar em uma conformação adequada, assim como o scFv para que haja interação, conformação essa inexistente no peptídeo mimético. Acrescido a isso, tem-se que as mutações sugeridas ocorreram em locais críticos para essa interação, o que pode ocasionar mudança conformacional que impede a interação com o alvo na membrana celular, mas não impede a ligação ao peptídeo mimético, uma vez que este não possui impedimento conformacional.

## 5 CONCLUSÕES

O trabalho foi capaz de investigar a importância da cauda SUMO no adequado enovelamento protéico, bem como sua influência na interação com o alvo. Após diversas análises, foi possível observar que é necessário a expressão das proteínas com a cauda SUMO, que confere maior solubilidade, porém é preciso retirá-la para realização de ensaios funcionais. Uma vez as proteínas expressas, purificadas e melhor enoveladas, foi possível avaliar a interação dos fragmentos de anticorpos com o alvo CD20 na superfície celular, onde um mutante – CicHA – apresentou 93% de ligação com o alvo, bem como foi possível realizar ensaios de cinética de interação com o peptídeo que mimetiza a região do CD20 onde os scFv's interagem, proporcionando valores quantitativos de constante de afinidade, obtendo-se uma afinidade cerca de 3 vezes maior para o mutante CicHA quando em comparação com a sequência nativa do Rituximabe no formato de scFv. Assim, ainda foi possível selecionar os fragmentos de anticorpos caracterizados e cloná-los no formato de bispecíficos anti-CD20xCD3. Em uma análise preliminar, os apenas o bispecífico BJ apresentou certa capacidade de reconhecimento do alvo na superfície celular. Dessa forma, propõe-se o uso da sequência CiCHA para o desenvolvimento de um anticorpo bispecífico *T-Cell Engager*.

## REFERÊNCIAS

- AHMADZADEH, M. et al. Anti-HER2 scFv Expression in Escherichia coli SHuffle®T7 Express Cells: Effects on Solubility and Biological Activity. **Molecular Biotechnology**, Tehran, Iran, v. 62, p. 18–30, 2020.
- BAGACEAN, C. et al. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia: From uncertainties to promises. **Immunotherapy**, Brest, France, v. 8, n. 5, p. 569–581, maio 2016.
- BAR, L. et al. Determination of the Rituximab Binding Site to the CD20 Epitope Using SPOT Synthesis and Surface Plasmon Resonance Analyses. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 93, n. 17, p. 6865–6872, 4 mai 2021.
- BRINKMANN, U.; KONTERMANN, R. E. The making of bispecific antibodies. **mAbs**, Munich, Germany, v. 9, n. 2, p. 182–212, fev. 2017.
- BUTTON, E. et al. A systematic review of prognostic factors at the end of life for people with a hematological malignancy. **BMC Cancer**, Brisbane, Australia, v. 17, n. 1, p. 213, dez. 2017.
- CARTER, P. J.; LAZAR, G. A. Next generation antibody drugs: Pursuit of the “high-hanging fruit”. **Nature Reviews Drug Discovery**, California, USA, v. 17, n. 3, p. 197–223, fev. 2018.
- CERVANTES-VILLAGRANA, R. D. et al. Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, Mexico City, Mexico, v. 5, n. 99, p. 1–23, 2020.
- CHIU et al. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, Malvern, USA, v. 8, n. 4, p. 55, dez. 2019.
- DE LA ROCHE, M.; ASANO, Y.; GRIFFITHS, G. M. Origins of the cytolytic synapse. **Nature Reviews Immunology**, Cambridge, UK, v. 16, n. 7, p. 421–432, jul. 2016.
- DHATCHINAMOORTHY, K.; COLBERT, J. D.; ROCK, K. L. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. **Frontiers in Immunology**, Worcester, USA, v. 12, p. 636568, 9 mar. 2021.
- DINH, T. L. et al. Using antigen-antibody binding kinetic parameters to understand single-molecule array immunoassay performance. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 88, n. 23, p. 11335–11339, 2016.
- DONDELINGER, M. et al. Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. **Frontiers in Immunology**, Chicago, USA, v. 9, p. 2278, 16 out. 2018.
- ESFAHANI, K. et al. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. **Current Oncology**, Quebec, Canada, v. 27, n. 2, p. S87-97, 2020.
- FERNÁNDEZ-QUINTERO, M. L. et al. CDR-H3 loop ensemble in solution – conformational selection upon antibody binding. **mAbs**, Innsbruck, Austria, v. 11, n. 6, p. 1077–1088, 18 ago. 2019.

FONSECA, M. H. G. et al. Boosting half-life and effector functions of therapeutic antibodies by Fc-engineering: An interaction-function review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Fortaleza, Brazil, v. 119, p. 306–311, nov. 2018.

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

GENENTECH, INC. **Rituxan (Rituximab) Label**: U.S. BL 103705/5230 Amendment. South San Francisco, CA: Genentech, Inc, 2006.

GOEBELER, M. E.; BARGOU, R. C. T cell-engaging therapies — BiTEs and beyond. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Wurzburg, Germany, v. 17, n. 7, p. 418–434, jul. 2020.

GOLLIHAR JR, J. D. **Methods in protein engineering and screening: From rational design to directed evolution and beyond**. Austin, Texas: The University of Texas at Austin, ago. 2017.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, Lausanne, Switzerland, p. 31–46, 2022.

HEITZER, E.; AUINGER, L.; SPEICHER, M. R. Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. **Trends in Molecular Medicine**, Graz, Austria, v. 26, n. 5, p. 519–528, maio 2020.

HUANG, Q. et al. Bispecific T cell engagers and their synergistic tumor immunotherapy with oncolytic viruses. **Am J Cancer Res**, Hubei, China, v. 11, n. 6, p. 2430–2455, 2021.

HUNTER, S. A.; COCHRAN, J. R. Cell-Binding Assays for Determining the Affinity of Protein-Protein Interactions: Technologies and Considerations. **Methods in Enzymology**, Sanford, USA, v. 580, p. 21–44, 31 jul. 2018.

JAIN, P.; O'BRIEN, S. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. **Expert Opinion on Biological Therapy**, Texas, USA, v. 13, n. 2, p. 169–182, fev. 2013.

JWAD, R.; WEISSBERGER, D.; HUNTER, L. Strategies for Fine-Tuning the Conformations of Cyclic Peptides. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 120, n. 17, p. 9743–9789, 9 set. 2020.

KAMAKURA, D.; ASANO, R.; YASUNAGA, M. T Cell Bispecific Antibodies: An Antibody-Based Delivery System for Inducing Antitumor Immunity. **Pharmaceuticals**, Kashiwa, Japan, v. 14, n. 11, p. 1172, nov. 2021.

KARAMYSHEV, A. L.; KARAMYSHEVA, Z. N. Lost in Translation: Ribosome-Associated mRNA and Protein Quality Controls. **Frontiers in Genetics**, [s.l.], v. 9, 2018.

KENNEDY, P. J. et al. **Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering**. **Critical Reviews in Biotechnology**, Porto, Portugal, Taylor and Francis Ltd, abr. 2018.

KOÇER, İ. et al. Effects of variable domain orientation on anti-HER2 single-chain variable fragment antibody expressed in the Escherichia coli cytoplasm. **Biotechnology Progress**, Ankara, Turkey, v. 37, n. 2, mar. 2021.

KRISHNAMURTHY, A.; JIMENO, A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. **Pharmacology and Therapeutics**, Aurora, USA, v. 185, p. 122–134, maio 2018.

LABRIJN, A. F. et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. **Nature Reviews Drug Discovery**, Framingham, USA, v. 18, n. 8, p. 585–608, ago. 2019.

LEE, H. T.; LEE, S. H.; HEO, Y. S. **Molecular interactions of antibody drugs targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in immuno-oncology**. **Molecules**, [s.l], MDPI AG, 2019.

LI, B. et al. Characterization of a rituximab variant with potent antitumor activity against rituximab-resistant B-cell lymphoma. **Blood**, Shanghai, China, v. 114, n. 24, p. 5007–50515, 2009.

LI, H.; ER SAW, P.; SONG, E. Challenges and strategies for next-generation bispecific antibody-based antitumor therapeutics. **Cellular & Molecular Immunology**, Guangzhou, China, v. 17, n. 5, p. 451–461, maio 2020.

LIU, Z. et al. Comparison of three commonly used fusion tags for the expression of nanobodies in the cytoplasm of Escherichia coli. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l], v. 32, n. 2, p. 462–469, 4 mar. 2018.

MARANHÃO, A. Q. et al. Discovering Selected Antibodies From Deep-Sequenced Phage-Display Antibody Library Using ATTLA. **Bioinformatics and Biology Insights**, Brasília, Brazil, v. 14, p. 1–8, 2020.

MCARTHUR, K.; KILE, B. T. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? **Trends in Cell Biology**, Melbourne, Australia, v. 28, n. 06, p. 475–493, jun. 2018.

MINISTRO, J.; MANUEL, A. M.; GONCALVES, J. Therapeutic Antibody Engineering and Selection Strategies. Em: [s.l: s.n.].

MOAZZAMI, R. et al. A Comparative Investigation of the Bispecific Antibody: Expression in Expi293F Cells and E.coli. **Quarterly of the Horizon of Medical Sciences**, Tehran, Iran, v. 27, n. 3, p. 400–417, jul. 2021.

NADDAFI, F. et al. A comparative study of the bispecific monoclonal antibody, blinatumomab expression in CHO cells and E. coli. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, Tehran, Iran, v. 48, n. 10, p. 961–967, nov. 2018.

PENG, H.-P. et al. Antibody CDR amino acids underlying the functionality of antibody repertoires in recognizing diverse protein antigens. **Scientific Reports**, Taipei, Taiwan, v. 12, n. 1, p. 12555, 22 jul. 2022.

PIERPONT, T. M.; LIMPER, C. B.; RICHARDS, K. L. Past, present, and future of Rituximab-The world's first oncology monoclonal antibody therapy. **Frontiers in Oncology**, Los Angeles, USA, v. 8, n. 163, jun. 2018.

REN, G.; KE, N.; BERKMEN, M. Use of the SHuffle strains in production of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, [s.l], v. 85, n. 5, p. 5.26.1-5.26.21, ago. 2016.

RIDGWAY, J. B. B.; PRESTA, L. G.; CARTER, P. “Knobs-into-holes” engineering of antibody C H 3 domains for heavy chain heterodimerization. **Protein Engineering**, San



Francisco, USA, v. 9, n. 7, p. 617–621, 1996.

ROSS, S. L. et al. Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing. **PLoS ONE**, [s.l], v. 12, n. 8, ago. 2017.

ROUGÉ, L. et al. Structure of CD20 in complex with the therapeutic monoclonal antibody rituximab. **Science**, San Francisco, USA, fev. 2020.

SAEED, A. F. U. H. et al. **Antibody engineering for pursuing a healthier future. Frontiers in Microbiology**, [s.l], Frontiers Media S.A., mar. 2017.

SCHMIDT, C. W. P.; OTONI, K. M. **The Golden Guide to Oncologic Pharmacy**. Curitiba, Brazil: Springer Nature Switzerland, 2022.

SEDYKH, S. E. et al. Bispecific antibodies: Design, therapy, perspectives. **Drug Design, Development and Therapy**, Novosibirsk, Russia, v. 12, p. 195–208, jan. 2018.

SEYFIZADEH, N. et al. A molecular perspective on rituximab: A monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Tabriz, Iran, v. 97, p. 275–290, jan. 2016.

SILVA, H. M. **Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti – CD3 Humano Caracterização da atividade ligante e da função efetora de Anticorpos humanizados Anti – CD3 Humano**. PhD Thesis—[s.l: s.n.].

SRIVASTAVA, A. et al. **Role of computational methods in going beyond x-ray crystallography to explore protein structure and dynamics. International Journal of Molecular Sciences**, [s.l], MDPI AG, nov. 2018.

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

SWIECH, K. et al. **Chimeric Antigen Receptor T Cells - Development and Production**. [s.l: s.n.].

TAN, S.; LI, D.; ZHU, X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Zhanjiang, China, v. 124, p. 1–11, abr. 2020.

TILLER, K. E.; TESSIER, P. M. Advances in Antibody Design. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [s.l], v. 17, n. 1, p. 191–216, dez. 2015.

TRABOLSI, A.; ARUMOV, A.; SCHATZ, J. H. T Cell–Activating Bispecific Antibodies in Cancer Therapy. **The Journal of Immunology**, Miami, USA, v. 203, n. 3, p. 585–592, ago. 2019.

UNDERWOOD, D. J.; BETTENCOURT, J.; JAWAD, Z. The manufacturing considerations of bispecific antibodies. **Expert Opinion on Biological Therapy**, Lexington, USA, 6 jul. 2022.

VAFI, O.; TRINKLEIN, N. D. Perspective: Designing T-Cell Engagers With Better Therapeutic Windows. **Frontiers in Oncology**, [s.l], v. 10, n. 446, abr. 2020.

VIARDOT, A.; BARGOU, R. **Bispecific antibodies in haematological malignancies**.

**Cancer Treatment Reviews**, Ulm, Germany, W.B. Saunders Ltd, , abr. 2018.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews Immunology**, Melbourne, Australia, v. 15, n. 6, p. 388–400, jun. 2015.

WANG, Q. et al. Design and Production of Bispecific Antibodies. **Antibodies**, Baltimore, USA, v. 8, n. 3, p. 43, ago. 2019.

WANG, W.; THIEMANN, S.; CHEN, Q. Utility of SPR technology in biotherapeutic development: Qualification for intended use. **Analytical Biochemistry**, Thousand Oaks, USA, v. 654, 14 jul. 2022.

WANG, X. et al. Development of an SPR-based binding assay for characterization of anti-CD20 antibodies to CD20 expressed on extracellular vesicles. **Analytical Biochemistry**, San Francisco, USA, v. 646, p. 114635, jun. 2022.

YANG, D. et al. Determination of high-affinity antibody-antigen binding kinetics using four biosensor platforms. **Journal of Visualized Experiments**, [s.l], v. 2017, n. 122, abr. 2017.

YANG, F.; WEN, W.; QIN, W. **Bispecific antibodies as a development platform for new concepts and treatment strategies**. **International Journal of Molecular Sciences**, Xi'an, China, MDPI AG, jan. 2017.

YOU, G. et al. **Bispecific antibodies: A smart arsenal for cancer immunotherapies**. **Vaccines**, [s.l], MDPI, jul. 2021.

YURASZECK, T.; KASICHAYANULA, S.; BENJAMIN, J. E. Translation and Clinical Development of Bispecific T-cell Engaging Antibodies for Cancer Treatment. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, Thousand Oaks, USA, v. 101, n. 5, p. 634–645, maio 2017.

ZHOU, P. et al. Is protein context responsible for peptide-mediated interactions? **Molecular Omics**, Chengdou, China, v. 15, n. 4, p. 280–295, 2019.