



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

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO ENTRE O CD22 E scFvs COM *linkers* CURTO E
LONGO USADOS EM TERAPIAS CAR-T *CELL* ANTI-CD22**

FORTALEZA

2025

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO ENTRE O CD22 E scFvs COM *linkers* CURTO E LONGO
USADOS EM TERAPIAS CAR-T *CELL* ANTI-CD22

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.

Coorientador: Dr. Marcus Rafael Lobo Bezerra.

FORTALEZA

2025

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

- P492a Pereira, Liandra Éllen Coelho.
 Avaliação da ligação entre o CD22 e scFvs com linkers curto e longo usados em terapias CAR-T cell anti-CD22 / Liandra Éllen Coelho Pereira. – 2025.
 82 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2025.
 Orientação: Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni.
 Coorientação: Prof. Dr. Marcus Rafael Lobo Bezerra.
1. Afinidade. 2. Estabilidade. 3. Ligação. 4. Oligomerização. I. Título.
- CDD 660.6
-

LIANDRA ÉLLEN COELHO PEREIRA

AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO ENTRE O CD22 E scFvs COM *linkers* CURTO E LONGO
USADOS EM TERAPIAS CAR-T *CELL* ANTI-CD22

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

Aprovada em: 27/03/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Virginia Picanço e Castro
Hemocentro de Ribeirão Preto

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente minha mãe, Elivânia, por ser minha maior incentivadora nos estudos e na vida, sem medir esforços para me apoiar. Ao meu pai, Iran, por todo empenho na minha criação e provimento de condições para estudar, as quais não lhe puderam ser concedidas plenamente no seu tempo.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni, pela orientação, tempo e recursos dedicados à minha formação. Ao Dr. Marcus Rafael Lobo Bezerra pela excelente coorientação durante todo esse percurso. Aos doutores participantes da banca examinadora, Dr. Edson Holanda Teixeira, Dra. Virginia Picanço e Castro e Dra. Clarissa Romero Teixeira (suplente) pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado, por sempre acompanhar de perto meu trabalho e por suas sugestões sempre pertinentes. À Ma. Alice Soares de Queiroz, por suas valiosas contribuições, que forneceram o embasamento computacional prévio a este trabalho.

A todos os familiares e amigos que me acompanharam e me auxiliaram, de diferentes formas nestes dois anos. Aos meus companheiros de laboratório Lucas, Samuel, Jucilene, Larisse, Maísa, Virgínia, Darlyson, Gabriel, Ronny, João e Nivian pela companhia, amizade e trocas construtivas durante todo esse período. Também agradeço por todas as caronas para conseguir chegar à Fiocruz, sem vocês eu não teria ido a lugar algum.

Ao meu parceiro de vida, meu amor, Mathias, por todo incentivo, carinho e auxílio nesse caminho de tantas mudanças.

Ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Pesquisa e Desenvolvimento da Fiocruz-CE, Rose, Mayara, Marcelo e Camila, por todo o apoio e companheirismo neste percurso.

Aos demais colegas do Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para a Saúde (GEPeSS) por todo o auxílio prestado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A imunoterapia tem emergido como uma estratégia inovadora no setor biotecnológico para o tratamento de pacientes com cânceres em estágio avançado. A Leucemia Linfocítica Aguda é uma das formas mais agressivas de câncer hematológico, e a Terapia Celular Adotiva baseada em CAR (Receptor Quimérico de Antígeno) tem se destacado como uma abordagem promissora para alcançar a remissão dessa neoplasia. Dentre as variantes de CAR, estudos baseados no anticorpo m971, que reconhece a proteína CD22 presente em células B, têm ganhado relevância. A estrutura do CAR inclui diversos domínios, entre eles o fragmento variável de cadeia única (scFv), que é responsável pelo reconhecimento do antígeno. Esse fragmento é composto pelos domínios V_H e V_L de um anticorpo, conectados por um *linker*. O comprimento do *linker* influencia diretamente a flexibilidade, funcionalidade, afinidade de ligação e estabilidade do anticorpo. Diante desse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir scFvs com *linkers* curto e longo, derivados do anticorpo m971, utilizando um sistema bacteriano para sua expressão e purificação, além de avaliar sua ligação com o CD22. Foram investigadas a estabilidade conformacional e o estado de oligomerização dos scFvs, além da cinética de interação com o antígeno. Para isso, foram padronizados protocolos de expressão em *Escherichia coli* e purificação dos scFvs. A estabilidade conformacional e o estado de oligomerização foram avaliados por diferentes abordagens biofísicas. A ligação dos scFvs com CD22 foi analisada por citometria de fluxo, utilizando células B da linhagem Raji, e por ensaios de interferometria de biocamada para quantificação da cinética de interação. Os resultados indicaram que o scFv com *linker* longo apresentou maior rendimento na purificação do que o scFv com *linker* curto. A análise da estabilidade conformacional revelou diferenças nos perfis estruturais dos scFvs. A cromatografia de exclusão por tamanho demonstrou que ambos os scFvs formam monômeros, sendo observada a geração secundária de dímeros para o scFv com *linker* curto. Além disso, a presença da proteína SUMO na região N-terminal dos scFvs afetou a ligação com o antígeno, tornando necessária sua remoção antes dos ensaios. Ambos os scFvs se ligaram ao CD22; entretanto, o scFv com *linker* curto exibiu maior capacidade de ligação em concentrações mais baixas. As constantes de afinidade obtidas confirmaram que o scFv com *linker* curto possui ligação mais forte com o CD22, corroborando os resultados da citometria de fluxo. Essas evidências contribuem para uma melhor compreensão das propriedades estruturais e funcionais desses scFvs, contribuindo com bases científicas robustas para proposição de melhores scFvs ou outros tipos de fragmentos ligantes.

Palavras-chave: afinidade; estabilidade; ligação; oligomerização.

ABSTRACT

Immunotherapy has emerged as an innovative strategy in the biotechnology sector for treating patients with advanced-stage cancers. Acute Lymphocytic Leukemia is one of the most aggressive forms of hematological cancer, and Adoptive Cell Therapy based on CAR (Chimeric Antigen Receptor) has stood out as a promising approach to achieving remission of this neoplasm. Among the CAR variants, studies based on the m971 antibody, which recognizes the CD22 protein present in B cells, have gained relevance. The CAR structure includes several domains such as the single-chain variable fragment (scFv), which is responsible for antigen recognition. This fragment is composed of the V_H and V_L domains of an antibody, connected by a linker. The linker length directly influences the flexibility, functionality, binding affinity, and stability of the antibody. In this context, the objective of this study was to produce scFvs with short- and long-linkers, derived from the m971 antibody, using a bacterial system for their expression and purification, as well as to evaluate their binding to CD22. The conformational stability and oligomerization state of the scFvs were investigated, along with the kinetics of interaction with the antigen. To achieve this, protocols for scFv expression in *Escherichia coli* and purification were standardized. The conformational stability and oligomerization state were assessed through different biophysical approaches. The binding of scFvs to CD22 was analyzed by flow cytometry using Raji B cell lines and biolayer interferometry assays to quantify interaction kinetics. The results indicated that the scFv with a long-linker had a higher purification yield than the scFv with a short-linker. Conformational stability analysis revealed differences in the structural profiles of the scFvs. Size-exclusion chromatography demonstrated that both scFvs form monomers, with secondary dimer formation observed for the scFv with a short-linker. Besides, the presence of the SUMO protein at the N-terminal region of the scFvs affected antigen binding, requiring its removal before the assays. Both scFvs bound to CD22; however, the scFv with a short-linker exhibited greater binding capacity at lower concentrations. The obtained affinity constants confirmed that the scFv with a short-linker has a stronger binding to CD22, corroborating the flow cytometry results. These findings contribute to a better understanding of the structural and functional properties of these scFvs, providing robust scientific foundations for the development of improved scFvs or other types of binding fragments.

Keywords: affinity; stability; interaction; oligomerization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Leucemia Linfocítica Aguda e formas de tratamento	7
1.2	A utilização de produtos biológicos no setor da saúde	9
1.3	Estrutura de anticorpos e função nas imunoterapias	11
1.3.1	Engenharia de fragmentos de anticorpos.....	15
1.3.2	Anticorpo m971 e antígeno CD22.....	17
1.3.3	Terapia com células CAR-T	19
1.4	Interação antígeno-anticorpo: Citometria de Fluxo e Interferometria.....	22
1.5	Estado de oligomerização de scFvs	25
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	HIPÓTESES	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivos específicos.....	28
5	METODOLOGIA	29
5.1	Material biológico.....	29
5.2	Transformação das linhagens recombinantes.....	29
5.3	Expressão de scFvs com <i>linker</i> curto e longo em sistema <i>E. coli</i> Shuffle B.....	29
5.4	<i>Western blotting</i>	30
5.5	Purificação de proteínas em coluna de afinidade e de exclusão molecular.....	31
5.6	Cromatografia de exclusão de tamanho analítica	32
5.7	Avaliação de estabilidade conformacional dos scFvs	32
5.8	Cultura de células eucarióticas	32
5.9	Citometria de Fluxo.....	33
5.10	Cinética de interação entre os scFvs e o CD22 por interferometria	34
6	RESULTADOS.....	35
6.1	Expressão de scFvs com <i>linker</i> curto e longo em sistema <i>E. coli</i> Shuffle B.....	35
6.2	Purificação dos scFvs em colunas de afinidade e de exclusão molecular	36
6.3	Cromatografia de exclusão por tamanho analítica	42
6.4	Avaliação de estabilidade conformacional dos scFvs	45
6.5	Citometria de fluxo dos scFvs com e sem cauda SUMO.....	48
6.6	Cinética de interação entre os scFvs e o CD22 por interferometria	67
7	DISCUSSÃO	71
8	CONCLUSÃO	76
9	PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um desafio de saúde global, sendo uma das principais causas de óbito, que impede o aumento da expectativa de vida em âmbito mundial. O controle do câncer é atualmente compreendido como um *continuum* de ações que se inicia na gestão das exposições aos fatores de risco, avança para a detecção precoce da doença e engloba os cuidados paliativos. Estes últimos incluem diagnóstico, tratamento, acompanhamento ao longo do período de sobrevivência e atenção no final da vida para aqueles que não alcançam a cura ou controle da doença. Para assegurar o cuidado abrangente em todas essas fases, é essencial um planejamento meticuloso, a organização eficiente dos serviços de saúde e a monitorização constante das ações de controle (INCA, 2023; World Health Organization (WHO), 2022).

As estimativas de ocorrência dos diversos tipos de câncer são cruciais no planejamento das medidas de controle e oferecem uma oportunidade de reflexão sobre a situação em nível nacional e estadual em relação aos fatores de risco. Ao longo do tempo, essa análise permite compreender os elementos que deram origem aos casos atuais e destaca as desigualdades das diferentes regiões geográficas do país no que diz respeito à distribuição dos tipos de câncer e ao acesso aos tratamentos (INCA, 2023).

Para atender ao *continuum* de ações no sentido de enfrentar uma doença tão complexa como o câncer, são utilizadas diferentes abordagens no tratamento, como terapia celular e anticorpos. No setor biotecnológico e farmacêutico, essas estratégias fazem uso de medicamentos biológicos ou biofármacos. Nesse cenário, o progresso no desenvolvimento de abordagens biotecnológicas para a obtenção de novas moléculas com potencial de combate ao câncer tem experimentado um crescimento anual constante.

1.1 Leucemia Linfocítica Aguda e formas de tratamento

A leucemia linfocítica aguda (LLA) afeta as células sanguíneas, especialmente os glóbulos brancos (leucócitos) e seus precursores hematopoiéticos. São caracterizadas principalmente pelo acúmulo de células neoplásicas na medula óssea, que apresentam mutação genética e não atingem maturidade funcional. Essas células anormais proliferam rapidamente e acabam substituindo as células sanguíneas saudáveis na medula óssea.

O tipo de leucemia difere conforme o tipo de célula sanguínea que passa a ser cancerosa, assim como a velocidade de multiplicação celular, que pode ser rápida (aguda) ou lenta (crônica). Existem mais de 12 tipos, sendo os quatro principais a leucemia mieloide aguda

(LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC). A incidência geralmente aumenta com a idade, embora possa ocorrer em qualquer fase da vida, com predominância de subtipos conforme a faixa etária: as LLA são mais frequentes em crianças menores de 15 anos, enquanto LLC e LMA são mais prevalentes em pessoas mais idosas (Emadi; Law, 2022; INCA, 2023).

O câncer ocupa a posição de segunda causa mais frequente de óbito entre crianças de 1 a 14 anos nos Estados Unidos, sendo a leucemia o câncer infantil mais comum, representando 28% dos casos (Siegel *et al.*, 2023). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa no Brasil para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo a leucemia o 10º tipo de câncer mais frequente, sem considerar os tumores de pele não melanoma. A estimativa de novos casos de leucemia no Brasil para cada um dos anos de 2023 a 2025 é de 11.540 casos, representando um risco estimado de 5,33 casos por 100 mil habitantes, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres (INCA, 2023).

A LLA é o câncer pediátrico mais comum, que também afeta adultos de todas as idades (Emadi; Law, 2022). As estimativas da American Cancer Society para LLA nos Estados Unidos no ano de 2023 (incluindo crianças e adultos) indicam cerca de 6.540 novos casos de LLA e 1.390 mortes por LLA. A probabilidade de desenvolver LLA é mais elevada em crianças com menos de 5 anos, diminuindo gradualmente até a faixa dos 20 anos e, posteriormente, aumentando lentamente após os 50 anos. Embora a maioria dos casos de LLA ocorra em crianças, a maioria das fatalidades associadas a essa condição (aproximadamente 4 em cada 5) ocorre em adultos (American Cancer Society, 2024).

A LLA é o tipo mais frequente de câncer em crianças, representando cerca de 75% das leucemias em pacientes com menos de 15 anos, e é a segunda causa mais comum de mortalidade em crianças dessa mesma faixa etária (Emadi; Law, 2022). No contexto brasileiro, a LLA ocupa a 8ª posição entre os tipos de câncer com maior índice de mortalidade, sendo também o câncer mais comum na população com até 20 anos de idade (DataSUS, 2021).

A principal abordagem para o tratamento da LLA envolve a combinação de agentes quimioterápicos convencionais, como daunorrubicina, vincristina e prednisolona (Berry *et al.*, 2017), juntamente com um medicamento biológico, a enzima L-asparaginase (L-ASNase). Transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH), também conhecido como transplante de medula óssea, é uma opção para casos de LLA de alto risco ou recorrente, e envolve a substituição das células da medula óssea do paciente por células-tronco saudáveis de um doador compatível. Há ainda abordagens emergentes de imunoterapia, a qual envolve o uso de medicamentos que estimulam o sistema imunológico a atacar as células leucêmicas. Os

exemplos dessa abordagem são os conjugados anticorpo-droga, *Bispecific T-cell engagers* (BiTEs), células T geneticamente modificadas para expressar um receptor quimérico de antígeno (CAR-T *cells*, do inglês *Chimeric Antigen Receptor T cells*), e inibidores de *checkpoint* imunológico (ICPIs), que oferecem esperança para melhorar os resultados em pacientes com LLA (Blum; Martins; Lübbert, 2017). Essas abordagens de imunoterapia surgem como alternativas promissoras à quimioterapia convencional, que frequentemente causa efeitos colaterais devido à sua falta de especificidade, destruindo tanto células cancerosas quanto saudáveis ao redor do tumor. Assim, empresas farmacêuticas buscam desenvolver terapias mais direcionadas, capazes de preservar as células saudáveis e focar exclusivamente nas células cancerosas (Elgundi *et al.*, 2017).

1.2 A utilização de produtos biológicos no setor da saúde

Os agentes terapêuticos biológicos, ou produtos biológicos, englobam uma diversidade de substâncias produzidas por células ou organismos vivos, utilizando uma variedade de processos biológicos, incluindo expressão genética controlada, tecnologias de anticorpos e tecnologias de DNA recombinante (Sandow *et al.*, 2015). Esses medicamentos de base biológica são usados para tratar diversas enfermidades e constituem cerca de um quarto do mercado farmacêutico global. Sua utilização no tratamento do câncer tem levado a avanços significativos na terapia oncológica e na assistência ao paciente. Os medicamentos biossimilares, que são semelhantes aos medicamentos biológicos de referência, têm o potencial de ampliar o acesso e fornecer opções mais acessíveis para o tratamento do câncer, à medida que expiram as patentes de alguns produtos biológicos amplamente utilizados (Joshi *et al.*, 2022).

Na indústria farmacêutica, o termo "biofármacos" é utilizado para descrever medicamentos produzidos por meio de tecnologia biotecnológica. Esse termo está intimamente associado a proteínas que são manipuladas por técnicas de DNA recombinante, incluindo anticorpos monoclonais. Essas biomoléculas podem ser obtidas por meio do cultivo celular ou de microrganismos geneticamente modificados. Os biofármacos são medicamentos de moléculas grandes que são centenas de vezes maiores que os produtos farmacêuticos convencionais ou medicamentos de moléculas pequenas.

Os biofármacos podem ser categorizados em diferentes gerações, e as principais diferenças entre essas gerações estão relacionadas às propriedades terapêuticas e à complexidade das proteínas produzidas. A primeira geração consiste em proteínas cuja sequência de aminoácidos é idêntica à da proteína nativa. Essa geração visa repor ou aumentar os níveis de proteínas

heterólogas no organismo, como é o caso das terapias de reposição enzimática. Os biofármacos de segunda geração são proteínas cuja sequência pode ser modificada. Nesse caso, o foco é aprimorar as propriedades terapêuticas, como a redução da imunogenicidade e o aumento da afinidade entre o ligante e a proteína. Na terceira geração, são desenvolvidas proteínas multifuncionais ou conjugadas com outras moléculas, no intuito de combinar ação terapêutica com outras funcionalidades, como entrega direcionada de medicamentos. Um exemplo são os anticorpos monoclonais conjugados com agentes quimioterápicos para terapia direcionada. A quarta geração compreende proteínas ainda mais complexas com múltiplas funcionalidades, com o objetivo de aprimorar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos colaterais. Cada geração representa avanços na engenharia de proteínas e na manipulação de moléculas biológicas para melhorar a eficácia e a especificidade dos tratamentos (Reis *et al.*, 2009).

Os anticorpos monoclonais (mAbs) recebem essa nomenclatura devido serem sintetizados por uma população de células B idênticas (um clone) em cultivo celular. Essas moléculas são homogêneas (reconhecem o mesmo epítipo) e representam uma classe de biofármacos cuja demanda global tem crescido continuamente desde o lançamento do primeiro anticorpo monoclonal, Muromonabe, em 1986.

Até dezembro de 2024, o desenvolvimento comercial de anticorpos terapêuticos resultou em mais de 200 anticorpos aprovados e um *pipeline* de quase 1.400 candidatos em avaliação clínica para o tratamento de diversas doenças (Crescioli *et al.*, 2025). Estes produtos incluem anticorpos conjugados, anticorpos bispecíficos e multiespecíficos, frações Fab, conjugados com proteínas Fc e moléculas biosemelhantes.

Os mAbs têm sido utilizados em conjunto com outros medicamentos e desempenham um papel fundamental na luta contra neoplasias, o que explica sua significativa contribuição para o mercado em constante crescimento de biofármacos. Somente com os mAbs, foi avaliado o tamanho do mercado global em US\$ 231,48 bilhões em 2023 e deve apresentar uma taxa composta de crescimento anual (CAGR) de quase 13,2% de 2024 a 2032, com previsão de gerar receita de cerca de US\$ 706,52 bilhões até 2032 (Zion Market Research, 2024).

Em 2020 e 2021, a participação dos biofármacos nas vendas globais de medicamentos de prescrição cresceu significativamente, impulsionada pela comercialização de vacinas biotecnológicas desenvolvidas para combater a pandemia de COVID-19 (Vargas, 2024). Em 2021, o mercado farmacêutico brasileiro faturou R\$ 88 bilhões (US\$ 14,9 bilhões), sendo o oitavo maior do mundo e o principal da América Latina, com laboratórios públicos como Fiocruz, Instituto Butantan, Funed e Hemobrás se destacando na comercialização de medicamentos biológicos (Vargas, 2024). Diante desse cenário, o governo federal tem lançado

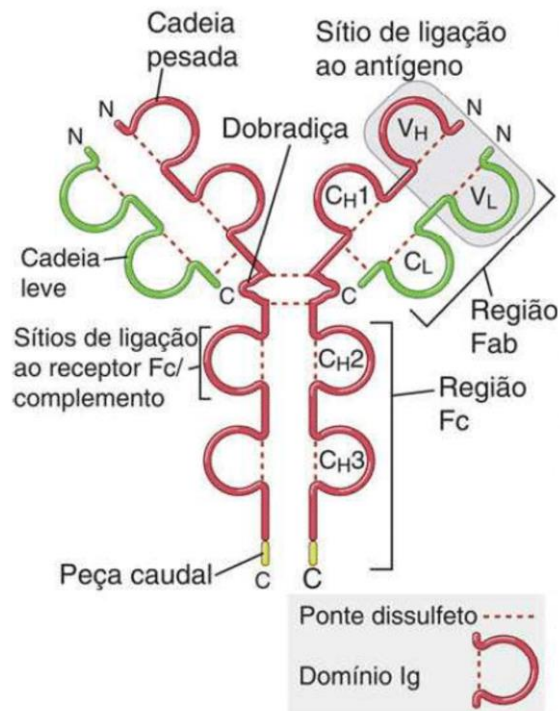
estratégias para enfrentar os desafios de saúde e reduzir a dependência de importação. O Complexo Econômico-Industrial da Saúde (CEIS) avançou em 2024 com um número recorde de projetos para fortalecer o SUS, incluindo o desenvolvimento e produção de vacinas, soros, insumos farmacêuticos ativos (IFAs), terapias avançadas, oncológicos, imunossupressores e medicamentos para doenças negligenciadas (Ministério da Saúde, 2025). Até 2026, estão previstos R\$ 57,4 bilhões em investimentos públicos e privados, sendo R\$ 8,9 bilhões do Novo Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), o maior aporte público já realizado para modernizar infraestrutura e impulsionar parcerias em saúde (Ministério da Saúde, 2025). O Programa para Ampliação e Modernização de Infraestrutura do Complexo Econômico-Industrial da Saúde (PDCEIS) é um dos principais programas para viabilizar a inovação e a capacidade produtiva do setor.

1.3 Estrutura de anticorpos e função nas imunoterapias

Os anticorpos, também denominados como imunoglobulina (Ig), são proteínas produzidas por vertebrados em resposta à exposição a estruturas estranhas, denominadas antígenos. Os anticorpos são altamente diversos e específicos, reconhecendo uma ampla variedade de estruturas moleculares. Essas proteínas também atuam como mediadores essenciais da imunidade humoral adaptativa, protegendo contra diferentes classes de microrganismos extracelulares. Os anticorpos podem existir na forma ligada à membrana, como receptores de antígenos em linfócitos B, ou na forma secretada por plasmócitos, circulando no sangue, tecidos e mucosas (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

Com relação à estrutura, a molécula de anticorpo possui uma configuração central simétrica, a qual é composta de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas (Figura 1). Existem dois tipos de cadeia leve: kappa (κ) e lambda (λ), e cinco tipos de cadeia pesada: μ , δ , γ , α e ϵ , que definem os isótipos IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, determinando as funções e localizações dos anticorpos no organismo (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

Figura 1 – Esquema de uma imunoglobulina G (IgG) secretada.



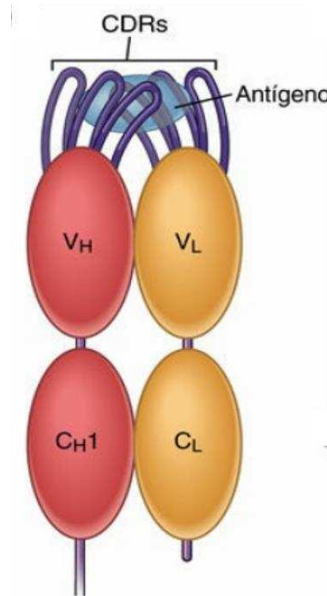
Fonte: (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). Os sítios de ligação antigênica são formados pela justaposição das regiões variáveis V_L e V_H . As regiões constantes da cadeia pesada terminam na região Fc, que medeia as funções efetoras do anticorpo.

As cadeias leve e pesada apresentam regiões variáveis (V) altamente polimórficas na porção aminoterminal, onde ocorrem as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), responsáveis pelo reconhecimento e pela especificidade da ligação ao antígeno. Já as regiões carboxiterminais constantes (C) das cadeias pesadas não participam da ligação ao antígeno, mas interagem com moléculas efetoras e células do sistema imune, mediando funções como ativação do complemento. Nas cadeias pesadas, a região V é formada por um domínio Ig, enquanto a região C é composta por três ou quatro domínios Ig. Cada cadeia leve contém um domínio Ig na região C e outro na região V. O sítio de ligação ao antígeno é formado pela justaposição dos domínios V_L (variável leve) e V_H (variável pesada), compondo o paratopo, que interage diretamente com o antígeno (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

O domínio de ligação ao antígeno (Fab) é composto pelos domínios V_L , C_L , V_H e C_{H1} . Mesmo quando separados do restante da estrutura (do Fragmento Cristalizável, Fc), esses domínios mantêm a capacidade de ligação ao antígeno. As diferenças na sequência e variabilidade no reconhecimento de antígenos entre diferentes anticorpos são localizadas em três pequenos trechos na região V_H da cadeia pesada (H1, H2, H3) e em três trechos na região

V_L da cadeia leve (L1, L2, L3). Esses trechos são as CDRs e são referidos como regiões hipervariáveis (Figura 2).

Figura 2 – Associação entre um antígeno e um anticorpo.



Fonte: (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). Associação entre um antígeno e um anticorpo: Representação esquemática das CDRs em azul escuro, formando uma área de ligação ao antígeno em azul claro.

Os parâmetros de avides e afinidade ajudam a descrever aspectos das interações entre anticorpos e antígenos. A avides se refere à força total de ligação entre um antígeno multivalente (que possui múltiplos epítomos) e um anticorpo multivalente (considerando todos os sítios de ligação simultaneamente). A avides é geralmente maior do que a afinidade de qualquer sítio de ligação individual, pois leva em conta todas as interações combinadas entre os epítomos do antígeno e os sítios do anticorpo. Já a afinidade, é referente à força individual de ligação entre um único sítio combinatório (paratopo) do anticorpo e um epítopo específico do antígeno. A afinidade é proporcional à complementaridade estrutural e química entre o sítio de ligação e o epítopo. É frequentemente representada pela constante de dissociação K_d , em unidades de concentração molar (M), e usada para indicar a afinidade de uma proteína por um ligante. Um K_d menor indica uma interação de afinidade mais forte, pois uma menor concentração de antígeno e anticorpo é necessária para formar o complexo (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019; Nelson; Cox, 2014). Assim, quanto mais forte a interação proteína-ligante, menor será o K_d .

Os anticorpos, especialmente os monoclonais, os mAbs, constituem uma classe crucial de moléculas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, como câncer, doenças autoimunes e inflamatórias. São exemplos de medicamentos aprovados o Trastuzumab,

indicado para tratamento de câncer de mama, e o Rituximab, utilizado no tratamento de linfoma não-Hodgkin (Hafeez; Gan; Scott, 2018; Weiner; Surana; Wang, 2010). A eficácia dessas imunoglobulinas está relacionada às características notáveis de afinidade e especificidade, que permitem o direcionamento preciso a alvos moleculares. Essas moléculas desempenham mecanismos de ação efetivos, como bloqueio de vias de sinalização celular, indução de apoptose e ativação da resposta imune.

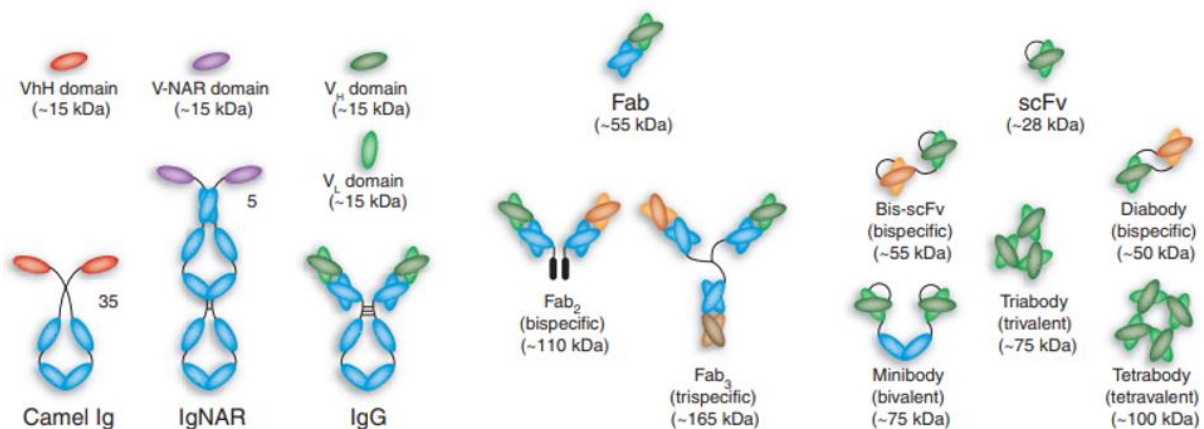
Os mAbs possuem complexidades estrutural e funcional, que elevam os desafios na produção e nos testes associados a esses anticorpos (Frenzel; Schirrmann; Hust, 2016). Entre as principais aplicações no tratamento do câncer estão: neutralização de células tumorais, estímulo ao sistema imunológico, uso em terapias de anticorpo-conjugado (ADC) e modulação de respostas inflamatórias, tornando-os ferramentas indispensáveis na imunoterapia moderna (Beck *et al.*, 2017; Chames *et al.*, 2009; Sharma; Allison, 2015).

Os mAbs derivados de células B murinas enfrentam desafios significativos relacionados à imunogenicidade quando utilizados em humanos (Chames *et al.*, 2009). A imunogenicidade desses mAbs frequentemente resulta na ativação de respostas imunes indesejadas, conhecidas como resposta HAMA (*Human Anti-Mouse Antibody*). Essa resposta é mediada por anticorpos humanos que reconhecem as porções murinas como exógenas, levando à rápida eliminação das moléculas do organismo, efeitos colaterais adversos, e, em alguns casos, falhas terapêuticas. Além disso, os mAbs murinos apresentam baixa compatibilidade com os receptores Fc humanos, dificultando a ativação eficiente de mecanismos efetores da resposta imune. Para contornar esses desafios, avanços na engenharia de anticorpos permitiram o desenvolvimento de mAbs quiméricos, que combinam domínios variáveis murinos e domínios constantes humanos, e mAbs humanizados, em que apenas pequenas porções murinas são preservadas (Kaplon; Reichert, 2019; Strohl, 2018; Weiner; Surana; Wang, 2010). Outros avanços permitiram o aprimoramento da região Fc dos mAbs, ampliando a eficácia terapêutica. Alterações nas glicosilações ou mutações pontuais têm otimizado a afinidade pelos receptores Fc humanos e potencializado mecanismos como a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e a fagocitose mediada por anticorpos (Foltz; Karow; Wasserman, 2013; Jefferis, 2009). Tais inovações consolidaram os mAbs como ferramentas terapêuticas essenciais no tratamento de doenças autoimunes, câncer e infecções crônicas.

1.3.1 Engenharia de fragmentos de anticorpos

Inicialmente, o foco da engenharia de anticorpos estava na manipulação das regiões variáveis para humanizar e desenvolver anticorpos com afinidade, ou para gerar diferentes tipos de fragmentos de anticorpos, como scFvs, *diabodies*, PEGylated Fabs, TandAbs (Strohl, 2018). As pesquisas avançaram consideravelmente com os estudos sobre anticorpos monoclonais, destacando a importância e funcionalidade dos fragmentos de anticorpos. Ficou evidente que não é necessário utilizar a molécula inteira para desempenhar uma função específica (Kennedy *et al.*, 2018; Saeed *et al.*, 2017). Esse avanço permitiu a exploração de inúmeros fragmentos distintos, adaptados para atender a propósitos específicos (Figura 3).

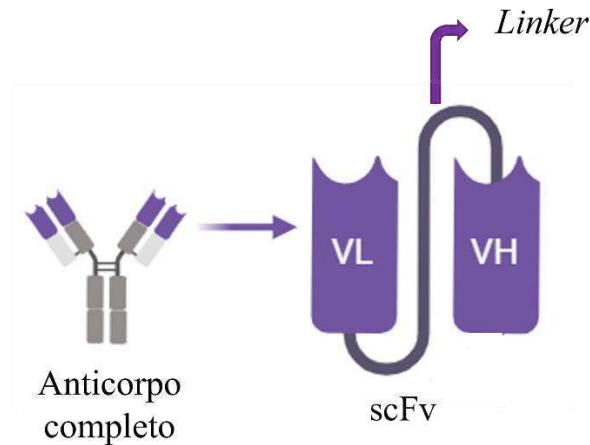
Figura 3 – Representação esquemática de diferentes formatos de fragmentos de anticorpos.



Fonte: (Holliger; Hudson, 2005). Esses fragmentos são construídos por técnicas de engenharia de anticorpos para aplicações terapêuticas aprimoradas. Em vermelho, tem-se domínio VhH de caméledeo; em roxo, domínio V-NAR de tubarão; em verde escuro, Vh de domínio único e, em verde claro, VL de domínio único; em azul, domínios C; em laranja, Vh e VL de IgG “clássica”.

Na figura 3, são mostrados alguns fragmentos obtidos por meio de técnicas de engenharia de anticorpos, como o scFv (do inglês, *single-chain fragment variable*). A estrutura desse fragmento engloba exclusivamente os domínios variáveis tanto da cadeia pesada (Vh) quanto da cadeia leve (VL), conectados por um pequeno *linker* peptídico altamente flexível, geralmente composto por glicina e serina (Figura 4). Esses domínios é que são responsáveis por reconhecer um epítipo expresso em um antígeno de forma bastante específica, já que apresentam as CDRs.

Figura 4 – Esquema ilustrativo da estrutura de um scFv, destacando sua composição com os domínios V_H e V_L , e evidenciando a conexão dos domínios variáveis de um anticorpo por meio de uma cadeia polipeptídica flexível conhecida como *linker*.



Fonte: a autora.

Nos fragmentos scFv, a dimensão reduzida (~ 25 kDa) em comparação com anticorpos completos (150 kDa) resulta em uma redução na meia-vida dessas moléculas. Isso ocorre porque esses fragmentos são facilmente eliminados pelos rins, que têm a capacidade de metabolizar compostos de até 55 kDa (Holliger; Hudson, 2005). Além disso, essas moléculas geralmente carecem da porção Fc, o qual se conecta ao receptor neonatal (FcRn) responsável pela extensão da meia-vida das IgGs (Fonseca *et al.*, 2018).

A seleção do formato depende da finalidade de uso. Os scFvs destacam-se na capacidade de alcançar alvos, devido à sua elevada penetrância nos tecidos, emergindo como uma alternativa terapêutica viável para tumores sólidos (Holliger; Hudson, 2005; Lugovskoy, 2017). Além disso, a maioria dos fragmentos de anticorpos pode ser expressa em sistemas bacterianos, beneficiando-se de suas características, como tamanho reduzido, menor complexidade em comparação com as IgGs e ausência de glicosilação, o que se apresenta como uma opção para reduzir os custos na produção de moléculas terapêuticas.

Nos scFvs, o tamanho do *linker* que liga os domínios V_H e V_L pode ser significativa para o processo de produção dessas moléculas e, até mesmo, a eficácia do tratamento (Shen *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2021). Esse tamanho pode alterar de 10 a 25 resíduos de aminoácidos, os quais geralmente possuem características hidrofílicas. A presença de aminoácidos hidrofílicos na cadeia polipeptídica flexível pode aumentar a solubilidade do scFv durante a expressão heteróloga (Shen *et al.*, 2008).

São relatados dois tipos usuais com *linkers*, sendo um composto somente por resíduos de glicina e serina, chamado (G4S)₃, e outro composto por resíduos de glicina, serina e outros aminoácidos, como lisina, glutamato, prolina e treonina, chamado *Whitlow Linker* (Huston *et al.*, 1988; Whitlow *et al.*, 1993).

1.3.2 Anticorpo m971 e antígeno CD22

O mAb humano m971, direcionado ao CD22, foi identificado inicialmente por meio da metodologia de *phage display* utilizando uma biblioteca de Fab humanos *naive* (Xiao *et al.*, 2009). A produção do m971, a fim de investigações experimentais, ocorre principalmente em células eucarióticas de mamífero, as quais permitem modificações pós-traducionais e dobramento adequado, garantindo a funcionalidade do anticorpo (Chen *et al.*, 2023; Ereño-Orbea *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021). A engenharia de anticorpos possibilitou aprimoramentos no m971, como sua construção na forma scFv, que apresenta produção facilitada em sistemas procariotos, maior difusão tecidual e flexibilidade para aplicações em engenharia molecular, incluindo terapias CAR-T (Ahmad *et al.*, 2012). Estruturalmente, a orientação do scFv de m971 é V_H-V_L.

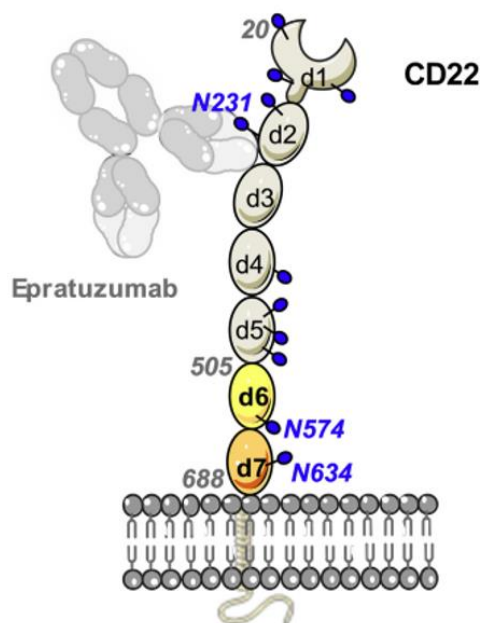
Existem outros candidatos terapêuticos direcionados a CD22 que não são de origem totalmente humana, como epratuzumab, inotuzumab ozogamicina e a imunotoxina BL22 (Xiao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2023). O m971 tem sido amplamente estudado para aplicações terapêuticas, especialmente em terapias CAR-T anti-CD22, com foco em leucemias de células B, como a LLA (Ereño-Orbea *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2023). Esse anticorpo reconhece um epítipo distinto das imunotoxinas HA22 e BL22, também utilizadas em CAR-T anti-CD22. Enquanto HA22 e BL22 se ligam ao domínio 3 do CD22, m971 se liga aos domínios extracelulares proximais d5–d7, sem envolvimento de glicanos, e apresenta avidez relativamente baixa (Xu *et al.*, 2023). O mAb epratuzumabe, por sua vez, reconhece domínios mais distais da membrana (Ereño-Orbea *et al.*, 2021). Essa especificidade torna o m971 promissor para CAR-T anti-CD22 e CARs biespecíficos anti-CD19/CD22.

O CD22 é uma glicoproteína transmembrana expressa em células B, frequentemente mantida em estágios mais tardios do desenvolvimento de células B, estando presente em tumores CD19-negativos. Atua como regulador da ativação do receptor de células B e pertence à família Siglec, reconhecendo glicanos terminados em ácido α -2,6-siálico. Seu domínio extracelular (ECD) é composto por sete domínios semelhantes a imunoglobulina (d1-d7) e

inclui 12 glicanos ligados a N (Fry *et al.*, 2018), como apresentados na figura 5. A interação do CD22 com ácido siálico leva à fosforilação dos motivos inibitórios baseados em tirosina e ao recrutamento da tirosina-proteína fosfatase SHP-1, reduzindo a resposta das células B (Ereño-Orbea *et al.*, 2021).

Enquanto o Fab de epratuzumabe se liga ao glicano no CD22 (N231 em d2, Figura 5), o m971 não interage com o glicano N634 em d7, sugerindo que sua ligação é independente dessa modificação. Isso pode prolongar seus efeitos anti-leucêmicos, conforme discutido por Ereño-Orbea et al. (2021), pois evita a interferência de glicosiltransferases, que podem alterar a glicosilação dos antígenos-alvo, afetando o reconhecimento, a afinidade e a imunogenicidade dos anticorpos. Assim, o desenvolvimento de CAR-T anti-CD22 baseados no m971 representa uma alternativa promissora para tratar cânceres de células B.

Figura 5 – Ilustração esquemática de CD22 ancorado à superfície celular por meio do anticorpo terapêutico epratuzumab.

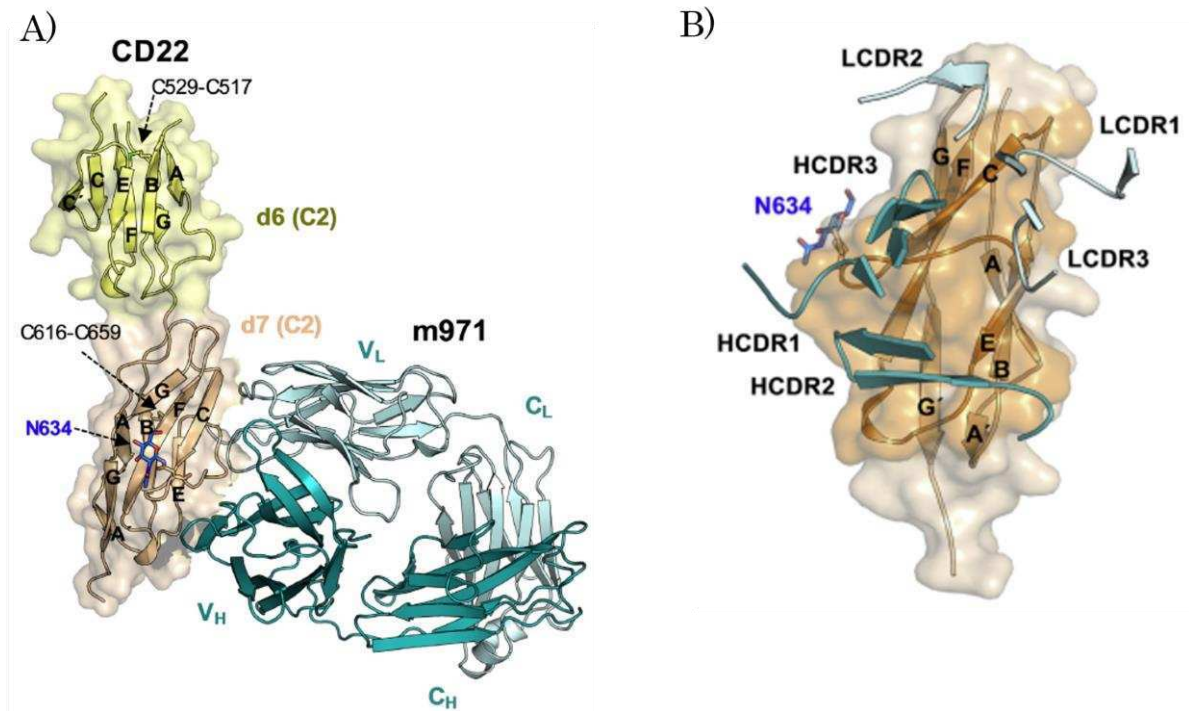


Fonte: (Ereño-Orbea *et al.*, 2021). O domínio extracelular do CD22 é formado por sete domínios. Essa glicoproteína transmembrana apresenta 12 glicanos ligados a N (representados por esferas azuis) no domínio extracelular.

A análise da estrutura cristalográfica do CD22 humano em complexação com o Fab de m971 revelou que o m971 se conecta ao domínio mais próximo da membrana, ou seja, ao domínio d7. Além disso, as três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (HCDRs 1, 2 e 3) e as regiões determinantes de complementaridade de cadeia leve (LCDRs 1 e 2) da porção Fab do m971 interagem com epítomos localizados na hélice C β e nas alças C–E

e E–F do domínio extracelular d7 da molécula CD22, conforme mostrado na Figura 6 (Ereño-Orbea *et al.*, 2021). Essas observações reforçam o potencial para aplicações terapêuticas,

Figura 6 – Estrutura tridimensional dos domínios d6 e d7 de CD22 em complexo com Fab de m971, à esquerda, e delineamento da interface de interação com CD22, à direita.



Fonte: (Ereño-Orbea *et al.*, 2021). Em A) cristal da estrutura de CD22_{d6-d7} em complexo com Fab m971. Os domínios d6 (amarelo) e d7 (trigo) apresentam uma dobra Ig do tipo C2. A N-acetilglucosamina ligada a N634 em d7 é exibida como bastões azuis. As ligações dissulfeto internas nos domínios Ig (C529–C517 em d6; C616–C659 em d7) também são representadas como bastões. O Fab m971 reconhece um epítipo em d7, envolvendo a fita β C e os loops C–E e E–F. As cadeias pesada (ciano escuro) e leve (ciano) de m971 são representadas como *cartoons*. Em B) Alças CDR de m971 interagem com o domínio d7 de CD22 (cor marrom). As alças de CDR das cadeias pesadas variáveis HCDR1, HCDR2 e HCDR3 interagem com a cadeia β C (cor azul-petróleo). LCDR1 e LCDR2 (cor ciano) interagem com as alças C–E e E–F de d7.

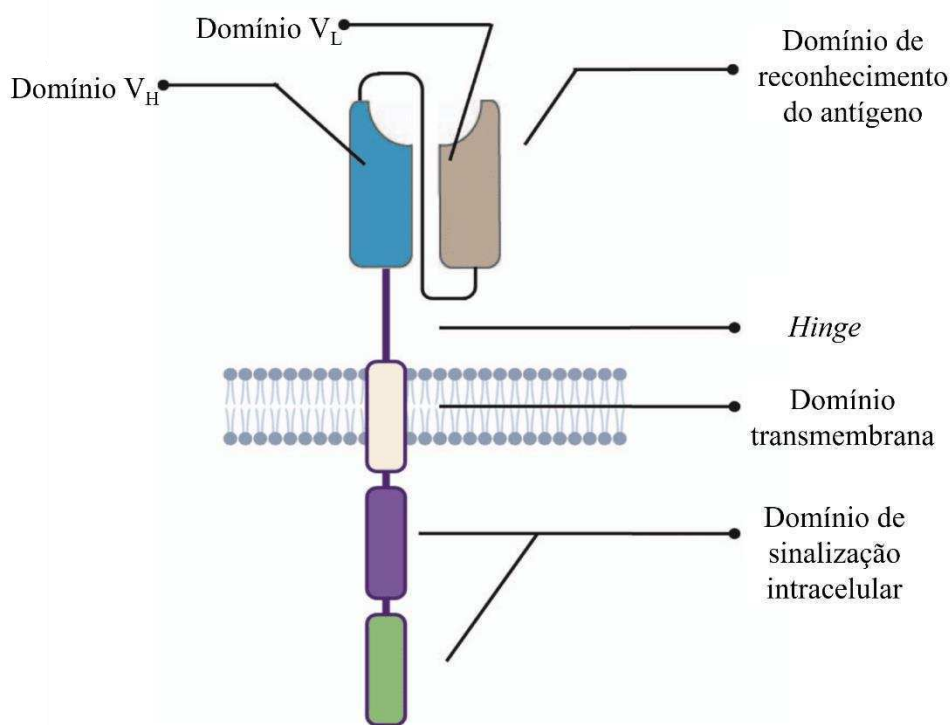
1.3.3 Terapia com células CAR-T

Uma abordagem em rápido crescimento na imunoterapia para tratar cânceres hematológicos envolve o uso de linfócitos T maduros modificados *ex vivo*, os quais são programados para expressar receptores quiméricos de antígenos (CARs) direcionados a antígenos específicos em células cancerígenas. O CAR projetado tem a capacidade de redirecionar as células T, conhecidas como células T receptoras quiméricas de antígenos, ou CAR-T, para atacar e destruir

seletivamente as células cancerígenas que expressam o antígeno, sem depender significativamente do complexo de histocompatibilidade (Ereño-Orbea *et al.*, 2021).

Os elementos essenciais de um CAR compreendem o domínio extracelular de ligação ao antígeno, geralmente um scFv, uma região transmembrana e de dobradiça, chamada de *hinge* ou região espaçadora, que ancora o receptor à superfície celular e projeta o fragmento variável de cadeia única para o domínio extracelular, além de motivos de sinalização intracelular provenientes do receptor de células T (como CD3 ξ , CD28, 4-1BB ou OX40) que são acionados após o engajamento com o antígeno (Figura 7). Dessa forma, os CARs são concebidos para converter eventos de reconhecimento de antígenos em sequências de sinalização que desencadeiam funções efectoras das células T, como a liberação de fatores citotóxicos e citocinas pró-inflamatórias (Ereño-Orbea *et al.*, 2021).

Figura 7 – Ilustração esquemática geral das porções estruturais de um módulo CAR



Fonte: Adaptado de (Jayaraman *et al.*, 2020).

Em casos de leucemias e linfomas associados a células B, o CD19 destaca-se como um alvo promissor para terapias baseadas em células CAR-T. Isso se deve à sua expressão restrita à linhagem de células B, o que reduz os efeitos citotóxicos globais fora do alvo. Embora a regressão completa do tumor seja alcançada em uma parcela significativa de pacientes, a

terapia com células CAR-T anti-CD19 enfrentou resistência em alguns casos devido à perda de expressão do antígeno. Nesse contexto, o receptor CD22 emerge como um alvo alternativo para terapias com células CAR-T em neoplasias de células B. Células CAR-T direcionadas ao CD22 demonstraram efeitos antineoplásicos robustos em ensaio clínico de fase 1 envolvendo pacientes que não responderam à remissão no protocolo de CAR-T anti-CD19 (Ereño-Orbea *et al.*, 2021; Fry *et al.*, 2018).

A pesquisa sobre terapia celular CAR-T direcionada ao CD22 começou com scFvs derivados das imunotoxinas recombinantes HA22 e BL22 (Xu *et al.*, 2023). No entanto, células CAR-T contendo o scFv de HA22 não demonstraram maior atividade citotóxica em comparação com aquelas usando o scFv de BL22. Isso pode ser atribuído ao fato de que o scFv de HA22 não gera um sinal de ativação suficientemente forte, mesmo na presença de estímulo antigênico adequado (Long; Haso; Orentas, 2013). Como alternativa promissora ao HA22, o anticorpo anti-CD22 totalmente humano m971 vem ganhando destaque.

O aumento da afinidade do scFv m971 não melhorou a atividade das células CAR-T *in vitro* e *in vivo* contra células leucêmicas com baixa expressão de CD22 (Ramakrishna *et al.*, 2019). No entanto, células CAR-T de segunda geração contendo o scFv m971 demonstraram maior atividade antitumoral em comparação com aquelas que utilizavam os scFvs BL22 ou derivados de HA22 (Haso *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2015). Isso pode estar relacionado à internalização mediada por HA22, que reduz a densidade de CD22 na superfície das células tumorais, um efeito não observado com o anticorpo m971 (Du *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009).

Em estudo conduzido pelo *National Cancer Institute (NCI)*, EUA, utilizando CAR-T anti-CD22 em pacientes com LLA, foram testadas duas construções de CAR. A primeira construção foi composta pelo scFv derivado de m971, cujas cadeias V_H e V_L foram conectadas por um *linker* com cinco aminoácidos (GGGGS), ou seja, por um *linker* curto. O scFv desse CAR foi unido ao hinge e à região transmembrana formados por CD8 α , que, por sua vez, foram conectados aos domínios de sinalização intracelular CD3 δ e 4-1BB. A segunda construção foi composta da mesma maneira, sendo diferenciada apenas no *linker*, que nesse caso possuía 20 aminoácidos ((GGGGS)₄), ou seja, mais longo. Os resultados da pesquisa demonstraram uma atividade mais promissora no CAR que incorporava o scFv mais curto, já que exibiu uma sinalização celular antileucêmica autônoma mais aprimorada que o scFv com *linker* longo (Singh *et al.*, 2021). O encurtamento do *linker* que conecta V_H e V_L no scFv pode impactar assim a eficácia do CAR-T anti-CD22. Singh e colaboradores (2021) observaram, desse modo, que *linkers* curtos favorecem a formação da sinapse imune e o agrupamento espontâneo de CARs sem necessidade de estímulo antigênico, promovendo ativação tônica e melhorando a

funcionalidade das células CAR-T.

O ensaio clínico piloto de células CAR-T anti-CD22 com scFv m971 com *linker* longo direcionados a pacientes pediátricos com LLA refratária ou resistente à quimioterapia (identificador ClinicalTrials.org NCT02650414) está em fase de recrutamento de pacientes. Já o estudo clínico voltado para adultos (identificador ClinicalTrials.org NCT02588456) foi encerrado por falta de eficácia. Ambos os estudos são de responsabilidade da Universidade da Pensilvânia.

No trabalho de Queiroz, 2024, foram investigadas as diferenças estruturais entre scFv e CD22, usando simulações de Dinâmica Molecular para estudar a interação entre eles, especialmente em modelos de membrana lipídica. Os resultados geraram um protocolo que permite avaliar a interação scFv/CD22 e propor mutações para modular a avidéz, o que pode ser efetivo para aplicação em CAR, para terapias mais eficientes em CAR-T.

Portanto, é essencial avaliar a capacidade de anticorpos de se ligarem aos antígenos específicos. Entender como ocorre a interação scFv/CD22 possibilita propor modificações no scFv para melhorar a terapia CAR-T. As técnicas de interferometria e citometria são complementares e constituem ensaios de funcionalidade bastante robustos. Ao serem usadas em complementaridade a dados *in silico* por DM, revelam detalhes molecular-atômico que outras técnicas não alcançam.

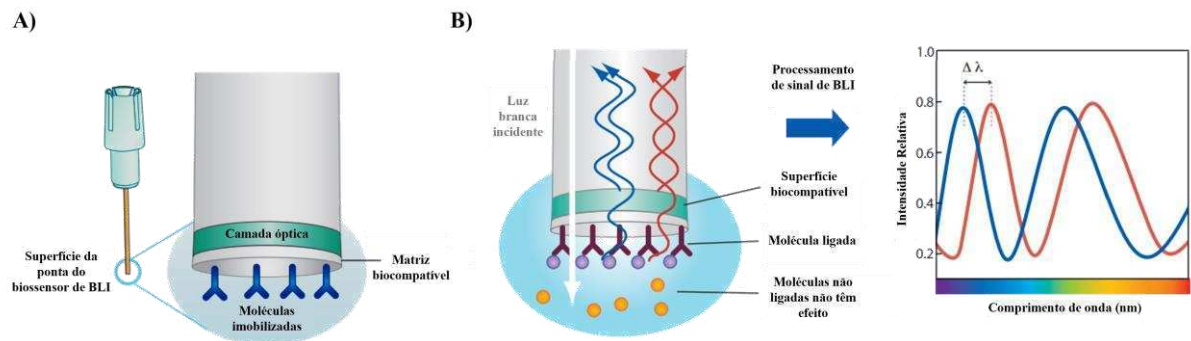
1.4 Interação antígeno-anticorpo: Citometria de Fluxo e Interferometria

Algumas técnicas *in vitro* podem ser utilizadas para determinar afinidade e capacidade de ligação de um anticorpo a um antígeno. Ao estudar a interação do anticorpo ao antígeno na forma solúvel, pode-se considerar a técnica de interferometria de biocamada (BLI, do inglês *Bio-Layer Interferometry*).

A BLI é uma técnica analítica óptica que mede diferentes padrões de interferência luminosa entre ondas de luz para analisar interações moleculares. Um biossensor de fibra óptica é exposto a luz branca, que reflete em duas camadas: uma camada biocompatível na ponta da fibra e uma camada de referência interna. A interferência entre os feixes refletidos depende da espessura da camada na ponta. Quando moléculas alvo se ligam à superfície do biossensor, essa espessura aumenta, alterando o padrão de interferência (Figura 8). A variação é detectada como uma mudança no comprimento de onda, permitindo monitorar em tempo real as interações moleculares (Tobias; Kumaraswamy, 2013).

Algumas limitações das condições experimentais da BLI podem ser destacadas, como a dependência de moléculas solúveis ou previamente imobilizadas no biossensor, o que pode não refletir a complexidade das interações em um ambiente celular, e a impossibilidade de realizar a análise em ambiente celular.

Figura 8 – Esquema de funcionamento de biossensor utilizado em BLI



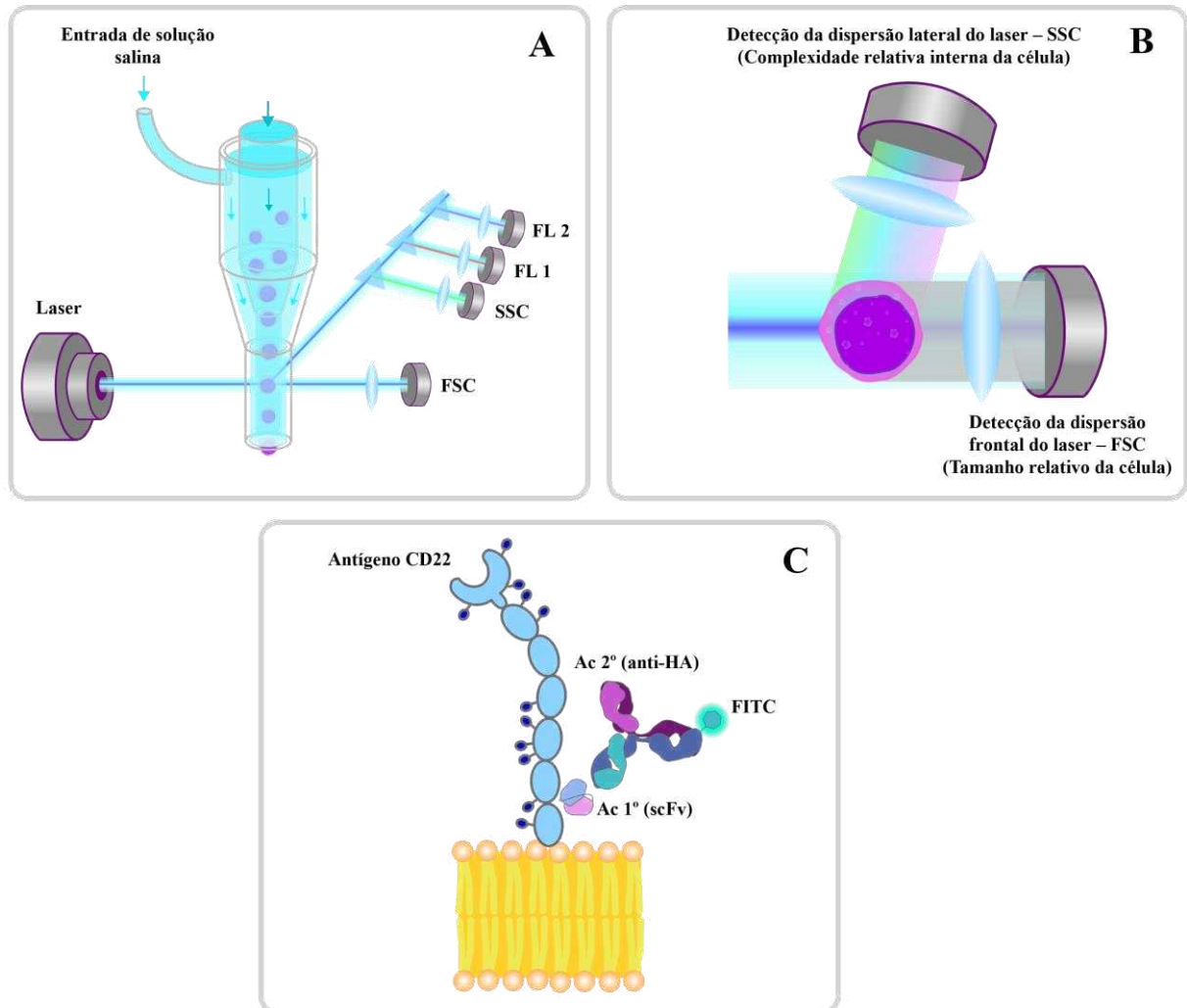
Fonte: Adaptado de Tobias; Kumaraswamy, 2013. A) Ilustração das duas interfaces ópticas na ponta do biossensor: a camada de referência interna (camada óptica) e a matriz biocompatível de superfície na qual as moléculas de ligante são imobilizadas. B) Ilustração do padrão de interferência da luz branca refletida de duas superfícies, pela técnica de análise óptica BLI. Mudanças no número de moléculas ligadas ao biossensor causam uma mudança no padrão de interferência que é medido em tempo real.

Com relação à interação do anticorpo ao antígeno associado à superfície celular, pode-se utilizar a técnica de citometria de fluxo, a qual é ideal para avaliar a ligação de anticorpos a antígenos expressos na superfície celular, como proteínas transmembrana. A acessibilidade de um antígeno específico em células utilizando anticorpos marcados com fluorocromos pode ser estudada (Figura 9C). O princípio da técnica de citometria de fluxo consiste na utilização de um laser para excitar esses fluorocromos, permitindo a análise de informações biológicas, moleculares e químicas. As células, transportadas por um fluxo hidrodinâmico contínuo, são interceptadas individualmente pelo laser, que induz a emissão de luz característica do fluorocromo (Figura 9A). Sistemas ópticos e eletrônicos coletam, filtram e convertem os sinais de dispersão de luz e fluorescência em pulsos elétricos. Esses pulsos são processados por um sistema computacional, que gera dados gráficos mono e biparamétricos, representando propriedades físicas, químicas e biológicas das células com base na intensidade da fluorescência e dispersão da luz (Bajgelman, 2019; de Carvalho; Ribeiro; Nogueira, 2010; Robinson *et al.*, 2023).

A necessidade de células em suspensão viáveis e alta autofluorescência das células podem ser fatores limitantes da técnica. Além disso, por meio da citometria de fluxo não é

possível obter informações diretas sobre as cinéticas de interação, como as taxas k_{on}/k_{off} ou afinidade molecular conseguidas na BLI.

Figura 9 – Esboço geral do princípio da técnica de citometria de fluxo.



Fonte: a autora. A) Laser incidindo na célula do fluxo hidrodinâmico, com detecção de sinal pelos detectores frontal (FSC), lateral (SSC) e canais de fluorescência (FL1 e FL2). B) Luz refletida e refratada é detectada no SSC, dando informações sobre a complexidade da célula, e a luz difratada é detectada no FSC, dando informações sobre o tamanho relativo da célula. Em C) representação da ligação do scFv (Ac – anticorpo 1º) ao antígeno CD22 presente na superfície da célula, com detecção possível em virtude do anti-HA (Ac – anticorpo 2º), conjugado com fluorocromo FITC.

As técnicas de citometria de fluxo e BLI são complementares e permitem analisar interações moleculares e celulares com alta precisão. A combinação de ambas possibilita uma abordagem integrada para explorar diferentes aspectos da interação antígeno-anticorpo, desde a caracterização inicial em solução até a validação em células. Isso oferece uma visão mais

detalhada de processos moleculares que são especialmente úteis em estudos de desenvolvimento de biomoléculas terapêuticas, como os scFvs.

1.5 Estado de oligomerização de scFvs

Para aplicar os scFvs, é importante definir o estado de oligomerização dessas moléculas. Ao encurtar o *linker* para cerca de 5-10 aminoácidos, pode ocorrer dimerização do scFv, originando o chamado *diabody*, e ao reduzir o *linker* ainda mais, ou removê-lo completamente, pode resultar na formação do chamado *triabody* (Arndt; Müller; Plückthun, 1998; Kortt *et al.*, 1997; Perisic *et al.*, 1994). O domínio V_H de um scFv pode parear com o domínio V_L de outro scFv e vice-versa, fenômeno denominado de troca de domínio (Arndt; Müller; Plückthun, 1998; Atwell *et al.*, 1999; Kwon; Kim; Lee, 2019; Perisic *et al.*, 1994).

Os scFvs podem formar dímeros sob determinadas condições. Além do comprimento do *linker*, alguns fatores podem fazer com que um scFv monomérico forme dímero em um equilíbrio dinâmico, como congelamento e descongelamento, condições de expressão, pH, força iônica, concentração de proteína e presença ou ausência de antígeno (Arndt; Müller; Plückthun, 1998; Kortt *et al.*, 1997).

Os *diabodies* possuem a capacidade de se ligar a dois antígenos distintos ou a dois epítomos diferentes de um mesmo antígeno, tornando-se moléculas bivalentes com avidéz superior em comparação aos fragmentos de anticorpos monoméricos. (Kwon; Kim; Lee, 2019; Lüdel *et al.*, 2019).

Para investigar o estado oligomérico das proteínas em solução, diversos métodos, como dispersão de raios X em baixo ângulo (SAXS) e espectroscopia de correlação de fótons (PCS), podem ser utilizados para avaliar seu tamanho, forma, massa molecular e propriedades hidrodinâmicas. Além disso, a formação de dímeros ou oligômeros pode ser identificada por meio de separação em colunas de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) analítica, um método que permite a obtenção de perfis de tamanho real devido às condições suaves de separação, que garantem alta resolução. A combinação de diferentes técnicas é fundamental, pois proteínas, como os anticorpos, são moléculas de complexidade biológica considerável (Lüdel *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

O Grupo de Engenharia de Proteínas e Soluções para Saúde (GEPeSS), da Fiocruz-CE, conta com um histórico de estudos de desenvolvimento de scFvs anti-CD19 e anti-CD20, especialmente utilizando técnica de *phage display* para selecionar anticorpos promissores contra alvos direcionados em terapias CAR-T. O estudo de Queiroz, 2024 analisou a interação entre scFv e CD22 por meio de simulações de Dinâmica Molecular, focando em modelos de membrana lipídica. Os resultados estabeleceram um protocolo para avaliar essa interação e sugerir mutações para modular a avidéz, contribuindo para terapias CAR-T mais eficazes.

A interação entre anticorpos e antígenos é uma questão fundamental no campo da imunologia e tem implicações críticas para o desenvolvimento de terapias contra o câncer. Entender a natureza e a força dessa interação (K_d) é essencial para avaliar a eficácia dos anticorpos em diversos contextos, desde aplicações terapêuticas até métodos diagnósticos. Desse modo, investigar a interação entre os scFvs derivados de m971 com *linker* curto e *linker* longo com o CD22, bem como avaliar a funcionalidade desses fragmentos de anticorpo, fornece uma abordagem abrangente e detalhada para a caracterização dessas moléculas. Além disso, outro fato que reforça a importância de se estudar essas moléculas é que foram publicados resultados de ensaios clínicos com dois CARs anti-CD22, com scFv com *linker* curto e longo, ambos usando V_H e V_L do m971 (Singh *et al.*, 2021). O CAR-T anti-CD22 com scFv com *linker* curto demonstrou maior potencial em comparação ao com *linker* longo. Este último, inclusive, teve seu uso em ensaios clínicos para adultos com LLA recidivante e refratária descontinuado devido à falta de eficácia.

Dessa forma, destaca-se a necessidade de explorar e otimizar a afinidade de scFvs em terapias CAR-T, especialmente quando direcionados a antígenos como o CD22, no tratamento de cânceres hematológicos.

Ao abordar as questões fundamentais relacionadas à interação e funcionalidade dos anticorpos, são fornecidas informações valiosas para avançar no entendimento das respostas imunológicas e contribuir para o aprimoramento de abordagens terapêuticas baseadas em anticorpos.

3 HIPÓTESES

- A. A produção dos scFvs com *linkers* curto e longo é viável em sistema heterólogo bacteriano, utilizando linhagem de *E. coli* Shuffle B.
- B. Existem diferenças nas funcionalidades de scFvs com *linkers* curto e longo na interação com CD22.

4 OBJETIVOS

Avaliar a interação entre scFvs com *linker* curto e longo, derivados do anticorpo m971, e o CD22.

4.1 Objetivos específicos

- a) Introduzir os genes dos scFv de m971 com *linkers* curto e longo em células da linhagem *E. coli* Shuffle B por meio de transformação bacteriana.
- b) Verificar a expressão dos scFvs por meio de gel de visualização proteica e imunodeteção mediante *western blotting*.
- c) Padronizar expressão e purificação dos scFvs em plataforma procariótica.
- d) Otimizar condições e parâmetros de expressão e rompimento celular.
- e) Realizar cromatografia de exclusão analítica para avaliar estado de oligomerização dos scFvs.
- f) Avaliar estabilidade conformacional dos scFvs mediante fluorescência dos resíduos de triptofano.
- g) Caracterizar a interação dos scFvs com o CD22 por meio de citometria de fluxo.
- h) Determinar parâmetros cinéticos de interação (k_{on} , k_{off} e K_d) por meio de interferometria de biocamada.

5 METODOLOGIA

5.1 Material biológico

Para transformação dos scFvs com *linker* curto e longo, o estudo partiu dos vetores pET28a-SUMO sintetizados (GenScript USA, Inc.) com as respectivas sequências gênicas codificadoras dessas moléculas para expressão recombinante em bactéria. Os vetores possuem gene de resistência à canamicina. A bactéria de expressão escolhida foi *Escherichia coli* Shuffle, derivada da linhagem *E. coli* B. Essa linhagem possui modificações genéticas que facilitam a expressão de proteínas com pontes dissulfeto no ambiente citoplasmático, algo que não é comum nas linhagens tradicionais de *E. coli* (New England Biolabs®, 2024).

5.2 Transformação das linhagens recombinantes

As linhagens de *E. coli* Shuffle B foram transformadas por choque térmico separadamente, a fim de receberem os plasmídeos pET28a-SUMO, contendo os genes de interesse, scFV m971 com *linker* curto e com *linker* longo. Para isso, utilizaram-se 40 ng do DNA plasmidial e 50 µL de *E. coli* Shuffle B. Os tubos contendo DNA e bactéria foram colocados em gelo por 20 minutos. Ao final desse tempo, os tubos foram transferidos para o banho seco a 42 °C por 45 segundos, seguido de 2 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se em cada tubo 1 mL de meio LB. Por fim, foram incubados em *shaker* a 200 rpm, 37 °C por 1 h para regeneração das células. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 30 segundos, descartando-se grande parte do sobrenadante, homogeneizando gentilmente o *pellet* no restante da solução. Utilizou-se 50 µL do homogeneizado para plaqueá-lo em 10 mL de meio LB ágar, contendo seu respectivo antibiótico de resistência (canamicina 40 µg /mL para pETSUMO) *overnight* a 37 °C em estufa.

5.3 Expressão de scFvs com *linker* curto e longo em sistema *E. coli* Shuffle B

Para teste inicial de expressão, os inóculos de pET28a-SUMO com *linker* longo e curto em Shuffle B foram preparados separadamente, com 50 mL de meio *Terrific Broth* (TB – Extrato de levedura 24% (p/v), Triptona 20% (p/v) e 0,4% (v/v) de Glicerol), 5mL de tampão fosfato filtrado em filtro de 0,45 µm (0,17 M de KH₂PO₄ e 0,72 M K₂HPO₄) com antibiótico canamicina (40 µg /mL) em frasco tipo erlenmeyer de 250 mL estéril. Adicionou-se 1 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 200 rpm, medindo-se a D.O._{600nm} até que esta atingisse 0,4-0,6. Induziu-se a expressão com Isopropil- β -D-tiogalactopiranosose (IPTG, Promega®) na concentração final de 1 mM, 4 h, a 30 °C, em agitador orbital a 200 rpm. Após esse período, o restante da cultura seguiu para centrifugação a 8.000 x g por 10 min e 4 °C. Aliquotas pré-indução e ao final do cultivo foram obtidas para posterior visualização das proteínas em gel de eletroforese.

No intuito de otimizar a produção dos scFvs de forma solúvel e evitar a formação de corpos de inclusão, outra condição de expressão foi testada. Nesse caso, os inóculos de pET28a-SUMO com *linker* longo e curto em Shuffle B foram preparados separadamente, com 250 mL de meio TB, seguindo as mesmas proporções anteriormente descritas, suplementado com canamicina (40 μ g/mL) em frasco tipo erlenmeyer de 1 L estéril. Adicionaram-se 5 mL de bactérias crescidas provenientes de colônias de um pré-inóculo também em meio TB. A indução da expressão foi feita com IPTG na concentração final de 0,5 mM, 16 h (overnight), a 16 °C, em agitador orbital a 200 rpm. Após esse período, o restante da cultura seguiu para centrifugação a 8.000 x g por 10 min e 4 °C. Os pellets foram armazenados em -20 °C para posterior purificação.

5.4 Western blotting

Para a realização do *western blotting* dos scFvs com *linker* longo e curto expressos no teste inicial (1 mM de IPTG, 4 h, 30 °C), correu-se um gel de poliacrilamida 12,5 % em condições desnaturantes e redutoras. Após a corrida, foi realizada a eletrotransferência dos scFvs para membrana de nitrocelulose em equipamento de eletrotransferência do tipo Semi-dry TransBlot Turbo Transfer System (Biorad®). 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 proteína L conjugada com HRP (horseradish) 1:5000 (v/v) diluído em leite 3 % em PBST, por 1 h sob agitação em temperatura ambiente. Por fim, foram realizadas 3 lavagens de 10 min cada e a membrana seguiu para revelação com substrato quimioluminescente. Para realização de *western blotting* dos scFvs sem cauda SUMO, seguiu-se metodologia similar, utilizando, alternativamente à proteína L, o anticorpo monoclonal HA Tag (2-2.2.14), HRP (Invitrogen), na diluição 1:5000 (v/v).

5.5 Purificação de proteínas em coluna de afinidade e de exclusão molecular

A purificação dos scFvs foi realizada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), utilizando um sistema automatizado ÄKTA Pure (Cytiva®) e uma coluna HisTrap HP 1 mL (Cytiva®) carregada com níquel. Os scFvs, expressos no vetor pET28a-SUMO, possuem uma tag de 6 histidina (6xHis), que se liga seletivamente ao níquel da coluna. O *pellet* obtido de 250 mL de cultura bacteriano foi ressuspensão em 20 mL de tampão A (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0) com 20 mM de imidazol, 1% de triton X-100, 1% de fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF) inibidor de proteases e 0,1% de coquetel inibidor de proteases (P8340, Sigma-Aldrich). A lise celular foi realizada por sonicação (Ultrassonicador QSonica Q700, microsonda 4420) em banho de gelo, com ciclos de 5 s de pulsos e 30 s de intervalo (amplitude de 5 %), totalizando 10 minutos. Após a sonicação, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min (4 °C) para separar as proteínas solúveis (sobrenadante) dos debris celulares e proteínas insolúveis (*pellet*).

O sobrenadante foi filtrado em filtro de membrana poliéter sulfona (PES) de 0,22 µm. Os tampões utilizados no ÄKTA Pure também foram filtrados em bomba de vácuo, utilizando filtros de 0,45 µm. No cromatógrafo, a amostra foi equilibrada com a coluna e foi 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 scFvs. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 para revelação das bandas proteicas.

Para remoção do imidazol e consequente preservação das proteínas, uma segunda etapa de cromatografia foi realizada, a cromatografia de exclusão molecular, em coluna Sephacryl™ S-200 HR. A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão fosfato-salino (PBS), sendo eluída também em PBS. Após essa etapa, as amostras foram concentradas em Amicon® Ultra, 10 kDa MWCO, e novo gel de eletroforese foi corrido.

Após a expressão das proteínas em pET28a-SUMO, é conveniente a excisão da cauda, procedimento realizado por meio da enzima *ubiquitin-like protease* (ULP) SUMO protease, que cliva a cauda SUMO de forma específica nos scFv-SUMO, levando consigo a cauda de histidina (HisTag). A enzima ULP SUMO protease foi previamente expressa de forma heteróloga pelo grupo e armazenada a 4 °C. A reação de clivagem da ULP SUMO protease se deu mediante

incubação *overnight* a 4 °C da proteína fusionada com a ULP, em uma proporção de 10:1 m/m (10 mg de proteína de interesse para 1 mg de ULP). O conteúdo da digestão foi passado em coluna IMAC, e os scFvs clivados foram coletados como pico não retido, monitorados por leitura de absorbância a 280 nm, uma vez que essas moléculas não possuem mais nenhuma cauda que as façam interagir com a matriz cromatográfica.

5.6 Cromatografia de exclusão de tamanho analítica

Para determinação do estado de oligomerização dos scFvs, foi realizada cromatografia de exclusão molecular analítica. Uma coluna Superdex™ 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) foi equilibrada com 2 volumes de coluna de tampão fosfato-salino (PBS). Após a injeção da amostra, a proteína foi eluída, observando-se a absorbância UV a 280 nm. A coluna foi calibrada com Blue Dextran (2.000 kDa, volume vazio) apoferritina (440 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), conalbumina (75 kDa), ovalbumina (44 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) em PBS antes de executar a corrida cromatográfica dos scFvs.

5.7 Avaliação de estabilidade conformacional dos scFvs

Foi realizada análise de estabilidade conformacional dos scFvs, com base na emissão de fluorescência por resíduos de triptofano, no equipamento Tycho® NT.6 (NanoTemper® Technologies). Foi obtida a fluorescência a 350 nm e 330 nm no curso de aquecimento de 35 a 95 °C, para obter um perfil de razão de fluorescência nos comprimentos de onda 330 nm e 350 nm ao longo de 12 dias.

5.8 Cultura de células eucarióticas

As linhagens celulares utilizadas nesse estudo foram Raji (CD22+), linhagem de linfócito B adquirida, que apresenta expressão na sua superfície celular do CD22; Jurkat (CD22-) e K562 (CD22-), linhagens de células linfoblásticas que não apresentam expressão do CD22. Essas linhagens celulares, previamente armazenadas em freezer -80 °C, foram descongeladas aquecendo-se a 37 °C até descongelar um criotubo contendo 1 mL de células previamente congeladas em meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®) e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido)

(Sigma Aldrich®). Em seguida, o conteúdo foi adicionado a 9 mL de meio RPMI 1640 suplementado e seguiu para centrifugação 300 x g, 5 min, 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado. Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram incubadas em incubadora (HERACell Vios 160i, ThermoFisher Scientific®) a 37 °C, 5% de CO₂, sendo monitoradas continuamente em relação à sua confluência.

5.9 Citometria de Fluxo

Nessa etapa, foram seguidos ensaios com as moléculas de scFv contendo ou não a cauda SUMO, a fim de investigar a influência dessa cauda na interação com o CD22.

As células cultivadas, Jurkat, K562 e Raji, foram inicialmente contadas e avaliadas quanto à viabilidade utilizando uma câmara de Neubauer. Uma amostra de 10 µL das células foi coletada e diluída na proporção 1:1 (v/v) em azul de tripano 0,4% para contagem. As células coradas foram depositadas na Câmara de Neubauer e visualizadas em microscópio óptico com aumento de 40x. Após a verificação da viabilidade e a contagem, o *pellet* celular foi diluído para obter uma concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. As células foram distribuídas em microplaca de 96 poços com fundo arredondado e centrifugadas a 400 x g por 5 min a 20 °C. As células foram lavadas com tampão FACS (PBS coontendo 2% SFB e 2 mM EDTA), descartando-se o sobrenadante. Em seguida, adicionaram-se 60 µL de corante de viabilidade fixável Invitrogen™ eBioscience™ eFluor™ 780 1:1000 (v/v) e de bloqueador de receptores Fcγ (receptores Fc para imunoglobulina G) BD Pharmingen™ Human BD Fc Block™ 1:20 (v/v). A mistura foi incubada por 20-30 min à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 140 µL de tampão FACS, e as células foram centrifugadas a 400 x g por 5 min a 20 °C, com descarte do sobrenadante. Posteriormente foram adicionados 60 µL de scFvs a 300 nM, seguidos por uma nova incubação por 20-30 min à temperatura ambiente. Novamente, adicionaram-se 140 µL de tampão FACS, e a centrifugação foi repetida nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, e 60 µL do anticorpo secundário anti-HA-FITC 1:500 (v/v) foram adicionados, com incubação por 20-30 min à temperatura ambiente. Ao término dessa etapa, foram adicionados 140 µL de tampão FACS e centrifugou-se a 400 x g por 5 min a 20 °C, descartando-se o sobrenadante. Uma última lavagem com tampão FACS foi realizada. Para validar a presença de CD22 na superfície da linhagem Raji e a ausência de CD22 na superfície das linhagens K562 e Jurkat, utilizou-se BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD22,

clone HIB22, 1:100 (v/v). Como as linhagens K562 e Jurkat podem ser usadas como controle negativo em ensaios de citometria para CD22 (Casey *et al.*, 2023), ambas foram consideradas nos experimentos. Nos dois ensaios iniciais de citometria, não foram utilizados corantes de viabilidade nem bloqueadores de receptores Fcγ. Após esse preparo, as células seguiram para citometria em FACSCelesta (BD Biosciences), em que foi setada a passagem de 10.000 eventos. Os dados obtidos foram analisados por meio do *software FlowJo*.

5.10 Cinética de interação entre os scFvs e o CD22 por interferometria

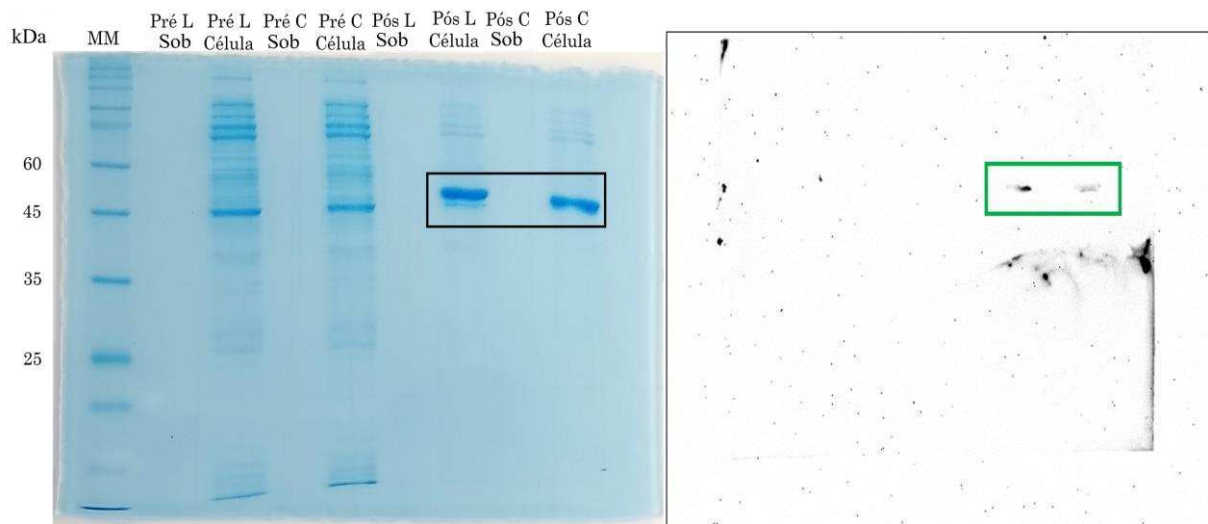
Para os ensaios de cinética de ligação, foram usados sensores de ácido nitrilotriacético de níquel (Ni-NTA). Os biosensores foram hidratados com 200 µL de tampão 1x *Kinetics Buffer*, composto por PBS + 0.02% Tween 20 + 0.1% BSA + 0.05% azida sódica, por 10 min a 30 °C para retirada da sacarose que os preserva. Em seguida, 2,5 µg/mL do CD22 (Cusabio®), domínios extracelulares d1 a d7 (CD22_{d1-d7}), contendo cauda 6xHis no C-terminal, foi carregado por 180 s em uma etapa chamada *loading*, seguido de etapa de baseline para retirada do excesso de CD22 em tampão *Kinetics Buffer*. Após essa lavagem, houve a interação do sensor funcionalizado com o CD22, mergulhando em 200 µL de scFv curto e longo (analito), em uma curva de concentração iniciando com 100 nM e reduzindo com diluições seriadas de 2x, por 300 s de associação, seguido de 300 s de dissociação. 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.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão de scFvs com *linker* curto e longo em sistema *E. coli* Shuffle B

A etapa de transformação das linhagens de *E. coli* Shuffle B por choque térmico, a fim de introduzir os plasmídeos pET28a-SUMO, contendo os genes de interesse, scFv m971 com *linker* curto e com *linker* longo, foi alcançada com sucesso. Colônias positivas foram cultivadas em meio TB, com expressão induzida, conforme protocolo descrito no item 5.3 do tópico metodologia, referente ao teste inicial de expressão. Foi possível constatar que, juntamente ao ensaio de *western blotting*, os scFvs foram expressos pelo sistema procarioto (Figura 10). Antes da indução com IPTG, não são observadas bandas proteicas referentes aos scFvs, o que confirma que a expressão dessas moléculas depende da indução por IPTG.

Figura 10 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas expressas, à esquerda, e *western blotting*, à direita. Em destaque pelo retângulo preto no gel de eletroforese bandas referentes aos scFvs com *linker* longo e com *linker* curto, respectivamente, e em destaque pelo retângulo verde no *western blotting*, bandas referentes aos scFvs com *linker* longo e com *linker* curto.

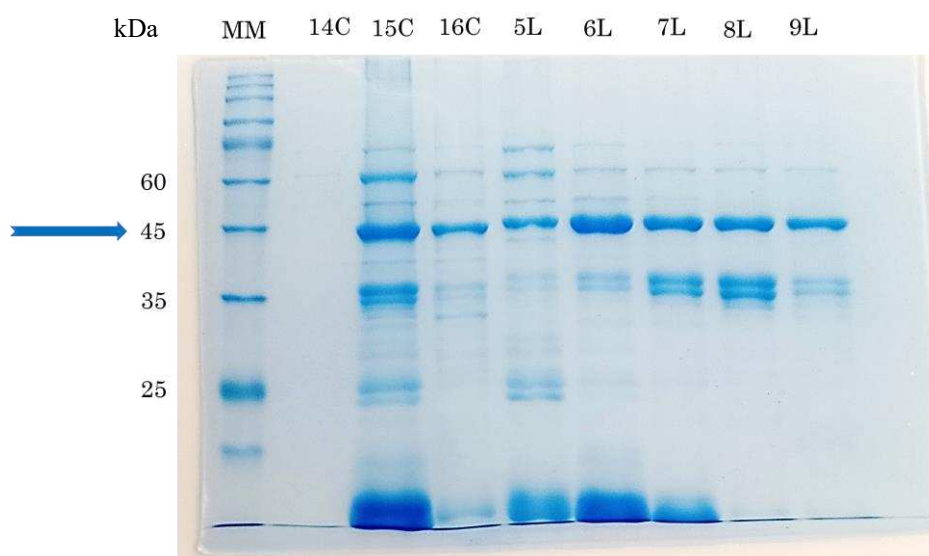


Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste das imagens. A massa esperada da construção his-SUMO-scFv é de aproximadamente 45 kDa. Na imagem, “MM” é marcador molecular; “pré” significa pré-indução; “pós” significa pós-indução; “L” significa scFv com *linker* longo e “C” significa scFv com *linker* curto; “Sob” significa sobrenadante de cultura.

6.2 Purificação dos scFvs em colunas de afinidade e de exclusão molecular

Após a etapa de purificação, em coluna de afinidade, foi possível verificar que o scFv-SUMO está posicionado em 45 kDa no gel de eletroforese, na figura 11.

Figura 11 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas presentes nas alíquotas referentes aos picos obtidos no processo de cromatografia de afinidade, visando a localização dos scFvs com *linkers* curto e longo no gel.

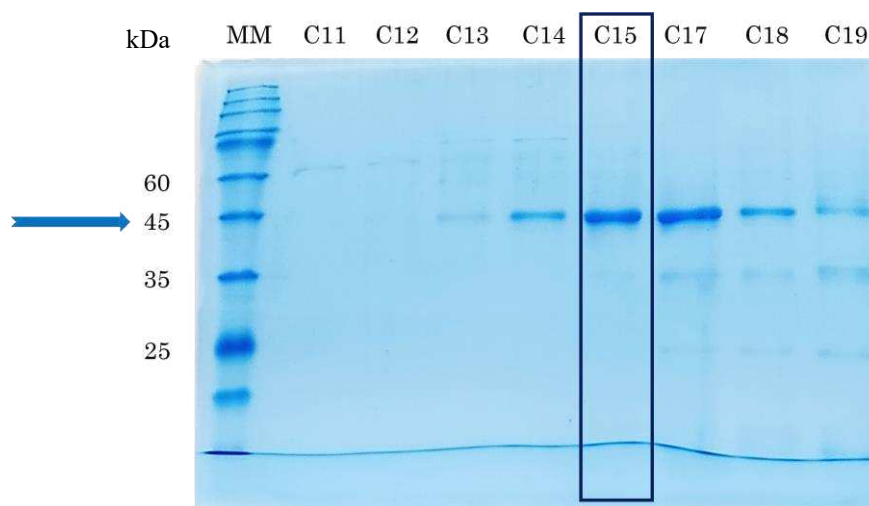


Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “14C” a “16C” corresponde às frações coletadas do scFv com *linker* curto; 5 a 9L corresponde às frações coletadas do scFv com *linker* longo. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

A etapa de purificação dos scFv, com coluna de exclusão molecular, permitiu o isolamento em relação a outras proteínas de *E. coli* (Figuras 12 e 13) presentes no gel. Da mesma forma, permitiu a remoção do imidazol utilizado na etapa de purificação anterior, em cromatografia de afinidade, o qual é interferente em ensaios de funcionalidade.

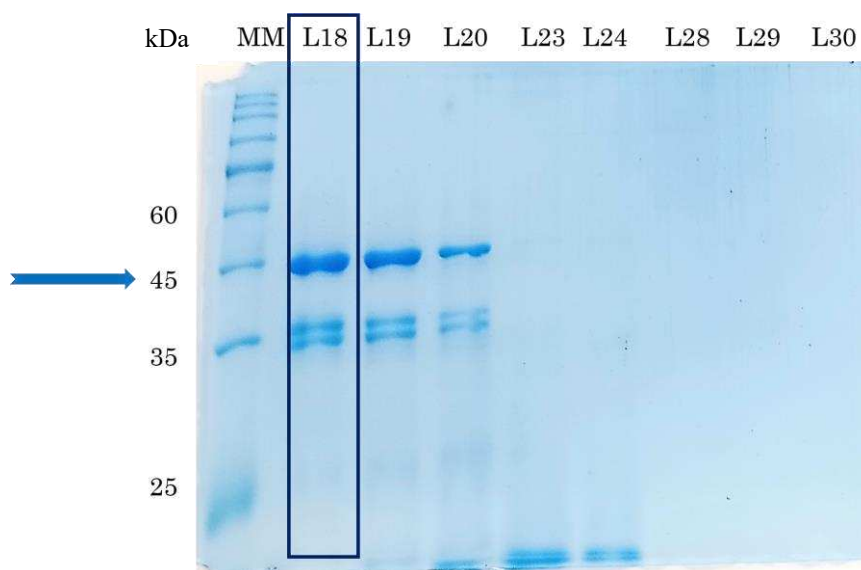
Além disso, a produção e purificação desses fragmentos possibilitou a obtenção de proteínas para utilização em ensaios iniciais de citometria de fluxo, a fim de verificar a ligação dos scFvs, contendo cauda SUMO, à molécula de CD22, a qual é expressa na superfície de células B. As amostras escolhidas para prosseguimento com esses experimentos foram C15 (Figura 12) e L18 (Figura 13).

Figura 12 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas nas alíquotas dos picos obtidos no processo de cromatografia de exclusão por tamanho para o scFv com *linker* curto com SUMO.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “C11” a “C19” corresponde às frações coletadas do scFv com *linker* curto (pico). Em destaque, amostra C15, com a qual foram prosseguidos os ensaios de funcionalidade. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

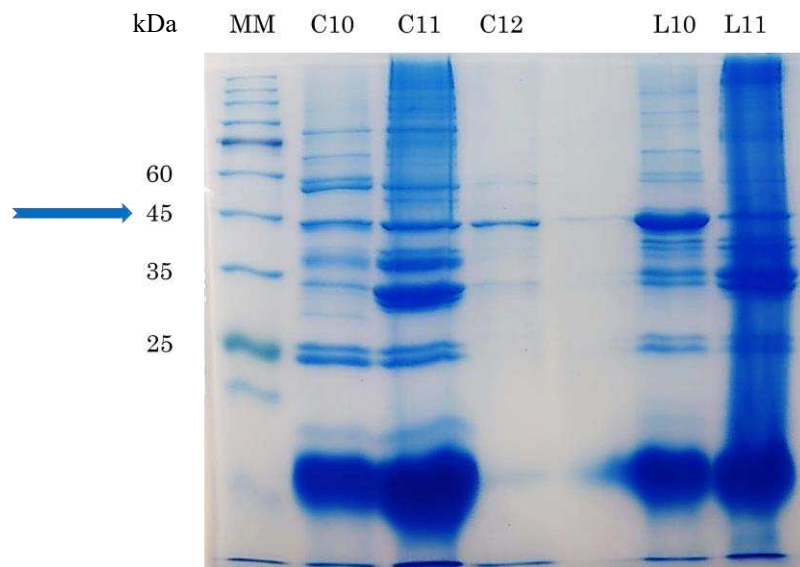
Figura 13 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas nas alíquotas dos picos obtidos no processo de cromatografia de exclusão por tamanho, visando identificar o scFv com *linker* longo com SUMO.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “L18” a “L30” corresponde às frações coletadas do scFv com *linker* longo (pico). Em destaque, amostra L18, com a qual foram prosseguidos os ensaios de funcionalidade. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

Para obtenção de mais scFvs para os ensaios de funcionalidade, foram realizados novos ciclos de expressão recombinante e purificação. Após a primeira etapa de purificação, em coluna de afinidade, foi possível observar, em gel de eletroforese, uma redução na quantidade de scFvs obtidos (Figura 14), comparando-se a purificações anteriores (Figuras 11, 12 e 13). Além disso, a aparição de fortes bandas, abaixo de 25 kDa, podem indicar possibilidade de degradação dos scFvs, possivelmente na etapa de rompimento celular, com condições de sonicação mais abruptas (Zhu *et al.*, 2018).

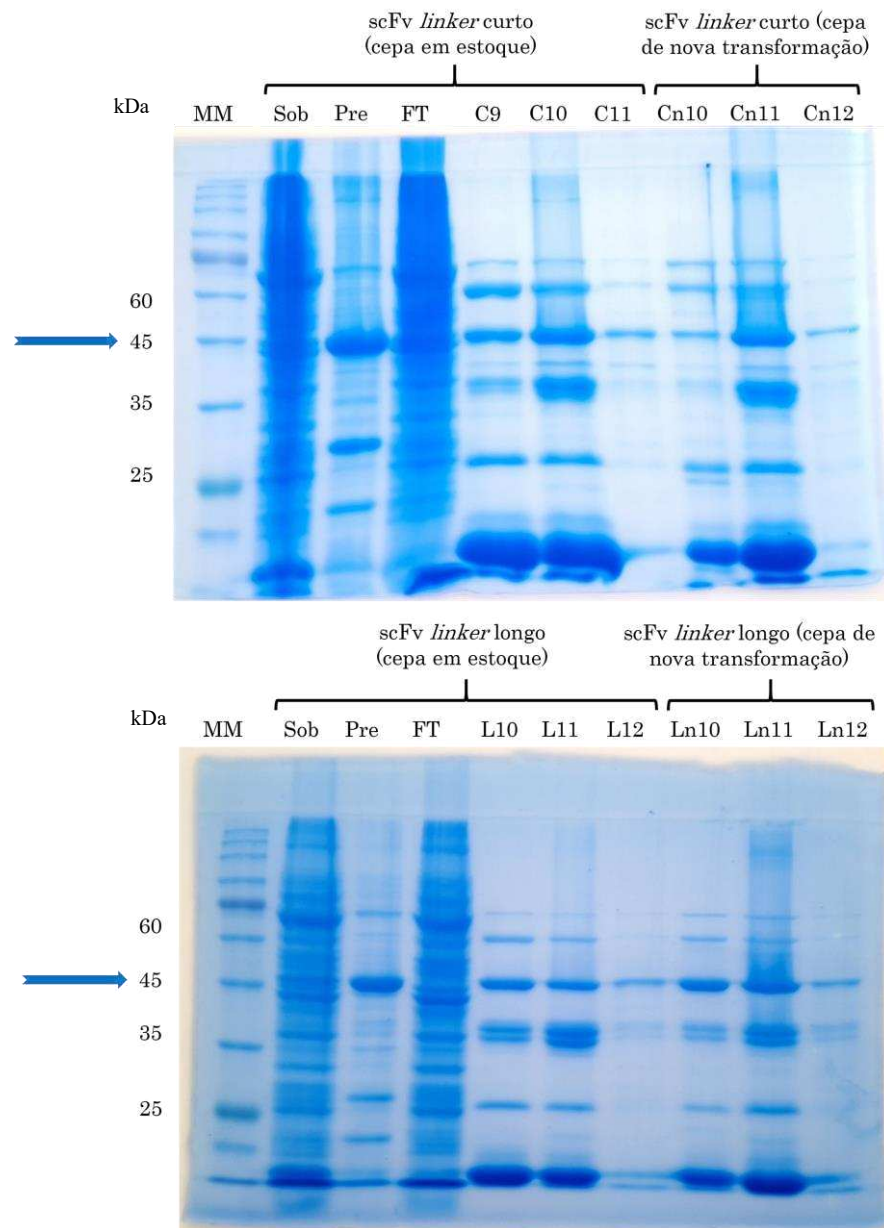
Figura 14 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas nas alíquotas dos picos obtidos no processo de cromatografia de afinidade para os scFvs com *linker* curto e longo.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “C10” a “C12” correspondem às frações coletadas do scFv com *linker* curto e “L10” e “L11” às frações do scFv com *linker* longo. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

Visto que as replicatas de expressão geraram rendimentos variáveis, foram realizadas novas expressões, usando as linhagens em estoque e linhagens transformadas novamente. As condições de expressão foram mantidas e as condições de rompimento celular foram abrandadas. Com isso, foi possível obter scFvs solúveis e purificados tanto por meio da linhagem em estoque quanto por meio da linhagem recém transformada (Figura 15).

Figura 15 — Géis de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas obtidas no processo de cromatografia de afinidade para os scFvs com *linker* curto e longo.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste das duas imagens que compõem essa figura. “MM” significa marcador molecular; “Sob” corresponde ao sobrenadante do rompimento celular; “Pre” significa a fração insolúvel (precipitado) do rompimento celular; “FT” corresponde ao *flow through* que não se ligou na coluna de afinidade; “C9” a “C11” e “L10” a “L12” correspondem às frações coletadas dos scFvs com *linker* curto e longo, respectivamente, obtidos da expressão das linhagens em estoque; “Cn10” a “Cn12” e “Ln10” a “Ln12” correspondem às frações coletadas dos scFvs com *linker* curto e longo, respectivamente, obtidos da expressão das linhagens recém transformadas. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

Na etapa de purificação dos scFvs com coluna de exclusão molecular, subsequente à cromatografia de afinidade, foi possível isolar os scFvs em relação a outras proteínas de *E. coli*, assim como a remoção do imidazol (Figura 16).

Figura 16 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas obtidas no processo de cromatografia de exclusão molecular para os scFvs com *linker* curto e longo, respectivamente.

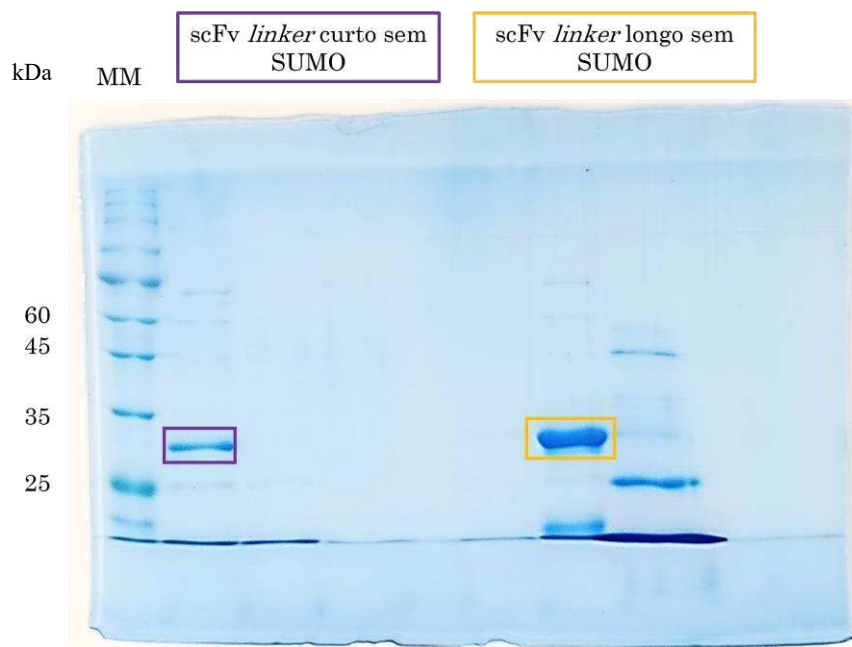


Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “C6” a “C9” e “L3” a “L6” correspondem às frações coletadas dos scFvs com *linker* curto e longo, respectivamente. Seta em azul aponta a massa de 45 kDa.

Após a cromatografia de exclusão molecular, os scFvs foram incubados com proteína ULP SUMO protease, para retirada da cauda SUMO (Figura 17). Por meio dessa etapa, buscou-se obter scFvs sem cauda SUMO, a fim de verificar a eficiência de ligação ao CD22, mediante técnicas de citometria de fluxo e de interferometria de biocamada.

Ao final das etapas de purificação, as amostras foram quantificadas em absorbância a 280 nm. O scFv com *linker* curto estava na concentração de 88 µg/mL, e o com *linker* longo a 416 µg/mL. As amostras C15 e L18, utilizadas para o ensaio de citometria com os scFvs contendo a cauda SUMO, também foram quantificadas, e foi verificado 30 µg/mL para o scFv com *linker* curto e 100 µg/mL para o com *linker* longo.

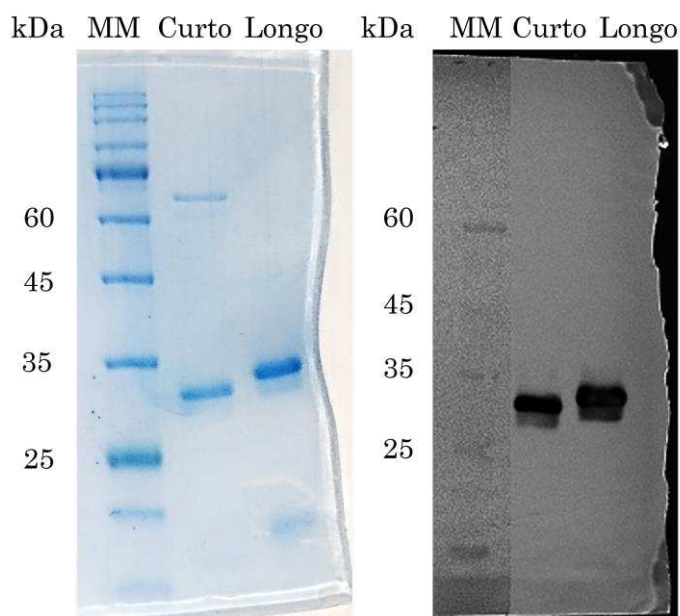
Figura 17 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas obtidas no processo de cromatografia de afinidade, com coleta de *flow through*, para os scFvs com *linker* curto e longo, respectivamente.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; as bandas proteicas correspondentes aos scFvs estão destacadas no gel de eletroforese, sendo destacado em roxo a banda de proteína referente ao scFv com *linker* curto, de 26,88 kDa, e destacado em amarelo a banda de proteína referente ao scFv com *linker* longo, de 27,83 kDa.

Foi realizada nova expressão, seguida de purificação e remoção da SUMO, atingindo-se 88 µg/mL de scFv com *linker* curto e 173,8 µg/mL de scFv com *linker* longo (Figura 18). Com essa produção, seguiu-se para caracterização de estabilidade térmica, interferometria de biocamada e citometria de fluxo.

Figura 18 — Gel de eletroforese para visualização das bandas referentes às proteínas expressas, à esquerda, e *western blotting*, à direita.



Fonte: a autora. Foram feitos ajustes na saturação da coluna do marcador do *western blotting*, assim como ajustes na nitidez, brilho e contraste da imagem. “MM” significa marcador molecular; “Curto” é scFv com *linker* curto, de 26,88 kDa, e “Longo” é scFv com *linker* longo, de 27,83 kDa.

6.3 Cromatografia de exclusão por tamanho analítica

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC, do inglês *Size-Exclusion Chromatography*) analítica pode ser fundamental na determinação do estado de oligomerização de determinadas moléculas. Essa técnica permite a separação das moléculas com base em seu tamanho molecular, fornecendo informações sobre a presença de diferentes estados oligoméricos, como monômeros, dímeros ou agregados de maior ordem. Com a elucidação do estado de oligomerização, torna-se possível diferenciar as formas monoméricas e oligoméricas dos scFvs em estudo, fornecendo *insights* sobre o comportamento em solução.

Durante a análise do estado oligomérico dos scFvs por SEC analítica, foi possível observar que as proteínas eluíram com picos principais correspondente a uma massa molecular de cerca de 27 kDa para o scFv com *linker* curto (Figura 19) e de 28 kDa para o scFv com *linker* longo (Figura 20), em uma concentração de proteína de 1 mg/mL. Um pico secundário, correspondente a uma massa molecular em torno de 47 kDa, foi constatado na SEC analítica da amostra de scFv com *linker* curto.

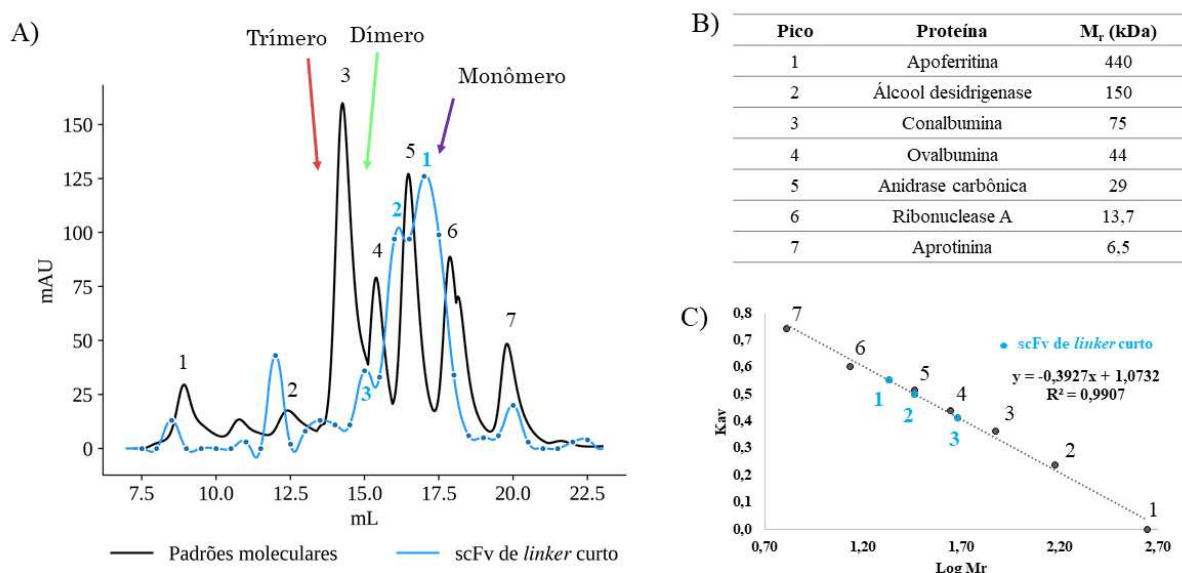
Alguns parâmetros foram definidos a partir dos dados das SEC analíticas, como o K_{av} (equação 1), que é o coeficiente de partição aparente médio, um fator usado na cromatografia

de filtração em gel para descrever o comportamento de uma molécula em relação ao acesso aos poros da matriz da coluna. Esse parâmetro é usado para construir curvas de calibração que correlacionam o volume de eluição de uma molécula com seu peso molecular, facilitando a estimativa do tamanho das moléculas desconhecidas.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o} \quad (1)$$

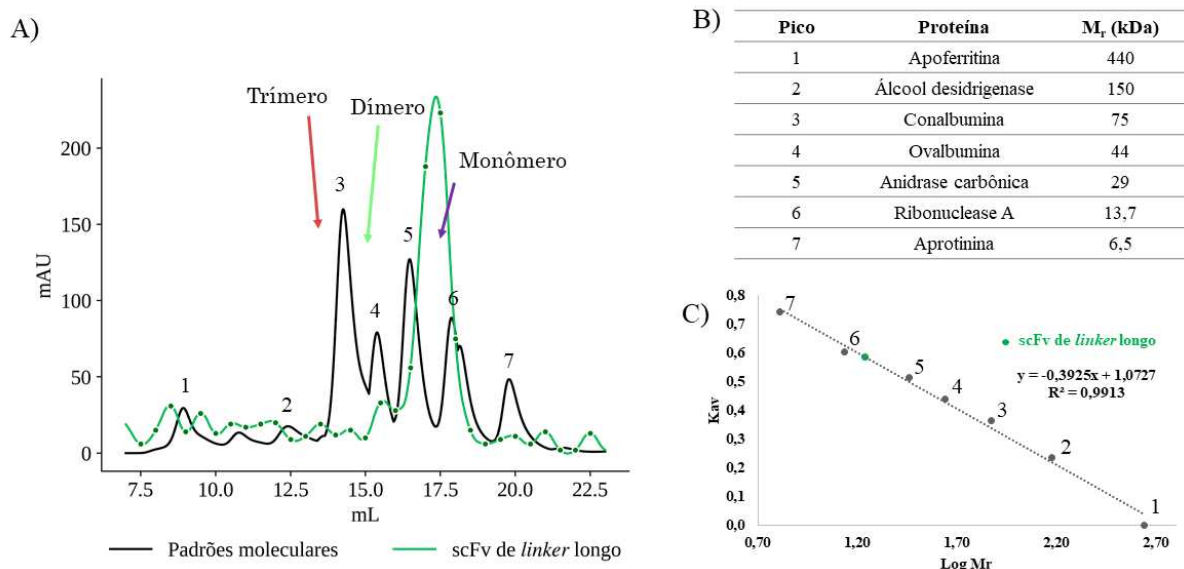
Onde V_o = volume de *void* da coluna, V_e = volume de eluição e V_c = volume geométrico da coluna.

Figura 19 — Perfil da SEC analítica do scFv com *linker* curto na coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL.



Fonte: a autora. Em A) tem-se a separação cromatográfica de 7 proteínas padrão, as quais estão na tabela em B), seguido da sobreposição do perfil cromatográfico do scFv com *linker* curto, em azul. Em C) tem-se a curva de calibração. Foi utilizada interpolação quadrática com a função `interp1d` da biblioteca SciPy da linguagem Python para estimativa das curvas a partir dos pontos medidos. As setas coloridas (vermelho, verde e roxo) indicam regiões no gráfico onde se esperaria aparecer picos correspondentes a oligômeros do tipo trímero, dímero ou monômero.

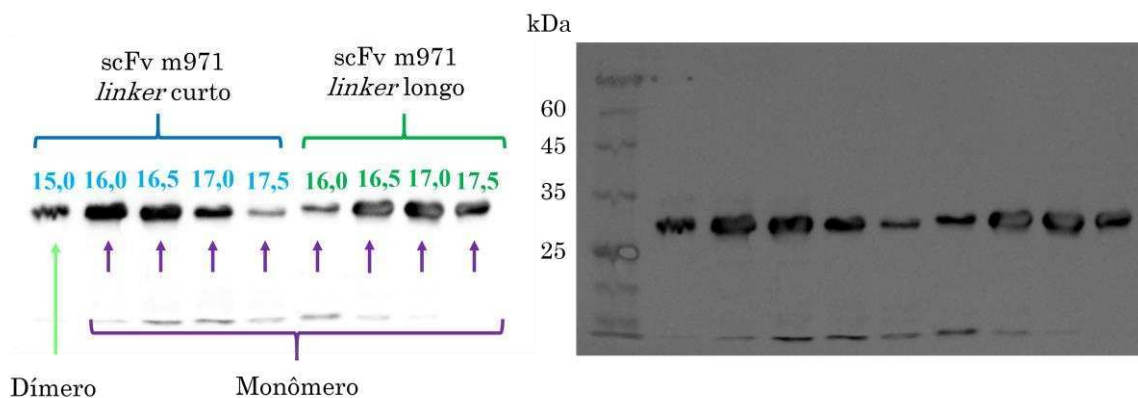
Figura 20 — Perfil da SEC analítica do scFv com *linker* longo na coluna Superdex 200 Increase 10/300 GL.



Fonte: a autora. Em A) tem-se a separação cromatográfica de 7 proteínas padrão, as quais estão na tabela em B), seguido da sobreposição do perfil cromatográfico do scFv com *linker* longo, em verde. Em C) tem-se a curva de calibração. Foi utilizada interpolação quadrática com a função `interp1d` da biblioteca SciPy da linguagem Python para estimativa das curvas a partir dos pontos medidos. As setas coloridas (vermelho, verde e roxo) indicam regiões no gráfico onde se esperaria aparecer picos correspondentes a oligômeros do tipo trímero, dímero ou monômero.

Após visualização em gel de eletroforese, seguido de imunodetecção por *western blotting*, foi possível confirmar que os picos obtidos nas SEC analíticas são referentes aos scFvs estudados (Figura 21).

Figura 21 — Visualização de bandas referentes aos scFvs coletados nos picos cromatográficos das SEC analíticas.



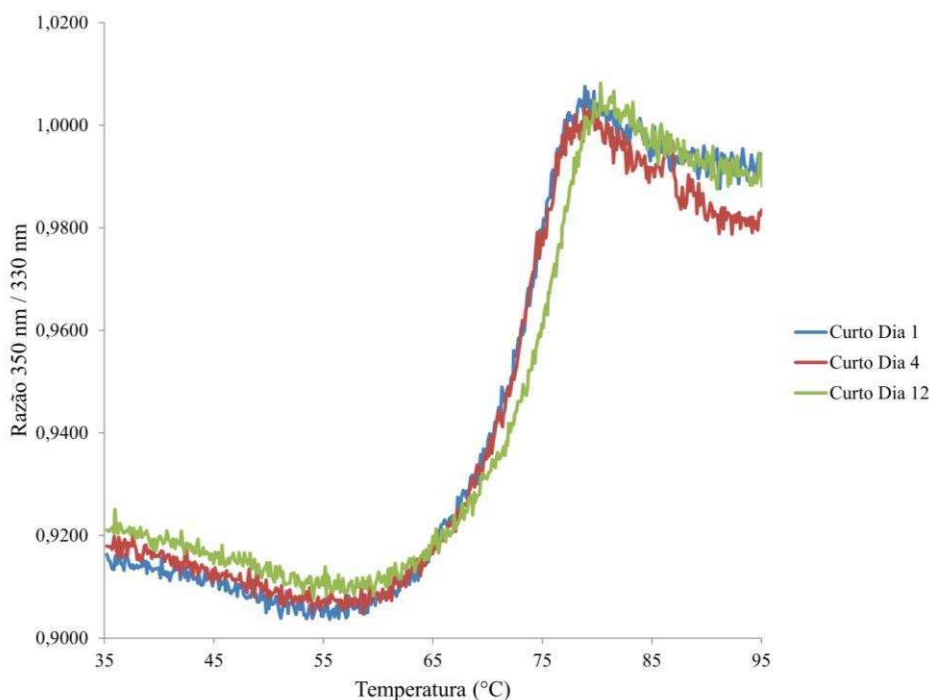
Fonte: a autora. A variável “15,0” corresponde ao pico na SEC analítica do scFv com *linker* curto que se comporta como dímero; de “16,0” a “17,5”, são as frações correspondentes ao scFv com *linker* curto se comportando como monômero. De “16,0” a “17,5”, tem-se o scFv com *linker* longo.

6.4 Avaliação de estabilidade conformacional dos scFvs

Por meio da fluorescência de resíduos de triptofano, explorando a autofluorescência intrínseca do aminoácido triptofano presente nas proteínas, pode-se detectar alterações no perfil de mudança estrutural dependente da temperatura, a nível molecular. A autofluorescência é sensível a mudanças no ambiente químico e estrutural da molécula e pode fornecer informações sobre mudanças conformacionais nas proteínas e interações moleculares. A principal forma de análise dessa fluorescência é a razão entre as emissões a 350 nm e a 330 nm, comumente usada para detectar alterações no ambiente local dos resíduos de triptofano, o que indica a mudança de espectro no perfil de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano (Trp).

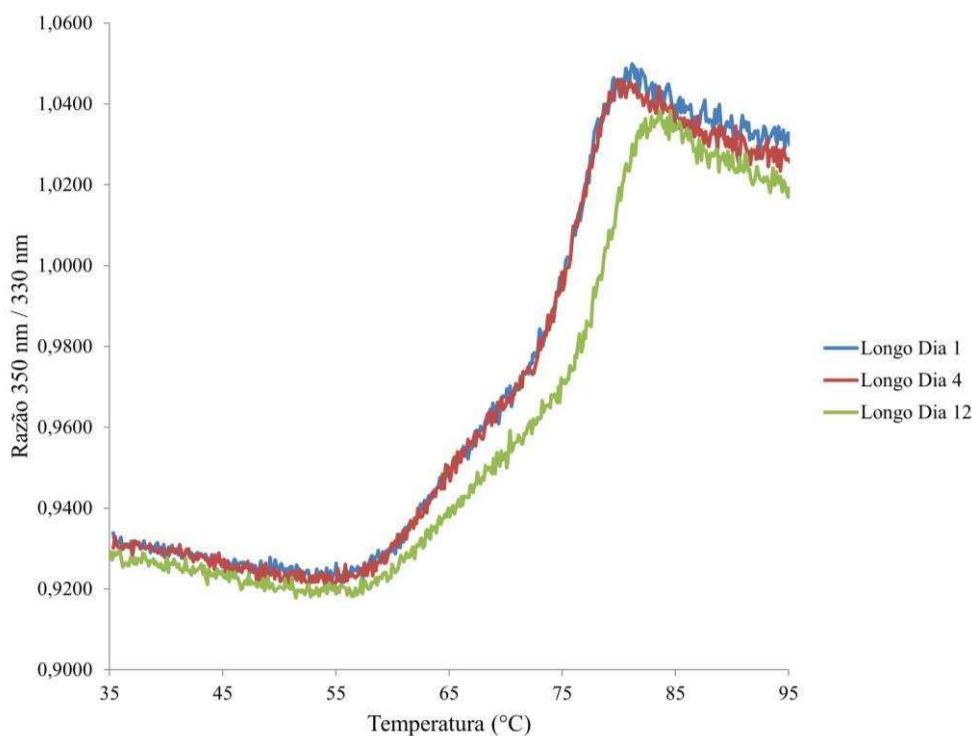
A análise da razão 350 nm/330 nm bruta, como mostrado nas figuras 22 e 23, revela perfis relativamente semelhantes para os scFvs com o passar de 12 dias de estocagem a 4 °C, indicando que as moléculas se mantiveram íntegras estruturalmente.

Figura 22 — Perfis de razão de fluorescência a 350 nm e 330 nm do scFv com *linker* curto sem SUMO no decorrer de 12 dias de estocagem a 4 °C.



Fonte: a autora. Gráfico mostrando como a razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura na amostra de scFv com *linker* curto no decorrer de 12 dias de estocagem a 4 °C. Dados obtidos no Tycho® NT.6.

Figura 23 — Perfis de razão de fluorescência a 350 nm e 330 nm do scFv com *linker* longo sem SUMO no decorrer de 12 dias de estocagem a 4 °C.



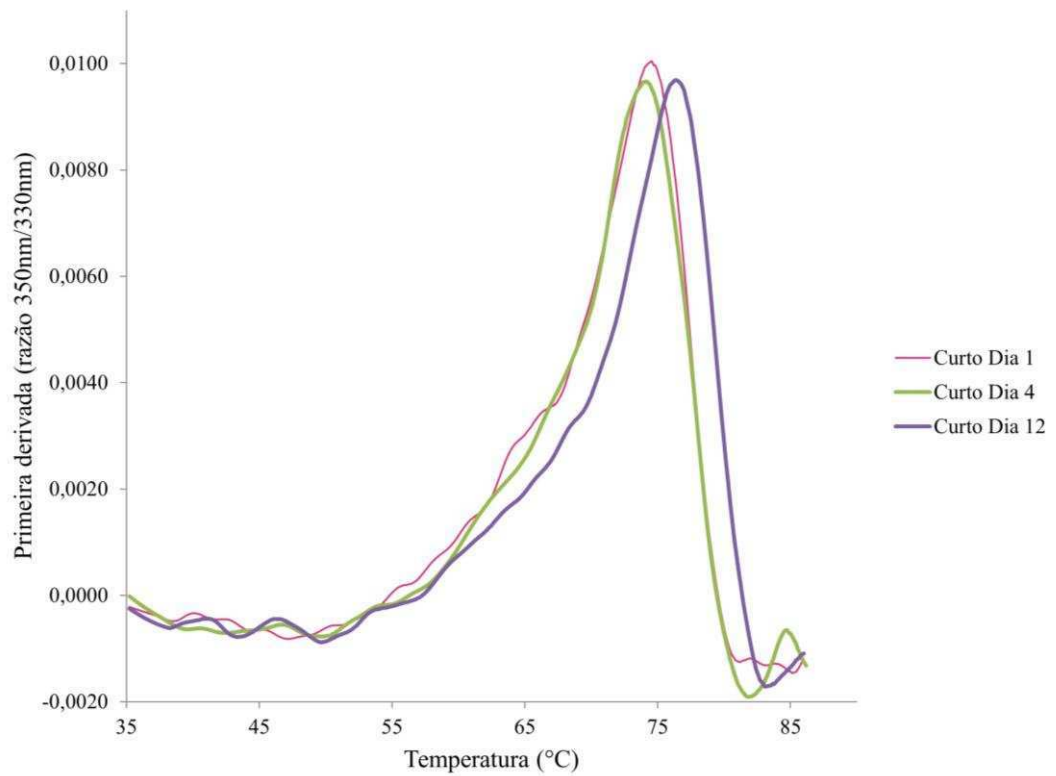
Fonte: a autora. Gráfico mostrando como a razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura na amostra de scFv com *linker* longo no decorrer de 12 dias de estocagem a 4 °C. Dados obtidos no Tycho® NT.6.

Além da razão bruta entre as fluorescências nesses comprimentos de onda, a análise da primeira derivada (Figuras 24 e 25) dessa razão revela detalhes que podem não ser facilmente percebidos nos dados brutos, como os pontos de inflexão, que indicam temperaturas onde ocorrem mudanças significativas na conformação tridimensional das proteínas. Esses pontos de inflexão (T_i) são identificados pelos picos nas curvas da primeira derivada e são fornecidos automaticamente pelo equipamento.

A análise forneceu pontos de inflexão que variaram de 74 a 76 °C para o scFv com *linker* curto sem SUMO. De forma semelhante, os pontos de inflexão para o scFv com *linker* longo sem SUMO variaram de 76 a 79 °C. Importante ressaltar que os perfis da razão 350 nm / 330 nm para os scFvs foram diferentes. Para o com *linker* curto, observa-se uma constância até

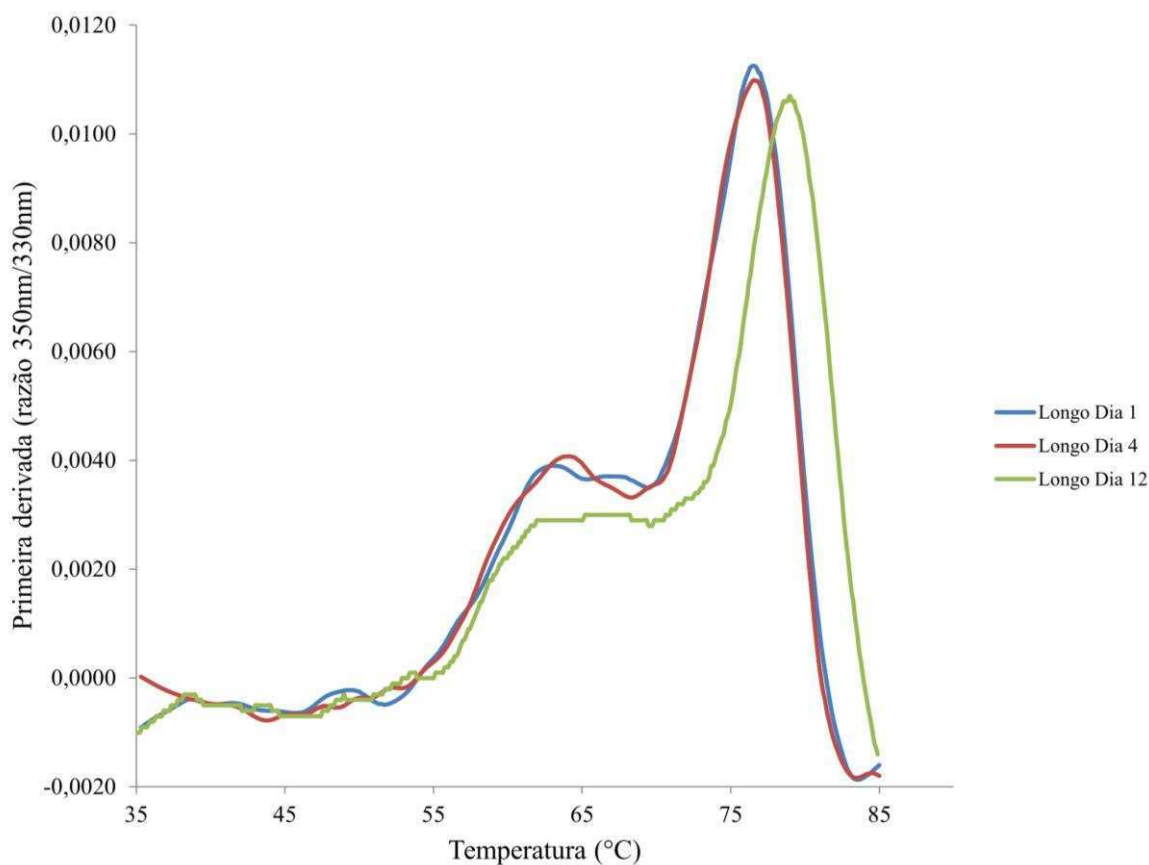
atingir a temperatura de inflexão. Já para o scFv com *linker* longo, nota-se uma desaceleração por volta de 60 °C.

Figura 24 — Primeira derivada da razão 350 nm / 330 nm de fluorescência do scFv com *linker* curto sem SUMO.



Fonte: a autora. Gráfico mostrando como a primeira derivada da razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura na amostra de scFv com *linker* curto com o passar dos dias de estocagem a 4 °C. Dados obtidos no Tycho® NT.6.

Figura 25 — Primeira derivada da razão 350 nm / 330 nm de fluorescência do scFv com *linker* longo sem SUMO.

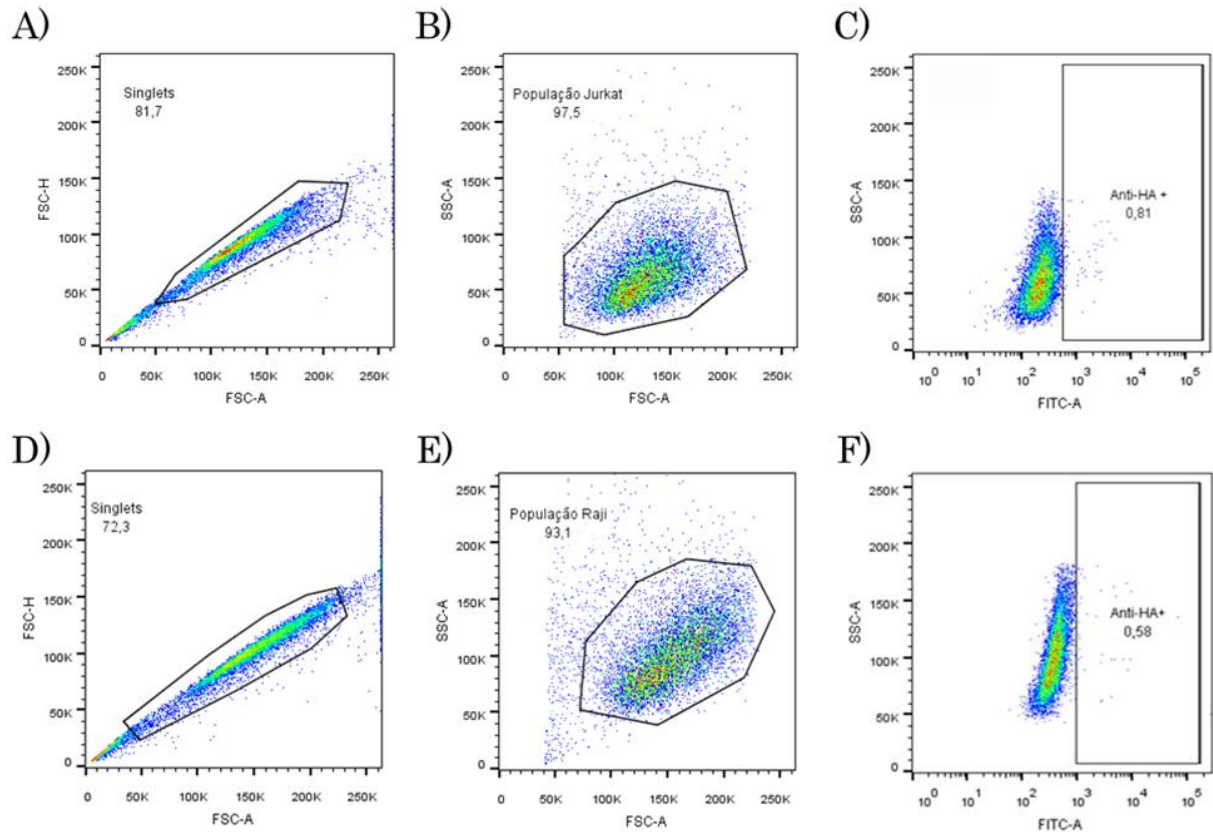


Fonte: a autora. Gráfico mostrando como a primeira derivada da razão entre a fluorescência a 350 nm e a 330 nm se comporta com o aumento de temperatura na amostra de scFv com *linker* longo com o passar dos dias de estocagem a 4 °C. Dados obtidos no Tycho® NT.6.

6.5 Citometria de fluxo dos scFvs com e sem cauda SUMO

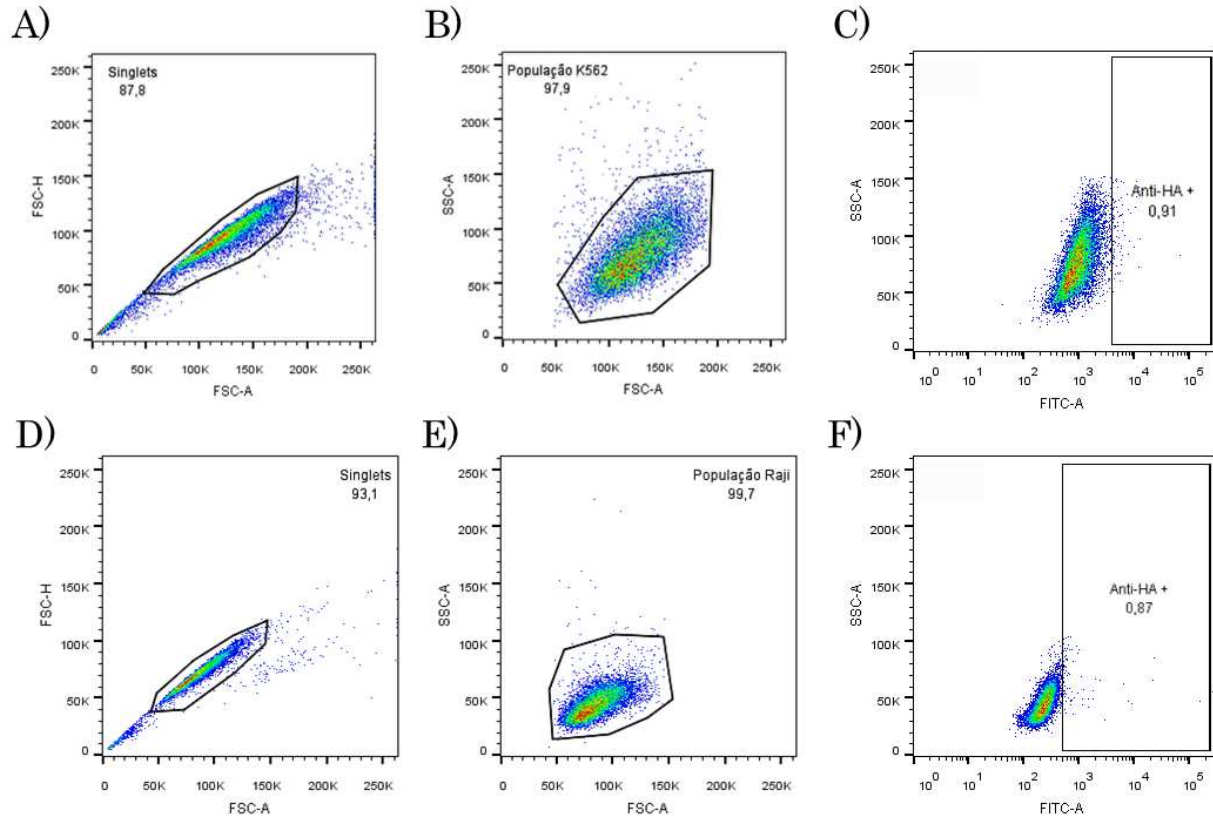
As estratégias utilizadas para selecionar as populações (“gates”) estão demonstradas nas figuras 26, 27, 28 e 29. Essa abordagem foi utilizada para as análises de todos os fragmentos de anticorpo utilizados no experimento. Esse tipo de representação é capaz de delimitar o tamanho (representado pelo eixo 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 26 — Análise de citometria de fluxo de células B, Jurkat e Raji. Representação da estratégia utilizada para selecionar a população de células de linfócitos B em ensaio usando os scFvs com cauda SUMO.



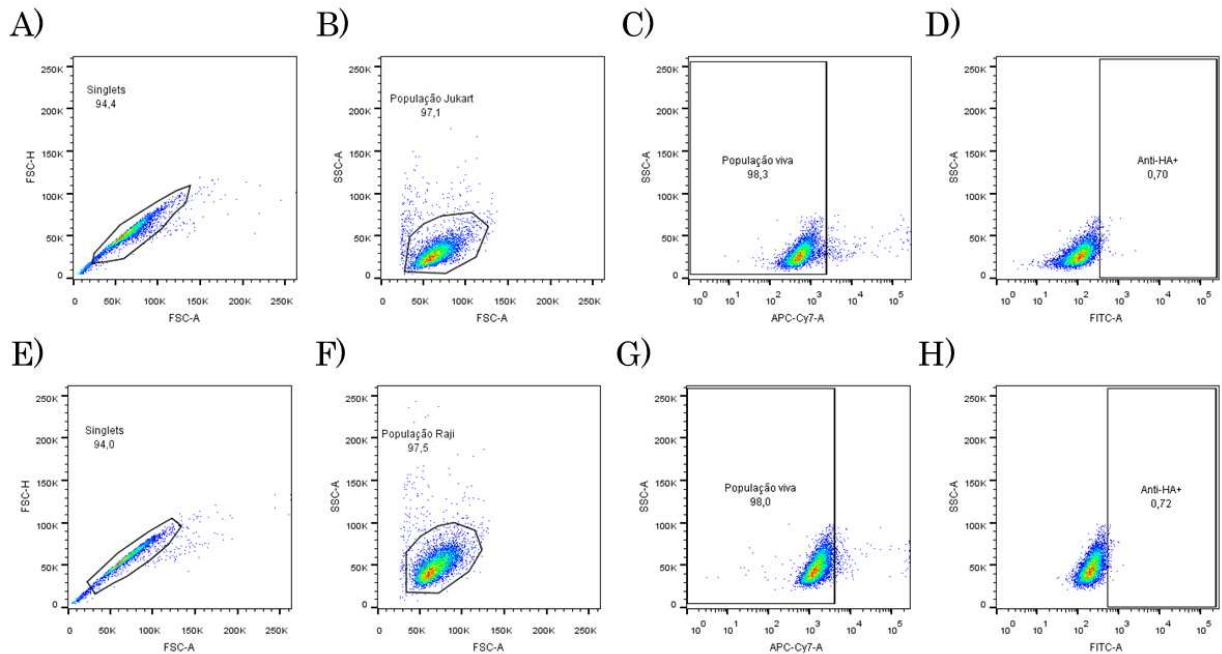
Fonte: a autora. Em A), é mostrado o gráfico de “singlets”, que se refere aos eventos individuais de células Jurkat que passam através do feixe de laser e são detectados pelo equipamento como entidades únicas. Em B), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Jurkat. Em C), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Jurkat. Em D), é mostrado o gráfico de “singlets” para células Raji e, em E), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Raji. Em F), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Raji. Em ambas as estratégias de *gating*, foi considerado o controle de ligação inespecífica (CLI), no qual não há adição de anticorpo primário, mas há adição de anticorpo secundário, anti-HA.

Figura 27 — Análise de citometria de fluxo de células B, K562 e Raji. Representação da estratégia utilizada para selecionar a população de células de linfócitos B em ensaio usando os scFvs sem cauda SUMO.



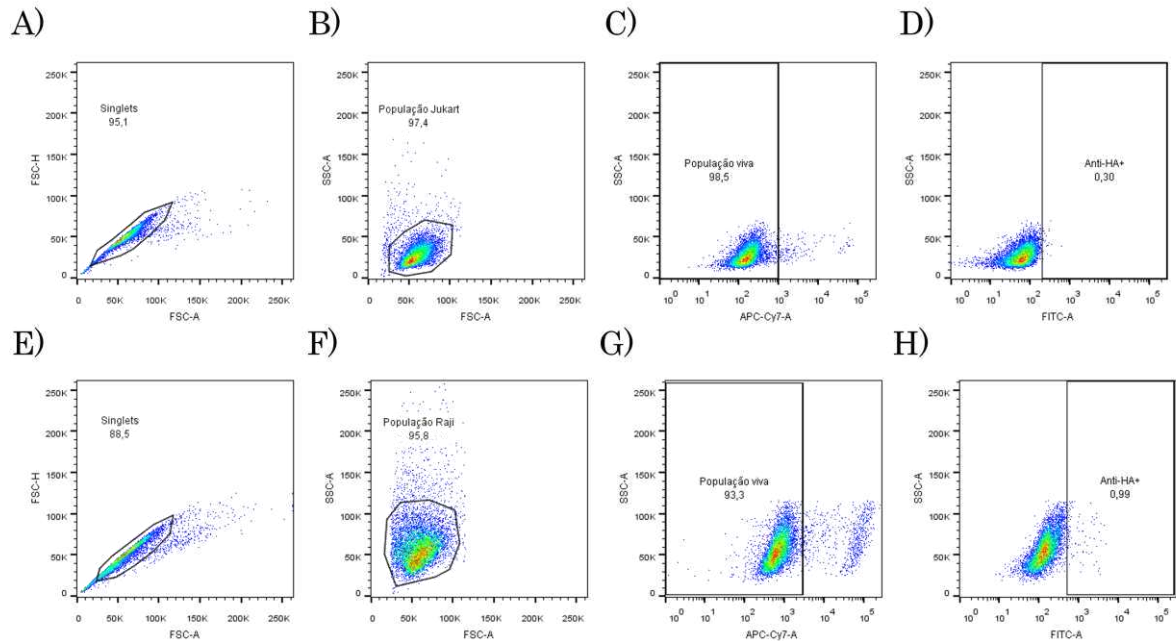
Fonte: a autora. Em A), é mostrado o gráfico de “singlets”, que se refere aos eventos individuais de células K562 que passam através do feixe de laser e são detectados pelo equipamento como entidades únicas. Em B), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular K562. Em C), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células K562. Em D), é mostrado o gráfico de “singlets” para células Raji e, em E), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Raji. Em F), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Raji. Em ambas as estratégias de *gating*, foi considerado o controle de ligação inespecífica (CLI), no qual não há adição de anticorpo primário, mas há adição de anticorpo secundário, anti-HA.

Figura 28 — Análise de citometria de fluxo de células B, Jurkat e Raji. Representação da estratégia utilizada para selecionar a população de células de linfócitos B em ensaio usando os scFvs sem cauda SUMO.



Fonte: a autora. Em A), é mostrado o gráfico de “singlets”, que se refere aos eventos individuais de células Jurkat que passam através do feixe de laser e são detectados pelo equipamento como entidades únicas. Em B), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Jurkat. Em C), tem-se a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo APC-Cy7, relacionado à viabilidade das células Jurkat. Em D), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Jurkat. Em E), é mostrado o gráfico de “singlets” para células Raji e, em F), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Raji. Em G), tem-se a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo APC-Cy7, relacionado à viabilidade das células Raji. Em H), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Raji.

Figura 29 — Análise de citometria de fluxo de células B, Jurkat e Raji. Representação da estratégia utilizada para selecionar a população de células de linfócitos B em ensaio usando os scFvs sem cauda SUMO.

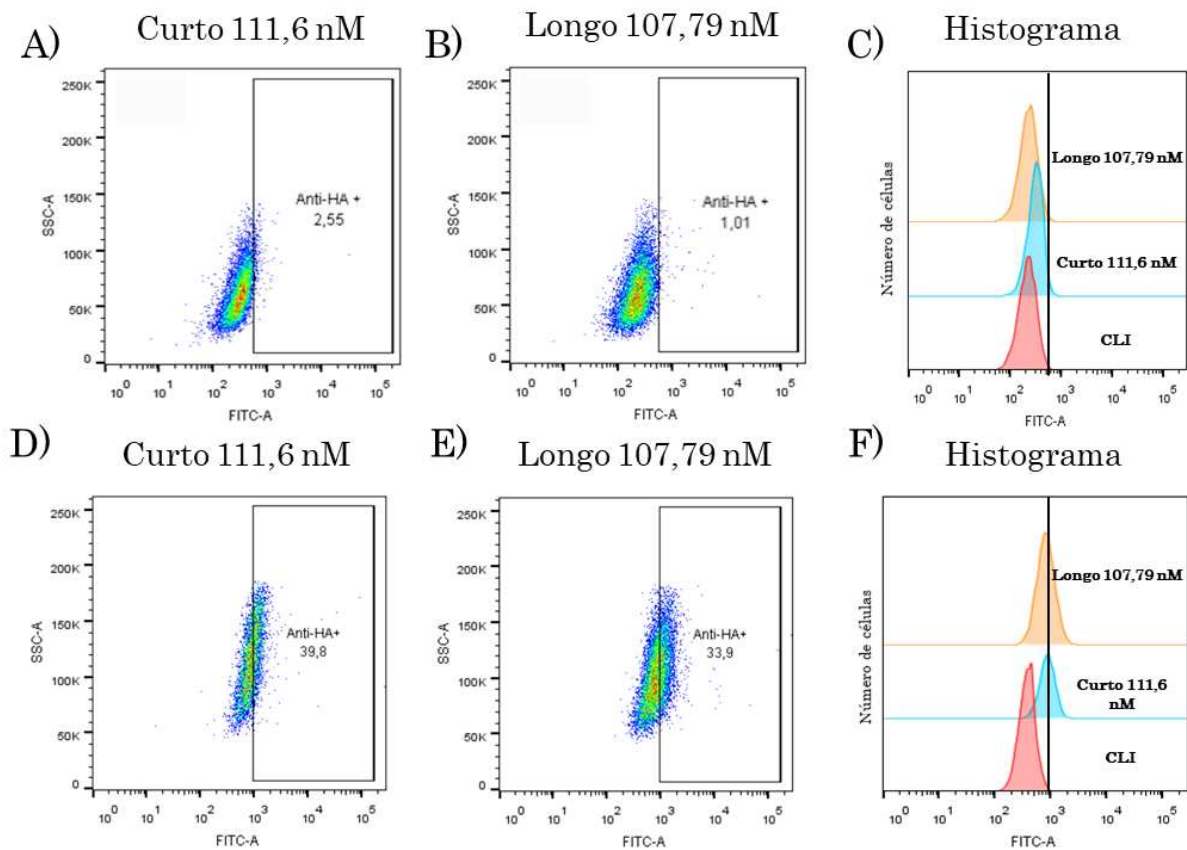


Fonte: a autora. Em A), é mostrado o gráfico de “singlets”, que se refere aos eventos individuais de células Jurkat que passam através do feixe de laser e são detectados pelo equipamento como entidades únicas. Em B), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Jurkat. Em C), tem-se a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo APC-Cy7, relacionado à viabilidade das células Jurkat. Em D), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Jurkat. Em E), é mostrado o gráfico de “singlets” para células Raji e, em F), o gráfico ilustra a delimitação da população de eventos dentro dos “singlets”, correspondente à linhagem celular Raji. Em G), tem-se a intensidade de fluorescência emitida pelo fluoróforo APC-Cy7, relacionado à viabilidade das células Raji. Em H), tem-se a intensidade de fluorescência emitida por moléculas marcadas com o fluoróforo FITC, relacionado à presença ou quantidade do marcador anti-HA ligado às células Raji.

A citometria de fluxo do scFv nativo, derivado de m971 e com cauda SUMO, revelou que há interação entre scFv e CD22 em superfície celular. No caso do scFv *linker* curto, os dados de citometria indicaram superior interação em comparação ao scFv com *linker* longo em células Raji (Figura 30). Por outro lado, nas células Jurkat não foi detectada marcação pelos scFvs, o que era esperado, uma vez que essas células não expressam a proteína CD22 em sua superfície. Adicionalmente, neste ensaio, o anticorpo HIB22, que se liga nos domínios N-terminais do CD22, mais distais da membrana, e é utilizado como controle positivo de interação, ainda não estava disponível.

Os gráficos SSxFITC indicam características de dispersão de luz lateral (SSA - *Side Scatter*) versus a fluorescência detectada no canal FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) (30A, 30B, 30D e 30E). Os gráficos de histograma são uma representação visual da distribuição da intensidade de fluorescência da população de células em relação ao marcador específico. Os gráficos de intensidade de fluorescência do fluorocromo FITC indica interação dos scFvs com a célula Raji (CD22+) e não interação com a célula Jurkat (CD22-) (Figuras 30C e 30F).

Figura 30 — Análise de citometria de fluxo de células Jurkat e Raji em interação dos scFvs com cauda SUMO ao CD22.



Fonte: a autora. A) e B) correspondem à marcação em células Jurkat (CD22-) e C) é um gráfico de histograma de distribuição da fluorescência correspondente à marcação em células Jurkat; D) e E) correspondem à marcação em células Raji (CD22+) e F) é um gráfico de histograma de distribuição da fluorescência correspondente à marcação em células Raji. CLI: controle de ligação inespecífica (sem adição de anticorpo primário e com adição de anticorpo secundário, anti-HA).

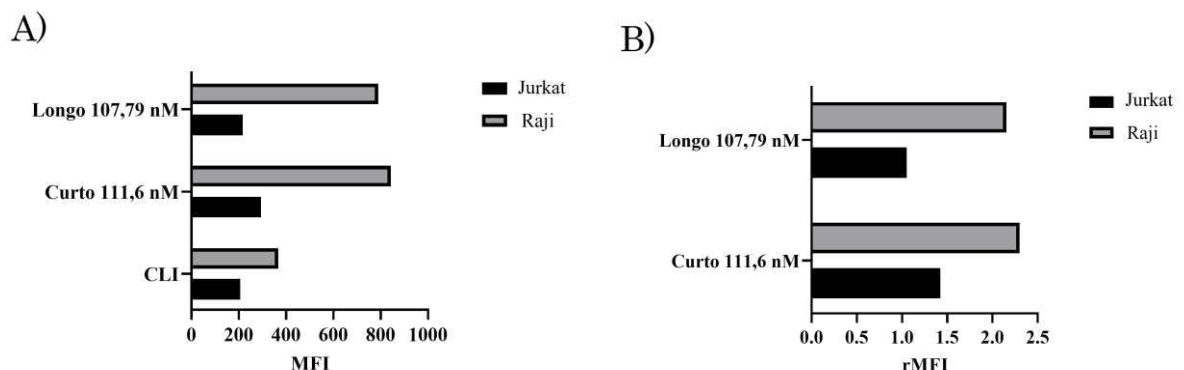
Duas métricas comuns para quantificar a fluorescência em citometria de fluxo e outras técnicas são a média de fluorescência intrínseca (MFI) e a média relativa de fluorescência intrínseca (rMFI). A MFI pode ser representada por três estatísticas: média aritmética, média

geométrica ou mediana. Neste trabalho, foi escolhida a média geométrica para análise dos eventos selecionados, que consiste em um tipo de média que calcula a tendência central de um conjunto de números, especialmente útil quando os valores são multiplicados entre si (De Novo Software, 2023).

A MFI é uma medida em um conjunto de células em uma amostra, representando a fluorescência média por célula. A MFI é uma medida absoluta da intensidade de fluorescência média em uma amostra e é comumente usada para medir a quantidade de moléculas fluorescentes, como anticorpos marcados, ligadas a cada célula. Já a rMFI é a MFI normalizada em relação a um controle, sendo, portanto, uma medida relativa. Dessa forma, o valor da MFI de uma amostra específica é comparado ao valor da MFI de uma amostra de referência. O parâmetro rMFI é usado para comparar a intensidade de fluorescência de diferentes amostras, corrigindo variações experimentais, permitindo avaliar mudanças relativas na expressão ou quantidade de moléculas ligadas. Em resumo, rMFI é útil quando se procura entender a variação relativa entre grupos, enquanto MFI permite uma leitura direta da fluorescência média de uma amostra específica.

Observa-se que MFI para células Jurkat (Figura 31A) manteve-se similar para todas as análises, o que sugere mais uma vez que não houve marcação dessas células pelos scFvs. Já para células Raji (Figura 31A), constata-se que há razoável marcação advinda da interação dos scFvs com SUMO ao antígeno CD22. Isso fica ainda mais evidente no gráfico de MFI relativo (rMFI) (Figura 31B).

Figura 31 — Gráficos de MFI e de rMFI para os scFvs com *linkers* curto e longo, com cauda SUMO, em experimento de citometria com células Jurkat (CD22-) e Raji (CD22+).

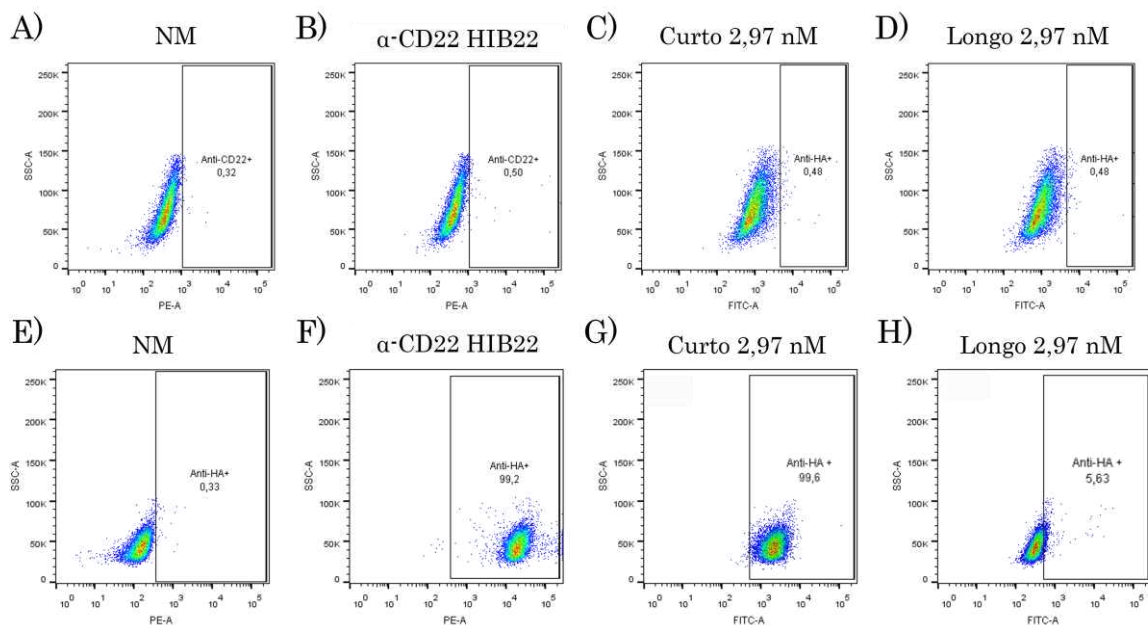


Fonte: a autora. Em A) tem-se o gráfico de MFI de Jurkat (CD22-) e de Raji (CD22+). Em B) tem-se rMFI, em que se usou o CLI como controle para a normalização dos dados.

Ao se remover a cauda SUMO dos scFvs, foi possível constatar uma interação mais eficiente dessas moléculas com o CD22 em superfície celular, sendo uma forte evidência de que a SUMO interfere na ligação molecular dos scFvs ao CD22.

Não foi observada marcação dos scFvs sem cauda SUMO à membrana de células K562 (Figuras 32C e 32D), o que é esperado, já que essas células não expressam o CD22 na sua superfície celular. O gráfico de marcação (Figura 32G e 32H) do scFv com *linker* curto após a clivagem da cauda SUMO, em uma concentração de 2,97 nM, revelou uma ligação de 99,6 % das células Raji. Já o scFv com *linker* longo sem SUMO, na concentração de 2,97 nM, não interagiu atrativamente com as células CD22+. Além disso, nesse ensaio foi utilizado anticorpo HIB22, que serviu de controle positivo de ligação, apresentando 99,2 % de ligação com células Raji.

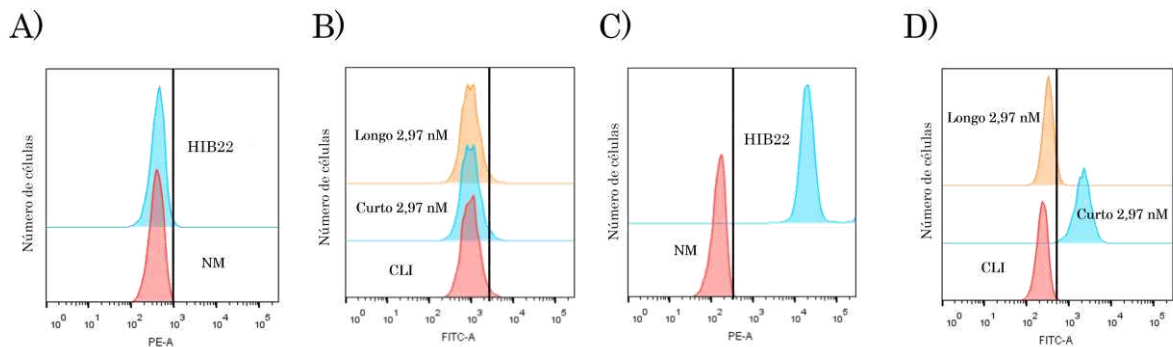
Figura 32 — Análise de citometria de fluxo de células K562 e Raji em interação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22.



Fonte: a autora. A) e B) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células K562 (CD22-); em C) e D) tem-se a marcação de scFv com *linker* curto e com *linker* longo, respectivamente, em células K562; em E) e F) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+); em G) e H) tem-se a marcação de scFv com *linker* curto e com *linker* longo, respectivamente, em células Raji. NM: não-marcado (sem adição de anticorpo primário e sem adição de anticorpo secundário).

As representações visuais na figura 33, por meio de histograma, ilustram de forma resumida os dados que foram apresentados na figura 32.

Figura 33 — Histogramas de marcação dos scFvs sem cauda SUMO, possivelmente ligados ao CD22 em células K562 (CD22-) e Raji (CD22+).

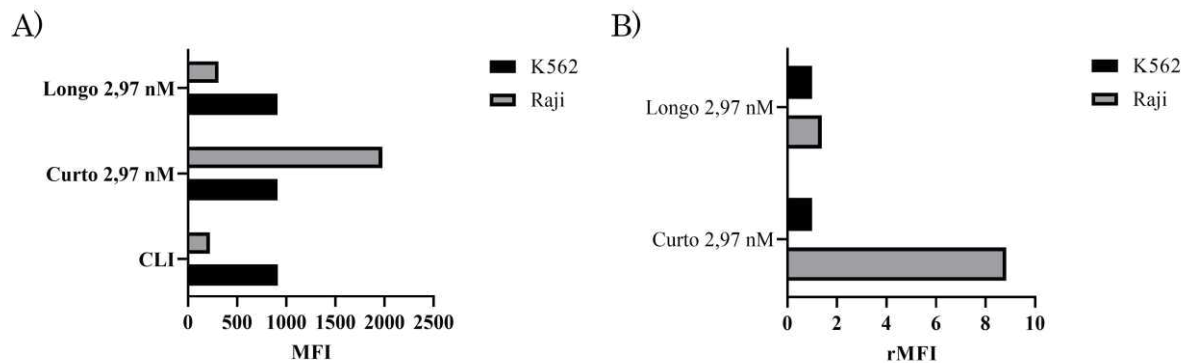


Fonte: a autora. Em A) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células K562 (CD22-) e em B) o histograma de marcação dos scFvs em células K562 (CD22-). Em C) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+) e em D) o histograma de marcação dos scFvs em células Raji (CD22+). CLI: controle de ligação inespecífica (sem adição de anticorpo primário e com adição de anticorpo secundário, anti-HA); NM: não-marcado (sem adição de anticorpo primário e sem adição de anticorpo secundário).

Com relação a MFI para células K562 desse ensaio, observa-se que se manteve similar nas análises (Figura 34A), o que sugere mais uma vez que não houve marcação dessas células pelos scFvs. Já para células Raji (Figura 34A e 34B), constata-se que há marcação advinda da interação atrativa do scFv com *linker* curto, na concentração de 2,97 nM, ao antígeno CD22, e não há marcação pelo scFv com *linker* longo.

Ambas as linhagens celulares, K562 e Jurkat, são utilizadas como controles negativos em ensaios de citometria de fluxo para CD22 devido à ausência de expressão deste marcador, sendo, portanto, funcionalmente intercambiáveis (Casey *et al.*, 2023). Devido à alta autofluorescência das células K562, no entanto, optou-se por utilizar a linhagem Jurkat nos ensaios posteriores.

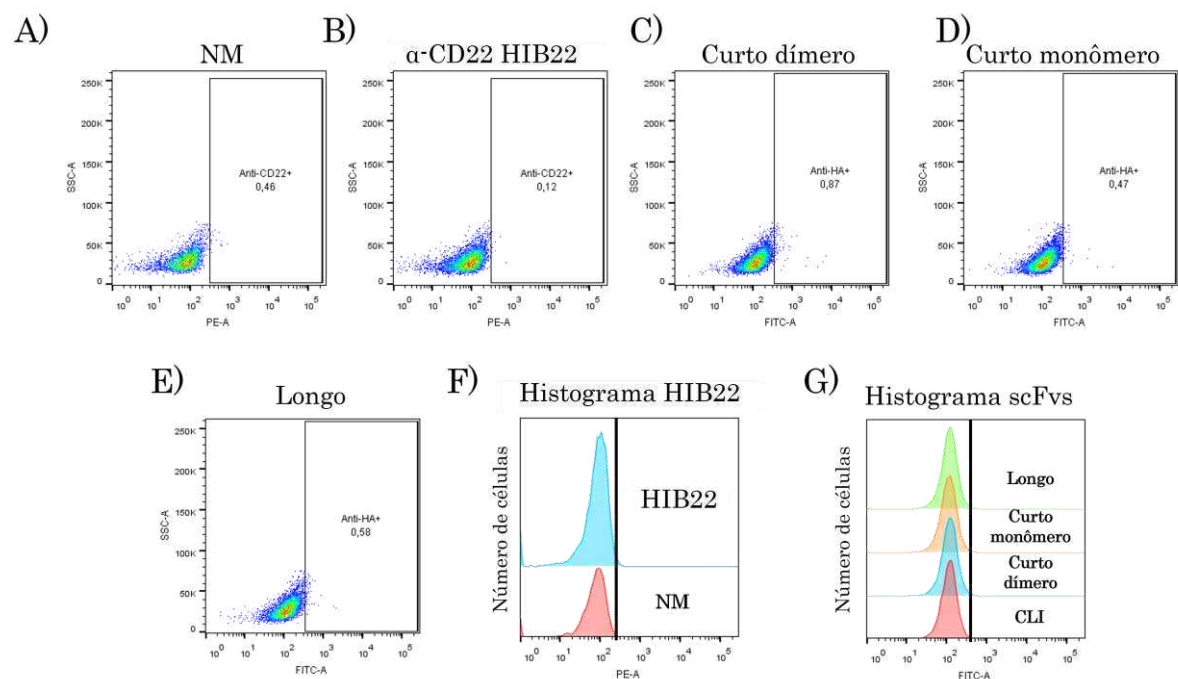
Figura 34 — Gráfico de MFI e de rMFI para os scFvs com *linkers* curto e longo, sem cauda SUMO, em experimento de citometria com células K562 (CD22-) e Raji (CD22+).



Fonte: a autora. Em A) tem-se o gráfico de MFI de K562 (CD22-) e de Raji (CD22+). Em B) tem-se rMFI, em que se usou o CLI como controle para a normalização dos dados.

Buscando analisar o efeito de uma concentração intermediária, de 30 nM, dos scFv sem SUMO na marcação de células em citometria, foi realizado um terceiro ensaio, em quadruplicata (Figuras 35, 36 e 37). Além disso, em complementaridade aos resultados do experimento de cromatografia de exclusão por tamanho analítica, foram avaliados os scFvs com *linker* curto em dois estados de oligomerização, dímero e monômero.

Figura 35 — Análise de citometria de fluxo de células Jurkat em interação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22.

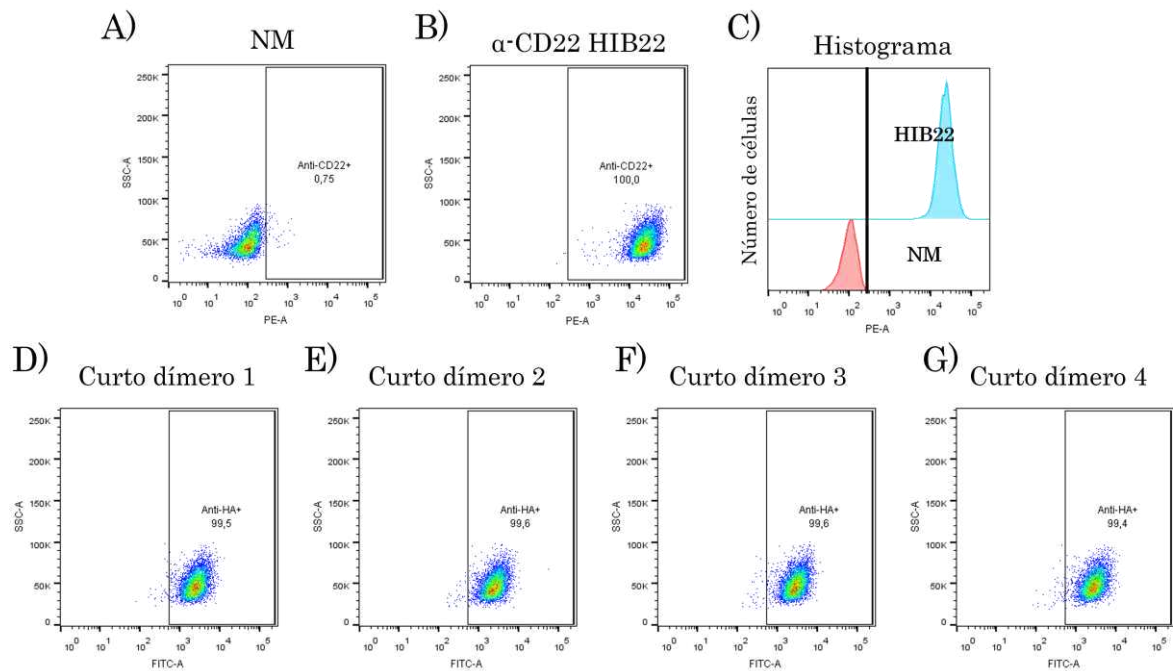


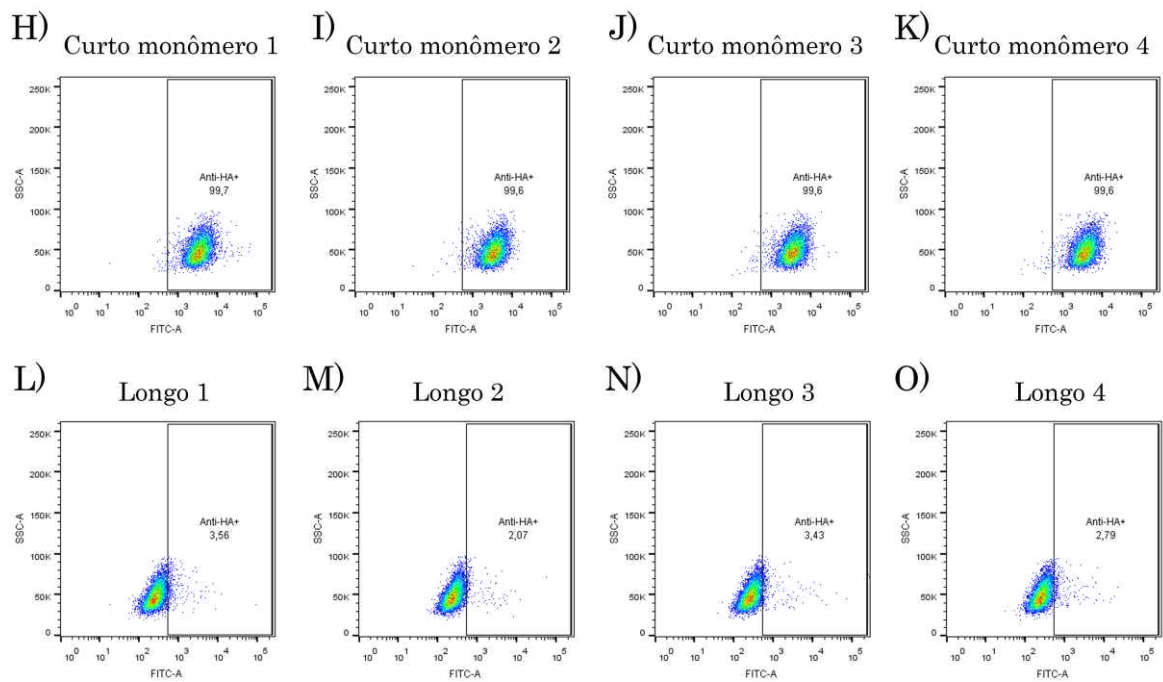
Fonte: a autora. A) e B) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células Jurkat (CD22+); em C), D) e E) tem-se a marcação de scFv com *linker* curto, dímero e

monômero, e com *linker* longo, respectivamente, em células Jurkat; em F) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células Jurkat (CD22-) e em G) o histograma de marcação dos scFvs em células Jurkat (CD22-). CLI: controle de ligação inespecífica (sem adição de anticorpo primário e com adição de anticorpo secundário, anti-HA) e NM: não marcado (sem adição de anticorpo primário e sem adição de anticorpo secundário).

Os dados de citometria apresentados nas figuras 36 e 37 permitem constatar que o scFv com *linker* curto apresenta marcação na concentração de 30 nM, enquanto que para o com *linker* longo não foi observado.

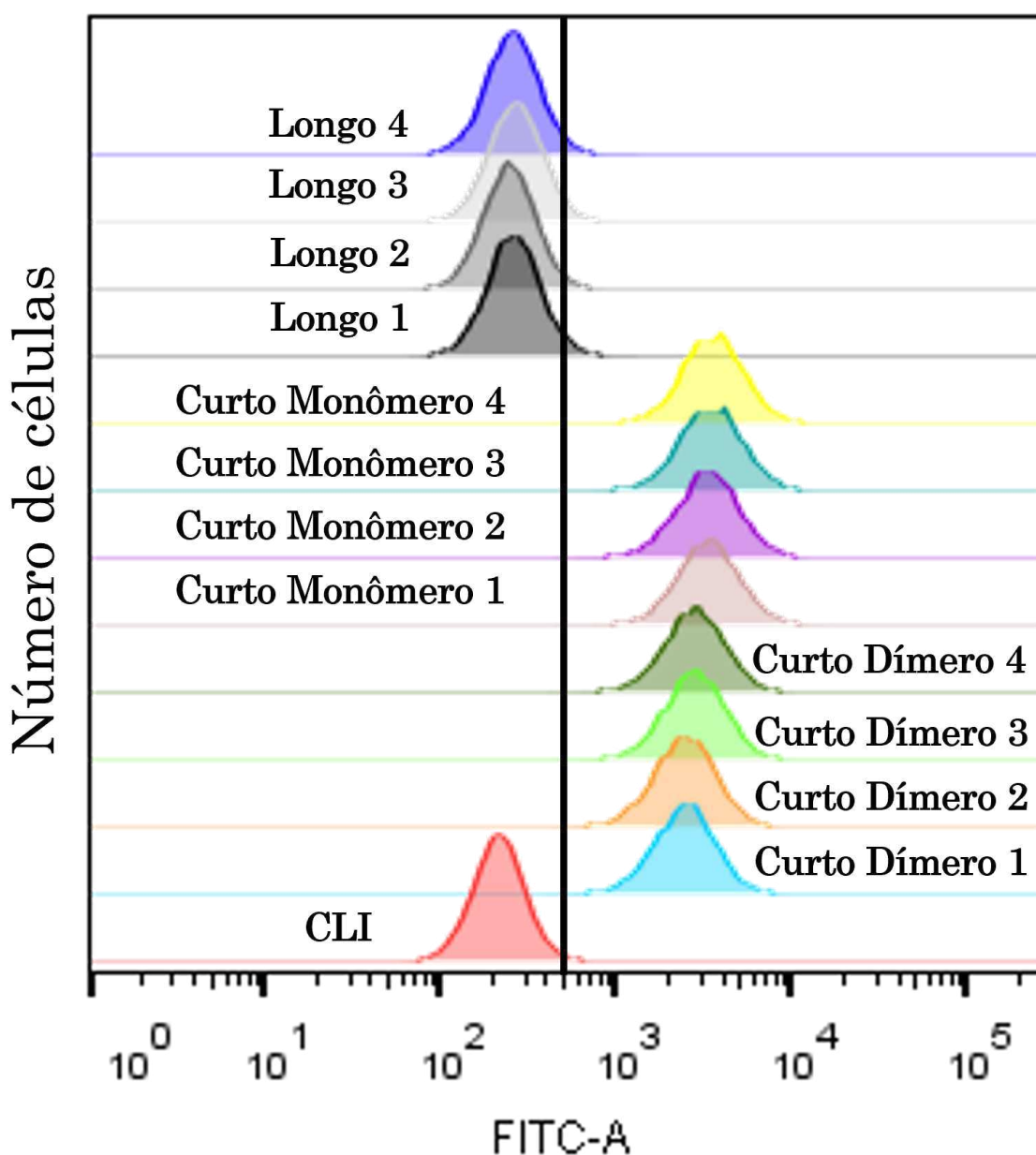
Figura 36 — Análise de citometria de fluxo de células Raji em marcação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22.





Fonte: a autora. A) e B) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+); em C) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+). De D) a G) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* curto no estado oligomérico de dímero em células Raji (CD22+); de H) a K) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* curto no estado oligomérico de monômero em células Raji (CD22+); de L) a O) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* longo em células Raji (CD22+).

Figura 37 — Histograma de marcação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22 expresso na membrana de células Raji.



Fonte: a autora. Eixo X representa a intensidade de fluorescência, que está diretamente relacionada à quantidade de CD22 detectada por cada scFv. Quanto mais à direita o pico estiver, maior a marcação celular. O eixo Y representa a contagem relativa de células que apresentam determinada intensidade de fluorescência. Picos mais altos indicam que a maioria das células tem uma intensidade de fluorescência dentro de um determinado intervalo.

O teste Anova unidirecional mostrou que houve diferença entre as amostras em MFI ($F(3) = 796,087$, $p < 0,001$). Com base no teste post-hoc de Bonferroni, o MFI de marcação do scFv com *linker* curto monômero é significativamente maior que o MFI do CLI ($p < 0,001$), que o MFI do scFv com *linker* longo ($p < 0,001$) e que o MFI do scFv com *linker* curto dímero

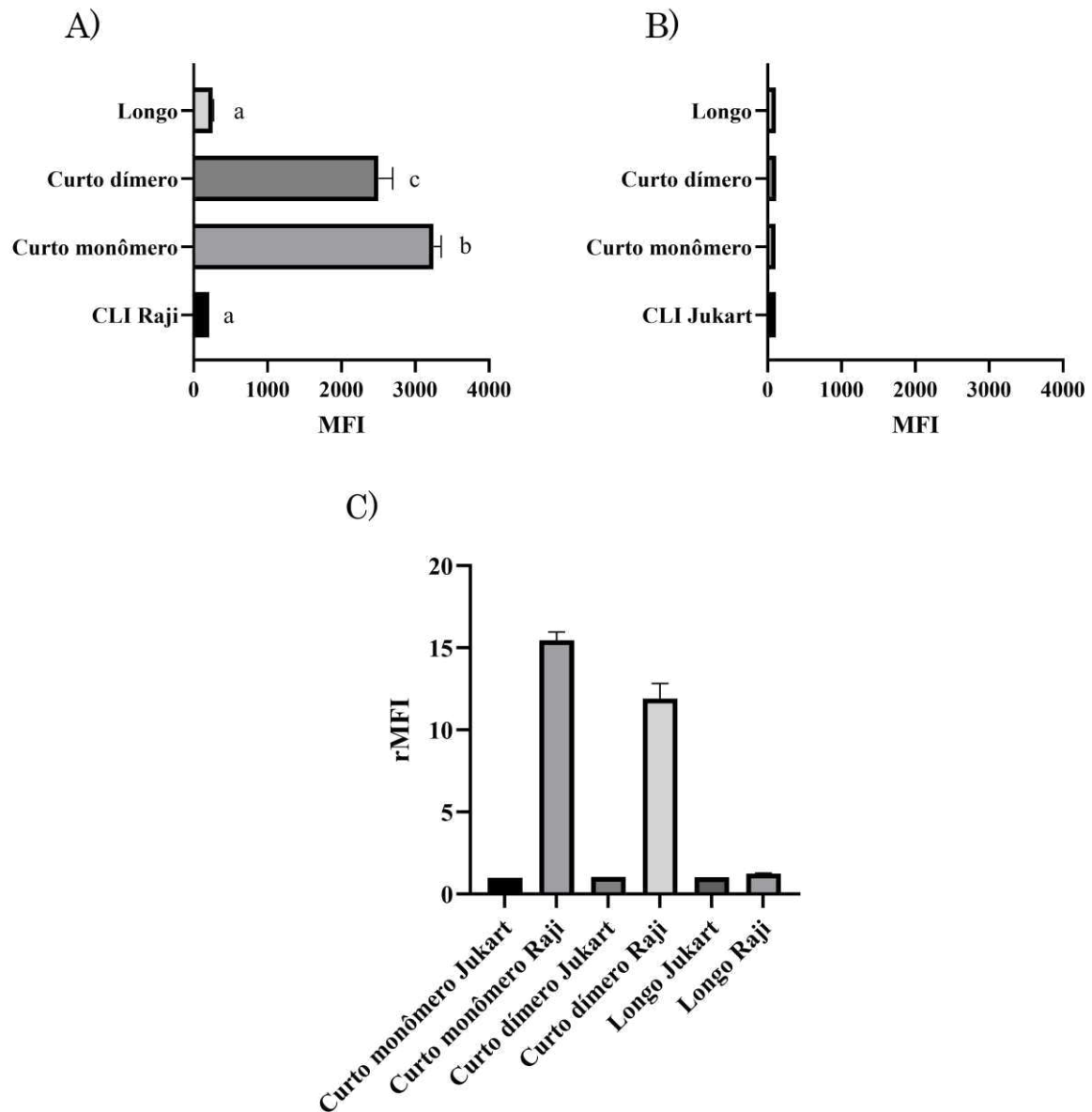
($p < 0,001$). O MFI do scFv com *linker* longo não é significativamente diferente do MFI do CLI ($p = 1,000$), mas é significativamente diferente do MFI do scFv com *linker* curto dímero ($p < 0,001$). Assim, os valores de MFI e rMFI (Tabela 1 e Figura 38) permitem confirmar que o scFv com *linker* longo não apresenta marcação na concentração de 30 nM analisada nesse ensaio, enquanto o scFv com *linker* curto apresenta. Adicionalmente, o scFv com *linker* curto dimérico parece apresentar uma redução sutil na ligação ao CD22 se comparado ao monômero, uma vez que há visível diferença na MFI dos scFvs (Tabela 1 e Figura 38A).

Tabela 1 — Valores de MFI de marcação, em células Raji e Jurkat, para os scFvs testados na concentração de 30 nM.

Linhagem	Amostra	MFI
Raji	CLI	210
	scFv <i>linker</i> curto monômero	3.247 ± 104
	scFv <i>linker</i> curto dímero	2.500 ± 194
	scFv <i>linker</i> longo	259 ± 9
Jurkat	CLI	110
	scFv <i>linker</i> curto monômero	107
	scFv <i>linker</i> curto dímero	114
	scFv <i>linker</i> longo	112

Fonte: a autora. São apresentados valores médios, seguidos de desvio padrão, para os scFvs com *linker* curto monômero e dímero e para o scFv com *linker* longo.

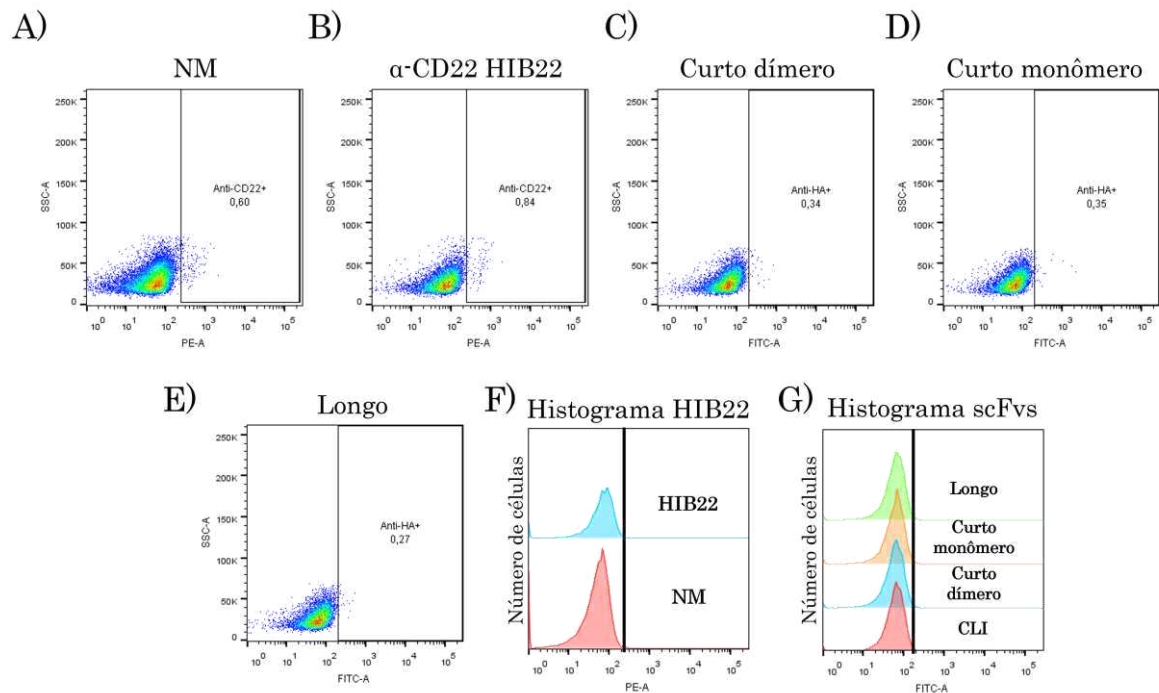
Figura 38 — Gráficos de MFI e rMFI dos scFvs sem cauda SUMO na membrana de células Raji (CD22+) e Jurkat (CD22-).



Fonte: a autora. A) corresponde ao gráfico de MFI para Raji; B) corresponde ao gráfico de MFI para Jurkat e C) corresponde ao gráfico de rMFI para Jurkat e Raji.

A fim de investigar o efeito de uma concentração maior, de 300 nM, dos scFvs na marcação de células em citometria, foi realizado mais um ensaio (Figuras 39, 40 e 41), em quadruplicata, o qual também trouxe informações complementares para a técnica de interferometria de biocamada.

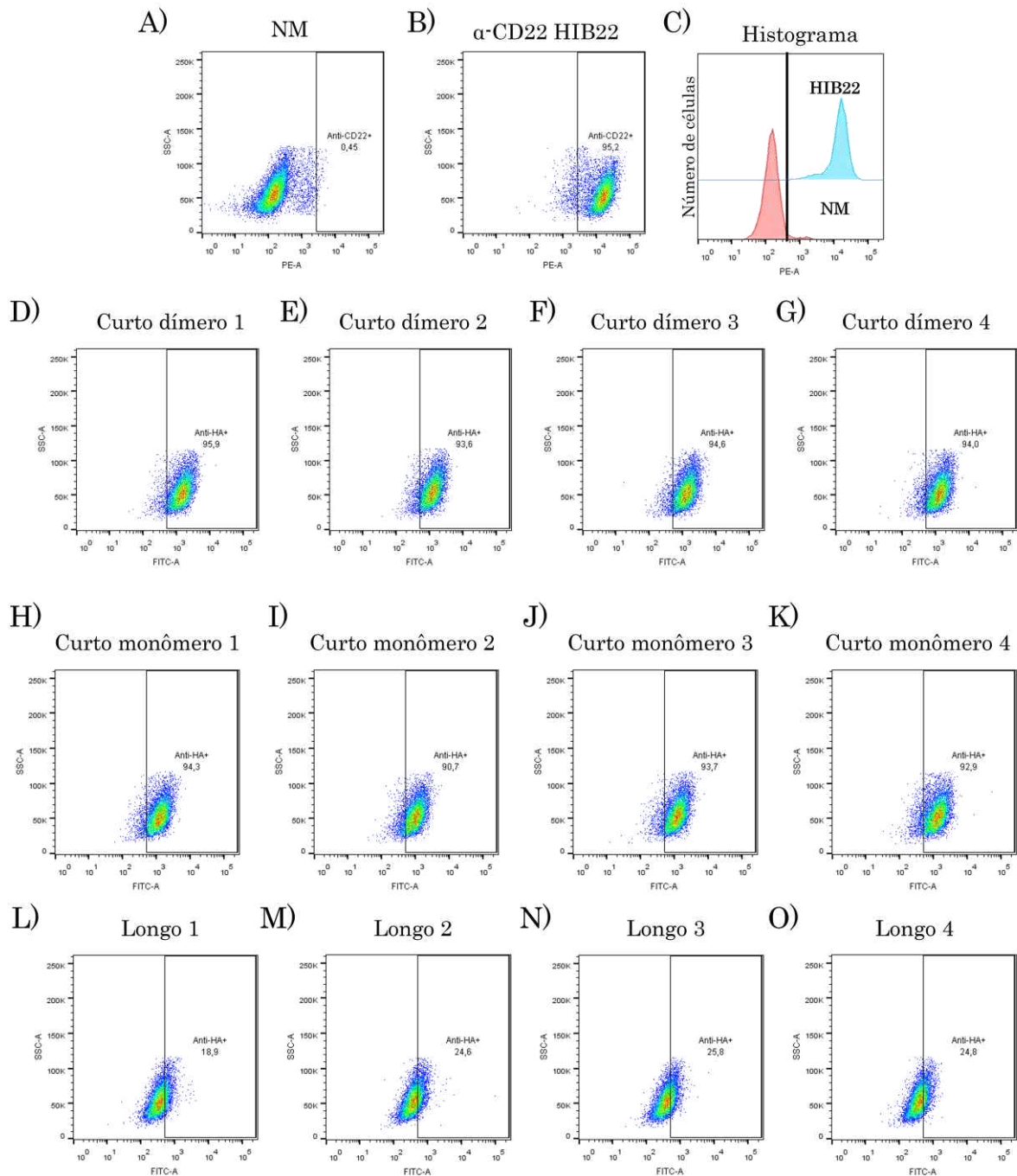
Figura 39 — Análise de citometria de fluxo de células Jurkat em interação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22.



Fonte: a autora. A) e B) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células Jurkat (CD22-); em C), D) e E) tem-se a marcação de scFv com *linker* curto, dímero e monômero, e com *linker* longo, respectivamente, em células Jurkat; em F) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células Jurkat (CD22-) e em G) o histograma de marcação dos scFvs em células Jurkat (CD22-). CLI: controle de ligação inespecífica (sem adição de anticorpo primário e com adição de anticorpo secundário, anti-HA) e NM: não marcado (sem adição de anticorpo primário e sem adição de anticorpo secundário).

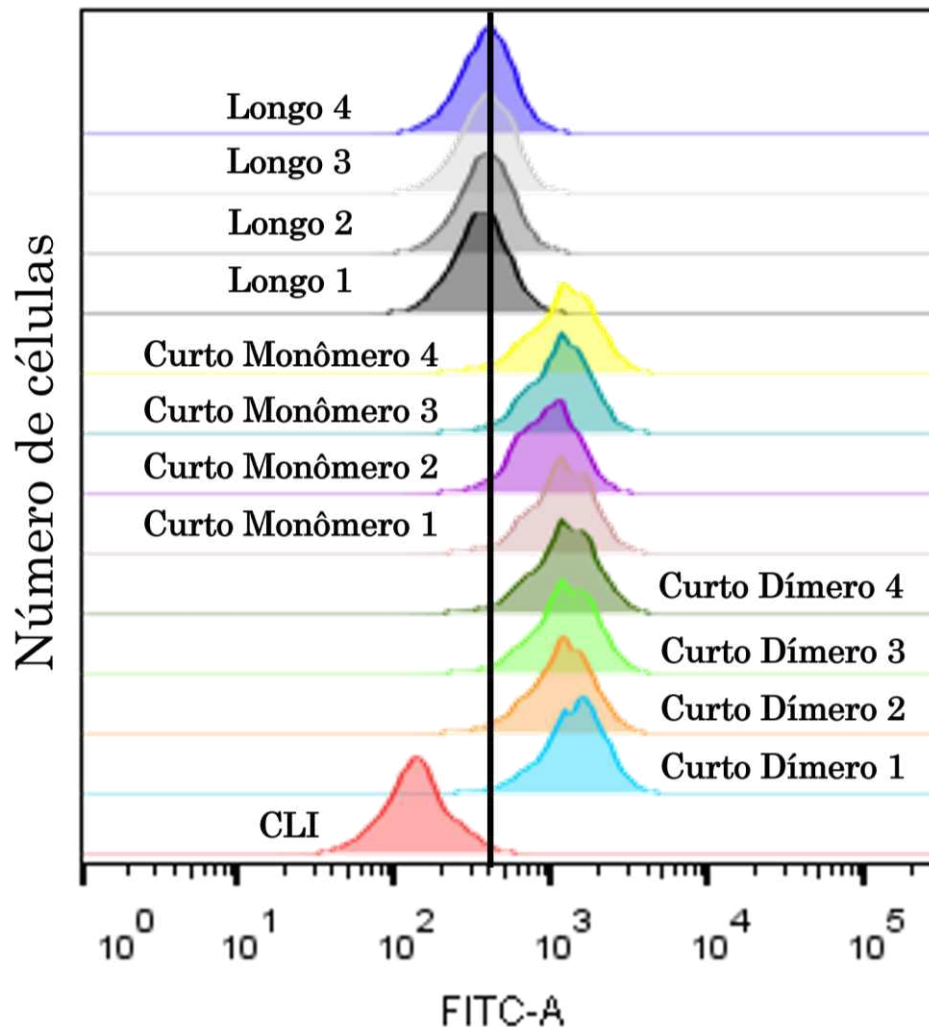
A partir dos resultados (Figuras 40 e 41), constatou-se que o scFv com *linker* longo só apresentou marcação na concentração por volta de 300 nM, enquanto o scFv com *linker* curto já apresentava marcação em concentrações a partir de 3 nM.

Figura 40 — Análise de citometria de fluxo de células Raji em marcação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22.



Fonte: a autora. A) e B) correspondem, respectivamente, às células não marcadas (NM) para o canal PE-A e HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+); em C) tem-se o gráfico de histograma de marcação do HIB22 anti-CD22 em células Raji (CD22+). De D) a G) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* curto no estado oligomérico de dímero em células Raji (CD22+); de H) a K) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* curto no estado oligomérico de monômero em células Raji (CD22+); de L) a O) corresponde à quadruplicata da marcação do scFv com *linker* longo em células Raji (CD22+).

Figura 41 — Histograma de marcação dos scFvs sem cauda SUMO ao CD22 expresso na membrana de células Raji.



Fonte: a autora. Eixo X representa a intensidade de fluorescência, que está diretamente relacionada à quantidade de CD22 detectada por cada scFv. Quanto mais à direita o pico estiver, maior a marcação celular. O eixo Y representa a contagem relativa de células que apresentam determinada intensidade de fluorescência. Picos mais altos indicam que a maioria das células tem uma intensidade de fluorescência dentro de um determinado intervalo.

Observa-se que MFI para células Jurkat (Tabela 2 e Figura 42B) manteve-se similar para todas as análises, o que sugere mais uma vez que não houve marcação dessas células pelos scFvs. Já para células Raji (Tabela 2 Figura 42A), constata-se que há considerável marcação advinda da interação dos scFvs ao antígeno CD22. Isso fica ainda mais evidente no gráfico de MFI relativo (rMFI) (Figura 42C). Além disso, tanto em sua forma monomérica quanto na sua forma dimérica, o scFv com *linker* curto exibiu uma marcação mais robusta com o CD22 na membrana das células Raji em comparação ao scFv com *linker* longo.

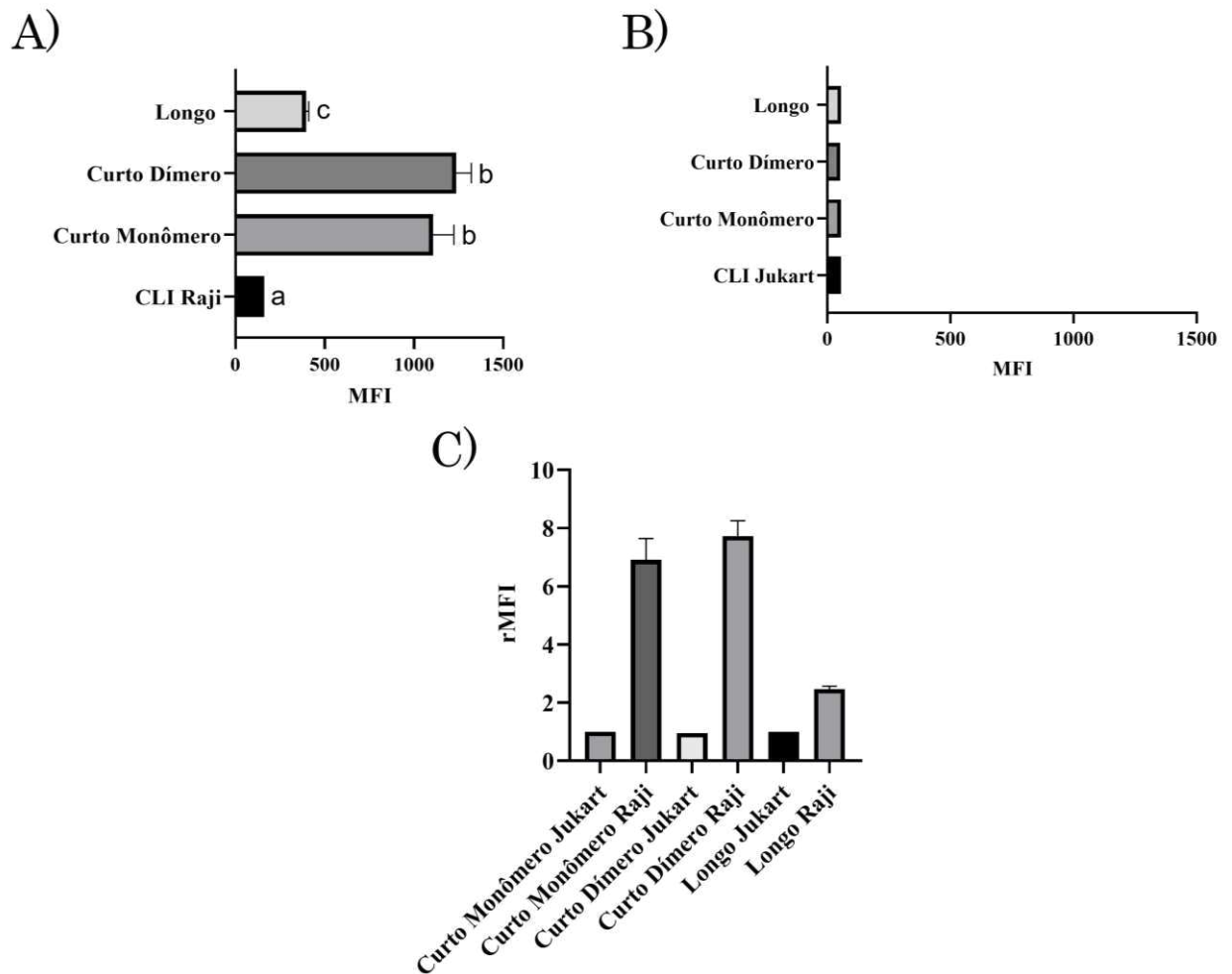
O teste Anova unidirecional mostrou que houve diferença entre as amostras em MFI ($F(3) = 160,472$, $p < 0,001$). Com base no teste post-hoc de Bonferroni, o MFI de marcação do scFv com *linker* curto monômero é significativamente maior do que o MFI do CLI ($p < 0,001$) e do que o MFI do scFv com *linker* longo ($p < 0,001$), mas não é significativamente diferente do MFI do scFv com *linker* curto dímero ($p = 0,224$). O MFI do scFv com *linker* longo é significativamente maior do que o MFI do CLI ($p = 0,038$) e menor do que o MFI do scFv com *linker* curto dímero ($p < 0,001$).

Tabela 2 — Valores de MFI de marcação, em células Raji e Jurkat, para os scFvs testados na concentração de 300 nM.

Linhagem	Amostra	MFI
Raji	CLI	160
	scFv <i>linker</i> curto monômero	1.106 ± 116
	scFv <i>linker</i> curto dímero	1.235 ± 85
	scFv <i>linker</i> longo	396 ± 15
Jurkat	CLI	56
	scFv <i>linker</i> curto monômero	55
	scFv <i>linker</i> curto dímero	53
	scFv <i>linker</i> longo	56

Fonte: a autora. São apresentados valores médios, seguidos de desvio padrão, para os scFvs com *linker* curto monômero e dímero e para o scFv com *linker* longo.

Figura 42 — Gráficos de MFI e rMFI dos scFvs sem cauda SUMO na membrana de células Raji (CD22+) e Jurkat (CD22-).



Fonte: a autora. A) corresponde ao gráfico de MFI para Raji; B) corresponde ao gráfico de MFI para Jurkat e C) corresponde ao gráfico de rMFI para Jurkat e Raji.

6.6 Cinética de interação entre os scFvs e o CD22 por interferometria

A aplicação da técnica de BLI, neste trabalho, permite estudar a tendência de um complexo anticorpo-antígeno se dissociar, quantificando assim a força na interação entre o anticorpo e o antígeno, expressa por meio da constante de dissociação (K_d). Na utilização dessa técnica, é essencial a identificação da melhor relação entre concentrações de scFv (como analito) em relação ao antígeno adsorvido no sensor. É importante conhecer a concentração de anticorpo necessária para ocupar metade dos sítios de ligação do antígeno (Tobias; Kumaraswamy, 2013). Para investigar essa relação, é necessário definir faixas de concentração do scFv (analito) e a concentração mais adequada de CD22 (ligante), juntamente com o tempo de carregamento, de modo a não saturar a superfície do sensor. Em concentrações muito altas, os sítios de ligação

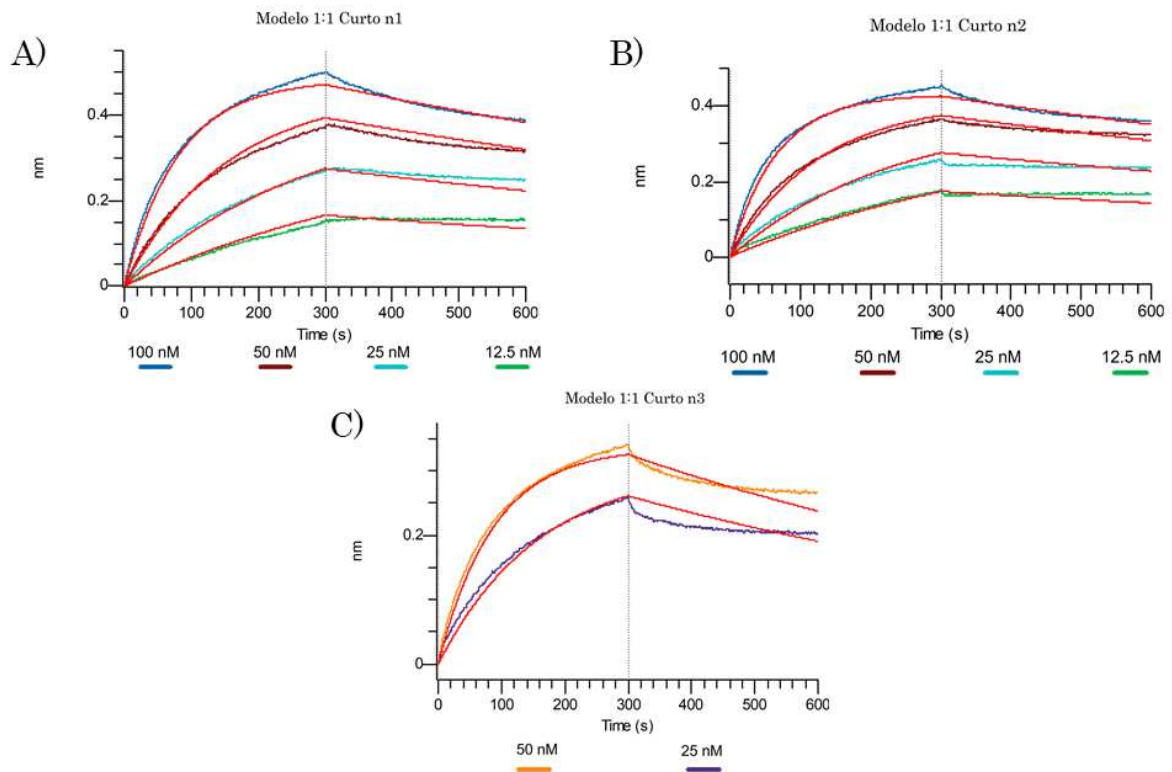
saturam rapidamente, comprometendo a geração do modelo de cinética de interação. Já em concentrações muito baixas, não se atinge a saturação.

Os dados gerados pela técnica de citometria de fluxo indicou as faixas de concentração de scFv que representam eficiência de ligação com o CD22, permitindo escolhas de concentração mais assertivas para as análises por BLI. Nas condições analisadas, a interferometria revelou perfis de associação e dissociação dos scFvs com *linker* curto e longo, conforme pode ser observado nas figuras 43 e 44, bem como a quantificação da cinética de interação fornecendo a constante de afinidade, conforme observado na tabela 3.

Foi possível obter os parâmetros cinéticos para os scFvs, como mostrados na tabela 3. Valores de R^2 maiores que 0,95 indicam boa relação com o modelo de ajuste, indicando uma proporção de 1:1 (uma molécula de scFv para uma de CD22). No caso de X^2 abaixo de 3, indicam que erro experimental é aceitável. Foi observado que para os scFvs com *linker* curto ou longo os experimentos apresentaram dados confiáveis (Tabela 3). Algumas concentrações de scFvs testadas estiveram muito acima ou muito abaixo da faixa de saturação adequada, tendo, portanto, sua cinética removida do modelo.

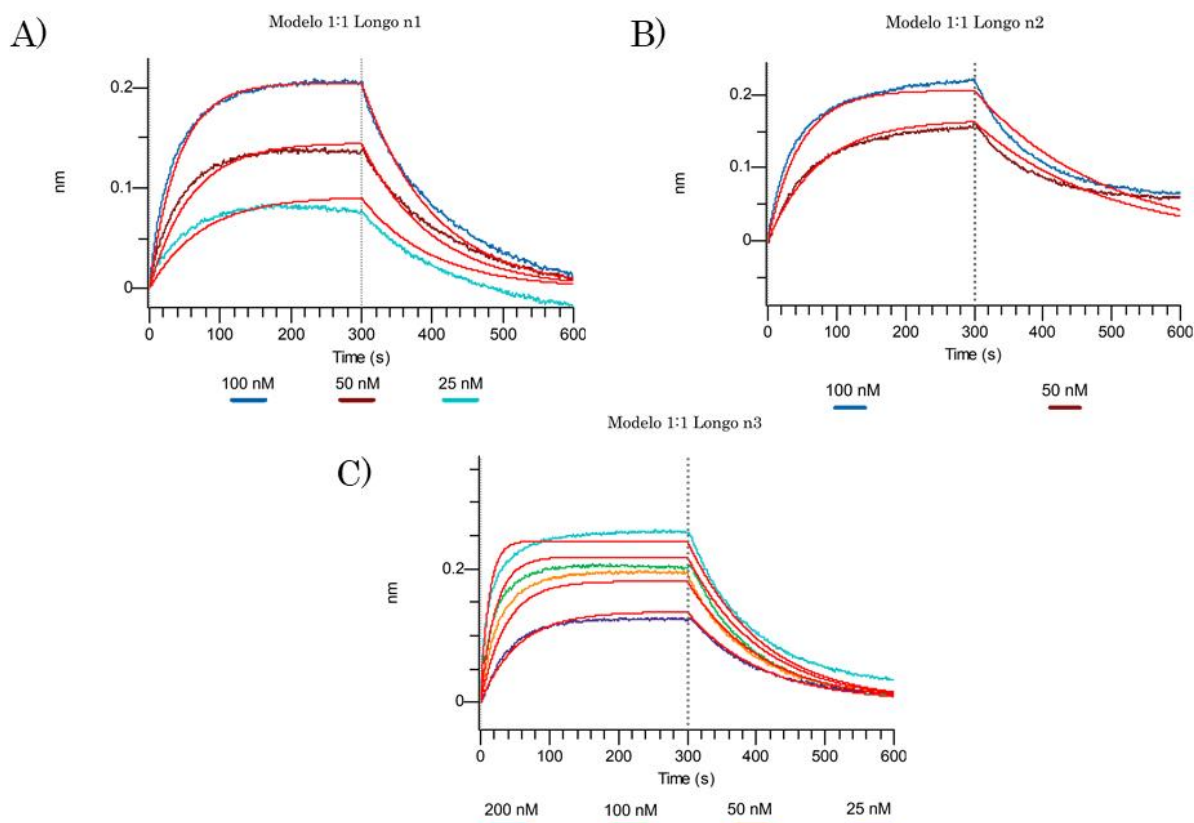
As diferenças observadas entre as interações dos scFvs e o CD22_{d1-d7} imobilizado com C-terminal no sensor revelaram que a faixa de saturação dos sítios de ligação para o scFv com *linker* curto é composta de concentrações menores desse analito, em comparação ao scFv com *linker* longo. Em concentrações até 100 nM, o modelo de ajuste para a ligação do scFv curto sugere estar mais adequado que o scFv longo.

Figura 43 — Sensorgramas de análises de cinética de interação do scFv com *linker* curto.



Fonte: a autora. Os sensorgramas ilustram as etapas de associação e dissociação de cada concentração em que o scFv foi analisado, durante os 600 segundos de análise. No eixo “y”, tem-se o deslocamento de comprimento de onda. No eixo “x”, tem-se o tempo em segundos. Foram feitos três ensaios em datas diferentes, e considerando modelo de ligação 1:1.

Figura 44 — Sensorgramas de análises de cinética de interação do scFv com *linker* longo.



Fonte: a autora. Os sensorgramas ilustram as etapas de associação e dissociação de cada concentração em que o scFv foi analisado, durante os 600 segundos de análise. No eixo “y”, tem-se o deslocamento de comprimento de onda. No eixo “x”, tem-se o tempo em segundos. Foram feitos três ensaios em datas diferentes, e considerando modelo de ligação 1:1.

Tabela 3 — Parâmetros cinéticos obtidos com a técnica de interferometria.

Amostra	K_d (nM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	Modelo	R^2	X^2
scFv curto/CD22	$5,12 \pm 0,71$	$1,57 \times 10^5$	$7,93 \times 10^{-4}$	1:1	0,98	1,38
scFv longo/CD22	$42,10 \pm 22,73$	$2,23 \times 10^5$	$8,14 \times 10^{-3}$	1:1	0,97	0,91

Fonte: a autora. Os valores ilustrados na tabela são provenientes da análise dos dados de cinética a partir do software Octet Analysis Studio 12.2.2. É importante observar 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.

7 DISCUSSÃO

A produção de scFv com *linkers* curto e longo derivados do anticorpo m971 em sistema bacteriano permitiu a análise sobre estabilidade molecular e a funcionalidade de ligação ao CD22. O rendimento de proteína alcançado chegou a 30 mg/L para o scFv com *linker* curto com SUMO e 100 mg/L para o scFv com *linker* longo com SUMO, ambos após dois passos cromatográficos. O scFv com *linker* longo, portanto, apresentou um rendimento 333% maior que o scFv curto. Com a remoção da SUMO, e consequente concentração das amostras pela etapa cromatográfica final, o scFv com *linker* curto apresentou rendimento de 88 mg/L e o scFv com *linker* longo um rendimento de 416 mg/L, o que corresponde a quase 473% mais que o scFv curto. Como a presença de aminoácidos hidrofílicos na região flexível da cadeia polipeptídica (*linker*) pode aumentar a solubilidade do scFv durante a expressão heteróloga (Shen *et al.*, 2008), isso pode explicar os maiores rendimentos proteicos observados para o scFv com *linker* longo.

Com relação à estabilidade molecular, o estudo de estabilidade conformacional mostrou que os scFvs, sem cauda SUMO, permaneceram estáveis, com temperaturas de inflexão variando de 74 a 79 °C, sugerindo grande estabilidade térmica das proteínas. Quando o resíduo de Trp está em um ambiente hidrofóbico, no interior da estrutura proteica, a emissão de fluorescência é mais forte em torno de 330 nm. Um valor baixo para a razão 350 nm / 330 nm (próximo de 0,35) indica que a maioria dos resíduos de Trp está em ambiente hidrofóbico, sugerindo que a proteína, no caso os scFvs, está em uma conformação mais compacta, nativa ou bem enovelada (NanoTemper, 2024).

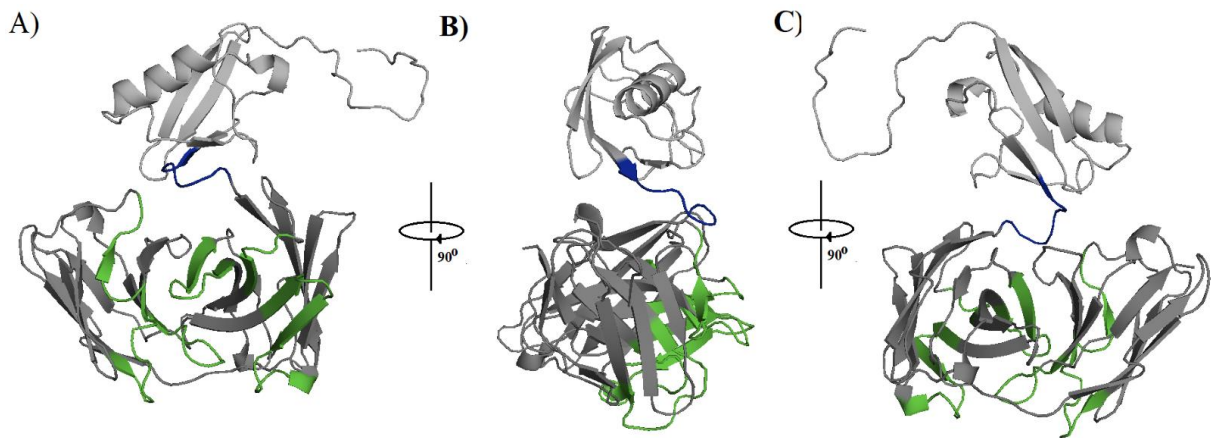
Os perfis da razão 350 nm / 330 nm para os scFvs foram distintos, como visto nas figuras 38 e 39. Para o com *linker* curto, observa-se uma curva com crescimento próximo do exponencial até a um ponto de inflexão, sendo que após essa temperatura há uma mudança brusca na estrutura do scFv. Já para o scFv com *linker* longo, nota-se “ombro” na curva, próximo de 60 °C, o que se pode supor que a molécula apresenta alguma mudança conformacional nessa temperatura, modificando o ambiente dos Trp. O tamanho do *linker* pode estar possibilitando essa flexibilidade na estrutura do scFv com *linker* longo. Isso quer dizer que o scFv com *linker* longo apresentou maior exposição de resíduos de triptofano a 60 °C, o que aumenta o sinal de emissão de fluorescência a 350 nm, sugerindo flexibilidade estrutural. No trabalho de Queiroz, 2024, a partir de simulações de dinâmica molecular (DM), observou-se que os scFvs com *linkers* curto e longo apresentaram diferenças estruturais sutis, que corroboram às diferenças observadas neste trabalho. A DM mostrou que o scFv com *linker*

longo manteve uma estrutura mais flexível que o com *linker* curto, como resultado da longa conexão dos resíduos entre os domínios V_H e V_L. No caso do scFv com *linker* curto, a sequência de GGGGS provocou uma alteração na superfície do scFv que faz interface com o CD22. Além de servirem como guia de estudos experimentais para esses modelos de scFv com *linker* curto e longo, o estudo permitiu identificar aspectos estruturais ligados à função de ligação entre o scFv e o CD22, inferindo mecanismos de estabilização molecular envolvidos na formação de cada um dos complexos.

Com base nos resultados de SEC analítica, foi possível verificar que há formação de uma fração de dímero, de forma secundária, para o scFv com *linker* curto, enquanto o scFv com *linker* longo apresenta-se como monômero. Embora alguns relatos na literatura indiquem que scFvs com *linkers* curtos tendem a formar dímeros (Arndt; Müller; Plückthun, 1998; Kortt *et al.*, 1997; Perisic *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2021), alguns scFvs podem demonstrar um equilíbrio dinâmico dependente da concentração entre monômero e dímero, sendo que, em baixa concentração de proteína (0,5 mg/mL), o pico do dímero é pouco visível, enquanto em 10 mg/mL o pico do dímero é bastante pronunciado (Lüdel *et al.*, 2019), o que pode condizer com os resultados encontrados neste trabalho, em que os scFvs foram testados na concentração de 1 mg/mL.

Com relação à funcionalidade, ensaios que promovem a interação entre o scFv e CD22 revelaram que a presença da cauda SUMO, embora útil para expressão e enovelamento (Butt *et al.*, 2005), prejudicou a ligação scFv-CD22. Devido ao tamanho da SUMO (11,2 kDa) e sua carga (ligeiramente negativa), ela pode causar impedimento estérico das CDRs do scFv ao CD22, principalmente quando ligada ao N-terminal do scFv, como ilustrado na figura 45. A alça de ligação entre SUMO e scFv é longa o bastante para posicionar a SUMO para causar o impedimento estérico de ligação scFv/CD22. A representação mostra que a SUMO está próxima das CDRs em V_H e V_L (Ahmad *et al.*, 2012; Wörn; Plückthun, 2001). Como a cauda SUMO dos scFvs de m971 pode estar muito próxima dessas regiões, especialmente de V_H, que foi observado ser a região de interface de maior contato com CD22, como descrito anteriormente (Ereño-Orbea *et al.*, 2021; Queiroz, 2024), pode atrapalhar o acesso ao antígeno, reduzindo a afinidade do scFv.

Figura 45 — Representação da estrutura do scFv com *linker* curto com a SUMO ligada ao N-terminal de V_H.



Fonte: a autora. Em A), representação estrutural em *cartoon* do scFv (cinza escuro) com as CDRs destacadas (em verde) e a SUMO (em cinza claro) e o *linker* entre SUMO e scFv. A) visão frontal, B) visão lateral rotacionado de 90° e C) visão posterior em referência a A). Elaborado pelo programa Pymol.

Após a remoção da cauda SUMO, os ensaios de citometria de fluxo e BLI demonstraram que o scFv com *linker* curto apresenta maior afinidade em baixas concentrações e interage mais atrativamente com o CD22 do que o scFv com *linker* longo.

Observou-se que o aumento da concentração dos scFvs resultou em uma elevação proporcional do sinal de marcação celular e da MFI (Figuras 32 a 34; 36 a 38; 40 a 42). O scFv com *linker* curto foi capaz de marcar as células de forma eficiente mesmo em concentrações mais baixas, com detecção observável a partir de aproximadamente 3 nM. Essas informações são fundamentais para a investigação das cinéticas de interação dos scFvs com o antígeno CD22 por meio da técnica de BLI. Por outro lado, para o scFv com *linker* longo sem SUMO, foi observada marcação somente em concentrações a partir de 300 nM. Esse resultado indica que o scFv com *linker* longo possui maior dificuldade na ligação ao CD22 em ambiente celular que o scFv com *linker* curto.

As observações encontradas neste trabalho com relação às diferenças de ligação entre os scFvs com *linkers* curto e longo e o CD22 podem ser correlacionadas com estudos anteriores na literatura. É relatada atividade mais promissora em CAR-T anti-CD22 com scFv m971 com *linker* curto, já que, com esse encurtamento do *linker*, há favorecimento da formação de sinapse imune e o agrupamento espontâneo de CARs sem necessidade de estímulo antigênico, promovendo ativação tônica e melhorando a funcionalidade das células CAR-T (Singh *et al.*, 2021). Isso pode estar proporcionando uma interação mais atrativa entre o scFv com *linker* curto e o CD22 do que para o scFv com *linker* longo.

Pelos ensaios de BLI, foi possível inferir a interação dos scFvs e o CD22_{d1-d7}. A faixa de saturação dos sítios de ligação do CD22_{d1-d7} para o scFv com *linker* curto é menor que a do scFv com *linker* longo, o que retrata a maior avidez do scFv com *linker* curto pelo CD22_{d1-d7}. Em concentrações até 100 nM, a curva modelada se ajusta melhor à curva composta por dados experimentais de ligação para o scFv curto, enquanto para o longo são necessárias concentrações maiores de scFv para melhor ajuste entre as curvas. O perfil da curva na fase de associação do scFv com *linker* curto reflete maior intensidade e saturação em menor tempo. Isso indica que mais moléculas de scFv com *linker* curto se ligaram à superfície do sensor se comparadas às moléculas de scFv com *linker* longo, corroborando mais uma vez a ligação mais forte do scFv com *linker* curto com o CD22_{d1-d7}. Além disso, a dissociação do scFv com *linker* curto do CD22_{d1-d7} é dez vezes mais lenta do que a dissociação do scFv com *linker* longo. Essas informações são fortes evidências de que a afinidade do scFv com *linker* curto pelo CD22_{d1-d7} é mais alta que a do scFv com *linker* longo. Essa avidez elevada do scFv curto pode ser crucial para a eficácia das terapias CAR-T. Estudos apontam que um scFv de alta afinidade, como o m971, aumenta a ativação e citotoxicidade das células CAR-T, o que é crucial para um direcionamento eficaz contra células cancerígenas. Modificações estruturais, como ajustes no comprimento do *linker* ou mutações específicas, são estratégias para melhorar a afinidade e a eficácia da terapia CAR-T anti-CD22 (Ereño-Orbea *et al.*, 2021).

O anticorpo m971 já foi estudado quanto à interação com o CD22 mediante algumas técnicas, como está resumido na tabela 4. O K_d da construção Fab de m971, tanto nativo quanto mutantes, foi determinado por meio de BLI. Já os K_d 's das construções scFv com *linker* curto e longo foram determinados por meio de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), uma técnica que difere de BLI, dentre outros motivos, por ter um princípio de detecção diferente, partindo de uma superfície metálica, e não sensor de fibra óptica mergulhado em meio líquido. A construção biespecífica de m971 teve seu K_d determinado mediante citometria de fluxo.

Tabela 4 — Constantes de afinidade (K_d) obtidas para diferentes construções de m971 por meio de diferentes técnicas.

Estrutura	K_d experimental (nM)	Técnica	Referência
Fab m971 e CD22 (nativo)	$24,8 \pm 1,8$	BLI	(Ereño-Orbea <i>et al.</i> , 2021)
Fab m971 e CD22 (mutante Y52A)	$32,9 \pm 3,9$	BLI	(Ereño-Orbea <i>et al.</i> , 2021)
Fab m971 e CD22 (mutante Y52R)	$4,5 \pm 0,0$	BLI	(Ereño-Orbea <i>et al.</i> , 2021)
Fab m971 e CD22	$207 \pm 1,0$	BLI	(Ereño-Orbea <i>et al.</i> , 2021)

(mutante S53A)			
Fab m971 e CD22 (mutante L100Q)	94,3 ± 10	BLI	(Ereño-Orbea <i>et al.</i> , 2021)
scFv curto/CD22	1,67	SPR	(Singh <i>et al.</i> , 2021)
scFv longo/CD22	6,05	SPR	(Singh <i>et al.</i> , 2021)
Anticorpo m971 biespecífico/CD22	1,60	Citometria de Fluxo	(Chen <i>et al.</i> , 2023)
scFv curto/CD22	5,12 ± 0,71	BLI	Este trabalho
scFv longo/CD22	42,1 ± 22,73	BLI	Este trabalho

Fonte: a autora.

Na interação antígeno-anticorpo, dois conceitos definem a força dessa ligação: afinidade e avides. A afinidade refere-se à força de ligação entre um único sítio de ligação de um anticorpo e um único epítipo de um antígeno. É uma medida da força individual dessa interação específica. Quando a afinidade é alta, predominam forças de atração entre as moléculas. Em casos de baixa afinidade, embora haja certa atração, forças de repulsão também atuam, reduzindo a estabilidade da ligação. Avides, por outro lado, é determinada por três fatores: a afinidade de ligação, que descreve a força de interação em um único sítio, a valência, que se refere ao número total de sítios envolvidos e o arranjo estrutural, que trata da estrutura do antígeno e do anticorpo envolvidos. Ela descreve a força total de ligação entre um anticorpo multivalente (com múltiplos sítios de ligação) e um antígeno multivalente (com múltiplos epítipos). Ela considera a soma das interações individuais, resultando em uma ligação mais forte e estável (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

A força de ligação entre um anticorpo e um epítipo específico depende de múltiplas interações químicas fracas, incluindo forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações íon-dipolo. Essas interações são influenciadas pela estrutura terciária do anticorpo e pela disposição espacial de poucos aminoácidos no paratopo. A formação do complexo antígeno-anticorpo ocorre quando o paratopo do anticorpo se aproxima do epítipo, promovendo a expulsão de moléculas de água e fortalecendo a ligação entre ambas as estruturas (Nur *et al.*, 2024; Reverberi, 2007). Em BLI, é observado sinal absoluto gerado, sem haver diferenciação de qual região está gerando tal sinal, ou seja, considera-se o somatório das interações, um valor global de interação. Isso representa a avides da molécula. Esses conceitos ajudam a explicar a alta avides do scFv com *linker* curto em comparação ao scFv com *linker* longo.

8 CONCLUSÃO

A produção dos scFvs recombinantes contendo *linkers* curto e longo se mostrou suficiente para as análises propostas, com rendimentos relevantes, de 88 mg/mL para o scFv com *linker* curto e de 416 mg/mL para o scFv com *linker* longo. A análise por cromatografia de exclusão por tamanho revelou que os scFvs predominam na forma monomérica, com formação secundária de dímeros observada para o scFv com *linker* curto. Os testes de estabilidade conformacional mostraram que os scFvs diferem estruturalmente, com o scFv com *linker* longo apresentando mudança estrutural na temperatura de 60 °C, em razão do comprimento do *linker*. A cauda SUMO na região N-terminal dos scFvs interfere na interação com o CD22, e sua remoção foi necessária para otimizar os ensaios de interação anticorpo-antígeno. Após a expressão e purificação das proteínas, foram realizados ensaios para caracterizar a interação dos scFvs com o CD22 na superfície celular em diferentes concentrações, bem como análises cinéticas utilizando os domínios extracelulares de CD22, d1-d7. Os resultados indicaram que o scFv com *linker* curto possui maior afinidade pelo CD22 do que o scFv com *linker* longo. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão das propriedades estruturais e funcionais desses scFvs, fornecendo uma base sólida para futuros estudos de otimização e aplicação em CARs.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem caminho para novas investigações que aprofundem o conhecimento sobre os scFvs estudados e possibilitem a proposição de mutações para modular sua avidéz. Essa abordagem pode ser fundamental para otimizar a aplicação dos scFvs em terapias CAR-T, tornando-as mais eficazes. A compreensão sobre a influência das mutações na interface de interação entre os scFvs e o CD22 é essencial para aprimorar a ligação dos anticorpos aos antígenos específicos. Essa elucidação possibilita um melhor entendimento sobre a relação estrutura afinidade/avidéz entre esses modelos de scFv na interação com o CD22 para proposição de novos scFvs.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; PILLAI, Shiv. **Imunologia Celular e Molecular**. 9ªed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2019.
- AHMAD, Zuhaida Asra *et al.* **ScFv antibody: Principles and clinical application**. [S. l.: s. n.], 2012.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)? About Acute Lymphocytic Leukemia (ALL)**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>. Acesso em: 8 set. 2024.
- ARNDT, Katja M; MÜLLER, Kristian M; PLÜCKTHUN, Andreas. **Factors Influencing the Dimer to Monomer Transition of an Antibody Single-Chain Fv Fragment** †. [S. l.: s. n.], 1998.
- ATWELL, John L *et al.* **scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between V_H and V_L domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies** *Protein Engineering* vol. [S. l.: s. n.], 1999.
- BAJGELMAN, Marcio Chaim. Principles and applications of flow cytometry. *In: DATA PROCESSING HANDBOOK FOR COMPLEX BIOLOGICAL DATA SOURCES*. [S. l.: s. n.], 2019. p. 119–124.
- BECK, Alain *et al.* **Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2017.
- BERRY, Donald A. *et al.* Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis. **JAMA Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2017.
- BLUM, Sabine; MARTINS, Filipe; LÜBBERT, Michael. **Immunotherapy in adult acute leukemia**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2017.
- BUTT, Tauseef R. *et al.* **SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins**. [S. l.: s. n.], 2005.
- CASEY, Nicholas Paul *et al.* Efficient chimeric antigen receptor targeting of a central epitope of CD22. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 299, n. 7, 2023.
- CHAMES, Patrick *et al.* **Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future**. [S. l.: s. n.], 2009.
- CHEN, Jie *et al.* Binding domain on CD22 molecules contributing to the biological activity of T cell-engaging bispecific antibodies. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 7, 2023.
- CRESCIOLI, Silvia *et al.* Antibodies to watch in 2025. **mAbs**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2025. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420862.2024.2443538>.

DATASUS. **Tecnologia da Informação a Serviço do SUS**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 8 nov. 2023.

DE CARVALHO; RIBEIRO; NOGUEIRA. **CURSOS DE INVERNO 2010 Citometria de Fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias**. [S. l.: s. n.], 2010.

DE NOVO SOFTWARE. **What is MFI (Mean or Median Fluorescence Intensity) and how do I calculate it in FCS Express?** [S. l.], 2023. Disponível em: <https://denovosoftware.com/faq/kb-what-is-mfi-mean-or-median-fluorescence-intensity-and-how-do-i-calculate-it-in-fcs-express/>. Acesso em: 23 out. 2024.

DU, Xing *et al.* Differential cellular internalization of anti-CD19 and -CD22 immunotoxins results in different cytotoxic activity. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 15, p. 6300–6305, 2008.

ELGUNDI, Zehra *et al.* **The state-of-play and future of antibody therapeutics**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2017.

EMADI; LAW. **MANUAL MSD Versão para Profissionais da Saúde: Leucemia linfoblástica aguda (LLA)**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-linfobl>.

EREÑO-ORBEA, June *et al.* Structural details of monoclonal antibody m971 recognition of the membrane-proximal domain of CD22. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 297, n. 2, 2021.

FOLTZ, Ian N.; KAROW, Margaret; WASSERMAN, Scott M. Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies what cardiologists need to know. **Circulation**, [s. l.], v. 127, n. 22, p. 2222–2230, 2013.

FONSECA, Marcela Helena Gambim *et al.* **Boosting half-life and effector functions of therapeutic antibodies by Fc-engineering: An interaction-function review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

FRENZEL, André; SCHIRRMANN, Thomas; HUST, Michael. **Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy**. [S. l.]: Taylor and Francis Inc., 2016.

FRY, Terry J. *et al.* CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 20–28, 2018.

HAFEEZ, Umbreen; GAN, Hui K.; SCOTT, Andrew M. **Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2018.

HASO, Waleed *et al.* Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 121, n. 7, p. 1165–1171, 2013.

HOLLIGER, Philipp; HUDSON, Peter J. **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** [S. l.: s. n.], 2005.

HUSTON, James S *et al.* **Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* (biosynthetic analogue/anti-digoxin antibodies/variable regions/gene synthesis/*Escherichia coli* expression)** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. [S. l.: s. n.], 1988.

INCA. **Estimativa | 2023 Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: [s. n.], 2023.

JAYARAMAN, Jayapriya *et al.* **CAR-T design: Elements and their synergistic function.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

JEFFERIS, Roy. **Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics.** [S. l.: s. n.], 2009.

JOSHI, Deeksha *et al.* **Biosimilars in Oncology: Latest Trends and Regulatory Status.** [S. l.]: MDPI, 2022.

KAPLON, Hélène; REICHERT, Janice M. Antibodies to watch in 2019. **mAbs**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 219–238, 2019.

KENNEDY, Patrick J. *et al.* **Monoclonal antibodies: technologies for early discovery and engineering.** [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2018.

KORTT, Alexander A *et al.* **Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five-and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer** Protein Engineering. [S. l.: s. n.], 1997.

KWON, Na Young; KIM, Youngjin; LEE, Jie Oh. **Structural diversity and flexibility of diabodies.** [S. l.]: Academic Press Inc., 2019.

LONG, Adrienne H. *et al.* 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 581–590, 2015.

LONG, Adrienne H.; HASO, Waleed M.; ORENTAS, Rimas J. Lessons learned from a highly-active CD22-specific chimeric antigen receptor. **OncoImmunology**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2013.

LÜDEL, Frank *et al.* Distinguishing between monomeric scfv and diabody in solution using light and small angle x-ray scattering. **Antibodies**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2019.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estratégia do Complexo Econômico-Industrial da Saúde avança em ações coordenadas para atender demandas do SUS.** [S. l.], 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2025/janeiro/estrategia-do-complexo->

economico-industrial-da-saude-avanca-em-aco-es-coordenadas-para-atender-demandas-do-sus. Acesso em: 8 mar. 2025.

NANOTEMPER. **Get tips on how to analyze, interpret and present your Prometheus data.** [S. l.], 2024. Disponível em: <https://support.nanotempertech.com/hc/en-us/articles/19208913127185--What-does-the-starting-value-of-the-350-nm-330-nm-ratio-mean>. Acesso em: 29 set. 2024.

NELSON; COX. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [S. l.: s. n.], 2014.

NUR, Alia *et al.* **A review of in vitro stochastic and non-stochastic affinity maturation strategies for phage display derived monoclonal antibodies.** [S. l.]: Elsevier B.V., 2024.

PERISIC, Olga *et al.* Crystal structure of a diabody, a bivalent antibody fragment. **Structure**, [s. l.], v. 2, p. 1217–1226, 1994.

QUEIROZ, Alice. **Desenvolvimento de protocolo, in silico, visando avaliação da interface entre um fragmento de anticorpo e o CD22, para aplicação em CAR-T cell.** 2024. - Federal University of Ceara, Fortaleza, 2024.

RAMAKRISHNA, Sneha *et al.* Modulation of target antigen density improves CAR T-cell functionality and persistence. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 17, p. 5329–5341, 2019.

REIS, Carla *et al.* **Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica.** [S. l.: s. n.], 2009. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/bibliotecadigital>.

REVERBERI, Roberto; REVERBERI, Lorenzo. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood Transfusion**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 227–240, 2007.

ROBINSON, J. Paul *et al.* **Flow Cytometry: The Next Revolution.** [S. l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2023.

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

SANDOW, Juergen *et al.* Equivalent recombinant human insulin preparations and their place in therapy. **European Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 10–16, 2015.

SHARMA, Padmanee; ALLISON, James P. **Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential.** [S. l.]: Cell Press, 2015.

SHEN, Zhihong *et al.* Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 80, n. 6, p. 1910–1917, 2008.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 17–48, 2023.

SINGH, Nathan *et al.* Antigen-independent activation enhances the efficacy of 4-1BB-

costimulated CD22 CAR T cells. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 842–850, 2021.

STROHL, William R. **Current progress in innovative engineered antibodies**. [S. l.]: Higher Education Press, 2018.

TOBIAS; KUMARASWAMY. **Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform**. [S. l.: s. n.], 2013.

VARGAS, Marco Antonio. O Mercado de biofármacos no Brasil e no mundo. *In*: TECNOLOGIAS E PREÇOS NO MERCADO DE MEDICAMENTOS. [S. l.]: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea), 2024. p. 53–107. Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/16356/1/Cap_2_O_Mercado_biofarmacos_no_Brasil_e_no_mundo.pdf.

WEINER, Louis M.; SURANA, Rishi; WANG, Shangzi. **Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy**. [S. l.: s. n.], 2010.

WHITLOW, Marc *et al.* **An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability** *Protein Engineering*. [S. l.: s. n.], 1993. Disponível em: <http://peds.oxfordjournals.org/>.

WÖRN, Arne; PLÜCKTHUN, Andreas. **Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments**. [S. l.]: Academic Press, 2001.

XIAO, Xiaodong *et al.* Identification and characterization of fully human anti-CD22 monoclonal antibodies. **mAbs**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 297–303, 2009.

XU, Jia *et al.* **Targeting CD22 for B-cell hematologic malignancies**. [S. l.]: BioMed Central Ltd, 2023.

ZHU, Zhenbao *et al.* Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. **Food Research International**, [s. l.], v. 106, p. 853–861, 2018.

ZION MARKET RESEARCH. **Monoclonal Antibody Therapeutics Market Size, Share, Forecast, Demand, Analysis 2032**. [S. l.], 2024. Disponível em: <https://www.zionmarketresearch.com/report/monoclonal-antibody-therapeutics-market>. Acesso em: 8 mar. 2025.