



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

BRUNA DE SOUSA LIMA

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE
CADEIA ÚNICA DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD19 FMC63 PARA
ESTUDOS DE APLICAÇÃO EM IMUNOTERAPIAS DO CÂNCER**

FORTALEZA

2022

BRUNA DE SOUSA LIMA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE
CADEIA ÚNICA DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD19 FMC63 PARA
ESTUDOS DE APLICAÇÃO EM IMUNOTERAPIAS DO CÂNCER

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof.^a Dra. Cláudia do Ó Pessoa.
Coorientador: Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

FORTALEZA

2022

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

L696e Lima, Bruna de Sousa.
EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA ÚNICA DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD19 FMC63 PARA ESTUDOS DE APLICAÇÃO EM IMUNOTERAPIAS DO CÂNCER / Bruna de Sousa Lima. – 2022.
64 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado.

1. expressão heteróloga. 2. scFv. 3. CD19. 4. FMC63. 5. c-Myc. I. Título.

CDD 615

BRUNA DE SOUSA LIMA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE
CADEIA ÚNICA DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD19 FMC63 PARA
ESTUDOS DE APLICAÇÃO EM IMUNOTERAPIAS DO CÂNCER

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família e amigos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

À minha família, pelos incentivos que me fizeram chegar à conclusão do meu curso e começo de uma nova carreira. Aos meus pais, por me possibilitar a realização do ensino superior. Agradeço minha mãe Lene, minha heroína, que sempre me apoiou e incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Agradeço ao meu pai Neto, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu e sempre esteve ao meu lado. As minhas tias Luciene, Lucilene e Naile, por sempre acreditar em mim e demonstrar tanto orgulho, e a minha avó, por todo carinho e cuidado.

Aos meus queridos amigos de longa data, Pablo, Eugênio, Sabrina e Vanessa, por sua compreensão durante os tempos de ausência ao longo da elaboração do TCC. Obrigado por todos os conselhos úteis e risadas compartilhadas, bem como palavras motivacionais e puxões de orelha.

À Universidade Federal do Ceará, pela formação acadêmica e por todas as experiências vividas, que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores que me acompanharam ao longo do curso e que, com empenho, se dedicam à arte de ensinar. Em especial ao Prof. Josimar Eloy, Prof. Tiago Lima Sampaio, Prof. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes, Prof.^a Aparecida Tiemi Nagao-Dias, Prof.^a Juliana Navarro Ueda Yachite e Nirla Rodrigues Romero, por toda contribuição ao curso de Farmácia, empenho e amor depositados em suas aulas e empatia com seus alunos.

Aos amigos que pude encontrar durante essa jornada, Diene, Edson, Ana Beatriz e Giovanna, os quais pretendo levar para vida. Obrigado por todo suporte, carinho, alegria e evolução proporcionados, sem vocês minha trajetória seria muito mais difícil.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza, em especial ao Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) pela infraestrutura cedida e por todos os ensinamentos adquiridos durante essa parceria.

À Fiocruz, instituição que possibilitou a realização deste trabalho, pela infraestrutura cedida e por todos os profissionais e amigos com quem pude conviver e aprender diariamente.

Aos amigos do Grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas, Igor, Larissa, Marcus Rafael e Larisse, por toda paciência, apoio e ensinamentos repassados. Vocês são profissionais e pessoas incríveis.

À Dra. Cláudia do Ó Pessoa, pela orientação.

Ao Dr. Gilvan Pessoa Furtado, pela oportunidade dada e por acreditar no meu potencial. Obrigado pela excelente orientação científica e todo apoio e motivação prestados.

À banca examinadora, Prof. Dra. Francisca Andréa da Silva Oliveira e Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio, pela disposição e valiosas colaborações e sugestões.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

A soul in tension that's learning to fly
Condition grounded but determined to try
(PINK FLOYD, 1987)

RESUMO

Dados da base populacional do INCA apontam que, no Brasil, o câncer é um grande problema de saúde pública. Além da alta taxa de incidência, seu tratamento é complexo e de alto custo, visto que uma parcela significativa dos medicamentos utilizados na terapia precisa ser importada. Nesse contexto, a imunoterapia tem ganhado cada vez mais destaque, se mostrando uma estratégia de tratamento promissora. Uma nova classe de imunoterápicos, conhecida como Receptores Quiméricos de Antígeno (CARs), consiste na modificação genética das células T derivadas do próprio paciente para expressar um receptor com a capacidade de reconhecer antígenos específicos presentes nas células alvo malignas. Um dos principais antígenos utilizados como alvo é o receptor de membrana CD19, uma proteína superexpressa em neoplasias de células B. A unidade responsável pelo reconhecimento do antígeno em um sistema CAR, geralmente é composta por um fragmento variável de cadeia única (scFv). Em CARs aprovados pela FDA que possuem o CD19 como alvo, é utilizado um scFv derivado do anticorpo murino FMC63, onde pode ser inserido marcadores de proteína (*tag*), como a *tag* c-Myc, para facilitar a manipulação laboratorial e a execução de experimentos de detecção e purificação. Deste modo, este trabalho objetivou expressar o scFv derivado do anticorpo FMC63 em sistema procarioto, com e sem a *tag* c-Myc, purificá-los e verificar a estabilidade das proteínas expressas. A expressão heteróloga foi realizada overnight a 15 °C utilizando o vetor pET-SUMO, a cepa de *E. coli* SHuffle e o IPTG, como indutor. O processo de purificação foi realizado por cromatografia de afinidade com metal imobilizado e as purificações foram avaliadas por SDS-PAGE, sendo realizados ainda ensaios de imunodeteção (*Western blot*) e de estabilidade térmica. A partir da eletroforese de proteínas e pelo *Western blot*, foi confirmada a expressão dos scFv anti-CD19. Foi alcançado um rendimento de 0,80 mg/L de cultura através da expressão e purificação da porção solúvel para o scFv anti-CD19 sem a *tag* c-Myc e um rendimento de 0,34 mg/L para scFv anti-CD19 com a *tag* c-Myc. O perfil de estabilidade térmica, obtidos por fluorescência intrínseca do triptofano, foi similar entre os scFv expressos. Conclui-se que os scFv anti-CD19 com e sem a *tag* c-Myc puderam ser expressos e purificados com a metodologia proposta e que a *tag* c-Myc não interfere na estabilidade da estrutura do scFv. A perspectiva é padronizar o processo de expressão e purificação do scFv, a fim de possibilitar a realização de ensaios de capacidade de ligação e afinidade, para verificar se a *tag* c-Myc interfere na interação anticorpo-antígeno.

Palavras-chave: expressão heteróloga; scFv; CD19; FMC63; c-Myc.

ABSTRACT

INCA's Population Base data indicates that cancer has become a huge public health problem in Brazil. Besides the high incidence rate, its treatment is complex and costly, since a representative portion of the drugs used in therapy are imported. In this context, immunotherapy has gained increasing prominence, proving to be a promising treatment strategy. A new class of immunotherapeutics, known as Chimeric Antigen Receptors (CARs), consists of genetically modifying patient-derived T cells to express a receptor with the ability to recognize specific antigens present on target malignant cells. One of the main antigens used as a target is the CD19 membrane receptor, a protein overexpressed in B-cell neoplasms. The domain responsible for antigen recognition in a CAR is usually composed of a single-chain variable fragment (scFv). In FDA-approved CARs targeting CD19, it is used a scFv derived from the murine antibody FMC63, in which protein markers (tags), such as the c-Myc tag, can be inserted to facilitate laboratory manipulation and the execution of detection and purification experiments. Thus, this work aimed to express the scFv derived from the FMC63 antibody in a prokaryotic system, with and without the c-Myc tag, purify them and verify the stability of the expressed proteins. Heterologous expression was performed overnight at 15 °C using pET-SUMO vector, *E. coli* SHuffle strain and IPTG as inducer. The purification process was performed by immobilized metal affinity chromatography and the purifications were evaluated by SDS-PAGE, and immunodetection (Western blot) and thermal stability assays were also performed. From protein electrophoresis and Western blot, the expression of the anti-CD19 scFv was confirmed. A yield of 0.80 mg/L culture was achieved by expression and purification of the soluble portion for the anti-CD19 scFv and a yield of 0.34 mg/L for anti-CD19 scFv with the c-Myc tag. The thermal stability profile, obtained by intrinsic tryptophan fluorescence, was similar among the expressed scFv. It is concluded that the anti-CD19 scFv with and without the c-Myc tag were able to be expressed and purified with the proposed methodology and that the c-Myc tag does not interfere in the stability of the scFv structure. The prospect is to standardize the process of expression and purification of the scFv, in order to enable the performance of binding capacity and affinity assays, to verify if the c-Myc tag interferes in the antibody-antigen interaction.

Keywords: heterologous expression; scFv; CD19; FMC63; c-Myc.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica de um anticorpo	16
Figura 2 – Principais fragmentos de anticorpos	17
Figura 3 – Estrutura básica dos Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs)	18
Figura 4 – As gerações dos Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs)	20
Figura 5 – Representação da estrutura molecular do receptor CD19	22
Figura 6 – Representação da estrutura tridimensional da <i>tag</i> c-Myc	25
Figura 7 – Vetor pET-SUMO	29
Figura 8 – Sequência dos 262 resíduos de aminoácidos codificados pelo gene c-Myc scFv-CD19	42
Figura 9 – Alinhamento das sequências e eletroferograma	44
Figura 10 – Curvas de absorbância das purificações dos scFv anti-CD19 da primeira expressão	45
Figura 11 – Géis de SDS-PAGE das purificações dos scFv anti-CD19 obtidos com a primeira expressão	46
Figura 12 – Resultados obtidos com a segunda expressão e purificação dos scFv anti- CD19	47
Figura 13 – Resultados obtidos com a purificação dos scFv anti-CD19 com steps de 15 40 e 100%	49
Figura 14 – Gel SDS-PAGE 12,5% de SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19 em tampão PBS 1x	51
Figura 15 – Gel SDS-PAGE após a clivagem da cauda SUMO	52
Figura 16 – <i>Western blot</i> com anticorpo anti-His <i>tag</i>	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão de BSA	53
Gráfico 2 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência do scFv-CD19 e c-Myc-scFv-CD19	56
Gráfico 3 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência dos scFv antes e após a clivagem da cauda SUMO	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência e numeração dos resíduos de aminoácidos presentes no epítipo antigênico do CD19 reconhecidos por FMC63	23
Tabela 2 – Amostras do vetor pET-SUMO-scFv-CD19 enviadas para sequenciamento	43
Tabela 3 – Quantificação das amostras do vetor pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19	45
Tabela 4 – Parâmetros utilizados no protocolo de sonicação em cada uma das purificações	50
Tabela 5 – Quantificações e rendimentos dos fragmentos de anticorpo (scFv) anti-CD19 expressos e purificados	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	Citotoxicidade mediada por Células Anticorpo-Dependente
ADCP	Fagocitose Celular Dependente de Anticorpo
AP	Fosfatase alcalina
APS	Persulfato de amônio
BCIP	Fosfato de bromo cloroindolil
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAR	Receptor Quimérico de Antígeno
CDC	Citotoxicidade Dependente de Complemento
CDR	Região de Determinação de Complementariedade
CH	Domínio constante da cadeia pesada de um anticorpo.
CL	Domínio constante da cadeia leve de um anticorpo.
D.O.	Densidade ótica
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo.
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento Cristalizável
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEK	Células embrionárias de rim humano
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosose
LB	Luria-Bertani
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LH	Linfoma Hodgkin
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B Refratária
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
mAb	Anticorpo monoclonal
MWCO	Limite de Peso Molecular
NBT	Nitro blue tetrazolium

PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonil
scFv	Fragmento Variável de Cadeia Única
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TEMED	N, N,N',N' - tetrametil etilenodimetilamina
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius
μ	Micro
A	Ampere
g	Gramma
K	Quilo
kDa	QuiloDalton
L	Litro
M	Molar
m	Mili
n	Nano
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
pb	Pares de Base
pH	Potencial hidrogeniônico
™	Trade Mark
U	Unidade enzimática
UV	Ultravioleta
V	Volts
β	Beta
κ	Kappa
ξ	Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer	14
1.2	Anticorpos	15
1.2.1	<i>Fragmento variável de cadeia única (scFv)</i>	16
1.3	Receptor quimérico de antígeno (CAR)	17
1.4	Receptor CD19	21
1.5	Anticorpo Monoclonal Murino FMC63	23
1.6	A <i>tag</i> c-Myc	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Clonagem do gene do scFv anti-CD19 com e sem <i>tag</i> c-Myc em pET-SUMO	29
4.1.1	<i>Obtenção do vetor pET-SUMO</i>	29
4.1.2	<i>Amplificação do inserto scFv-anti-CD19</i>	30
4.1.3	<i>Digestão com enzimas de restrição</i>	31
4.1.4	<i>Reação de ligação entre vetor e inserto</i>	32
4.1.5	<i>Transformação em E. coli TOP 10</i>	32
4.1.6	<i>PCR de colônia</i>	33
4.1.7	<i>Envio das amostras para sequenciamento</i>	33
4.1.8	<i>Teste de digestão</i>	34
4.2	Obtenção de células quimiocompetentes	34
4.3	Transformação das cepas de expressão <i>E. coli</i> SHuffle	35
4.4	Eletroforese em gel de agarose	36
4.5	Expressão heteróloga dos scFv anti-CD19 com e sem a <i>tag</i> c-Myc	36
4.6	Purificação proteica por cromatografia de afinidade	37
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
4.8	Troca de tampão e clivagem da cauda SUMO	38
4.9	Quantificação	39
4.10	<i>Western blot</i> com Anti-His <i>tag</i>	40

4.11	Ensaio de estabilidade térmica	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Clonagem do gene do scFv anti-CD19 com e sem <i>tag</i> c-Myc em pET-SUMO.....	42
5.2	Expressão e purificação do scFv anti-CD19 com e sem <i>tag</i> c-Myc em <i>E. coli</i> SHuffle	45
5.3	Clivagem da cauda SUMO e purificação	50
5.4	Quantificação e rendimentos	52
5.5	<i>Western blot</i>	54
5.6	Ensaio de estabilidade térmica	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) define câncer, também conhecido como neoplasia maligna, como um termo abrangente que engloba diversos tipos diferentes de doenças, cuja característica em comum é o crescimento desordenado de células, podendo ou não invadir tecidos vizinhos ou até mesmo órgãos mais distantes. A velocidade com que essas células cancerígenas se multiplicam, sua capacidade de invadir outros tecidos e o local onde se originaram, são pontos utilizados para diferenciar os seus diversos tipos existentes (INCA, 2022).

Entre estes, os cânceres hematológicos representam uma taxa significativa de incidência, dos quais podem-se citar a leucemia e os linfomas de Hodgkin e não Hodgkin como os de maior importância clínica. A leucemia é uma doença que atinge os glóbulos brancos, caracterizada pelo acúmulo de células blásticas anormais na medula óssea, células jovens que substituem as células sanguíneas normais, ocasionando uma série de complicações, como anemia, infecções e hemorragias (ANDRADE *et al.*, 2013). Já a classificação de Hodgkin, se refere ao câncer originado nos linfonodos do sistema linfático. Os linfomas não Hodgkin incluem mais de 20 tipos diferentes da doença, sendo o linfoma de maior incidência em crianças, atingindo também com frequência indivíduos acima de 60 anos (INCA, 2022).

No Brasil, estudos realizados pelo INCA estimam mais de 10.000 novos casos de linfoma não-Hodgkin (INCA, 2020). O mesmo estudo também aponta que no Brasil, em 2017, houve mais de 4.000 óbitos por linfoma não Hodgkin, sendo este o oitavo câncer mais incidente em homens e o décimo em mulheres (INCA, 2020). Para o País, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem papel fundamental no tratamento de neoplasias. Estudos indicam que entre 2010 e 2015 houve um aumento de cerca de 70% dos gastos relacionados à atenção oncológica pelo SUS, sendo estimado um custo médio anual por paciente (em paridade de poder aquisitivo de USD) de PPP \$9.572,30 (LANA *et al.*, 2020). Diante disto, o câncer, em seu processo de desenvolvimento, se configura como um problema de saúde pública, exigindo sua abordagem por meio de políticas governamentais para seu controle, dentre as quais se encaixa o desenvolvimento de novos medicamentos mais específicos e de maior valor agregado, que possam ser disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde.

Os medicamentos convencionais utilizados no tratamento do câncer, os quimioterápicos, possuem uma alta taxa de efeitos colaterais, justamente por não serem

específicos a um alvo (ANDRADE *et al.*, 2013). Com isso, as imunoterapias têm ganhado cada vez mais destaque nas pesquisas, como uma alternativa terapêutica eficiente e com menos efeitos colaterais, possibilitando um tratamento mais direcionado para a destruição de células tumorais, sem afetar tanto as células saudáveis.

1.2 Anticorpos

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas produzidas pelas células B, quando ativadas e diferenciadas em plasmócitos ao reconhecerem algum antígeno. São moléculas responsáveis pela imunidade humoral, com capacidade de se ligar a antígenos específicos e recrutar células efetoras para a eliminação destes. Os anticorpos humanos podem ser divididos em 5 classes ou isotipos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), cada qual com características distintas de concentração plasmática, distribuição pelo corpo, função principal e estrutura. Há ainda subclasses de IgA (IgA1 e IgA2) e IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (ABBAS *et al.*, 2015).

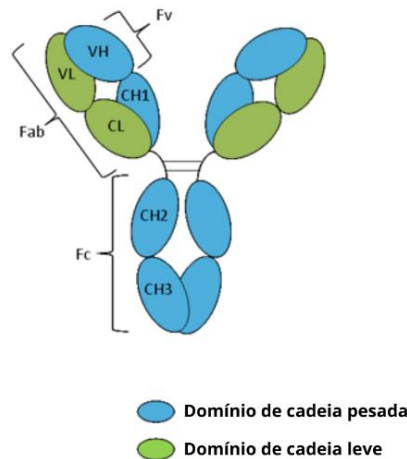
De modo geral, as classes apresentam uma mesma estrutura fundamental, sendo IgG, IgE e IgD geralmente expressos como monômeros, IgM como pentâmero (quando secretado) e IgA como dímero. O isotipo mais utilizado no desenvolvimento de anticorpos para uso terapêutico é o IgG, pois além de ser o mais comum e abundante no organismo, ele também apresenta cinética na circulação bem estudada (ABBAS *et al.*, 2015).

Tais moléculas possuem em sua estrutura dois tipos de cadeias polipeptídicas, chamadas de cadeia pesada (H) e cadeia leve (L). Cada anticorpo, em sua estrutura básica (Figura 1), possui duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, idênticas entre si e interligadas por meio de pontes dissulfeto. A cadeia leve é formada por um domínio variável (VL) e um domínio constante (CL), enquanto a cadeia pesada possui um domínio variável (VH) e de 3 a 4 domínios constantes (CH1, CH2 e CH3). A estrutura do anticorpo possui ainda dobradiças, resíduos de aminoácidos que ligam o primeiro domínio constante da cadeia pesada (CH1) ao segundo domínio constante da cadeia pesada (CH2), o que confere flexibilidade à molécula, facilitando o seu acesso e distribuição na superfície do antígeno (ABBAS *et al.*, 2015).

As cadeias leves (VL e CL) associadas à porção variável e ao primeiro domínio constante das cadeias pesadas (VH e CH1) formam dois fragmentos Fab, fração de ligação ao antígeno (Figura 1) (HOLLIGER; HUDSON, 2005). O sítio de ligação ao antígeno, ou paratopo, fica restrito às porções variáveis (VH e VL), cada qual com 3 sequências hipervariáveis, chamadas de CDRs (Regiões Determinantes de Complementariedade), que são complementares ao antígeno e responsáveis pela especificidade do anticorpo. Além disso, os

domínios constantes restantes das cadeias pesadas (CH2 e CH3) formam o fragmento Fc (Fração Cristalizável) (Figura 1), responsável pela função efetora do anticorpo, tais como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e opsonização de patógenos (HOLLIGER; HUDSON, 2005).

Figura 1 – Estrutura básica de um anticorpo



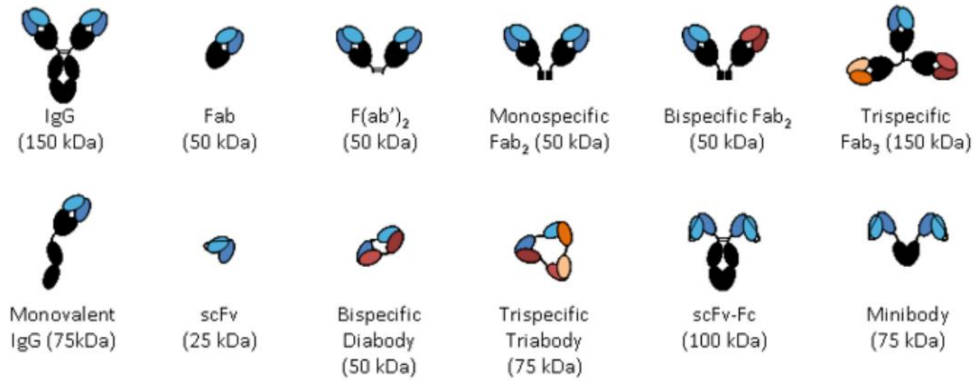
Fonte: adaptada de Absolute antibody, 2022. Região Fab: fragmento de ligação ao antígeno, constituído por VH (porção variável da cadeia pesada), VL (porção variável da cadeia leve), CL (porção constante da cadeia leve) e CH1 (primeira porção constante da cadeia pesada). Região Fv: fragmento variável, composto por VH (porção variável da cadeia pesada) e VL (porção variável da cadeia leve), e responsável por reconhecer o antígeno. Região Fc: fragmento cristalizável, compostos pelas segunda e terceira porções constantes da cadeia pesada (CH2 e CH3) e responsável pelas funções efetoras.

1.2.1 Fragmento variável de cadeia única (scFv)

Atualmente, com a engenharia de anticorpos, é possível, além do desenvolvimento de anticorpos completos, gerar fragmentos desses anticorpos (Figura 2), que também possuem aplicação clínica, podendo atuar no tratamento de cânceres e de doenças autoimunes. Um exemplo é o scFv (fragmento variável de cadeia única, do inglês *single-chain variable fragment*), que possui apenas os domínios variáveis da cadeia leve e pesada (VL e VH), ligados entre si por um peptídeo flexível, a fim de simular a região Fv do anticorpo e manter sua especificidade (HOLLIGER; HUDSON, 2005). Esse peptídeo flexível também pode ser chamado de *linker* e é formado normalmente por 10-25 resíduos de aminoácidos, de preferência hidrofílicos para que se obtenha um scFv com maior solubilidade. Um dos *linkers* mais utilizados é composto pelos aminoácidos glicina e serina (G₄S)₃, que além de melhorar a

solubilidade do fragmento também lhe garante uma maior flexibilidade (MOHAMMADI *et al.*, 2016).

Figura 2 – Principais fragmentos de anticorpos



Fonte: Adaptado de Absolute antibody, 2022. Alguns dos fragmentos de anticorpos desenvolvidos pela engenharia de anticorpos a partir da estrutura de uma IgG.

Por possuir uma estrutura menos complexa do que a de um anticorpo completo, o scFv facilita a manipulação em laboratório, o que possibilita o uso de sistemas de expressão mais baratos e simples, como procariotos, o que diminui os custos da pesquisa. Além disso, por possuir um tamanho menor, quando comparado a um anticorpo completo, ele permite uma melhora da distribuição do fármaco no organismo, uma alta penetrabilidade em tumores e um baixo tempo de meia-vida. Isso faz com que o mesmo tenha um menor tempo de retenção em tecidos não-alvo e uma menor imunogenicidade (AHMAD *et al.*, 2012; HOLLIGER; HUDSON, 2005).

Todas essas características fazem com que haja uma preferência pela utilização de scFvs em estudos, tanto nas pesquisas de anticorpos monoclonais como no desenvolvimento dos Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs). Em CARs, o scFv é utilizado como domínio de reconhecimento ao antígeno, possibilitando que a resposta imunológica desencadeada seja mais específica e direcionada para o antígeno alvo, motivo pelo qual a imunoterapia é mais eficaz e menos agressiva ao paciente.

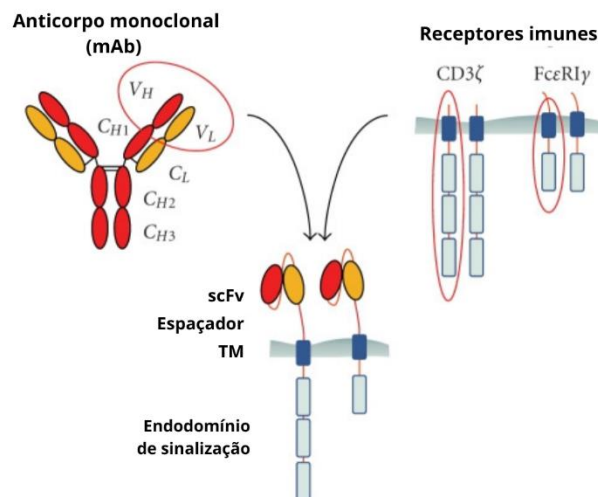
1.3 Receptor quimérico de antígeno (CAR)

A imunoterapia utilizando Receptores Quiméricos de Antígenos (CAR), se baseia na transferência de células T autólogas, modificadas geneticamente para expressar CAR,

receptores desenvolvidos com base nos TCRs (Receptores de células T). Uma célula T normal possui TCR, um receptor que permite a detecção e destruição de células tumorais a partir da apresentação dos Antígenos Associados ao tumor (TAAs) ou Antígenos específicos ao tumor (TSAs) pelo Complexo de Histocompatibilidade Humano de classe 1 (MHC I) (CARTELLIERI *et al.*, 2010).

O projeto clássico de CAR possui em sua estrutura um domínio extracelular, composto por uma porção de ligação específica e uma região espaçadora (porção flexível), um domínio transmembrana e um domínio intracelular de sinalização e ativação (Figura 3) (CARTELLIERI *et al.*, 2010).

Figura 3 – Estrutura básica dos Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs)



Fonte: Adaptado de CARTELLIERI *et al.*, 2010. Em sua estrutura básica, o CAR consiste em uma porção de ligação ao antígeno, uma região espaçadora, uma região transmembrana (TM) e um endodomínio de sinalização. Geralmente, a porção de ligação ao antígeno é composta por um scFv derivado de um anticorpo monoclonal específico de TAA, enquanto o endodomínio de sinalização deriva de receptores imunes de ativação e coestimulação.

A porção de ligação específica é formada por um fragmento variável de cadeia única (scFv) de um anticorpo específico para o reconhecimento de antígenos tumorais. O uso de um scFv como região de reconhecimento ao TAAs permite uma ampla variedade de aplicações ao CAR. Primeiramente, ao contrário do TCR, o CAR não necessita que o MHC I apresente o antígeno para reconhecê-lo, e por esse motivo possibilita também a identificação de antígenos de outras naturezas, visto que o MHC só processa e apresenta antígenos de origem proteica. Desta forma, pode-se utilizar também estruturas de carboidratos e glicolipídios como alvos potenciais (CARTELLIERI *et al.*, 2010).

Outra vantagem é a possibilidade de realizar mutações na porção scFv para modificar sua afinidade pelo antígeno alvo, um dos fatores que interfere na atividade das células T com CAR (CAR-T). A magnitude da resposta celular de células CAR-T contra as células tumorais depende, além da afinidade de ligação do scFv pelo seu alvo, da eficácia da expressão de CAR na superfície da célula efetora, da densidade de antígeno na célula tumoral e acessibilidade do epítopo na célula alvo (CARTELLIERI *et al.*, 2010).

Com base na afinidade de ligação entre anticorpo e antígeno é possível facilitar a diferenciação entre o tecido normal e tumoral, quando há diferença de densidade de antígenos. Estudos indicam que um scFv com baixa afinidade por um alvo possui capacidade de destruir células onde o antígeno é abundantemente expresso, mas não consegue causar a morte de células saudáveis onde o alvo é expresso em níveis baixos ou normais (CHMIELEWSKI *et al.*, 2004; GUEDAN *et al.*, 2018).

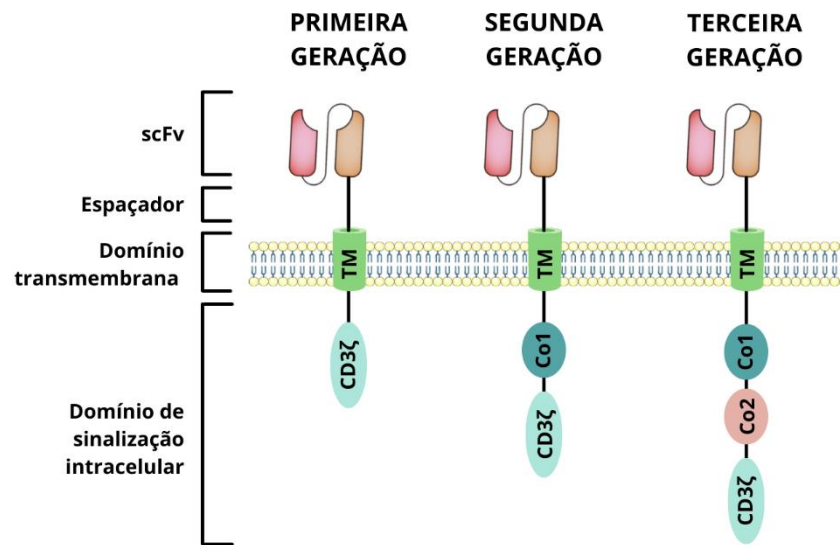
Um CAR com scFv de baixa afinidade contra EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) em estudo, demonstrou efeito sobre células que superexpressam o alvo e não apresentou resposta as células com níveis mais baixos de EGFR (CARUSO *et al.*, 2015). Estudos também foram feitos com células CAR-T baseadas no trastuzumabe, onde o scFv com afinidade reduzida apresentou reatividade apenas para HER2 das células de câncer de mama, sem exercer efeito contra as células normais que expressavam o antígeno (LIU *et al.*, 2015). Estes resultados ilustram a versatilidade do uso scFv, que pode ser desenhado e manipulado para influenciar a especificidade e diferenciar tecidos.

Inicialmente, os CARs eram compostos pelo fragmento variável de cadeia única (scFv), um espaçador, a região transmembrana e um domínio de sinalização intracelular, composto pela cadeia zeta do complexo CD3 (CD3 ζ). Esta estrutura foi chamada de CAR de primeira geração (Figura 4), que utilizava apenas CD3 ζ como molécula coestimuladora do sinal de ativação (GUEDAN *et al.*, 2018).

Apesar da atividade antitumoral comprovada, os CARs de primeira geração se mostraram carentes de algumas alterações durante os ensaios clínicos para melhorar sua eficácia terapêutica e permanência celular, que ainda eram insatisfatórias (CHU *et al.*, 2018; CARTELLIERI *et al.*, 2010). Sabendo disso e de que as células T necessitam de dois sinais de ativação, um via MHC e outro via moléculas coestimuladoras, foram incorporados à estrutura de CARs mais uma molécula coestimulatória como segunda via de ativação. Assim, surgiram os CARs de segunda geração (Figura 4). O domínio coestimulador utilizado na maioria dos CARs é o CD28, mas uma série de outras moléculas coestimuladoras também já foram testadas, como CD27, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB) e ICOS, por exemplo (GUEDAN *et al.*, 2018).

A incorporação de outro coestimulador possibilitou uma melhor sinalização de ativação, que conseqüentemente melhorou a produção de citocinas e a proliferação e persistência in vivo das células CAR-T (GUEDAN *et al.*, 2018). A terceira geração de CARs (Figura 4), diante dos promissores resultados alcançados com a adição de um coestimulador além do CD3 ζ nos CARs, incorporou mais uma molécula coestimuladora na sua estrutura.

Figura 4 – As gerações dos Receptores Quiméricos de Antígenos (CARs)



Fonte: Adaptado de BEZERRA *et al.*, 2022. A primeira geração de CARs consiste em um scFv como domínio de ligação, uma região espaçadora, um domínio transmembrana e um único domínio de sinalização intracelular (CD3 ζ). A segunda geração incluiu uma nova molécula coestimuladora ao domínio de sinalização intracelular (CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 ou CD27). A terceira geração possui é composta por duas moléculas coestimuladoras, além de CD3 ζ , geralmente CD28 ou ICOS como Co1 e 4-1BB, OX40 ou CD27 como Co2.

A imunoterapia com CARs vem sendo amplamente estudada e apresentou diversos resultados positivos em ensaios clínicos, já tendo sido inclusive aprovada algumas dessas terapias pela Food and Drug Administration (FDA), como tisagenlecleucel (Kymriah®), axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) e brexucabtagene autoleucel (Tecartus®) (HAN *et al.*, 2021). Entre elas, o tisagenlecleucel (Kymriah®) e axicabtagene ciloleucel (Yescarta®) possuem como alvo o antígeno CD19, uma proteína de membrana expressa exclusivamente em células B e que se encontra em superexpressão nos linfomas. Os medicamentos estão sendo utilizados no tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B Refratária (LLA-B) e Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) e têm demonstrado resultados promissores (SCHUSTER *et al.*, 2015; KOCHENDERFER *et al.*, 2017).

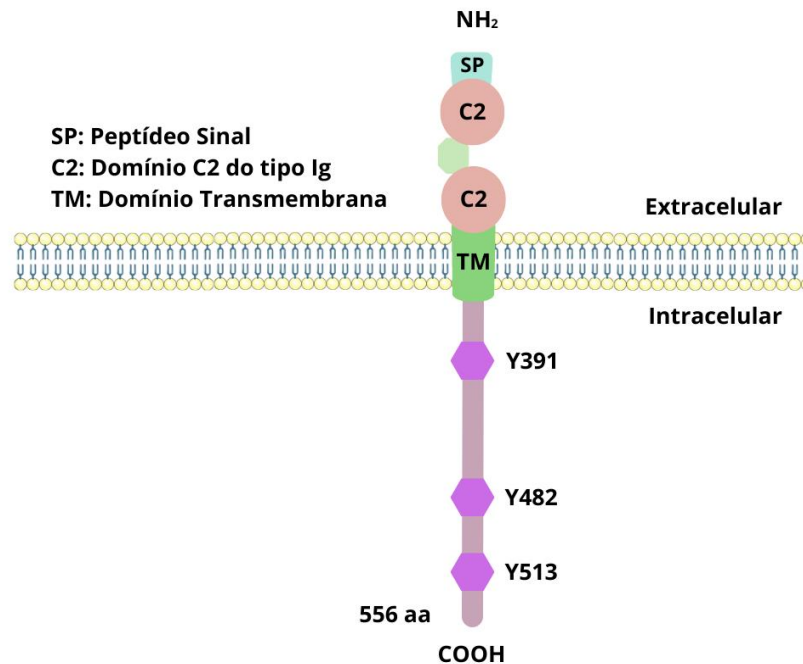
1.4 Receptor CD19

A sigla CD se refere ao grupamento de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*), um sistema relacionado a um conjunto de marcadores de superfície celular utilizados para diferenciar diversos tipos de células, seja por linhagem ou estágio de diferenciação (ABBAS *et al.*, 2015). O CD19 é uma proteína de membrana presente em linfócitos B que atua como co-receptor na transdução de sinal do receptor de antígenos de células B (BCR). A ligação entre o CD19 e o BCR desencadeiam a liberação de cálcio e um aumento na proliferação celular, o que influencia no desenvolvimento e no desempenho da função das células B (LI *et al.*, 2017).

Esta molécula é classificada como uma glicoproteína transmembrana do tipo I, pertencente à superfamília de imunoglobulina (Ig) (WANG *et al.*, 2012; SHINICHI SATO, 1999). É composta por 556 resíduos de aminoácidos, possuindo um peso molecular de 95 kDa, e pode ser dividida em 3 porções: a extracelular, a transmembrana e a intracelular. A porção extracelular é a que possui o epítipo antigênico que pode ser reconhecido por anticorpos, a qual é codificada por 4 dos 15 exons responsáveis por codificar este receptor (WANG *et al.*, 2012).

A porção extracelular do CD19 compreende a região N-terminal, composta por dois domínios C2 do tipo Ig, os quais estão separados por uma ligação dissulfeto, possuindo ainda sítios de ligação para carboidratos N-ligados (WANG *et al.*, 2012). Já a porção intracelular do CD19 é uma região altamente conservada, que compreende a região C-terminal. Este domínio é composto por 242 resíduos de aminoácidos, dos quais nove são resíduos de tirosina próximos à extremidade (Figura 5). Estudos sugerem que três desses resíduos de tirosina (Y391, Y482 e Y513) possuem um papel crítico na função biológica do CD19 e que a substituição de dois desses resíduos por outro aminoácido pode afetar a transdução de sinal (WANG *et al.*, 2012).

Figura 5 – Representação da estrutura molecular do receptor CD19



Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2012. O CD19 é uma proteína transmembrana do tipo 1 composta por 556 aminoácidos. Possui em sua região extracelular dois domínios C2 do tipo Ig separados por um pequeno domínio helicoidal com possíveis ligações dissulfeto. A sua região intracelular é composta por 242 resíduos de aminoácidos altamente conservados, incluindo vários resíduos de tirosina. Três dos principais resíduos de tirosina, os quais estão intimamente relacionados à atividade biológica de CD19, estão representados na imagem.

O CD19 se tornou um alvo promissor pois, além de ser expresso exclusivamente em células B, não sendo expresso em células tronco hematopoiéticas e células do plasma (OHAD HAMMER, 2012), ele está presente durante todo o processo de maturação dessas células, desde as células pré-B até a diferenciação dessas células em células plasmáticas (FISCHER *et al.*, 2017). Ademais, a molécula também está superexpressa em linfomas de células B, como leucemias linfoblásticas agudas, linfomas de células B e leucemias de células B, estando inclusive em concentrações mais altas quando comparado a outros alvos estudados, como CD20 e CD22 (SUBKLEWE *et al.*, 2019).

Diante do exposto, o uso de CD19 como alvo em imunoterapias vem sendo cada vez mais explorado. Entre as moléculas estudadas, é válido ressaltar o anticorpo FMC63, o qual reconhece de forma específica o CD19 e já tem sido aplicado em pesquisas no formato scFv como domínio de reconhecimento ao antígeno em CARs (VAN DER STEGEN *et al.*, 2015).

1.5 Anticorpo Monoclonal Murino FMC63

Os anticorpos monoclonais (mAb, do inglês monoclonal Antibody) são anticorpos produzidos por um único clone de linfócito B, o qual é isolado, clonado e imortalizado. A sua origem, de um único linfócito B, faz com que todos os anticorpos produzidos por este sejam idênticos entre si, compartilhando as mesmas propriedades físico-químicas e especificidade. Eles possuem diversas aplicações, sendo utilizados no tratamento de doenças como imunoterápicos, para diagnóstico, produção de vacinas, ensaios de detecção e quantificação de várias moléculas, entre outras.

Os mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais são diversos e diferentes entre si. De modo geral, eles podem atuar causando a apoptose celular, por meio da citotoxicidade dependente de complemento (CDC), onde a via clássica do sistema complemento é ativada para eliminar o antígeno, via citotoxicidade mediada por células anticorpo-dependente (ADCC), onde são recrutadas outras células efetoras para destruir o antígeno, e por fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP) (SUZUKI *et al.*, 2015).

O FMC63 é um anticorpo monoclonal anti-CD19 murino, ou seja, tanto a sua porção variável (Fab) quanto a sua porção constante (Fc) são de origem animal (camundongo), sendo derivadas mais especificamente de uma imunoglobulina da classe IgG2a (ZOLA *et al.*, 1991). A interação entre o anticorpo e o CD19 ainda não foi bem elucidada, visto que ainda não há de fato um consenso em relação a quais são os resíduos do epítipo do CD19 que são relevantes e participam do paratopo do FMC63. De modo geral, os estudos atuais sugerem que o anticorpo reconhece os resíduos de aminoácidos presentes em três alças (*loops*) diferentes (*loop 1*, *loop 2* e *loop 3*) do domínio extracelular da proteína CD19 (Tabela 1) (TEPLYAKOV *et al.*, 2018; GHORASHIAN *et al.*, 2019). Entre os três *loops* com os quais o anticorpo interage, a região correspondente ao exon 4, que codifica o *loop 3*, representa o seu principal sítio de reconhecimento (SOMMERMEYER *et al.*, 2017; ORLANDO *et al.*, 2018).

Tabela 1 – Sequência e numeração dos resíduos de aminoácidos presentes no epítipo antigênico do CD19 reconhecidos por FMC63

Epítipo antigênico	Sequência	Resíduos
<i>Loop 1</i>	LCQPGPPSEKAW	96-107
<i>Loop 2</i>	KLYVWAKDRPEI	155-166
<i>Loop 3</i>	HVHPKGPKS	216-224

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O FMC63 é um anticorpo já bem caracterizado que vem sendo amplamente utilizado em estudos que tem como alvo a proteína CD19, principalmente em pesquisas que utilizam a sua porção scFv como domínio de reconhecimento ao antígeno em CARs (VAN DER STEGEN *et al.*, 2015), os quais têm obtido resultados promissores para o tratamento de neoplasias como a Leucemia Linfóide Aguda de células B refratária (LLA-B), Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDGCB) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (TURTLE *et al.*, 2016; NEELAPU *et al.*, 2017; PORTER *et al.*, 2015). Além disso, já foram aprovadas pela FDA as terapias Kymriah® e Yescarta®, CARs que utilizam um scFv derivado do anticorpo FMC63 para o reconhecimento do antígeno CD19.

1.6 A tag c-Myc

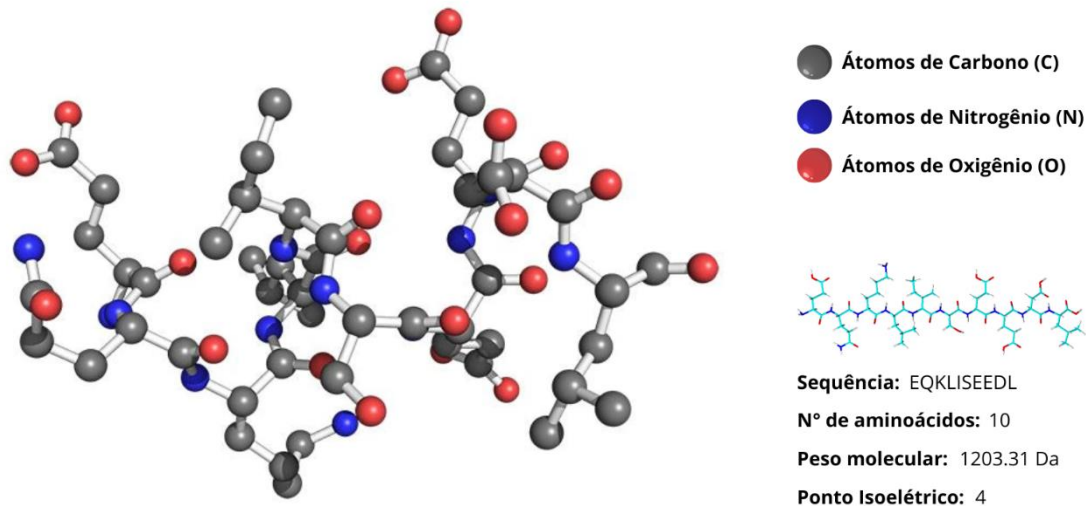
As *tags*, também conhecidas por cauda, são polipeptídios pequenos que podem ser utilizados como marcadores de proteínas, os quais são amplamente empregados em técnicas de engenharia genética e manipulação de DNA, inseridos na porção N-terminal ou C-terminal de uma proteína recombinante para facilitar sua manipulação e uso em procedimentos laboratoriais. Normalmente, quando a proteína recombinante estudada não possui um anticorpo específico capaz de reconhecê-la é feita a inserção de uma *tag* em sua estrutura, a qual pode ser detectada por um anticorpo anti-*tag*, permitindo assim a realização de experimentos que anteriormente não eram possíveis, auxiliando em processos como a purificação, identificação, isolamento e quantificação de proteínas (VANDEMOORTELE *et al.*, 2019).

Apesar da praticidade do uso de *tags*, é importante saber selecionar qual será utilizada nos estudos, pois a mesma pode interferir nos resultados dos ensaios, interferindo por exemplo nas interações da proteína recombinante. Grande parte dessa interferência se deve ao tamanho da *tag* utilizada, de modo que quanto maior o tamanho da *tag*, maiores as chances de haver inibição ou diminuição de interações com a proteína recombinante (MAJOREK *et al.*, 2014). Desta forma, na maioria dos estudos é preferível o uso de *tags* menores, como as *tags* FLAG, HA e c-Myc, por exemplo (ZHAO *et al.*, 2013).

A proteína c-Myc completa é formada por 439 resíduos de aminoácidos e possui um peso molecular de 62 kDa. Ela atua no núcleo celular como um fator de transcrição que regula o crescimento, a diferenciação, o metabolismo e a morte celular (MADDEN *et al.*, 2021). Já a *tag* c-Myc possui apenas 10 resíduos de aminoácidos em sua estrutura (EQKLISEEDL), correspondentes aos aminoácidos do intervalo 410-419 da região C-terminal da proteína c-Myc,

o que lhe confere um peso molecular de 1203.31 Da e um ponto isoelétrico (pI) de 4 (Figura 6) (CHROMOTEK, 2022; SCHÜCHNER *et al.*, 2020).

Figura 6 – Representação da estrutura tridimensional da *tag* c-Myc



Fonte: Adaptado de Proteintech® (2022).

A *tag* c-Myc é uma das *tags* mais utilizadas por pesquisadores, devido ao seu tamanho reduzido e por já ser bem caracterizada, sendo empregada principalmente em métodos de identificação e purificação, como imunoprecipitação, imunofluorescência, western blotting, ELISA e citometria de fluxo (TERPE, 2003; ZHAO *et al.*, 2013). O seu tamanho pequeno reduz a probabilidade de que as interações e estabilidade da proteína recombinante de interesse sejam afetadas pela inserção da *tag*, e por ser de origem humana reduz-se as chances de haver reações de imunogenicidade.

Além disso, outra vantagem é que a *tag* possui diversos anticorpos capazes de reconhecê-la, como por exemplo o anticorpo 9E10 (SCHÜCHNER *et al.*, 2020). Este fator é essencial, principalmente se tratando de trabalhos com proteínas recombinantes, as quais muitas vezes não possuem anticorpos específicos capazes de reconhecê-las, o que impossibilita ou dificulta a realização de metodologias de detecção e purificação (YOUNG *et al.*, 2012).

Um bom exemplo são os CARs, que são proteínas recombinantes complexas formadas pela combinação de outras proteínas, as quais constituem os seus domínios. Isso torna a inserção de uma *tag* à sua estrutura uma etapa pertinente para o estudo de CARs, os quais inclusive já vem utilizando a *tag* c-Myc para auxiliar na manipulação laboratorial dessas proteínas (MOOT *et al.*, 2016; NUNOYA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). A *tag* pode ser inserida a diferentes regiões

da proteína, no N-terminal, C-terminal ou em ambas as regiões. Esse posicionamento também pode interferir na atividade e estabilidade da proteína de interesse, sendo definido de acordo com os objetivos da pesquisa e estudos conformacionais. Tendo isso em mente, e lembrando do fato de que a adição da *tag* pode afetar a proteína recombinante de diversas formas, é importante a realização de estudos que investiguem se o uso de *tags* na estrutura do CAR pode interferir na sua eficácia, prejudicando assim o processo de sinalização responsável por ativar as células T.

2 JUSTIFICATIVA

O grupo de Engenharia de Proteínas Terapêuticas da Fiocruz Ceará, atua principalmente com a pesquisa de novos anticorpos monoclonais mutantes, buscando aumentar a afinidade deles com seus respectivos alvos. Inicialmente, trabalha-se com fragmentos de anticorpos no formato scFv, pela maior facilidade de manipulação laboratorial e expressão destes. De modo geral, o foco do grupo é desenvolver imunoterápicos *biobetters*, termo referente a proteínas recombinantes similares aos biofármacos, modificadas para possuir eficácia superior à molécula original. Ademais, as pesquisas realizadas também buscam fomentar o desenvolvimento de novas terapias.

Um grupo de pesquisa parceiro, liderado pelo Dr. Martín Hernán Bonamino, pesquisador do Instituto Nacional de Câncer e da Fiocruz-RJ, desenvolve CARs com a *tag* c-Myc. A inserção de uma *tag* na estrutura do CAR é um método muito utilizado para auxiliar a manipulação laboratorial dessas moléculas e possibilitar a realização de ensaios de detecção, quantificação e purificação. Dentre as principais *tags*, podemos destacar o c-Myc, uma *tag* bem caracterizada, com tamanho reduzido e que pode ser reconhecida por um anticorpo anti-c-Myc 9E10.

Os CARs anti-CD19 comercializados atualmente possuem em sua estrutura um scFv derivado do FMC63, um anticorpo monoclonal anti-CD19 de origem murina. Buscando entender melhor a interação entre o CAR e o antígeno CD19, além de investigar como a adição da *tag* c-Myc ao scFv pode influenciar nesta ligação, este trabalho propôs expressar o scFv anti-CD19 derivado do FMC63 com e sem a *tag* c-Myc em um sistema bacteriano e purificá-lo. A perspectiva é de padronizar o processo de expressão e purificação dos scFv anti-CD19 para em seguida obter proteína suficiente para realização de ensaios de comparação da capacidade de ligação dos scFv com e sem c-Myc ao seu antígeno, de modo a verificar se houve alguma influência da *tag* sobre esta interação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Expressar e purificar o fragmento variável (scFv) derivado do anticorpo monoclonal anti-CD19 FMC63, com e sem a *tag* c-Myc, em sistema de procaríoto

3.2 Objetivos Específicos

- Clonar os genes do scFv derivado do anticorpo monoclonal anti-CD19 FMC63, com e sem a *tag* c-Myc, no vetor de expressão pET-SUMO;
- Transformar as cepas de clonagem e expressão com os vetores pET-SUMO-scFv-CD19 e pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19;
- Expressar o scFv anti-CD19 com e sem a *tag* c-myc em sistema procaríoto;
- Purificar o scFv por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP;
- Avaliar estabilidade térmica dos scFv anti- CD19 expressos.

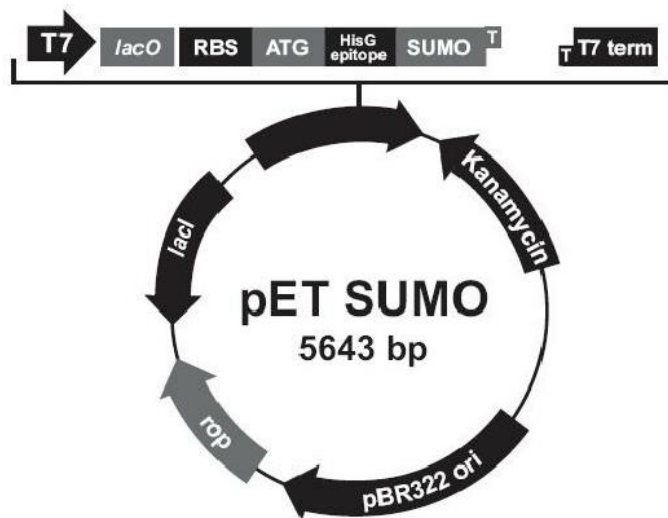
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Clonagem do gene do scFv anti-CD19 com e sem *tag* c-Myc em pET-SUMO

4.1.1 Obtenção do vetor pET-SUMO

O vetor de escolha para os experimentos foi o pET-SUMO (Figura 7), o qual adiciona à porção N-terminal da proteína uma *tag* SUMO (pequeno modificador ubiquitina-símile, ou do inglês, *small ubiquitin-like modifier*). A adição desta *tag* à proteína expressa possibilita uma maior solubilidade para a proteína e uma maior probabilidade de um enovelamento adequado. Além disso, o vetor possui em sua estrutura um gene de resistência à canamicina, o qual pode ser utilizado como marcador de seleção.

Figura 7 – Vetor pET-SUMO



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

As células competentes da cepa *E. coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico, protocolo descrito no tópico 4.3, com o vetor pET-SUMO e armazenadas a -80 °C. Em uma placa de Petri contendo 10 mL de meio LB-ágar seletivo com canamicina (40 μ g/mL), antibiótico ao qual o plasmídeo pET-SUMO possui resistência, foi feita a inoculação de 20 μ L do estoque de *E. coli* DH5 α utilizando a técnica de esgotamento do inóculo por estrias. A placa foi incubada *overnight* em estufa bacteriológica a 37 °C.

No dia seguinte, foi feita a inoculação de uma colônia isolada crescida na placa de Petri em um tubo com 5 mL de meio LB líquido com canamicina (40 μ g/mL), sendo feito também

um controle negativo contendo apenas meio e antibiótico, para identificação de qualquer contaminação cruzada. Os tubos foram incubados *overnight* em agitador orbital a 200 rpm e 37 °C. Por fim, a cultura de células obtida foi submetida a uma purificação do DNA plasmidial para obtenção do vetor pET-SUMO, utilizando o Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega®), conforme orientações do fornecedor. A quantificação do plasmídeo foi realizada em aparelho NanoDrop (ThermoScientific®).

4.1.2 Amplificação do inserto scFv-anti-CD19

A amplificação do gene scFv anti-CD19 foi feita a partir do estoque do vetor pUC-c-Myc-scFv-CD19, por meio de Reação em cadeia da polimerase (PCR). Para esta reação, foram utilizados *primers* específicos para a sequência do scFv anti-CD19, os quais foram desenhados para inserção dos sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III em cada extremidade do gene, estando destacados em vermelhos nas sequências abaixo.

CD19-SUMO-*forward*: 5' – ATC**GGATCC**GACATCCAGATGACCCAGAC – 3'

CD19-SUMO-*reverse*: 5' – GCG**AAGCTT**TTAAGAAGAAACGGTAACAG – 3'

Em tubo eppendorf de 0,2 mL foram adicionados 5 µL de tampão da enzima DNA polimerase Pfu, 1 µL da enzima DNA polimerase Pfu (1 U), 4 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's), 1 µL de *primer forward* (10 mM), 1 µL de *primer reverse* (10 mM), 1 µL de DNA (~20 ng) e 37 µL de água ultrapura, totalizando ao fim 50 µL. Para controle negativo foi feita uma reação substituindo o DNA por água ultrapura em volume equivalente.

Os parâmetros de programação utilizados no termociclador foram:

- 1) 95 °C por 2 minutos;
- 2) 95 °C por 30 segundos – desnaturação;
- 3) 58 °C por 30 segundos – anelamento;
- 4) 72 °C por 2 minutos – extensão;
- 5) 72 °C por 5 minutos.

As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 29 vezes, efetuando assim 30 ciclos no total. O produto de PCR obtido foi analisado através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente purificado através do Kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega®), seguindo as recomendações do fornecedor. A quantificação do gene foi realizada em aparelho NanoDrop (ThermoScientific®).

4.1.3 Digestão com enzimas de restrição

Ambas as reações de digestão dos scFv anti-CD19 utilizaram as enzimas de restrição *Bam*HI (Promega®) e *Hind*III (Promega®), sendo preparadas uma reação para o produto de PCR do scFv-CD19 e outra para c-Myc-scFv-CD19, além de uma para o vetor pET-SUMO, de modo que o vetor e os insertos obtivessem extremidades coesivas complementares.

As reações foram preparadas conforme recomendações do fabricante, em tubos eppendorf de 1,5 mL contendo:

- 2 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 10X;
- 2 µL do tampão E da enzima (Promega®);
- 1 µL (10 U) de *Bam*HI (Promega®);
- 1 µL (10 U) de *Hind*III (Promega®);
- Aproximadamente 1 µg de DNA (scFv-CD19, para c-Myc-scFv-CD19 ou pET-SUMO);
- Água ultrapura q.s.p. 20 µL.

Durante todo o procedimento as enzimas foram mantidas em um suporte gelado. Os tubos com as reações preparadas foram incubados a 37 °C por 3 horas e em seguida foram mantidos a 65 °C durante 15 minutos, para inativação das enzimas de restrição.

Para evitar a recircularização do vetor digerido, fazendo com que o vetor torne-se circular novamente, foi realizada posteriormente a desfosforilação do pET-SUMO, que consiste na retirada do grupo fosfato da região 5' da dupla fita. Desta forma, o vetor pET-SUMO digerido foi incubado com a enzima fosfatase alcalina SAP (Promega®) por 1 hora a 37 °C. A reação foi preparada em tubo eppendorf de 1,5 mL com 10 U da enzima, 2,5 µL de tampão 10X, 20 µL do produto da digestão e água ultrapura q.s.p. 25 µL. Após a incubação, a enzima é inativada a 65 °C por 15 minutos. Os produtos obtidos após a digestão e desfosforilação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. A banda referente ao vetor pET-SUMO linearizado e aos scFv anti-CD19 com e sem c-Myc foram excisadas do gel e purificadas com o Kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega®), seguindo as recomendações do fornecedor. A quantificação do vetor e insertos foi realizada em aparelho NanoDrop (ThermoScientific®).

4.1.4 Reação de ligação entre vetor e inserto

A reação de ligação do vetor pET-SUMO aos scFv anti-CD19 com e sem a *tag* c-Myc foi realizada em tubos eppendorf de 1,5 mL, os quais continham:

- Aproximadamente 100 ng de vetor;
- Aproximadamente 65 ng de inserto;
- 2 µL de tampão 10X da enzima T4 DNA ligase;
- 1 µL (1 U) da enzima T4 DNA ligase (Promega®);
- Água ultrapura q.s.p. 20 µL.

Também foi feito um controle negativo, o qual substituía o volume utilizado de inserto por água ultrapura. Os tubos foram incubados *overnight* a 4 °C e no dia seguinte, para interromper a reação de ligação, foram transferidos para um banho seco à 70 °C por 10 minutos. A razão molar inserto/vetor utilizada para o procedimento foi de 5:1.

A seguinte fórmula, sugerida pelo fabricante, foi utilizada para calcular a quantidade de inserto que foi adicionado a reação de ligação:

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

4.1.5 Transformação em *E. coli* TOP 10

Células da cepa de *E. coli* TOP 10 passaram por um processo de quimiocompetência, descrito no tópico 4.2, para estarem aptas para receber o plasmídeo contendo o gene de interesse, tanto o pET-SUMO-scFv-CD19 quanto o pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19. Após a quimiocompetência, as células TOP 10 foram transformadas por choque térmico, procedimento também detalhado nos tópicos seguintes. As células transformadas foram plaqueadas em 10 mL de meio LB-ágar contendo canamicina (40 µg/mL) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C *overnight*. O meio seletivo com antibiótico permite apenas o crescimento das colônias que conseguiram englobar os plasmídeos pET-SUMO-scFv-CD19 e pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19, os quais possuem um gene de resistência ao antibiótico utilizado no meio.

4.1.6 PCR de colônia

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de colônia é realizada para confirmar quais das colônias obtidas após o processo de transformação conseguiram de fato englobar o nosso plasmídeo. Primeiramente foram selecionadas algumas colônias que cresceram isoladamente nas placas em meio LB-ágar seletivo com canamicina (40 µg/mL), após o processo de transformação (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Em tubos eppendorf de 0,2 mL foram adicionados 23 µL do mix GenScript (mistura contendo tampão 10x, dNTP's, GenScript taq DNA polimerase e água ultrapura), 1 µL de *primer forward*, 1 µL de *primer reverse* e DNA, obtido por esfregação das colônias através da ponta de uma ponteira estéril, a qual foi submersa no tubo eppendorf. Para controle negativo foi feita uma reação com apenas a ponteira estéril sem a presença de DNA, e para o controle positivo foi utilizado um vetor pET-SUMO clonado com outro gene não relacionado.

Os parâmetros de programação utilizados no termociclador foram:

- 1) 95 °C por 2 minutos;
- 2) 95 °C por 30 segundos – desnaturação;
- 3) 55 °C por 30 segundos – anelamento;
- 4) 72 °C por 2 minutos – extensão;
- 5) 72 °C por 5 minutos.

As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 29 vezes, efetuando assim 30 ciclos no total. Os produtos de PCR obtidos foram analisados através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.1.7 Envio das amostras para sequenciamento

O miniprep é uma reação de extração e purificação do DNA plasmidial, realizada com a cultura da bactéria transformada, que contém o nosso plasmídeo com o DNA de interesse. As colônias selecionadas como positivas na PCR realizada foram inoculadas, separadamente, em 5 mL de meio LB com canamicina (40 µg/mL), antibiótico ao qual o plasmídeo possui gene de resistência, e incubadas a 37 °C em agitador orbital a 230 rpm *overnight*.

Com o pré-inóculo obtido foram realizados o minipreps, utilizando o Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega®) e seguindo o protocolo determinado pelo fabricante (PROMEGA, 2011). Em seguida, foi feita a quantificação dos plasmídeos, realizada

em aparelho NanoDrop (ThermoScientific®). As amostras foram alíquotadas em tubos eppendorf na concentração de aproximadamente 60 ng/μL, sendo enviadas em um volume de 10 μL em cada tubo para o sequenciamento na unidade da Fiocruz de Pernambuco, que utiliza o método de Sanger. Ao total foram enviadas 3 amostras de pET-SUMO-scFv-CD19, obtidas de diferentes colônias.

4.1.8 Teste de digestão

O teste de digestão foi realizado como uma evidência adicional da presença dos nossos genes de interesse (scFv-CD19 e c-Myc-scFv-CD19) no pET-SUMO extraído e purificado das colônias selecionadas, visto que já tinha sido realizado o sequenciamento do pET-SUMO-scFv-CD19. Este ensaio foi realizado com duas colônias selecionadas positivas para pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19. Em tubos eppendorf de 0,2 mL foram adicionados 2 μL de BSA 10X, 2 μL do tampão E da enzima (Promega®), 0,5 μL (10 U) de *Bam*HI (Promega®), 0,5 μL (10 U) de *Hind*III (Promega®), aproximadamente 300 ng de DNA (c-Myc-scFv-CD19) e água ultrapura q.s.p. 10 μL. A reação ocorreu por 1 hora a 37 °C, com a finalidade de avaliar, após corrida em gel de agarose 0,8%, a ocorrência de bandas correspondentes a presença do inserto e ao vetor parcialmente digerido.

4.2 Obtenção de células quimiocompetentes

As linhagens de células *Escherichia coli* Top10 e SHuffle foram submetidas a um protocolo de quimiocompetência (AZEVEDO *et al.*, 2003) para se tornarem hábeis para a reação de transformação. Para isso, colônias isoladas, obtidas previamente por uma cultura em placa de Petri por esgotamento, foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio *Luria Bertani* (LB) sem antibiótico e incubadas a 37 °C sobre agitação de 200 rpm *overnight*.

No dia seguinte, 1 mL dos pré-inóculos crescidos foram adicionados em 100 mL de meio LB e incubados a 37 °C em agitador orbital em 200 rpm até alcançar a densidade ótica (D.O.) a 600 nm de 0,4 a 0,6. O espectrofotômetro foi zerado com meio LB sem células para uma correta aferição da D.O. Quando a D.O. foi atingida, as culturas foram centrifugadas a 5000 xg por 10 minutos, descartando os sobrenadantes e ressuspensando os *pellets* de células cuidadosamente em 40 mL de MgCl₂ (0,1 M), previamente preparado e refrigerado.

Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a 4 °C e 3000 xg por 10 minutos, onde os sobrenadantes foram novamente descartados e os *pellets* ressuspensos em 2 mL de CaCl₂ (0,1 M), também gelado. As células, na sequência, foram deixadas em gelo por 20 minutos, e, logo após, adicionou-se 1 mL de glicerol 50%. Por fim, as amostras obtidas foram divididas em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL, previamente gelados, para serem armazenadas em freezer -80 °C.

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

Células quimiocompetentes da cepa de *E. coli* SHuffle foram utilizadas para a transformação (AZEVEDO *et al.*, 2003), onde as mesmas receberam o plasmídeo contendo o gene de interesse, tanto o pET-SUMO-scFv-CD19 quanto o pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19, para expressão dos scFv anti-CD19.

Para isso, foram utilizadas culturas em estoque da cepa quimiocompetente, as quais devem ser descongeladas em banho de gelo. Em um tubo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 10 µL de MgCl₂ (0,1 M), 5 µL de CaCl (0,1 M) e 1 µL de pET-SUMO-scFv-CD19 e em outro tubo 10 µL de MgCl₂ (0,1 M), 5 µL de CaCl (0,1 M) e 1 µL de pET-SUMO-c-Myc-scFvCD19, ao final completando o volume de cada tubo com água estéril q.s.p. 50 µL. Posteriormente, a cada tubo foram adicionados 50 µL de células SHuffle competentes e em seguida os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 minutos. O experimento foi realizado em duplicata e com controles negativos, onde a água foi adicionada ao invés do plasmídeo, em volume equivalente. Após os 30 minutos nos gelos, os tubos foram transferidos para banho seco a 42 °C, onde foram incubados por 1 minuto e, em seguida, 2 minutos no gelo novamente, causando assim o choque térmico.

Para a etapa de regeneração, foram adicionados 900 µL de meio LB às células e os tubos foram transferidos para um agitador orbital, onde ficaram submetidos a uma agitação de 200 rpm a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 3 minutos, onde, em seguida, descartou-se 950 µL do sobrenadante e os aproximadamente 50 µL restantes foram utilizados para ressuspender os *pellets* formados. Após homogeneizados, os 50 µL foram plaqueados em 10 mL de meio LB-ágar contendo canamicina (40 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C *overnight*.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é realizada para análise do DNA por meio da separação por peso molecular. Para corrida, foi preparado o gel de agarose 1%, com 1 g de agarose e 100 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) pH 8 1x. As amostras foram preparadas em tubos eppendorf de 0,5 mL, onde foram diluídas em tampão de amostra 5x (Loading Dye + GelRed™) de acordo com o volume final desejado e de forma que o tampão de amostra tenha concentração final de 1x (CARVALHO *et al.*, 2010). Para corrida de produtos de PCR de colônia foram utilizados 4 µL do tampão de amostra e 16 µL da amostra, com volume final de 20 µL. Utilizou-se também 7 µL de marcador com peso molecular de 1 Kb, para identificar o tamanho das bandas formadas na corrida. Os parâmetros utilizados na corrida foram de 80 V, 100 mA.

4.5 Expressão heteróloga dos scFv anti-CD19 com e sem a tag c-Myc

Para expressão do scFv anti-CD19 foram crescidas cepas de *E. coli* SHuffle transformadas com o pET-SUMO-scFv-CD19 e pET-SUMO-scFv-CD19-Myc, separadamente, em pré-inóculos contendo 5 mL de meio LB e canamicina (40 µg/µL), antibiótico ao qual os plasmídeos possuem o gene de resistência. Os pré-inóculos foram incubados em agitador orbital a 37 °C e 230 rpm *overnight*. Também foi feito um controle negativo, contendo apenas meio de cultura e antibiótico, para garantir que não houve contaminação durante o experimento.

Cada pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB com antibiótico canamicina (40 µg /µL) em erlenmeyers estéreis. Antes da inoculação, separou-se 1 mL do meio, já acrescido com antibiótico (canamicina), para utilizar como branco nas leituras da densidade ótica (D.O.) no espectrofotômetro. As culturas foram incubadas em agitador orbital a 37 °C e 250 rpm, sendo realizada a medida da D.O. a 600 nm até que esta atingisse 0,4 a 0,6 de absorbância. Após a D.O. ser alcançada, foi realizada a indução da expressão com isopropil-β-D-tiogalactopiranosose (IPTG), que foi adicionado as culturas para uma concentração final de 0,3 mM. As culturas foram então novamente incubadas em agitador orbital *overnight*, a 15 °C e 230 rpm. No dia seguinte, as culturas foram centrifugadas a 8.000 xg por 10 minutos, a 4° C, sendo ao final o sobrenadante descartado e os *pellets* armazenados a -20 °C.

Os *pellets* obtidos após a expressão foram ressuspensos em 20 mL de uma solução contendo tampão A (tampão de equilíbrio utilizado na cromatografia para purificação), 1% de

triton x-100 e 1mM do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF). Para lise celular, as amostras foram submetidas a sonicação em banho de gelo, configurada para utilizar uma amplitude de 10% com 5 segundos de sonicação e 80 segundos de intervalo, até completar 5 minutos totais de sonicação. O conteúdo sonicado foi centrifugado a 10.000 xg por 30 minutos e 4 °C, e depois os sobrenadantes foram filtrados com filtro de 0,22 µm, para então serem submetidos ao processo de purificação.

4.6 Purificação proteica por cromatografia de afinidade

A purificação dos scFv anti-CD19 foi realizada por cromatografia de afinidade por metal imobilizado em coluna HisTrap HP com volume de 1 mL, usando o sistema de cromatografia de fase líquida ÄKTA pure (GE HEALTHCARE, 2018). A coluna HisTrap HP possui em sua matriz níquel imobilizado, o que permite a sua interação com a cauda poli-histidina (His-tag) presente no complexo expresso His-tag-SUMO-N-terminal dos scFv anti-CD19. Para realizar a eluição das proteínas com cauda poli-histidina são utilizadas diferentes concentrações de imidazol, o qual compete pelos sítios de ligação com o níquel da matriz cromatográfica.

Foram utilizados os seguintes tampões, filtrados e sonicados previamente:

- Tampão A com 300 mM de NaCl, 50 mM de Tris, com pH 8,0;
- Tampão B: 300 mM de NaCl, 50 mM de Tris, 500 mM de Imidazol, com pH 8,0;

Inicialmente, todo o sistema e a coluna foram lavados com água Milli Q filtrada. Após, foi realizado o equilíbrio da coluna com aproximadamente 15 mL de tampão de lavagem (Tampão A), e em sequência a amostra foi injetada por bomba de fluxo, sendo programado um volume menor do que o total, a fim de evitar sucção de ar pelo sistema, com uma velocidade 0,5 mL/min. Após lavagem da amostra com tampão A, para eluição da nossa proteína, foi utilizado inicialmente um gradiente de concentração do tampão B, em uma faixa de 4 a 80%, seguido de um step com 100%. Conforme ocorre a eluição, as frações foram coletas em tubos de eppendorf de 2 mL.

Após a eluição, a coluna foi novamente equilibrada com tampão A, e, ao fim, tratada com água Milli-Q e etanol 20%, também filtrados e sonicados, sendo acondicionada sob refrigeração em etanol 20%. Todo o sistema ÄKTA também passou por esse tratamento, até estabilizar a condutividade e UV, sendo por fim condicionado em etanol 20%, para evitar qualquer contaminação microbiológica (GE HEALTHCARE, 2018).

O espectro em UV do aparelho indica em quais das frações de eluição está a proteína de interesse. Além das frações coletadas durante a eluição, também foi feita a coleta de uma alíquota da lavagem inicial da amostra com tampão A (*flow-through*) e uma alíquota da lavagem final da coluna com tampão A (*wash*), para enriquecer a análise na eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e verificar a qualidade da purificação.

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um ensaio realizado para análise de proteínas, por separação por tamanho, utilizado tanto para avaliar a qualidade da purificação bem como etapa prévia para o *Western blot*. Para ambos os casos foram utilizados géis de poliacrilamida 12,5%, com corrida em uma tensão de 120 V (CARVALHO *et al.*, 2010).

O gel de poliacrilamida é composto por duas partes, um gel de corrida (*lower*) com 12,5% de acrilamida, e um gel de empilhamento (*upper*) com 6% de acrilamida. Para o preparo de cada um foi seguida a fórmula:

- Gel de corrida ou *lower*: 3,3 mL de água; 2,5 mL de bisacrilamida 40%, 2 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8, 80 µL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), 85 µL de APS 10% (persulfato de amônio) e 8,5 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina);
- Gel de empilhamento ou *upper*: 2,9 mL de água, 0,75 mL de bisacrilamida 40%, 1,25 mL de tampão Tris 0,5 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 55 µL de APS 10% e 5,5 µL de TEMED.

Para serem aplicadas no gel, cada amostra passou por um tratamento prévio, onde foram diluídas em tampão 5X (composto por glicerol, β-mercaptoetanol e azul de Coomassie) em tubos eppendorf de 1,5 mL e aquecidas por 10 minutos a 100 °C em banho seco. Também foi aplicado 3 µL de solução de marcadores de pesos moleculares (TrueColor High Range P M Sinapse). Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie brilliant Blue G-250 para visualização das bandas.

4.8 Troca de tampão e clivagem da cauda SUMO

Após a purificação, o scFv fica armazenado em tampão de eluição, contudo, para análises biológicas, deve ser feita a troca de tampão para retirada do imidazol e clivagem da cauda SUMO, a qual pode interferir nos resultados. Primeiramente foi realizada a troca do

tampão de eluição para PBS 1x. Para isso, foi utilizada a metodologia de diafiltração, que além de permitir a troca de tampão, também concentra a proteína. As frações obtidas na purificação que demonstraram possuir bandas referentes aos scFv anti-CD19 com e sem a *tag* c-Myc no gel de poliacrilamida, foram diluídas em 500 mL de PBS e em seguida adicionadas aos poucos em filtros para centrífuga Amicon® Ultra, um tubo Falcon que possui um sistema com de filtração que retém proteínas maiores que o seu poro (10K MWCO - *Molecular weight cut-off*, em português Limite de Peso Molecular). O tubo foi centrifugado de 3000 xg a 4000 xg por tempo suficiente para que a solução inserida seja filtrada, mas que o filtro não fique seco. A solução que passou pelo filtro foi descartada e o restante da solução é inserida no tubo e submetida a centrifugação. O processo foi repetido até que restasse apenas cerca de 3 mL da solução original. Ao final, o produto obtido foi quantificado com o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

Após a troca de tampão, foi realizada a clivagem da cauda SUMO, uma reação que é catalisada pela enzima ULP1 Sumo-protease. Para isso, as amostras de scFv anti-CD19 obtidas após a troca de tampão foram incubadas com a ULP1 Sumo-protease *overnight* a 4 °C, em uma proporção de 1:20 (m/m) da ULP com a proteína de interesse. Em sequência a digestão com a ULP, deve ser realizado um novo passo cromatográfico, para purificação dos scFv sem a cauda SUMO. Desta forma, equilibrou-se o conteúdo da digestão com 500 µL de coluna His-Link por 1 hora em banho de gelo sob agitação. Após o tempo de incubação, foi realizada uma nova cromatografia de afinidade, desta vez executada em bancada. Por não possuírem mais a cauda SUMO, os scFv expressos não conseguem mais interagir com a matriz cromatográfica e, portanto, não são retidos. Os scFv foram coletados como pico não retido, monitorados por leitura de absorbância a 280 nm em cubeta de quartzo, até a linha de base. A cauda SUMO clivada foi eluída com 300 mM de imidazol e coletada para avaliação da digestão.

Ao final do procedimento, as frações coletadas, tanto dos scFv como da cauda SUMO clivadas, foram analisadas por SDS-PAGE e os scFv foram quantificados com o Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

4.9 Quantificação

Para a reação de digestão com ULP para clivagem da cauda SUMO é necessário quantificar a proteína presente na amostra, para que se possa utilizar a correta proporção de massas entre nossa proteína e a enzima ULP. Desta forma, após a troca de tampão foi realizado o ensaio proteico Pierce BCA (Pierce™ BCA Protein Assay kit), um teste baseado no ácido

bicinchonínico (BCA) para quantificação de proteínas por detecção colorimétrica. A reação utiliza como princípio a redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} promovida pela proteína em meio alcalino, em que quanto mais proteína, maior é a quantidade de Cu^{1+} formado. O BCA presente na reação, reage com o cátion de cobre reduzido (Cu^{1+}) e forma a cor púrpura, que se intensifica de acordo com a quantidade do íon. O complexo BCA- Cu^{1+} possui forte absorvância linear a 562 nm com concentrações crescentes de proteínas.

Primeiramente é necessário fazer uma curva padrão com BSA (Albumina Sérica Bovina) com o mesmo tampão onde a nossa proteína está solúvel. O BSA foi diluído em PBS 1x em concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Também foi feito um branco, contendo apenas o tampão PBS 1x. O procedimento foi realizado conforme manual do fabricante.

A partir da curva padrão criada, foram feitos os cálculos para determinação da quantificação. As amostras de SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19, bem como as amostras obtidas após a clivagem da cauda SUMO, foram feitas em duplicata.

4.10 Western blot com Anti-His tag

O *Western blot* foi realizado para confirmar, por imunodeteção, que as bandas observadas no gel de poliacrilamida de fato correspondem ao scFv anti-CD19 com e sem a tag c-Myc. Para isso, foi realizada, anteriormente, uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% na tensão de 120 V. Após a corrida, foi realizada a transferência das bandas de proteína para a membrana de nitrocelulose, por 13 minutos a 25 V e 2,5 A, com auxílio do aparelho Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, seguindo o protocolo do fabricante. Após o fim da transferência, a membrana foi incubada por 10 minutos com corante Ponceau S sob leve agitação, para confirmar a transferência das bandas de proteínas do gel para a membrana e verificar se pode ser dada continuidade ao experimento. Passados os 10 minutos, o corante foi recolhido e a membrana foi lavada com água destilada.

Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite bovino desnatado diluído em PBS-T (PBS + 0,05% Tween20), onde ela permaneceu submersa sob refrigeração *overnight* (AZEVEDO *et al.*, 2003). Em sequência, retirou-se a solução de leite e foram realizadas 3 lavagens, de 10 minutos cada, sob agitação e à temperatura ambiente com PBS-T. Após as lavagens, a membrana foi submersa em uma diluição de 1:5000 (v/v) do anticorpo anti-His-AP (Anticorpo anti-His tag conjugado com fosfatase alcalina) em PBS-T, conforme indicação do fornecedor, onde ela ficou incubada por 1 hora à temperatura ambiente e sob leve agitação,

tendo-se o cuidado de evitar o contato da solução com a luz. Em seguida, foram realizadas novamente 3 lavagens com PBS-T, similares às feitas anteriormente (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Após as 3 lavagens com PBS-T, foi feita mais uma lavagem com tampão APB, que também foi utilizado para revelação posteriormente. Em seguida, foi feito o preparo do substrato, onde foram diluídos 66 μL de NBT (nitro blue tetrazolium) em 10 mL de tampão APB e depois adicionados 33 μL de BCIP (fosfato de bromo cloroindolil). Com o substrato pronto, a membrana foi então incubada com ele, por 15 minutos sob leve agitação. A revelação ocorre entre 5 a 20 minutos, tempo máximo em que a membrana deve permanecer submersa no substrato.

4.12 Ensaio de estabilidade térmica

O ensaio de estabilidade térmica foi realizado por meio da emissão de fluorescência intrínseca das proteínas, a qual ocorre devido aos aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e fenilalanina. Destes, o triptofano é o que mais influencia no sinal, sendo o mais sensível à polaridade do solvente e às mudanças do microambiente da proteína (ALEXANDER, 2014). A sua excitação máxima ocorre em um comprimento de onda de 280 nm, com emissão de fluorescência máxima de 330 nm em um ambiente apolar e 350 nm em ambiente polar. Sob condições de aquecimento, os resíduos de triptofano presentes no núcleo hidrofóbico da proteína ficam expostos à água após a desnaturação ou desdobramento da proteína (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014). Com isso, o pico de emissão sofre um desvio, o que possibilita o monitoramento do nível de enovelamento da proteína.

Para o experimento foi utilizado o equipamento Tycho™ NT.6 (NanoTemper, Munich), que permite o monitoramento do desdobramento de proteínas e a determinação da sua estabilidade em diferentes microambientes, além de comprovar a viabilidade proteica de acordo com o tempo e condições de armazenamento. As amostras foram colocadas em capilares, em um volume de 10 μL , e inseridas no equipamento, onde são aquecidas de 35 °C a 95 °C, com rampa de 30 °C por minuto. Ao fim, o equipamento gera um gráfico com os valores de fluorescência e temperatura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Clonagem do gene do scFv anti-CD19 com e sem *tag* c-Myc em pET-SUMO

O plasmídeo purificado de pET-SUMO foi quantificado em aparelho Nanodrop, com concentração de 106,6 ng/μL. Para que o vetor possa integrar o inserto do gene de interesse, é necessário tratá-lo com enzimas de restrições, para obtenção do vetor linearizado com extremidades coesivas e complementares ao inserto.

Já o gene do scFv anti-CD19 foi obtido através de um vetor pUC-c-Myc-scFv-CD19, o qual possuía duas moléculas da *tag* c-Myc conectadas sequencialmente ao N-terminal do domínio V_L do scFv. O scFv presente no vetor possuía um *linker* formado por (G₄S)₃ ligando a porção C-terminal do V_L à porção N-terminal do V_H (Figura 8). Para amplificação do gene scFv-CD19 presente no vetor pUC foi realizada uma PCR, utilizando primers desenhados especificamente para anelarem-se às sequências do gene de interesse, além de adicionarem às extremidades dessa sequência os sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, de forma a possibilitar a correta introdução do inserto no vetor pET-SUMO. O produto de PCR obtido foi analisado através de uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1%, purificado e quantificado. Foi obtida uma concentração de 83,2 ng/μL do gene scFv-CD19.

Figura 8 – Sequência dos 262 resíduos de aminoácidos codificados pelo gene c-Myc-scFv-CD19



Fonte: Elaborado pela autora. Sequência do gene c-Myc-scFv-CD19, contendo duas sequências seguidas da *tag* c-Myc (10 aminoácidos cada), ligada ao N-terminal da estrutura V_L-*linker*-V_H (242 aminoácidos).

Outra estratégia bastante utilizada consiste no tratamento direto do vetor de clonagem com enzimas de restrição, as mesmas utilizadas para digerir o vetor de expressão. Essa foi a abordagem utilizada para a obtenção do gene c-Myc-scFv-CD19. O vetor pUC-c-Myc-scFv-CD19 foi transformado em cepa *E. coli* TOP 10, cultivado em meio seletivo com antibiótico e purificado. Foi realizada uma quantificação em aparelho Nanodrop, resultando em uma

concentração de 139,2 ng/ μ L de pUC-c-Myc-scFv-CD19.

Após a obtenção de todos os insertos e do vetor, foram realizadas as reações de digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, seguidas por uma reação de ligação com DNA ligase. Os vetores pET-SUMO-scFv-CD19 e pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19 foram transformados em cepa de clonagem *E. coli* TOP 10, cultivados em meio seletivo e purificados. Para o scFv-CD19, foram obtidas cinco colônias positivas, das quais foram selecionadas três para serem enviadas ao sequenciamento (Tabela 2).

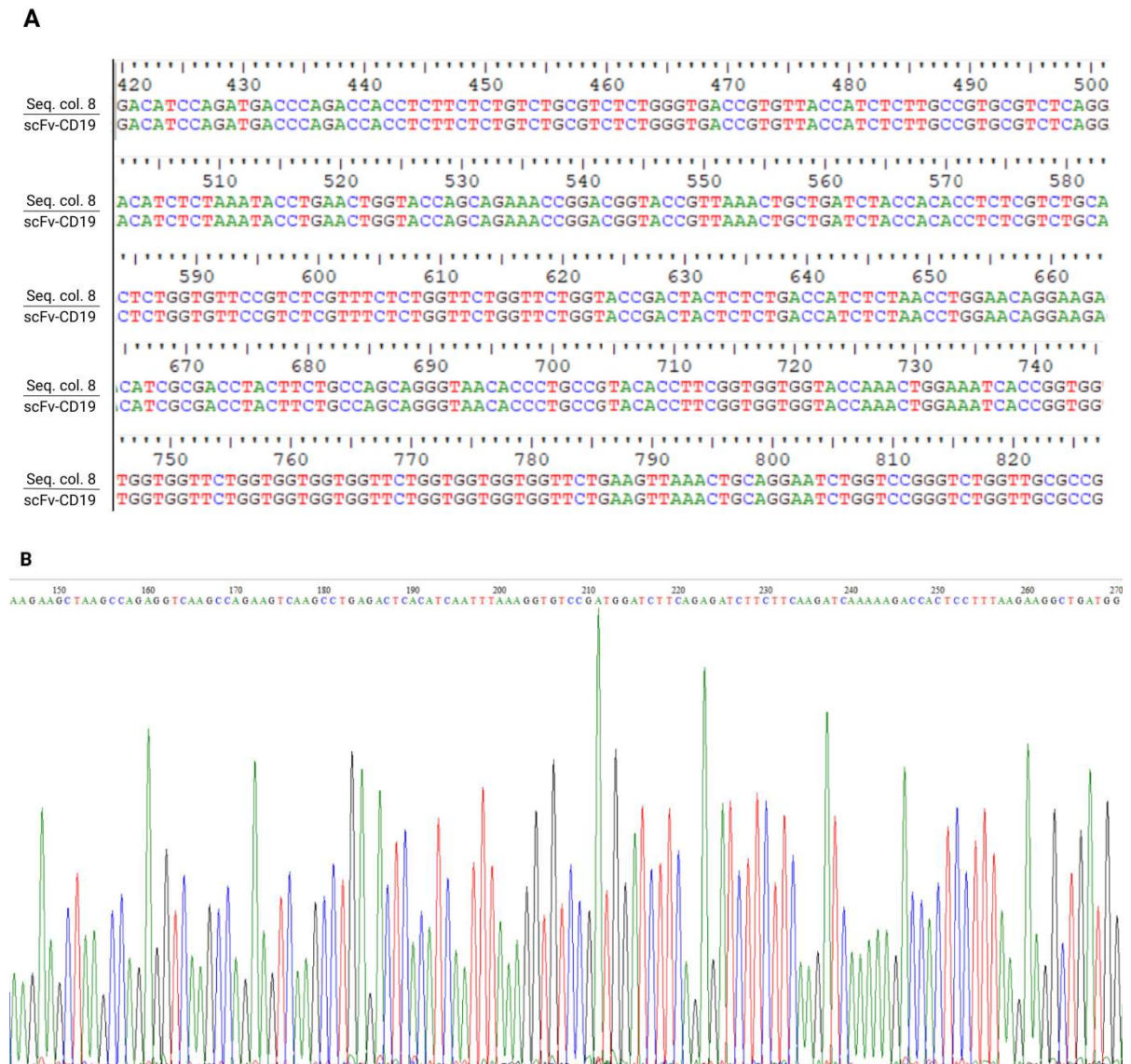
Tabela 2 – Amostras do vetor pET-SUMO-scFv-CD19 enviadas para sequenciamento

Colônias	Concentração obtida	Concentração da alíquota enviada (10 μ L)
1	102,6 ng/ μ L	61,56 ng/ μ L
3	111,7 ng/ μ L	67,02 ng/ μ L
8	381,3 ng/ μ L	76,26 ng/ μ L

Fonte: Elaborada pela autora.

O sequenciamento é realizado para confirmar que houve correta inserção do gene de interesse no vetor pretendido. Os resultados obtidos foram analisados no *software* Bioedit®, com auxílio da ferramenta de alinhamento *Clustal W*. Um trecho do alinhamento entre a sequência do DNA plasmidial pET-SUMO-scFv-CD19 e a sequência original do scFv derivado do FMC63 pode ser observado na figura 9, que também apresenta um trecho do eletroferograma do sequenciamento como evidência da sua qualidade. A sequência apresentada na figura pertence a amostra da colônia 8, a qual foi utilizada para o prosseguimento do trabalho e execução da expressão.

Figura 9 – Alinhamento das sequências e eletroferograma



Fonte: Elaborado pela autora. (A) Trecho do alinhamento entre a sequência original do scFv-CD19 derivado do anticorpo FMC63 e a sequência obtida após a clonagem do gene (col. 8). (B) Trecho do eletroferograma do sequenciamento da colônia 8.

Para o c-Myc-scFv-CD19, foram obtidas duas colônias positivas (Tabela 3), das quais foi escolhida a colônia 1 para seguir com o trabalho. Não foi realizado sequenciamento do pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19, visto que o sequenciamento realizado para pET-SUMO-scFv-CD19 pode ser utilizado como um indicativo de que a subclonagem do vetor pUC não apresentou mutações no gene do scFv anti-CD19. Como indício adicional foi realizado um teste de digestão com as duas colônias positivas para c-Myc-scFv-CD19, em que foi comprovado a presença do gene de interesse no vetor pET-SUMO.

Tabela 3 – Quantificação das amostras do vetor pET-SUMO-c-Myc-scFv-CD19

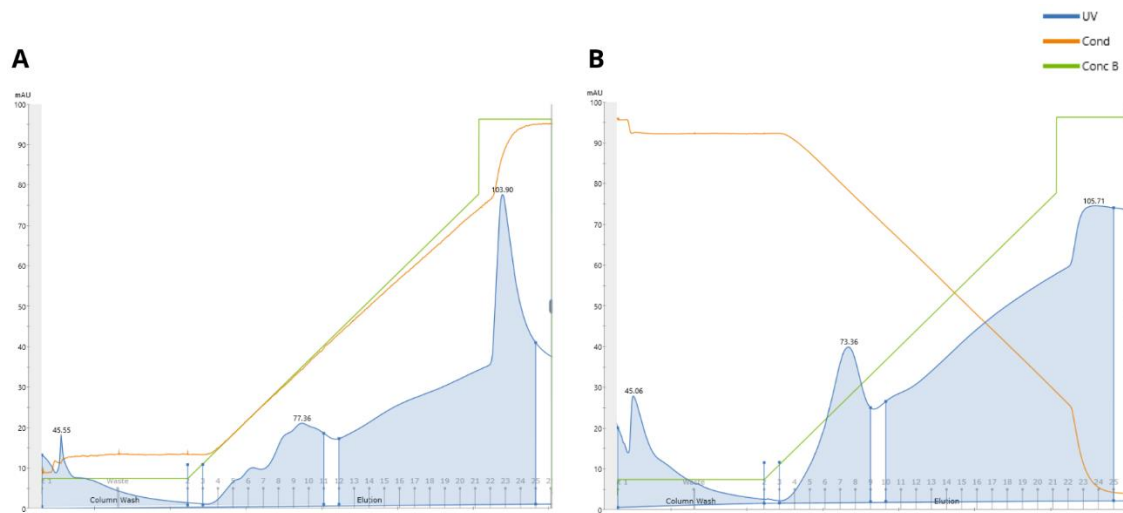
Colônias	Concentração obtida
1	226 ng/ μ L
2	220,3 ng/ μ L

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Expressão e purificação do scFv anti-CD19 com e sem tag c-Myc em *E. coli* SHuffle

Durante o trabalho foram realizadas duas expressões, ambas utilizando as colônias 1 e 8, correspondentes ao c-Myc-scFv-CD19 e scFv-CD19 respectivamente. Primeiramente, foi realizada uma expressão com 300 mL de meio LB para cada scFv. As purificações foram realizadas com concentração linear do tampão B (tampão com 500 mM de imidazol), variando de 4% a 80% com um *step* de 100% (Figura 10). As frações obtidas durante a purificação foram analisadas em gel de SDS PAGE 12,5%.

Figura 10 – Curvas de absorbância das purificações dos scFv anti-CD19 da primeira expressão

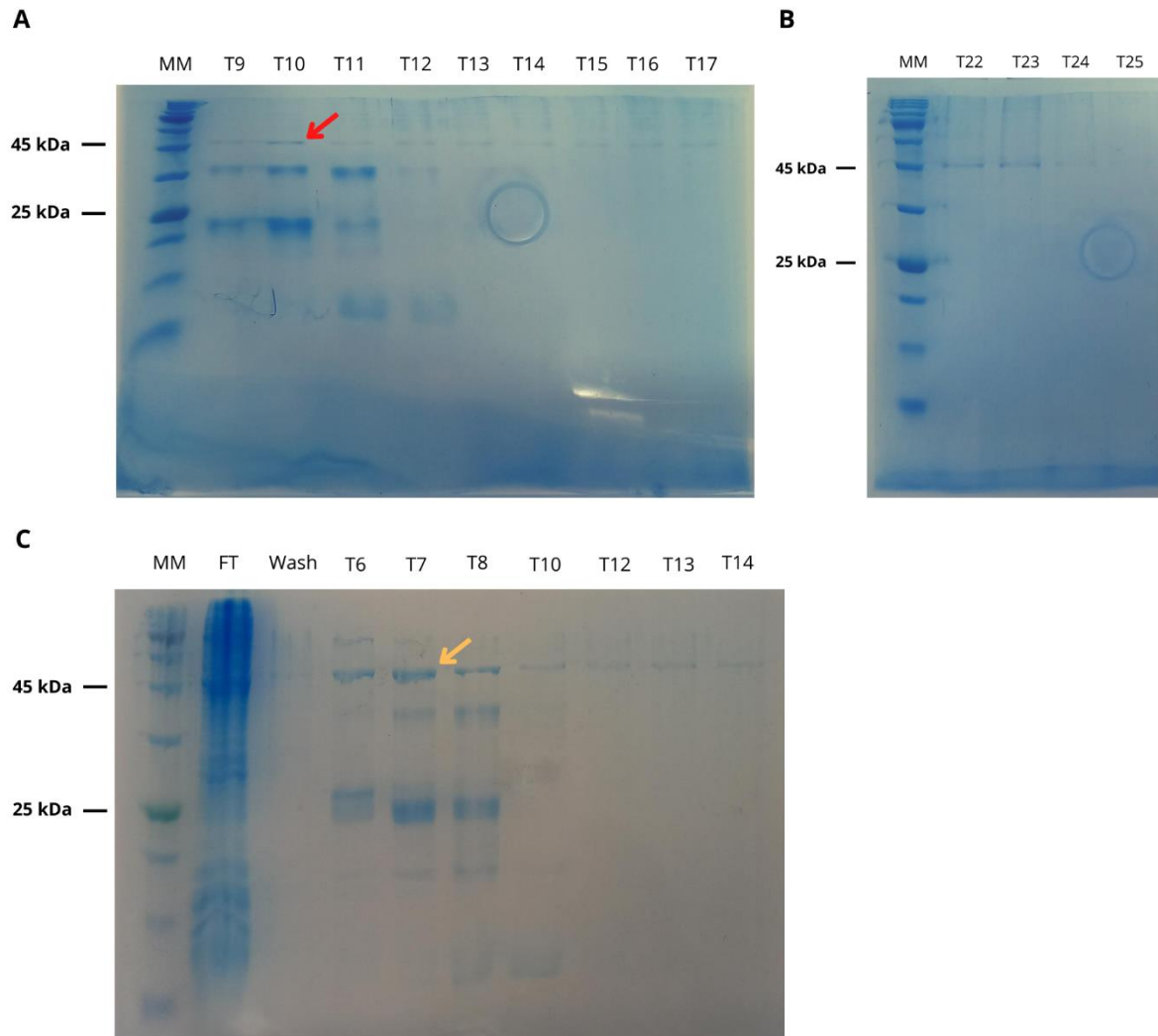


Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Curvas obtidas durante o processo de purificação, onde a linha azul é referente a UV em mAU, a linha laranja representa a condutividade e a linha verde a concentração do tampão B. (A) Curva referente a purificação do SUMO-scFv-CD19. (B) Curva referente a purificação do SUMO-c-Myc-scFv-CD19.

Foram selecionados para serem analisados nos géis além das frações, o *flow-through* e *wash*, já que se tratava da primeira purificação. A proteína scFv possui aproximadamente 26 kDa e a cauda SUMO cerca de 16 kDa, enquanto cada tag c-Myc tem 1,2 kDa. Dessa forma,

eram esperadas bandas de ~42 kDa para SUMO-scFv-CD19 e ~45 kDa para SUMO-c-Myc-scFv-CD19 (Figura 11).

Figura 11 – Géis de SDS-PAGE das purificações dos scFv anti-CD19 obtidos com a primeira expressão



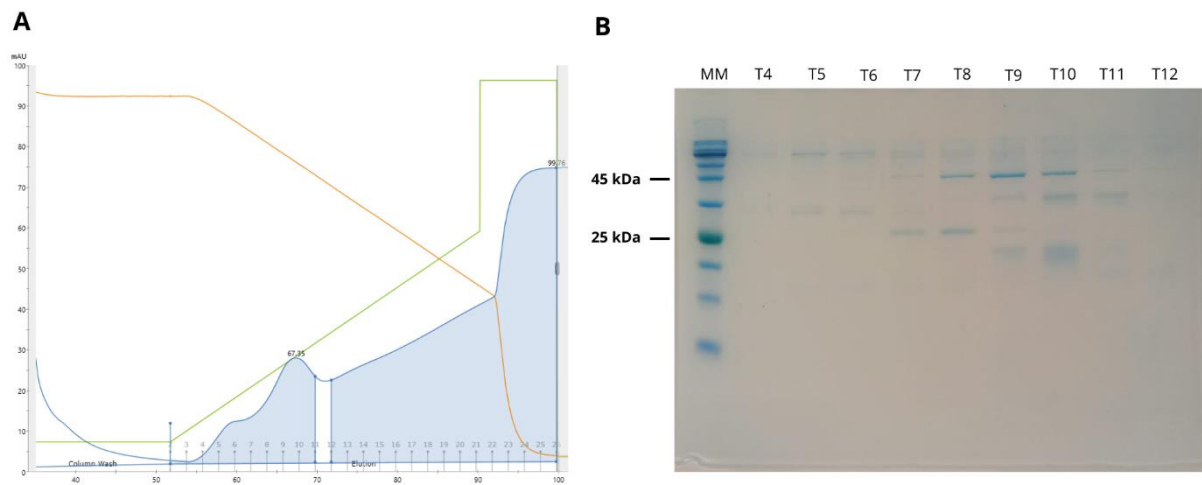
Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Géis SDS-PAGE 12,5%. MM: marcador de peso molecular (TrueColor); FT: flow-through. (A e B) Gel referente a purificação do SUMO-scFv-CD19. A seta vermelha indica a banda do SUMO-scFv-CD19 purificado. (C) Gel referente a purificação do SUMO-c-Myc-scFv-CD19. A seta amarela indica a banda do SUMO-c-Myc-scFv-CD19 purificado.

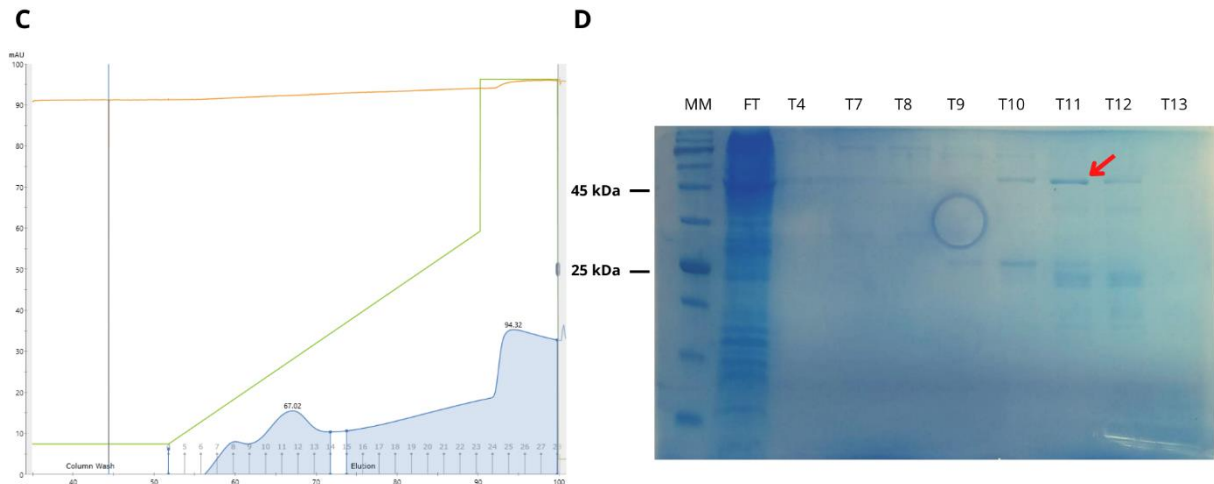
Na purificação do SUMO-scFv-CD19 a curva obtida demonstrou um pico mais achatado na fração 9, o qual foi confirmado no gel de poliacrilamida, que apresenta uma discreta banda próximo à altura de 45 kDa. Além dessa banda, também é possível observar outras de tamanhos menores na mesma alíquota, as quais podem ser resultantes da purificação com gradiente linear e removidas em uma outra purificação com *steps*. Um pico pode ser visto na

fração 22, eluído em uma concentração de 100% de tampão B, onde, após análise do gel, também se verifica a presença de SUMO-scFv-CD19 em uma concentração bem menor, o que não representa uma perda significativa. Em relação à purificação do SUMO-c-Myc-scFv-CD19, o pico formado foi mais definido, estando mais concentrado na fração 7, que também apresentou uma banda correspondente à proteína no gel. Esta também apresentou o mesmo problema da outra, possuindo diferentes bandas na mesma alíquota, em que também se assumiu a mesma explicação do ocorrido anteriormente. Para confirmação da expressão dos scFv anti-CD19 foi realizado um *Western blot* com algumas frações destas primeiras purificações (Figura 16).

A fim de otimizar o processo de purificação foi realizada a segunda expressão com 500 mL de meio LB, onde se dividiu o produto obtido em quatro frações de 125 mL cada. As purificações feitas em seguida (Figura 12), utilizando apenas 125 mL do expresso e um intervalo menor para o gradiente de concentração de B (4% a 60% e um *step* com 100%), definido com base nos resultados obtidos nas purificações anteriores.

Figura 12 – Resultados obtidos com a segunda expressão e purificação dos scFv anti-CD19



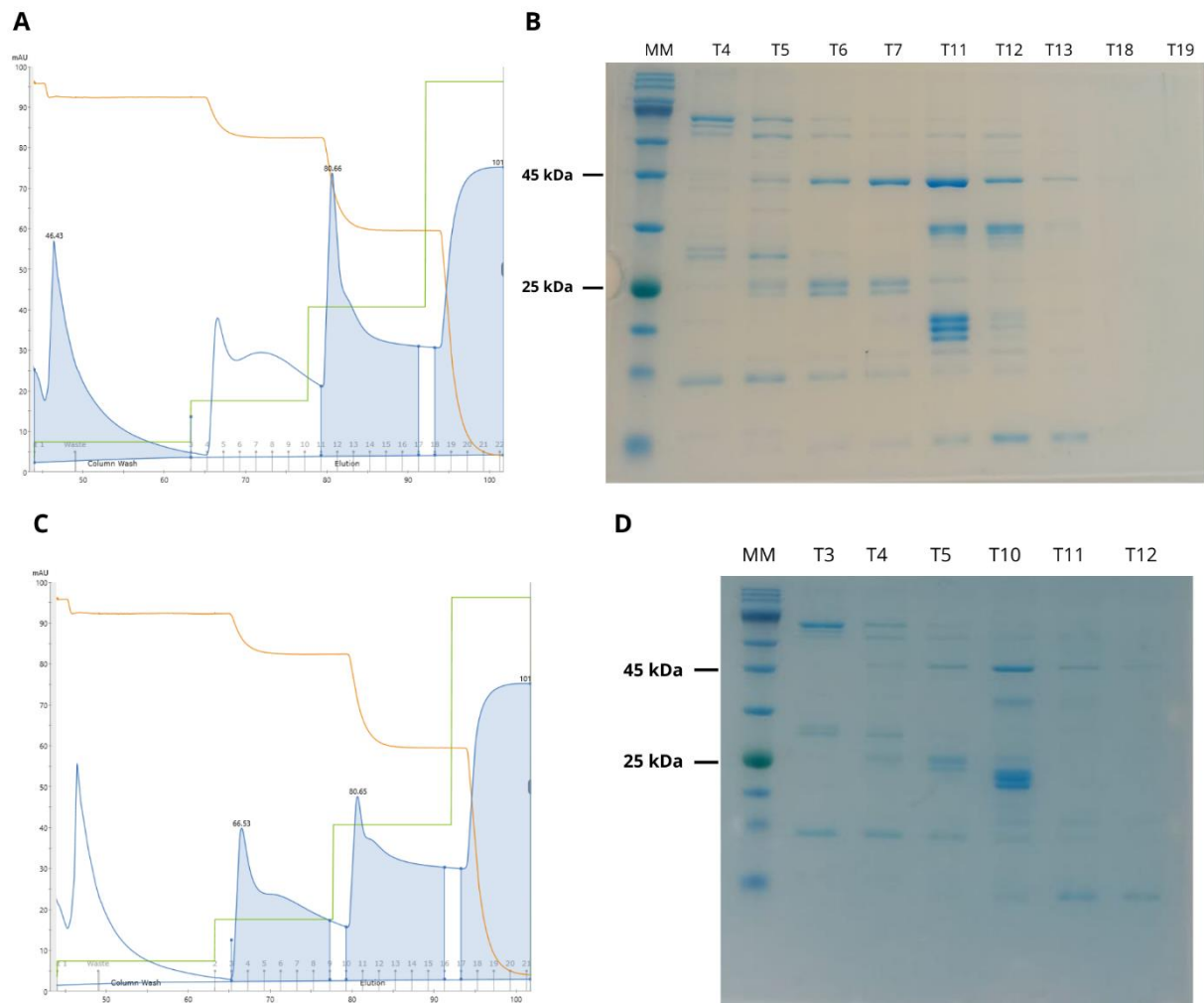


Fonte: Elaborada pela autora. (A e B) Curva e gel SDS-PAGE 12,5% referentes a purificação do SUMO-scFv-CD19 com gradiente de 4 a 60%. (C e D) Curva e gel SDS-PAGE 12,5% referentes a purificação do SUMO-c-Myc-scFv-CD19 com gradiente de 4 a 60%. A seta vermelha indica a banda do SUMO-c-Myc-scFv-CD19 purificado.

Analisando as curvas obtidas, nota-se uma diminuição da concentração em relação à primeira, o que já era esperado devido à redução do volume do expresso utilizado para purificação. Os picos obtidos foram mais definidos que os anteriores, devido ao menor gradiente de concentração utilizado, que melhorou a resolução da cromatografia, auxiliando na decisão dos *steps* utilizados nas purificações seguintes. O pico em 100% de imidazol presente na purificação anterior do SUMO-scFv-CD19 não foi observado novamente nesta segunda purificação. Os géis apresentaram bandas mais fortes aproximadamente na altura de 45 kDa justamente nas frações próximas e referentes aos picos. As frações inespecíficas de tamanhos diferentes persistiram presentes nos géis, levantando a hipótese de que estas eram resultado da degradação da proteína, ponto discutido mais à frente no tópico referente ao ensaio de *western blot* com anticorpo anti-His *tag*.

Após análise do padrão apresentado nas purificações anteriores, a última purificação foi realizada com *steps* de 15, 40 e 100% de concentração de tampão B (Figura 13). A amostra purificada para cada scFv anti-CD19 corresponde a todo o restante obtido na última purificação, ou seja, 375 mL de cultura. Foi possível observar a formação de picos mais definidos nas curvas de UV obtidas e um padrão similar de bandas nos géis, que além de apresentar a banda correspondente aos scFv próxima à altura de 45 kDa, também exibiram outras bandas.

Figura 13 – Resultados obtidos com a purificação dos scFv anti-CD19 com steps de 15, 40 e 100%



Fonte: Elaborada pela autora. (A e B) Curva e gel SDS-PAGE 12,5% referentes a purificação do SUMO-scFv-CD19 com *steps* em 15, 40 e 100%. (C e D) Curva e gel SDS-PAGE 12,5% referentes a purificação do SUMO-c-Myc-scFv-CD19 com *steps* em 15, 40 e 100%.

A principal hipótese para explicar a presença destas bandas é a degradação da ~~nessa~~ proteína. A suspeita inicialmente foi que durante o processo de sonicação a sonda utilizada, por possuir um diâmetro grande e, por consequência, promover uma sonicação muito vigorosa, esquentava demais a amostra, ocasionando a degradação de parte das proteínas expressas. Desta forma, o protocolo de sonicação foi atenuado ao decorrer das purificações (Tabela 4) e observou-se se o banho de gelo utilizado durante o processo não estava sendo suficiente para manter a amostra refrigerada.

Tabela 4 – Parâmetros utilizados no protocolo de sonicação em cada uma das purificações realizadas

Purificação	Amplitude	<i>On</i>	<i>Off</i>	Tempo total*
1°	15%	5 segundos	40 segundos	15 minutos
2°	15%	5 segundos	40 segundos	5 minutos
3°	10%	5 segundos	80 segundos	5 minutos

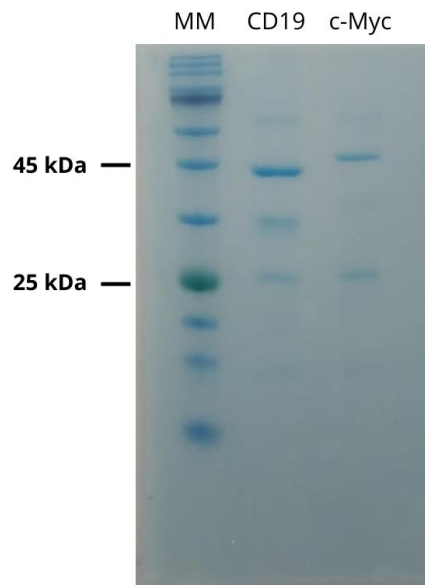
Fonte: Elaborada pela autora. *O tempo total se refere ao tempo em que a sonda permanece emitindo vibrações (*On*), os intervalos entre os pulsos (*Off*) não são contabilizados.

5.3 Clivagem da cauda SUMO e purificação

Após o processo de purificação é necessário realizar a troca do tampão em que a proteína purificada se encontra, para retirada do imidazol, que pode interferir nos outros ensaios a serem realizados. Para isso, foi empregada a metodologia de diafiltração, com auxílio de uma coluna Amicon com filtro poroso de 10K MWCO (*Molecular weight cut-off*, ou Limite de Peso Molecular, em português). Nesta técnica, uma solução contendo a proteína diluída no novo tampão é filtrada por meio da pressão de centrifugação, passando pelo filtro apenas as moléculas menores. Assim, é feita a separação das proteínas solúveis presentes na solução, ficando retido no filtro apenas a nossa proteína, de maior tamanho molecular.

Após o processo de ultrafiltração, as amostras obtidas de SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19 foram analisadas por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (Figura 14). Nota-se que após a troca de tampão por ultrafiltração houve uma redução das bandas inespecíficas de impurezas em ambas as amostras, restando ainda algumas, as quais podem ser removidas com o processo de clivagem da cauda SUMO. É interessante observar que o gel permite visualizar de forma clara a pequena diferença de peso molecular entre o SUMO-scFv-CD19 (~42 kDa) e SUMO-c-Myc-scFv-CD19 (~45 kDa), em que a amostra contendo a *tag* c-Myc possui uma banda um pouco mais elevada do que a amostra do scFv anti-CD19 sem a *tag*.

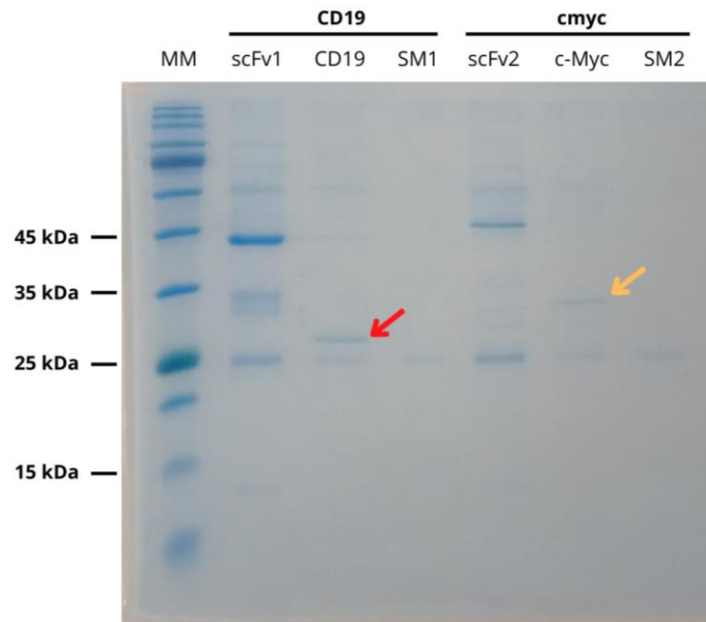
Figura 14 – Gel SDS-PAGE 12,5% de SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19 em tampão PBS 1x



Fonte: Elaborada pela autora. Gel SDS-PAGE 12,5% após a troca de tampão para PBS 1x. Em CD19 podemos observar uma banda próxima à altura de 45 kDa, referente ao SUMO-scFv-CD19. Em c-Myc, observa-se uma banda um pouco mais elevada em relação à anterior, referente ao SUMO-c-Myc-scFv-CD19.

As amostras obtidas após a troca de tampão (3 mL cada), foram digeridas com a enzima ULP1 Sumo-protease, purificadas e analisadas em SDS-PAGE 12,5% (Figura 15). Se baseando em ensaios realizados anteriormente no laboratório com outros scFv de trabalho, foi presumido que a permanência da cauda SUMO na estrutura da proteína, embora contribua para maior solubilidade da molécula durante a expressão, poderia interferir nos resultados obtidos, reduzindo a estabilidade e atividade do scFv, podendo ainda interagir com outras moléculas utilizadas nos ensaios, o que pode gerar falsos positivos ou falsos negativos. Deste modo, foi reservado uma alíquota de 500 μ L de SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19 para comparação em teste de estabilidade térmica e testes futuros de capacidade de ligação. Além disso, a clivagem da SUMO foi realizada com o intuito de reduzir as impurezas ainda presentes nas amostras, mesmo após a troca do tampão por dialofiltração.

FIGURA 15 – Gel SDS-PAGE após a clivagem da cauda SUMO



Fonte: Elaborada pela autora. MM: Marcador de peso molecular (TrueColor); scFv1: SUMO-scFv-CD19 antes da clivagem da cauda SUMO; CD19: scFv-CD19 após a clivagem da cauda SUMO; SM1: Cauda SUMO clivada do scFv-CD19; scFv2: SUMO-c-Myc-scFv-CD19 antes da clivagem da cauda SUMO; c-Myc: c-Myc-scFv-CD19 após a clivagem da cauda SUMO; SM2: Cauda SUMO clivada do c-Myc-scFv-CD19. A seta vermelha indica a banda referente ao scFv-CD19 sem SUMO e a seta amarela o c-Myc-scFv-CD19, também sem a cauda.

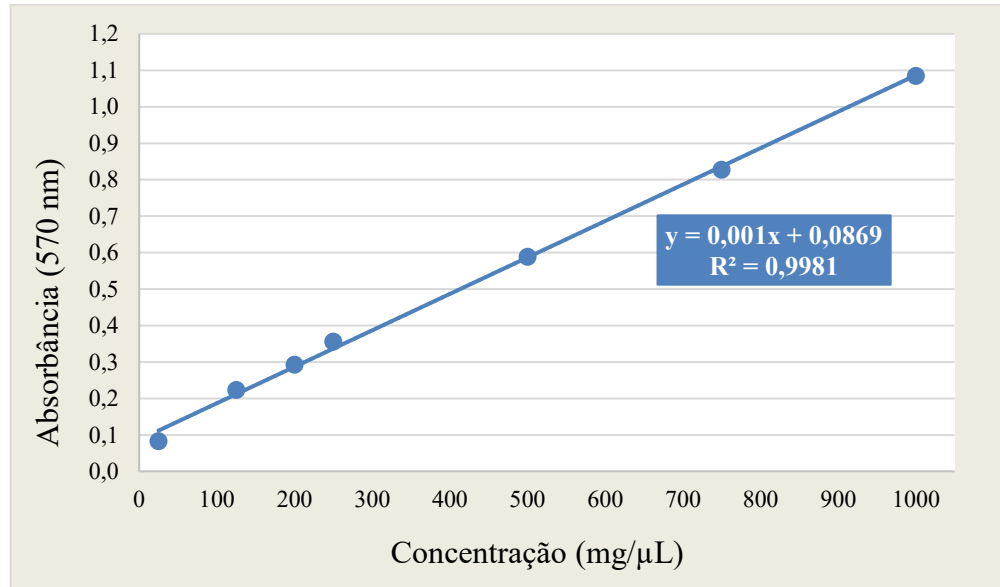
Analisando o gel da figura 15, podemos notar a presença de uma banda na altura de aproximadamente 25 kDa na amostra do scFv-CD19 (~26 kDa) após a clivagem da cauda SUMO, referente à proteína sem a cauda. A banda do scFv anti-CD19 com a *tag* c-Myc pode ser visualizada um pouco mais elevada, em uma altura aproximada de 35 kDa, referente ao c-Myc-scFv-CD19 (~29 kDa), que é um pouco mais pesado que o outro devido a *tag*. A ausência de uma banda na altura de 45 kDa, peso aproximado do scFv com SUMO, em ambas as amostras coletadas após a clivagem da cauda SUMO, demonstra que o processo de clivagem foi bem sucedido.

5.4 Quantificação e rendimentos

Após a troca de tampão para retirada do imidazol, foi realizada uma quantificação das proteínas através do Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific), nos quais a cauda SUMO ainda estava presente. Também foi realizada outra quantificação dos scFv anti-CD19 após a clivagem com a proteína ULP Sumo-protease, utilizando o mesmo método. Para calcular as concentrações das amostras, foi feita uma curva padrão com BSA (Albumina de Soro

Bovino) (Gráfico 1), a qual obteve um R^2 de 0,9981.

Gráfico 1 – Curva padrão de BSA



Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores obtidos em cada quantificação estão representados na tabela 5. Com base na concentração de cada scFv, foi realizado o cálculo de rendimento da expressão, com resultados apresentados em mg de proteína por litro de cultura de expressão (Tabela 5).

Tabela 5 – Quantificações e rendimentos dos fragmentos de anticorpo (scFv) anti-CD19 expressos e purificados

Proteínas	Quantificação (μg/mL)	Rendimento (mg/L)
SUMO-scFv-CD19	226,1	1,81
SUMO-c-Myc-scFv-CD19	130,6	1,04
scFv-CD19	85,6	0,80
c-Myc-scFv-CD19	42,1	0,34

Fonte: Elaborada pela autora.

O rendimento calculado se refere à quantidade de proteína solúvel presente na amostra após todo o processamento, considerando a quantidade gerada durante a expressão pela bactéria e as perdas durante os processos de purificação, estas sendo bastante significativas quando comparados os rendimentos antes e após a clivagem da cauda SUMO. Em comparação com os rendimentos obtidos atualmente na expressão de outros scFv de estudo do nosso grupo de

pesquisa, os valores alcançados neste trabalho se assemelham à média alcançada, tendo em vista que o grupo ainda está buscando padronizar as expressões e purificações nas novas instalações e equipamentos do laboratório. Além disso, podemos encontrar dados na literatura com valores de rendimento próximos para a expressão de scFv, como apresentado em Sonoda *et al.* (2010), que obteve 2,7 mg/L de scFv utilizando estratégias de expressão similares às utilizadas neste trabalho. Contudo, é válido ressaltar que essa faixa varia, sendo possível encontrar também artigos com rendimentos bem superiores, como Zarschler *et al.* (2013) e Gaciarz *et al.* (2016), que utilizaram uma cepa modificada de SHUFFLE para expressão de scFv e obtiveram rendimento superior a 200 mg/L, e Ye *et al.* (2008) e Liu *et al.* (2015), que também utilizaram o pET-SUMO como vetor de expressão e obtiveram resultados melhores. Isso demonstra que é de suma importância a padronização de parâmetros para cada proteína para que haja otimização do processo como um todo, desde a escolha da cepa e vetor a serem utilizados até as condições de purificação e armazenamento.

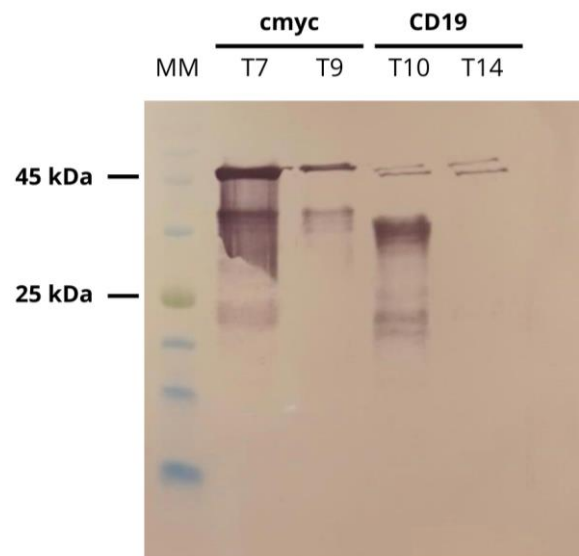
5.5 Western blot

Foi realizado um ensaio de *Western blot* para confirmação de que as bandas obtidas nos géis de SDS-PAGE de fato eram referentes aos SUMO-scFv-CD19 e SUMO-c-Myc-scFv-CD19. Para isso, utilizou-se uma membrana de nitrocelulose e um anticorpo anti-His tag, capaz de se ligar à cauda de poli-histidina (6x-His) presente no complexo His-tag-SUMO-N-terminal de ambos os scFv expressos.

O anticorpo utilizado era conjugado à fosfatase alcalina (AP), uma enzima bastante empregada como marcador em ensaios de imunodeteção, cuja função é possibilitar a identificação da ligação entre o anticorpo anti-His tag e a proteína. Para que haja a emissão de algum sinal, a enzima conjugada necessita de um substrato cromogênico, como a associação de NBT e BCIP, os quais foram utilizados na metodologia executada.

Aplicando estes princípios, foi possível determinar se as bandas obtidas próximas à altura de 45 kDa pertenciam aos scFv anti-CD19. A membrana de nitrocelulose revelada pode ser observada na figura 16. Nesta, é possível visualizar, além das bandas de ~45 kDa, outras bandas inespecíficas marcadas, correspondentes a algumas das bandas de impurezas presentes nos géis.

Figura 16 – *Western blot* com anticorpo anti-His tag



Fonte: Elaborada pela autora. Membrana de nitrocelulose após revelação com NBT/BCIP com amostras de scFv-CD19 e c-Myc-scFv-CD19 obtidas com a primeira expressão e purificação.

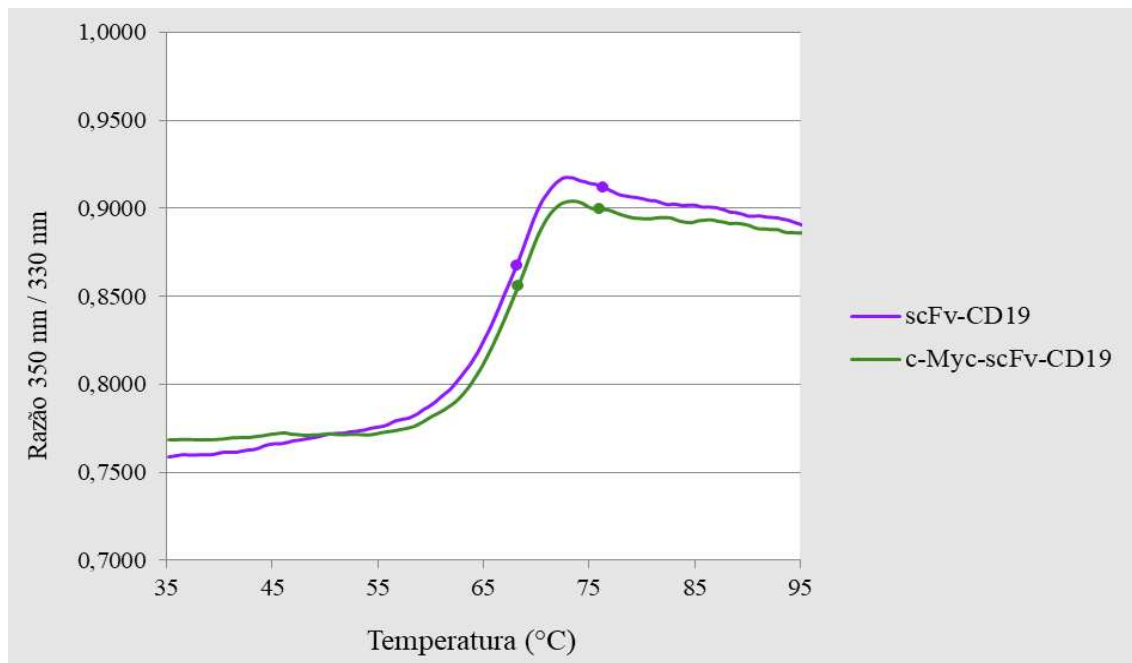
Esse dado pode ser um indício de que essas outras bandas de fato tratam-se de resíduos de degradação da nossa proteína de interesse, visto que o anticorpo anti-His tag também foi capaz de reconhecer essas bandas, indicativo de que elas possuem resquícios de uma cauda poli-histidina. Para confirmação, poderia ser realizado um outro *Western blot* com a proteína L-HRP. A proteína L conjugada a peroxidase HRP (*horseradish peroxidase*) é uma proteína recombinante, derivada da bactéria *Peptostreptococcus magnus*, que possui a capacidade de se ligar com alta afinidade à região variável das cadeias leve do tipo *kappa* 1, 3 e 4 das imunoglobulinas, além de reconhecer também fragmentos de anticorpos, como o scFv, já que a estrutura mantém parte da cadeia leve.

Para retirada dessas bandas inespecíficas, já que se trata de proteínas de peso molecular menor a 45 kDa podem ser utilizadas algumas estratégias. Uma delas é a dialofiltração, em que foi feita a separação de proteínas por membrana filtrante com poros de tamanho específico que retém as proteínas de maior peso molecular. Outra abordagem que também foi utilizada para remoção das proteínas indesejadas é a clivagem da cauda SUMO, onde a proteína obtida é digerida pela enzima ULP1 Sumo-protease e submetida a outro processo de purificação por cromatografia de afinidade.

5.6 Ensaio de estabilidade térmica

Os perfis obtidos para o scFv-CD19 e o c-Myc-scFv-CD19 no ensaio de estabilidade térmica realizado podem ser visualizados no gráfico 2. Ambos os scFv anti-CD19 expressos apresentaram um perfil similar de estabilidade térmica, com temperatura de inflexão média de 68 °C e 76 °C. Isso demonstra que a *tag* c-Myc não interferiu na estabilidade da estrutura do scFv anti-CD19 de forma significativa.

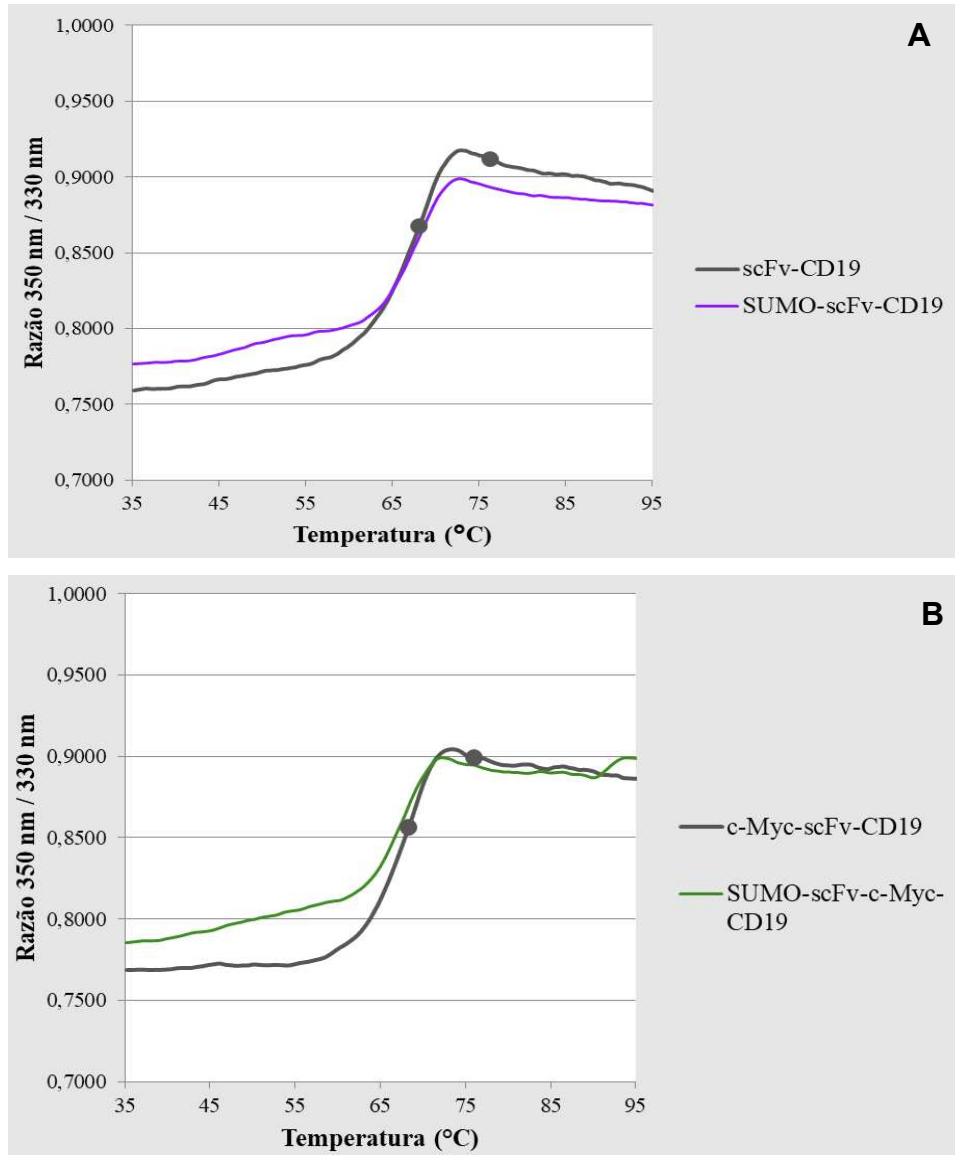
Gráfico 2 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência do scFv-CD19 e c-Myc-scFv-CD19



Fonte: Elaborada pela autora.

Também foi realizado um ensaio com as proteínas obtidas antes da clivagem da cauda SUMO (Gráfico 3), para comparação dos perfis e verificação da influência da SUMO na estabilidade térmica dos scFv. A diferença obtida entre os scFv com e sem a cauda SUMO não foi significativa, estando os valores de temperatura de inflexão obtidos bem próximos (gráfico 4).

Gráfico 3 – Perfis comparativos de emissão de fluorescência dos scFv antes e após a clivagem da cauda SUMO



Fonte: Elaborada pela autora. (A) Perfil comparativo de emissão de fluorescência entre scFv-CD19 com e sem a cauda SUMO. (B) Perfil comparativo de emissão de fluorescência entre c-Myc-scFv-CD19 com e sem a cauda SUMO.

É importante ressaltar que as temperaturas obtidas neste ensaio se assemelham bastante às obtidas em outros testes realizados com os scFv de trabalho do nosso grupo de pesquisa. Essa pequena variação entre perfis provavelmente acontece devido à similaridade das estruturas e seqüências proteicas. Rofo *et al.* (2021) realizou estudos de estabilidade térmica de anticorpos

com o mesmo aparelho utilizado neste trabalho, onde dois dos anticorpos analisados apresentaram temperaturas de inflexão ligeiramente mais baixas devido à presença de scFv em suas extremidades N-terminais. Os valores mais baixos apresentados por scFv, principalmente quando em comparação com anticorpos que são estruturalmente mais complexos, se devem à maior susceptibilidade dos scFv a mudanças térmicas. Anticorpos completos costumam apresentar valores de temperatura de inflexão próximos a 80 °C (CHOI *et al.*, 2019; ROFO *et al.*, 2021). Estes valores mais elevados podem ser atribuídos a diversos fatores, como a quantidade reduzida de aminoácidos aromáticos na sequência proteica, que diminui a fluorescência emitida, ou o local onde esses resíduos se encontram, que pode torná-los menos disponíveis para interação (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho permitiu a percepção de que com o sistema heterólogo escolhido é possível expressar e purificar as moléculas de scFv anti-CD19 com e sem a *tag* c-Myc com sucesso, identificando a presença dos scFv nas amostras expressas através de *Western blot*, o qual apresentou bandas de proteína marcadas na altura prevista, correspondentes ao seu peso molecular esperado. Além disso, o ensaio de estabilidade térmica também demonstrou que a adição da *tag* c-Myc a estrutura do scFv anti-CD19 não interferiu na estabilidade da proteína. Por meio deste ensaio, percebe-se que as moléculas expressas possuem uma boa estabilidade, similar ao que é esperado para um scFv. Contudo, apesar dos avanços alcançados, o processo demonstra a necessidade de algumas melhorias, visando a otimização da expressão e obtenção de um rendimento maior, além da padronização da purificação, de forma que se consiga uma amostra mais pura com menos perdas durante o processo, sem degradação de proteínas.

Os resultados obtidos com este estudo possibilitam a realização posterior de outros ensaios mais completos, tendo como perspectiva a determinação da capacidade de ligação dos fragmentos variáveis (scFv) expressos ao antígeno CD19, a fim de verificar se a inserção da *tag* c-Myc interfere de forma negativa nesta ligação. Também se objetiva futuramente a realização de um ensaio quantitativo para determinação da constante de afinidade do fragmento de anticorpo gerado. Para isto, será utilizado o equipamento Octet96red (Sartorius®), o qual possibilita aferir a cinética de interação dos anticorpos com o antígeno por meio da técnica de interferometria.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. *Imunologia celular e molecular*. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABSOLUTE ANTIBODY. **Antibody fragments**. A. Disponível em: <<https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/>>. Acesso em: 11 maio 2022.
- ABSOLUTE ANTIBODY. **Antibody Isotypes & Subtypes**. Disponível em: <<https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/antibody-isotypes-subtypes/>>. Acesso em: 11 maio 2022.
- AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B.; HAMID, M. scFv antibody: principles and clinical application. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, n. 980250, 2012.
- AJOREK, K. A.; KUHN, M. L.; CHRUSZCZ, M.; ANDERSON, W. F.; MINOR, W. Double trouble-Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. **Protein Sci.**, v. 23, n.10, p. 1359-1368, 2014.
- ALEXANDER, C. G. et al. Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2241-2250, 2014.
- ANDRADE, V.; SAWADA, N. O.; BARICHELLO, E. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Rev Esc Enferm USP**. v. 47, n. 2, p. 355-61, 2013.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. *Técnicas básicas em Biologia Molecular*. 1ed. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003.
- BEZERRA, M. R. L. et al. CAR-T Cells and Other Related Technologies. *In*: SCHMIDT, C. W. P.; OTONI, K. M. **The Golden Guide to Oncologic Pharmacy**. 1ed. Springer Cham, Jan. 2022. p. 281-314.
- CARTELLIERI, M.; et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Immunotherapy of Cancer. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- CARUSO, H. G.; HURTON, L. V.; NAJJAR, A.; et al. Tuning Sensitivity of CAR to EGFR Density Limits Recognition of Normal Tissue While Maintaining Potent Antitumour Activity. **Cancer Research**, v. 75, n. 17, p. 3505–3518, 2015. American Association for Cancer Research Inc.
- CARVALHO, C. V; RICCI, G.; AFFONSO, R. *Guia de Práticas em Biologia Molecular*. 1ed. São Paulo: Yendis Editora, 2010.
- CHMIELEWSKI, M.; HOMBACH, A.; HEUSER, C.; ADAMS, G. P.; ABKEN, H. T cell

activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. **J. Immunol**, v. 173, p. 7647–7653, 2004.

CHOI, J. *et al.* Antigen-binding affinity and thermostability of chimeric mouse-chicken IgY and mouse-human IgG antibodies with identical variable domains. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

CHROMOTEK. Myc-tag: An epitope tag for protein characterization, protein interaction analysis, and purification. Disponível em:

<<https://resources.chromotek.com/blog/myc-tag-an-epitope-tag-for-protein-characterization-protein-interaction-analysis-and-purification>>. Acesso em: 14 de jun. de 2022.

CHU, F.; CAO, J.; NEELALPU, S. S. Versatile CAR T-cells for cancer immunotherapy. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 22, p. 73-80, 2018.

FISCHER, J. *et al.* CD19 Isoforms Enabling Resistance to CART-19 Immunotherapy Are Expressed in B-ALL Patients at Initial Diagnosis. **J Immunother**, v. 40, p. 187-195, 2017.

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

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

GHORASHIAN, S.; KRAMER, A.M.; ONUOHA, S. *et al.* Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. **Nature Medicine**. v. 25, p. 1408-1414, 2019.

GUEDAN, S.; CALDERON, H.; POSEY, A. D. Jr.; MAUS, M. V. Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. **Molecular therapy. Methods & clinical development**, v.12, p. 145-156, 2018.

HAN, D.; *et al.* Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Hematological Malignancies. **Journal of Cancer**, v.12, n. 2, p. 326-334, 2021.

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

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Ministério da saúde. Rio de Janeiro, 2019.

INCA. **Tipos de câncer.** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>>. Acesso em: 05 maio 2022.

KOCHENDERFER, J. N.; SOMERVILLE, R. P. T.; LU, T. *et al.* Long-duration complete remissions of diffuse large B cell lymphoma after anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell therapy. **Mol Ther**, v. 25, p. 2245–2253, 2017.

- LANA, A. P. et al. Cost analysis of Cancer in Brazil: a population-based study of patients treated by public health system from 2001-2015. **Value in Health Regional Issues**, v. 23, p. 137-147, 2020.
- LI, W.; QIU, S.; CHEN, J.; JIANG, S.; CHEN, W.; JIANG, J.; WANG, F.; SI, W.; SHU, Y.; WEI, P.; FAN, G.; TIAN, R.; WU, H.; XU, C.; WANG, H. Chimeric Antigen Receptor Designed to Prevent Ubiquitination and Downregulation Showed Durable Antitumor Efficacy. **Immunity**, v. 53, n. 2, p. 456–470, 2020.
- LI, X.; DING, Y.; ZI, M.; SUN, L.; ZHANG, W.; CHEN, S.; XU, Y. CD19, from Bench to Bedside. **Immunology Letters**, v. 183, p. 86-95, 2017.
- LIU, X.; JIANG, S.; FANG, C.; YANG, S.; OLALERE, D.; PEQUIGNOT, E. C.; COGDILL, A. P.; LI, N.; RAMONES, M.; GRANDA, B. Affinity-tuned ErbB2 or EGFR chimeric antigen receptor T cells exhibit an increased therapeutic index against tumors in mice. **Cancer Research**, v. 75, p. 3596–3607, 2015.
- LIU, Z.; ZHANG, J.; FAN, H.; *et al.* Expression and purification of soluble single-chain Fv against human fibroblast growth factor receptor 3 fused with Sumo tag in Escherichia coli. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 302–306, 2015.
- MADDEN, S. K.; DE ARAUJO, A. D.; GERHARDT, M. et al. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. **Mol Cancer**, v. 20, n. 3, 2021.
- MOHAMMADI, M.; NEJATOLLAHI, F.; SAKHTEMAN A.; ZAREI N. Insilico analysis of three different tag polypeptides with dual roles in scFv antibodies. **Journal of Theoretical Biology**, v. 402, p. 100–106, 2016.
- MOOT, R.; RAIKAR, S. S.; FLEISCHER, L.; QUERREY, M.; TYLAWSKY, D. E.; NAKAHARA, H.; DOERING, C. B.; SPENCER, H. T. Genetic engineering of chimeric antigen receptors using lamprey derived variable lymphocyte receptors. **Molecular therapy oncolytics**, v. 3, n. 16026, 2016.
- NEELAPU, S. S.; LOCKE, F. L.; BARTLETT, N. L. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. **N Engl J Med.**, p. 2531–2544, 2017.
- NUNOYA, J. I.; MASUDA, M.; YE, C.; SU, L. Chimeric Antigen Receptor T Cell Bearing Herpes Virus Entry Mediator Co-stimulatory Signal Domain Exhibits High Functional Potency. **Molecular therapy oncolytics**, v. 14, p. 27–37, 2019.
- OHAD HAMMER. CD19 as an attractive target for antibody-based therapy. **mAbs**, v. 4, p. 571-577, 2012.
- ORLANDO, E. J. *et al.* Genetic mechanisms of target antigen loss in CAR19 therapy of acute lymphoblastic leukemia. **Nature Medicine.**, v. 24, p. 1504–1506, 2018.
- PROTEINTECH. **ChromoTek Myc VHH, recombinant binding protein**. Disponível em: <<https://www.ptglab.com/products/Myc-VHH-recombinant-binding-protein-yt.htm>>. Acesso em: 14 de jun. de 2022.

PORTER, D. L. *et al.* Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. **Sci Transl Med.**, v. 7, 2015.

ROFO, F. *et al.* Novel multivalent design of a monoclonal antibody improves binding strength to soluble aggregates of amyloid beta. **Translational neurodegeneration**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2021.

SCHÜCHNER, S.; BEHM, C.; MUDRAK, I.; OGRIS, E. The Myc tag monoclonal antibody 9E10 displays highly variable epitope recognition dependent on neighboring sequence context. **Science signaling**, v. 13, n. 616, 2020.

SCHUSTER, S. J.; SVOBODA, J.; DWIVEDY NASTA, S., *et al.* Sustained remissions following chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. **Blood**, p. 126-183, 2015.

SHINICHI SATO. CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity. **Journal of Dermatological Science**, v. 22, p. 1–10, 1999.

SOMMERMEYER, D.; HILL, T.; SHAMAH, S. M.; *et al.* Fully human CD19-specific chimeric antigen receptors for T-cell therapy. **Leukemia**, v. 31, n. 10, p. 2191–2199, 2017.

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

SUBKLEWE, M.; VON BERGWELT-BAILDONA, M.; HUMPE, A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. **Transfus Med Hemother**, v. 46, p. 15–24, 2019.

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

TEPLYAKOV, A.; OBMOLOVA, G.; LUO, J.; GILLILAND, G. L. Crystal structure of B-cell co-receptor CD19 in complex with antibody B43 reveals an unexpected fold. **Proteins**, v. 86, n. 5, p. 495–500, 2018.

TERPE K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523–533, 2003.

TURTLE, C. J.; HANAFI, L. A.; BERGER, C. *et al.* CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. **J Clin Invest.**, p. 2123–2138, 2016.

VAN DER STEGEN, S. J.; HAMIEH, M.; SADELAIN, M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 14, p. 499-509, 2015.

VANDEMOORTELE, G.; EYCKERMAN, S.; GEVAERT, K. Pick a Tag and Explore the Functions of Your Pet Protein. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1078-1090, 2019.

WANG, K.; WEI, G.; LIU, D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. **Experimental Hematology & Oncology**, 2012.

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

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnology journal**, v. 7, n. 5, p. 620–634, 2012.

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

ZHAO, X.; LI, G.; LIANG, S. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. **Journal of analytical methods in chemistry**, v. 2013, n. 581093, 2013.

ZOLA, H.; MACARDLE, P. J.; BRADFORD, T.; WEEDON, H.; YASUI, H.; KUROSAWA, Y. Preparation and characterization of a chimeric CD19 monoclonal antibody. **Immunol. Cell Biol.**, v. 69, p. 411-422, 1991.