



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Luísa Valério Franca

**Minimização da agregação proteica de fragmentos de anticorpos de
cadeia única (scfv) com aplicação em terapias de células CAR-T**

BRASÍLIA

2025

Luísa Valério Franca

**Minimização da agregação proteica de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv)
com aplicação em terapias de células CAR-T.**

Dissertação apresentada para Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) da Universidade de Brasília, como exigência para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Profª. Dra. Andrea Queiroz Maranhão
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

BRASÍLIA

2025

AGRADECIMENTOS

Esta é a última seção da minha dissertação que eu escrevi. Inesperadamente, foi a mais difícil e demorada de escrever. Talvez porque seja a parte mais íntima de todo esse documento. Não me entenda mal, não foi difícil por falta de gratidão – na verdade, há várias pessoas às quais sou eternamente grata por terem me ajudado durante esses dois (longos) anos de mestrado. A realidade é que eu não sei como sintetizar, em uma só página, a montanha-russa de sentimentos que vivenciei no Lab 01.

Em primeiro lugar, eu quero agradecer a minha família. Minha mãe Adriana, meu pai Wilton, minha irmã Leh; aos meus avós, tios, tias e primos. Obrigada por serem minha família. Um obrigada especial para o Duck (meu filhote), para a Luna, o Lino e a Neji (os cachorrinhos na família) e para a gatinha Tina.

Eu também quero agradecer as amigadas que me acompanharam durante essa jornada. A comunidade dentro do laboratório é impressionante: completos desconhecidos que se juntam numa grande família, unidos pelo desejo comum de fazer ciência (independente dos obstáculos diversos e do financiamento insuficiente). Agradeço a Loteria da Babilônia, que me ensinou que é possível acertar um *jackpot* de vez em quando, mesmo que o prêmio acumulado seja parcialmente consumido pelo tempo.

Ah, e o que falar das Ratazanas do Lab 01? O que mais vou sentir falta é das nossas conversas divertidas – e censuráveis, cá entre nós – que aconteciam na copa. Nos intervalos entre experimentos, o departamento era tomado por risadas altas (de quem ri na cara do desespero) e pelo cheiro de um cafézinho passado na hora. E no mais? Um salve pros meus queridos amigos do pilotis!

Agradeço aos meus professores, principalmente a prof. Andrea e o prof. Marcelo, por terem me ensinado o que é ser uma pesquisadora. Agradecimentos extras à prof. Janice e ao prof. Aisel, por sua ajuda inestimável. Também cabe agradecer à UnB, que foi a minha segunda casa durante os últimos sete anos. Vou além, agradeço infinitamente à universidade pública por me proporcionar as vivências e as experiências imprescindíveis para meu crescimento profissional e (especialmente) meu crescimento pessoal.

Por fim, eu agradeço a “eu” de sete anos atrás. Agradeço por ter confiado que chegaríamos em algum lugar. Se cheguei ou não, eu não sei – mas, com certeza, caminhei até um lugar novo. E continuarei caminhando...

“Provação. Agora entendo o que é provação. Provação: significa que a vida está me provando. Mas provação: significa que eu também estou provando. E provar pode se transformar numa sede cada vez mais insaciável.”

– A Paixão Segundo G.H., Clarice Lispector

“No fim das contas, é disso mesmo que deveríamos ser feitos: de trocas, compartilhamento de expectativas, astúcias, desafios inventados, sanidade de corpos miúdos que se arriscam em gangorras, balanços, escorregas. A meninada malandra sabe que a vida não é feita da gente ou do outro; mas da gente e do outro; com o outro.”

– Crônicas Exusíacas e Estilhaços Pelintras, Luiz Antônio Simas.

“A Companhia, com modéstia divina, evita toda publicidade [...] e provoca toda espécie de conjecturas. Uma insinua abominavelmente que há séculos não existe a Companhia e que a sacra desordem das nossas vidas é puramente hereditária, tradicional; [...]

Outra, não menos vil, argumenta que é indiferente armar ou negar a realidade da tenebrosa corporação, porque a Babilônia não é outra coisa senão um infinito jogo de acasos.”

– A Loteria da Babilônia, Jorge Luis Borges

“Assim como os músicos, os matemáticos e os atletas de elite, os cientistas atingem o auge cedo e declinam rápido. Não é a criatividade que se esvai, é a energia: a ciência é um esporte de resistência. Para produzir aquele único experimento esclarecedor, mil experimentos não esclarecedores têm de ser jogados no lixo; é uma batalha entre a natureza e a determinação. [...] Não se trata de perfeição, mas apenas do incansável e sedento empenho de um organismo para estar à altura do seu ambiente. Esse é o motor que impele a evolução.”

– O Gene, Siddhartha Mukherjee

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Mieloma Múltiplo.....	3
1.2 Tratamentos contra Mieloma Múltiplo.....	7
1.3 Imunoterapia com anticorpos terapêuticos.....	8
1.3.1 Anticorpos anti-BCMA.....	11
1.4 Terapia Celular com Receptor Quimérico de Antígeno (CAR-T).....	13
1.4.1 Exaustão de células CAR-T: agregação molecular.....	16
1.4.2 Otimização de fragmentos de anticorpos para imunoterapias.....	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	19
2.1 Justificativa.....	19
2.2 Objetivo geral.....	19
2.3 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Desenho dos fragmentos de anticorpo scFv.....	21
3.1.1 Humanização dos fragmentos de anticorpo anti-BCMA.....	22
3.1.2 Harmonização dos scFvs: Análise de agregação in silico.....	24
3.2 Linhagens celulares.....	25
3.2.1 Células bacterianas.....	25
3.2.2 Cultura de células eucarióticas.....	26
3.3 Transformação bacteriana por choque térmico.....	27
3.4 Extração de DNA plasmidial.....	28
3.5 Quantificação dos ácidos nucleicos purificados.....	28
3.6 Digestão com enzimas de restrição.....	29
3.7 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose.....	29
3.8 Expressão heteróloga dos scFvs em E. coli.....	30
3.8.1 Seleção de clones produtores.....	30
3.8.2 Padronização da expressão.....	30
3.8.3 Indução da expressão heteróloga por IPTG em maior escala.....	31
3.9 Extração de proteínas citoplasmáticas.....	32
3.9.1 Extração por método enzimático.....	32
3.9.2 Extração por método físico.....	32
3.10 Obtenção dos scFvs anti-BCMA purificados.....	33
3.10.1 Purificação por Cromatografia de Afinidade.....	33

3.10.2	Concentração e diálise dos scFvs purificados.....	34
3.11	Análise de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante.....	35
3.11.1	Coloração do gel por Comassie Blue.....	36
3.11.2	Coloração do gel por Nitrato de Prata.....	36
3.12	Imunodeteção por Western Blotting.....	37
3.13	Quantificação de proteínas purificadas.....	37
3.13.1	Por fluorimetria.....	37
3.13.2	Por Espectrofotometria.....	38
3.14	Exclusão Molecular.....	38
3.14.1	Padronização da Coluna de Cromatografia.....	39
3.14.2	Fracionamento por Exclusão Molecular.....	39
3.15	Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS).....	40
3.16	Citometria de Fluxo.....	41
4.	RESULTADOS.....	43
4.1	Predição in silico do perfil de agregação dos scFvs anti-BCMA.....	43
4.2	Otimização da expressão heteróloga dos scFvs em E. coli.....	44
4.2.1	Obtenção de linhagens de E. coli transformadas.....	44
4.2.2	Comparativos das condições de cultivo celular.....	46
4.3	Padronização da Obtenção dos scFvs anti-BCMA recombinantes.....	49
4.3.1	Comparativo das condições de extração.....	49
4.3.2	Otimização da purificação por Cromatografia de Afinidade.....	51
4.4	Escalonamento da produção dos scFvs.....	55
4.4.1	Produção em escala de 100 mL.....	55
4.4.2	Produção em escala de 200 mL.....	57
4.5	Análise do Perfil de Agregação por Exclusão Molecular.....	60
4.5.1	Padronização da cromatografia.....	60
4.5.2	Exclusão Molecular dos scFvs anti-BCMA.....	61
4.6	Análise do perfil de agregação por Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS).....	62
4.6.1	Padronização inicial do protocolo.....	62
4.6.2	Estudo da influência das concentrações dos scFvs na agregação.....	65
4.7	Capacidade de Ligação ao BCMA por Citometria de Fluxo.....	71
4.7.1	Citometria com a linhagem celular Raji.....	71
4.7.2	Citometria com a linhagem celular U266.....	73
4.7.2.1	Avaliação inicial de ligação em células tumorais.....	73
4.7.2.2	Análise do reconhecimento antigênico em função da concentração dos anticorpos recombinantes.....	76
5.	DISCUSSÃO.....	79
6.	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Impacto global do mieloma múltiplo.....	4
Figura 2: Previsão do impacto do mieloma múltiplo até 2050.....	5
Figura 3: Estrutura dos fragmentos de cadeia única (scFv).....	9
Figura 4: Expressão do BCMA durante ontogenia dos linfócitos B.....	11
Figura 5: Imunoterapias contra mieloma múltiplo.....	12
Figura 6: Estrutura do anticorpo J22.9-xi e interação com o BCMA.....	13
Figura 7: Influência da sinalização tônica na exaustão de células CAR-T.....	17
Figura 8: Representação esquemática do vetor pET-SUMO com scFv anti-BCMA Murino..	22
Figura 9: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do scFv anti-BCMA murino.....	23
Figura 10: Esquema da síntese dos vetores plasmidiais.....	25
Figura 11: Etapas iniciais da produção em sistema bacteriano.....	31
Figura 12: Probabilidade de agregação dos scFvs.....	44
Figura 13: Perfil de restrição dos vetores de expressão dos scFvs recombinantes.....	45
Figura 14: Produção do scFv Murino.....	47
Figura 15: Produção do scFv Humanizado.....	47
Figura 16: Produção do scFv Harmonizado.....	48
Figura 17: Produção do scFv Caótico.....	49
Figura 18: Otimização da extração das proteínas heterólogas.....	50
Figura 19: Avaliação da purificação do scFv Murino por IMAC.....	52
Figura 20: Avaliação da purificação de scFv Humanizado por IMAC.....	53
Figura 21: Análise da purificação em pequena escala dos scFvs Murino e Humanizado.....	55
Figura 22: Otimização da purificação dos scFvs por IMAC.....	56
Figura 23: Purificação dos scFvs produzidos em maior escala.....	58
Figura 24: Imunodeteção dos scFvs purificados.....	59
Figura 25: Padronização da cromatografia de exclusão molecular.....	61
Figura 26: Comparação do perfil de exclusão molecular entre os scFvs.....	62
Figura 27: Determinação do tamanho hidrodinâmico dos scFvs por DLS.....	64
Figura 28: Análise da agregação do scFv Murino em função da concentração.....	66
Figura 29: Análise da agregação do scFv Humanizado em função da concentração.....	67
Figura 30: Análise da agregação do scFv Harmonizado em função da concentração.....	69
Figura 31: Análise da agregação do scFv Caótico em função da concentração.....	70
Figura 32: Reconhecimento do antígeno BCMA em células Raji.....	72
Figura 33: Análise fenotípica das células de mieloma múltiplo U266.....	74
Figura 34: Ligação dos scFvs em células de mieloma múltiplo U266.....	75
Figura 35: Capacidade de ligação dos scFvs em diferentes concentrações.....	76
Figura 36: Ligação específica dos scFvs anti-BCMA em células alvo.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estágios clínicos do Mieloma Múltiplo.....	6
Tabela 2: Imunoterapias anti-BCMA para Mieloma Múltiplo Refratário.....	15
Tabela 3: Padronização da purificação por IMAC.....	34
Tabela 4: Condições otimizadas de purificação por IMAC.....	34
Tabela 5: Reagentes para polimerização do gel de Poliacrilamida.....	36
Tabela 6: Condições das etapas de purificação por exclusão molecular.....	39
Tabela 7: Quantificação dos DNAs plasmidiais purificados.....	45
Tabela 8: Concentração obtida dos scFvs anti-BCMA Murino e Humanizado (50 mL)...	54
Tabela 9: Rendimento da produção dos scFvs anti-BCMA Murino e Harmonizado (100mL).....	57
Tabela 10: Rendimento médio da produção dos scFv anti-BCMA.....	60
Tabela 11: Resultados do DLS dos scFvs.....	63
Tabela 12: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Murino.....	66
Tabela 13: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Humanizado.....	68
Tabela 14: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Harmonizado.....	69
Tabela 15: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Caótico.....	71
Tabela 16: Intensidade de Fluorescência Média (MFI) dos scFvs.....	75
Tabela 17: Intensidade Média de Fluorescência (MFI) da citometria com diferentes concentrações dos scFvs.....	77

RESUMO

O mieloma múltiplo (MM) é um tipo de câncer hematológico caracterizado pela proliferação anormal de células plasmáticas, que apresentam superexpressão do antígeno de maturação de células B (BCMA). Apesar dos avanços nos tratamentos, o MM ainda é considerado incurável. A imunoterapia com células T geneticamente modificadas para expressar receptores quiméricos de antígeno (CAR-T) representa uma importante mudança de paradigma contra neoplasias hematológicas, incluindo MM. No entanto, a exaustão celular das células CAR-T, mesmo na ausência do alvo, é um fator limitante da eficácia desta abordagem. Um dos fatores que contribui para a exaustão das células CAR-T é a agregação dos fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFvs) na porção extracelular dos CARs levando, conseqüentemente, à redução da sua atividade antitumoral. Portanto, este trabalho tem o objetivo de projetar novos scFv anti-BCMA, considerando a redução de sua imunogenicidade pela humanização e, adicionalmente do seu potencial de agregação, processo aqui denominado, em conjunto *harmonização*. Para tal, um scFv anti-BCMA murino disponível na literatura foi utilizado como base para o desenho de versões humanizadas e da versão harmonizada. O potencial de agregação teórico das sequências foi analisado *in silico*, resultando em três scFvs com graus crescentes de agregação prevista: humanizado, harmonizado e caótico. Os anticorpos foram expressos em formato solúvel em linhagens de *Escherichia coli* e purificados por métodos cromatográficos. Os resultados da detecção imunológica por *western blotting* confirmaram a expressão de anticorpos em bactérias transformadas após indução, com um acúmulo dependente do tempo. As análises de exclusão molecular e de espalhamento dinâmico da luz (DLS) corroboram os perfis de agregação previstos, pois o scFv harmonizado exibiu padrões de agregação inferiores em comparação às demais versões de scFvs. Além disso, análises com citometria de fluxo demonstraram que todos os scFvs são capazes de se ligar ao antígeno BCMA expresso em células de linhagem de MM. Com isso, os resultados preliminares possibilitam o aprimoramento da compreensão de agregação de anticorpos e sugerem que a harmonização pode ser aplicada para o desenho de novos CARs.

Palavras-chave: scFv; Agregação Proteica; Terapia com células CAR-T; BCMA; Mieloma Múltiplo.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is a type of hematologic cancer characterized by plasma cell abnormalities that overexpress B-cell maturation antigen (BCMA). Despite advances in treatments, MM is still considered incurable. Immunotherapy with T cells genetically modified to express chimeric antigen receptors (CAR-T) represents a major paradigm shift against hematologic malignancies, including MM. However, CAR-T cell exhaustion, even in the absence of the target, is a limiting factor in the efficacy of this approach. One of the factors contributing to CAR-T cell exhaustion is the aggregation of single-chain antibody fragments (scFvs) in the extracellular portion of CARs, consequently leading to reduced antitumor activity. Therefore, this work aims to design new anti-BCMA scFvs, considering the reduction of their immunogenicity through humanization and, additionally, their aggregation potential, a process herein collectively referred to as *harmonization*. To this end, a murine anti-BCMA scFv available in the literature was used as the basis for the design of humanized and harmonized versions. The theoretical aggregation potential of the sequences was verified *in silico*, resulting in three scFvs with increasing degrees of predicted aggregation: humanized, harmonized and chaotic. The antibodies were expressed in soluble form in *Escherichia coli* strains and purified by chromatographic methods. The results of immunological detection by western blotting confirmed the antibody expression in transformed bacteria after induction, with time-dependent accumulation. Size exclusion and dynamic light scattering (DLS) analyses corroborate the predicted aggregation profiles, as the harmonized scFv exhibited lower aggregation patterns compared to the other scFv versions. Furthermore, flow cytometry analyses demonstrated that all scFvs are capable of binding to the BCMA antigen expressed on MM cell lines. Thus, these preliminary results allow for improved understanding of antibody aggregation and suggest that harmonization can be applied to the design of new CARs.

Keywords: scFv; Protein Aggregation; CAR-T Cell Therapy; BCMA; Multiple Myeloma.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mieloma Múltiplo

Atualmente, o câncer é uma das principais doenças que impactam a população mundial, configurando uma relevante questão de saúde pública. Tanto a incidência quanto a taxa de mortalidade de neoplasias têm aumentado mundialmente e, com isto, cresce também o impacto econômico associado ao câncer (Chen *et al.*, 2023). O Mieloma Múltiplo (MM) é um tipo de neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação anormal de células plasmáticas, ou plasmócitos (linfócitos B) tumorais cujo desenvolvimento inicial ocorre na medula óssea.

De modo semelhante a outras neoplasias, a tumorigênese do MM envolve múltiplas alterações genéticas que interrompem a homeostase celular, e levam à proliferação descontrolada de células. Durante a ontogenia dos linfócitos B, os processos de maturação de afinidade nos centros germinativos favorecem o acúmulo de mutações nas regiões dos genes de imunoglobulina, além de translocações e aneuploidias cromossômicas (González *et al.*, 2007). Esses eventos genéticos podem resultar em alterações que promovem a sobrevivência e a proliferação descontrolada das células, contribuindo para a transformação dos plasmócitos em células tumorais (Garcillán *et al.*, 2018).

No Brasil, dados do Observatório de Oncologia (Globocan) apontam aproximadamente 13 mil óbitos por MM registrados entre 2018 e 2021, além de uma prevalência de casos em pacientes do sexo masculino e acima de 65 anos de idade. Neste cenário, o Observatório também estima que os custos de tratamento contra cânceres acumulam em mais de 3 bilhões de reais para o sistema público de saúde, em 2022 (Melo *et al.*, 2022). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, sigla em inglês, disponível em gco.iarc.fr/today), agência pertencente à Organização Mundial da Saúde, estimou uma incidência de 1,8 casos de MM por 100.000 habitantes na América Latina, com uma taxa de mortalidade de 1,3 por 100.000 habitantes (**Figura 1**). Além disso, a mortalidade atribuída ao MM foi de aproximadamente 11 mil, em dados brutos, no mesmo ano.

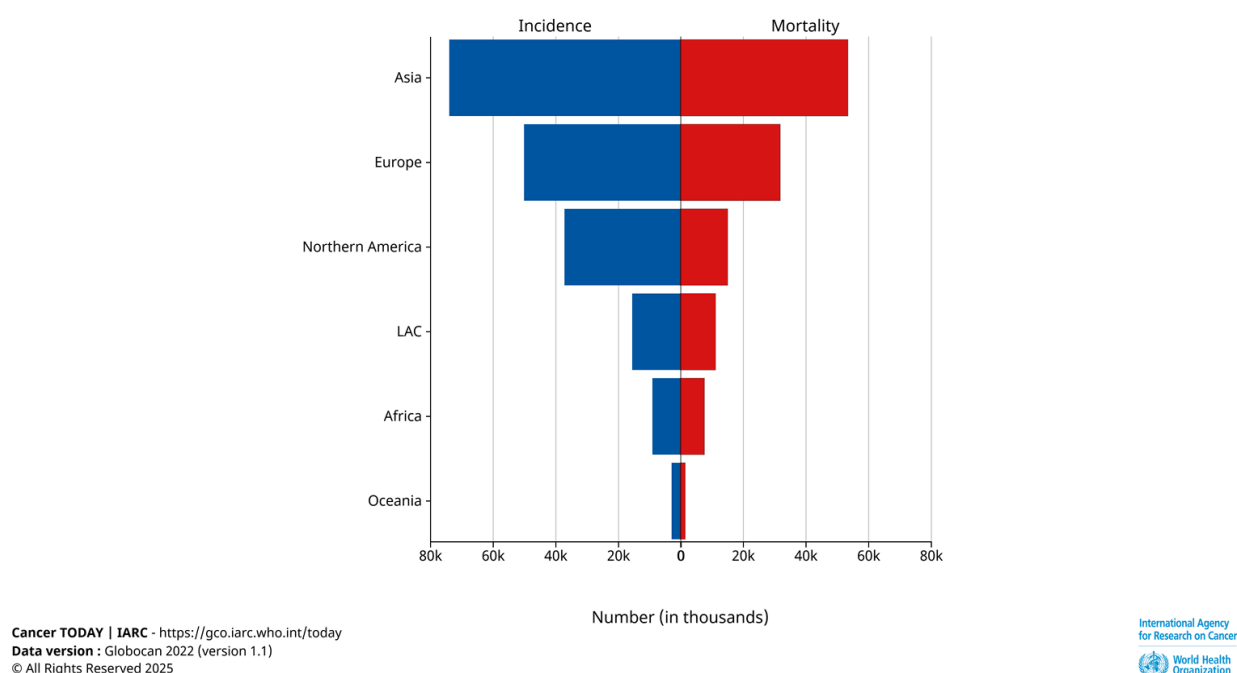


Figura 1: Impacto global do mieloma múltiplo. Incidência, em azul, e mortalidade, em vermelho, do mieloma múltiplo em diferentes continentes, apresentando a América Latina (LAC, sigla em inglês) como a quarta região mais afetada em ambas características. Fonte: Adaptado de Cancer Today, GloboCan, Organização Mundial da Saúde (2022).

Por fim, o Globocan também realizou estimativas da incidência e mortalidade futuras de MM, com base nos dados epidemiológicos obtidos mundialmente em 2022. As projeções indicam um aumento expressivo até 2050, com o número de mortes por câncer estimado para alcançar 133 mil entre homens e 106 mil entre mulheres, em comparação às 67 mil e 54,5 mil registradas, respectivamente, no ano-base. Especificamente na América Latina e Central, a taxa de mortalidade deve dobrar no mesmo período, passando de 6,2 mil para 12,5 mil para homens e de 5,2 mil para 10,2 mil em mulheres (**Figura 2**). Ademais, as tendências crescentes de expectativa de vida em países em desenvolvimento apresentam um contexto relevante de saúde pública, em que as taxas de incidência e mortalidade do MM podem ser intensificadas pelo diagnóstico tardio e demais barreiras no tratamento oncológico (Curado *et al.*, 2018).

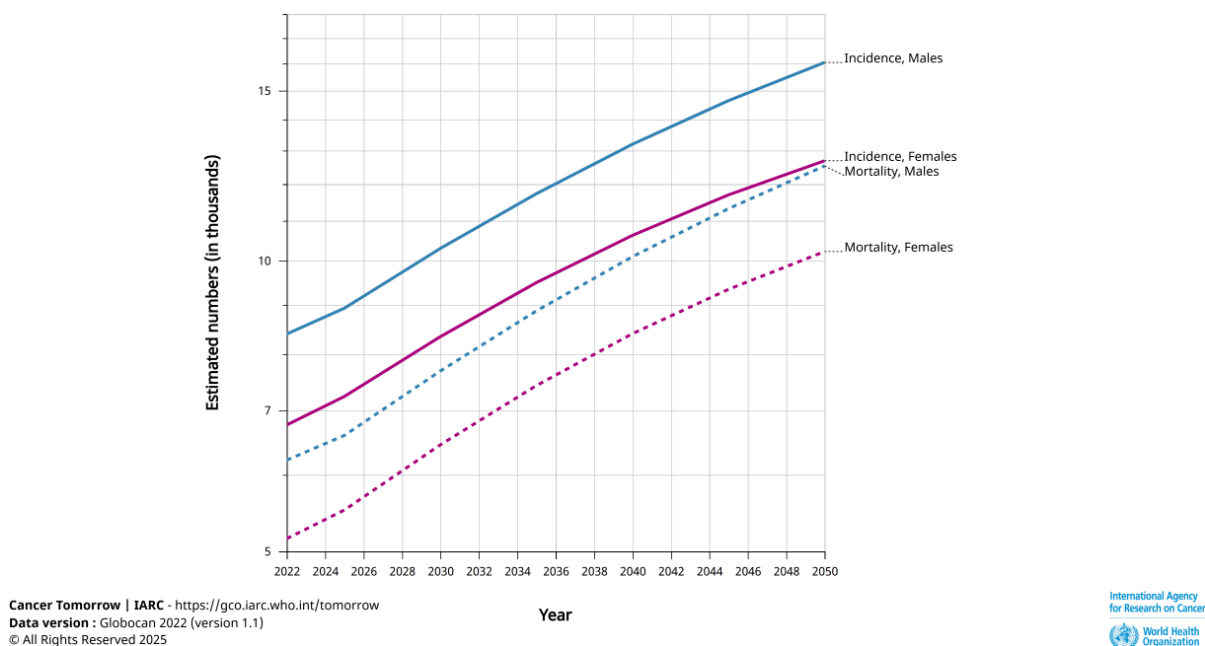


Figura 2: Previsão do impacto do mieloma múltiplo até 2050. Estimativa de incidência e de mortalidade do mieloma múltiplo. Dados calculados para homens e mulheres dos países da América Latina, considerando as informações coletadas em 2022. Fonte: Cancer Tomorrow, GloboCan, Organização Mundial da Saúde (2022).

Dentre os fatores de risco para MM, os mais relevantes são a idade, o sexo e o histórico familiar. Os eventos e sintomas definidores de MM são baseados no Critério CRAB, sigla em inglês para as alterações nos níveis de cálcio (C), insuficiência renal (R), anemia (A) e danos ósseos e lesões osteolíticas (B). Além dos danos em diferentes órgãos, altos níveis de proteína (como a proteína monoclonal e a $\beta 2$ -microglobulina) no sangue ou na urina e predisposição a infecções também são observados em pacientes com MM (Kuehl; Bergsagel, 2002). Desta forma, as manifestações clínicas do MM estão relacionadas ao estágio da doença (**Tabela 1**). A organização de Trabalho Internacional sobre Mieloma (IMWG, *International Myeloma Working Group*), fundado pela Fundação Internacional do Mieloma, categoriza tais estágios do MM em:

- 1) Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS, sigla em inglês): Condição inicial benigna e geralmente relacionada à idade, em pacientes sem nenhum dos critérios CRAB e que apresentam um nível sérico baixo (<3 g/dL) de imunoglobulinas – geralmente chamadas de proteína M ou monoclonal, neste contexto, que podem ser detectadas em formatos variados, como anticorpo intacto ou como componentes livres da cadeia leve. Deve ser monitorada por médicos onco-hematologistas pelo risco de progressão para MM (Landgren *et al*, 2009);

2) MM Latente ou Indolente (SMM, *Smouldering Myeloma* sigla em inglês): Estágio com pouca alteração nos critérios CRAB, mas com níveis elevados de plasmócitos anormais na medula óssea (>10%) de Proteína Monoclonal (>3 g/dL);

3) Mieloma Múltiplo: Cenário sintomático da doença, com maior progressão dos critérios CRAB, além da presença significativa de proteínas séricas e urinárias e elevada infiltração de plasmócitos na medula óssea (>60%). O mieloma pode evoluir e se manifestar em sítios extramedulares, configurando uma forma mais agressiva da doença.

Tabela 1: Estágios clínicos do Mieloma Múltiplo.

Critérios	MGUS	SMM	MM
Proteína Monoclonal	<3 g/dL	>3 g/dL	Presente
Células plasmáticas na medula óssea	<10%	>10%	>60%
Deteção de proteínas na urina	<500 mg/ 24h	>500 mg/ 24h	Presente
Eventos definidores de MM	Ausentes	Ausentes	Critérios CRAB presentes, intra ou extramedular

MGUS: Monoclonal gammopathy of undetermined significance, ou Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; SMM: Smouldering Multiple Myeloma, ou Mieloma Latente; MM: Mieloma múltiplo; CRAB: alterações nos níveis de cálcio, na função renal, de anemia e lesões ósseas. Fonte: Adaptado de Cowan (2022).

Além desses critérios definidores de mieloma, o diagnóstico da doença também é realizado por exames laboratoriais e citogenéticos. Testes sorológicos, como a SPEP (sigla em inglês para eletroforese de proteínas séricas), a imunofixação de proteínas séricas e a dosagem das cadeias leves livres (FLC, do inglês Free Light Chain) no soro, são essenciais para detectar e caracterizar a presença da proteína M (Rajkumar et al., 2020). Além disso, a cariotipagem e a caracterização citogenética por hibridização fluorescente in situ (FISH, sigla em inglês) são recomendadas para identificar alterações genéticas distintas de plasmócitos tumorais, como trissomias e mutações (translocações, por exemplo) em loci de imunoglobulina, majoritariamente IgH (Lakshman et al, 2018).

Uma vez que o estágio sintomático do MM é detectado por exames laboratoriais e de imagem (tomografia e ressonância magnética), o tratamento deve ser iniciado rapidamente a

fim de maximizar a eficácia terapêutica e melhorar o prognóstico do paciente. Assim como em outras neoplasias, a sobrevida global do MM é influenciada por características do próprio paciente, pela sua resposta ao tratamento, pela carga tumoral e pelo perfil biológico do tumor (Palumbo et al., 2015). A avaliação do risco prognóstico dos pacientes é feita por sistemas de classificação como o International Staging System (ISS, ou Sistema de Estadiamento Internacional), que considera os níveis elevados de β 2-microglobulina e lactato desidrogenase sérica (LDH), além de quantidades reduzidas de albumina sérica.

1.2 Tratamentos contra Mieloma Múltiplo

Os tratamentos existentes para MM são focados na morte ou redução dos plasmócitos tumorais e, idealmente, devem controlar a progressão da doença e reduzir o risco de mortalidade relacionado ao mieloma. A seleção do tratamento para o MM deve considerar a idade dos pacientes, assim como a presença de comorbidades pré-existentes, a fim de otimizar a eficácia terapêutica e minimizar riscos associados. Em suma, o tratamento padrão para MM inclui a terapia inicial, seguida de transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas em pacientes elegíveis, e terapia de manutenção com um agente imunomodulador. Essa abordagem está associada a uma sobrevida livre de progressão mediana de 41 meses, em contraste com 8,5 meses observados na ausência de tratamento (Cowan et al., 2022).

A Fundação Internacional de Mieloma da América Latina (ou IMF, sigla em inglês) recomenda que a terapia inicial, também chamado de “terapia de indução”, seja baseada na combinação de pelo menos dois medicamentos, incluindo um inibidor de proteassoma — como o bortezomibe e o carfilzomibe — ou um agente imunomodulador (a Talidomida ou a Lenalidomida, por exemplo), associados ao corticosteroide dexametasona. Um ensaio clínico de fase 2 demonstrou o benefício clínico do bortezomibe em pacientes com MM refratário, em comparação ao tratamento exclusivamente com dexametasona, apesar da maior incidência de eventos adversos graves (Richardson *et al.*, 2005). De forma semelhante, um ensaio clínico de fase 3 conduzido por Mateos *et al.* (2013) avaliou a eficácia do tratamento com lenalidomida e dexametasona em pacientes com SMM. Este estudo revelou um aumento significativo na sobrevida global após 3 anos, além de uma taxa de sobrevivência de 94% no grupo tratado, em comparação a 80% no grupo controle. Por fim, estratégias que combinam os três fármacos mencionados no tratamento inicial do MM demonstraram amplos benefícios

clínicos, com sobrevida livre de progressão de 65 meses, ou aproximadamente 5 anos (Joseph *et al.*, 2020).

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas —no qual o próprio paciente é o doador— é considerado o padrão-ouro associado ao tratamento convencional em indivíduos elegíveis, ou seja, aqueles sem disfunções significativas nos sistemas cardíaco, pulmonar, renal ou hepático. A elegibilidade ao procedimento é regulada pelo Sistema Nacional de Transplantes no Brasil e financiado pelo Sistema Único de Saúde, o SUS, onde há o maior programa público de transplante de órgãos, tecidos e células do mundo (Sistema Nacional de Transplantes, Ministério da Saúde do Brasil). Os protocolos de tratamento para MM que combinam quimioterapia seguida de transplante demonstraram melhorar as taxas de resposta e a sobrevida global, em comparação com a quimioterapia em dose convencional (Spencer *et al.*, 2009). Ademais, a terapia de manutenção com lenalidomide após o transplante prolonga significativamente a sobrevida dos pacientes e atrasa a progressão da doença, conforme evidenciado por uma meta-análise conduzida por McCarthy *et al.* (2017).

Além dos fármacos convencionais, os imunoterápicos representam uma abordagem inovadora e promissora no tratamento de neoplasias, por meio da modulação do sistema imunológico para reconhecer e eliminar as células tumorais (D’Agostino *et al.*, 2017). Dentre esses agentes, podemos citar os anticorpos monoclonais e as terapias celulares, que têm demonstrado eficácia significativa contra diversos tipos de câncer, contribuindo para a sobrevida dos pacientes.

1.3 Imunoterapia com anticorpos terapêuticos

Atualmente, os anticorpos terapêuticos correspondem à classe de fármacos com maior crescimento no mercado farmacêutico, por suas características intrínsecas altamente favoráveis para o uso clínico (Suurs *et al.*, 2019). Estruturalmente, cada molécula de anticorpo é composta por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves idênticas (**Figura 3**). As regiões Fab (do inglês *Antigen Binding Fragment*), localizadas nas porções N-terminais das cadeias, são responsáveis pelo reconhecimento específico do antígeno por meio das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), sequências hipervariáveis que formam a interface de ligação ao antígeno: o paratopo. Assim, a ligação de um anticorpo ao seu antígeno ocorre por meio desta interação específica entre o paratopo e o seu epítipo específico, que são regiões presentes no antígeno-alvo. A região de reconhecimento ao

antígeno (Fab) apresenta a cadeia leve completa (VLCL) associada ao fragmento Fd, constituído pelo domínio variável da cadeia pesada (VH), bem como pelo seu primeiro domínio constante (CH1). Já a porção Fc (Fragmento cristalizável), constituído pela região de dobradiça (*hinge*) e demais domínios constantes da cadeia pesada (CH2CH3) interage com receptores imunológicos e com componentes do sistema complemento, sendo essencial para a mediação das funções efetoras da Ig. A estrutura dos anticorpos é estabilizada por ligações dissulfeto intra e intercadeias, localizadas tanto nos domínios constantes quanto nos variáveis (Goulet; Atkins, 2020).

Os avanços da engenharia de anticorpos monoclonais permitiram o desenvolvimento de terapias altamente específicas com imunofármacos, oferecendo abordagens mais direcionadas e eficazes em comparação às terapias convencionais (Ahmad et al., 2012). A engenharia de anticorpos envolve o estudo de múltiplas versões, ampliando suas aplicações terapêuticas. Dentre os formatos de anticorpos, os fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) contêm os domínios variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH), unidos por um conector (*linker*) peptídico curto e flexível. Dessa forma, os scFvs possuem menor tamanho molecular e mantêm o domínio de ligação ao antígeno.

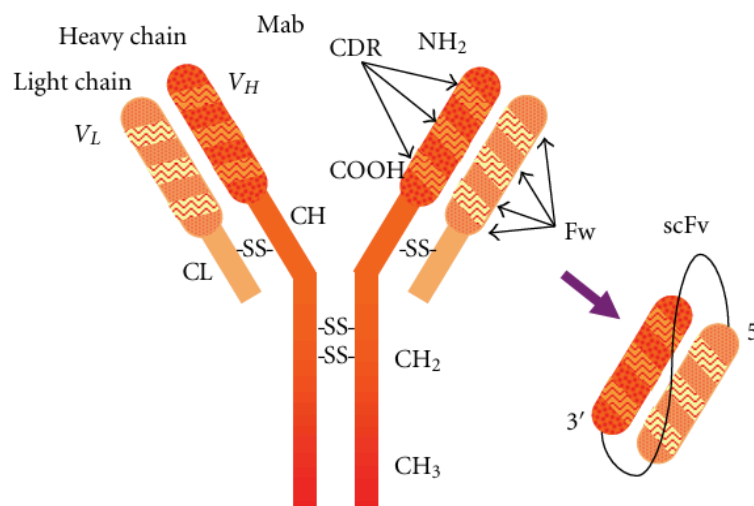


Figura 3: Estrutura dos fragmentos de cadeia única (scFv). O esquema apresenta uma imunoglobulina como um tetrâmero das cadeias pesadas (laranja) e leves (bege, ou laranja claro), além do scFv com as regiões variáveis unidas por um peptídeo conector flexível (*linker*). As CDRs estão destacadas pela textura diferencial nas regiões de reconhecimento ao antígeno. Fonte: Ahmad *et al.* (2012)

No desenvolvimento de imunoterapias baseadas em anticorpos, a seleção do antígeno alvo constitui uma etapa estratégica fundamental. Neste caso, é crucial que o antígeno esteja

preferencialmente expresso nas células malignas, com mínima ou nenhuma presença em tecidos saudáveis. Assim, a especificidade reduz os efeitos colaterais e potencializa a eficácia do tratamento (Goulet; Atkins, 2020). Para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, um dos antígenos alvo estudado em imunoterapia contra cânceres hematológicos é a proteína de membrana CD-38, com funções relacionadas à adesão celular de linfócitos B e à atividade ectoenzimática (Deaglio *et al.*, 1998), além de uma expressão alta e heterogênea em células de MM (Lin *et al.*, 2004). O Daratumumabe (nome comercial Dalinvi, da marca Darzalex), anticorpo monoclonal humano do tipo IgG1, é um exemplo de imunoterápico cujo alvo é o CD38, e é indicado pela Anvisa em combinação com a terapia de indução desde 2017. Além deste, o anticorpo quimérico Isatuximabe (Sarclisa, nome comercial do fabricante Sanofi-Medley) também apresentou benefícios clínicos significativos na sobrevida de pacientes com MM refratário (Attal *et al.* 2019), e recebeu aprovação da Anvisa e do FDA (Food and Drug Administration) em 2024.

Um dos principais antígenos-alvo de células de MM é o antígeno de maturação de células B (BCMA) (Novak *et al.*, 2004). Também conhecido como CD269, o BCMA é uma proteína transmembrana da superfamília 17 de Receptores de Fator de Necrose Tumoral (TNFRSF17), foi um dos primeiros alvos estudados para imunoterapia contra o MM, por atuar tanto como biomarcador como alvo terapêutico, sendo um dos antígenos mais relevantes do MM (Sanchez *et al.*, 2018). Além da função relacionada à sobrevivência e homeostase celular, o BCMA é expresso em plasmócitos, linfócitos B produtores de anticorpos, e em todas as linhagens tumorais de MM (**Figura 4**). Ademais, a expressão diferencial do BCMA já foi observada em diferentes neoplasias hematológicas, além do MM (Dogan *et al.*, 2020). Esta relação do BCMA com as neoplasias foi estudada em células de pacientes com Linfoma de Hodgkin (Chiu *et al.*, 2006), Leucemia Mielogênica Aguda (Bolkun *et al.*, 2016) e também Leucemia Linfóide Crônica (Ferrer *et al.*, 2023), por exemplo. Portanto, o BCMA representa um alvo promissor para o desenvolvimento de imunoterapias contra o MM, e foi escolhido como antígeno-alvo neste trabalho.

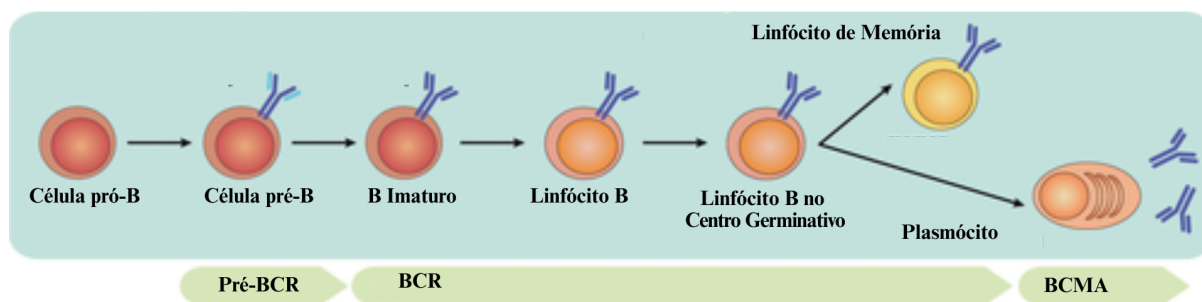


Figura 4: Expressão do BCMA durante ontogenia dos linfócitos B. Os linfócitos B expressam diferentes proteínas de membrana ao longo da diferenciação celular, sendo que o BCMA é majoritariamente observado nas fases finais do desenvolvimento dos plasmócitos e células B de memória. Fonte: Adaptado de Garcillán (2018).

1.3.1 Anticorpos anti-BCMA

Atualmente, as terapias anti-BCMA disponíveis estão agrupadas em três categorias principais (**Figura 5**): fármacos conjugados anticorpo-droga (ADCs, sigla em inglês), anticorpos biespecíficos e terapia celular com células CAR-T. Um dos exemplos de fármacos baseados em ADCs anti-BCMA incluem o J6M0-mcMMAF (GSK2857916, GlaxoSmithKline) um conjugado de anticorpo humanizado com um fármaco anti-neoplásico, com capacidade de recrutar células imunes efectoras e eliminar os plasmócitos tumorais de maneira seletiva (Tai *et al.*, 2014; Offidani *et al.*, 2021). O medicamento Belantamabe Mafodotina-blmf (BLENREP, nome comercial), composto por este anticorpo acoplado a uma droga citotóxica, teve aprovação acelerada pelo FDA em 2020 para pacientes com MM refratário com 4 tratamentos prévios. No entanto, este medicamento ainda não recebeu aprovação pela Anvisa.

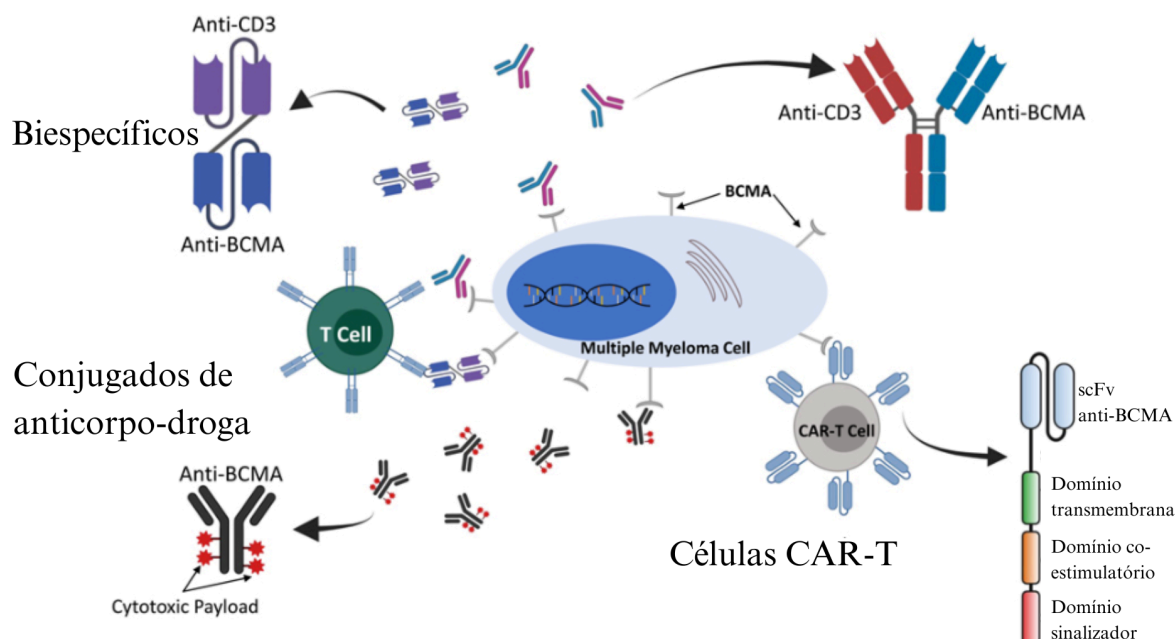


Figura 5: Imunoterapias contra mieloma múltiplo. A ilustração apresenta a célula tumoral expressando o BCMA como alvo para terapias baseadas em anticorpos biespecíficos, conjugados à droga e em terapias com células CAR-T. Os domínios do receptor quimérico estão simplificados à direita. Fonte: Paul *et al.* (2023).

Além deste, também existem anticorpos biespecíficos direcionados ao BCMA e ao antígeno CD3, conhecidos como Acoplador de Células T Biespecífico ou BiTE® (Bispecific T cell Engagers, em inglês). Entre os medicamentos aprovados para o tratamento do MM refratário, destacam-se o Elrexfio (Elranatamabe, da Pfizer; Lesokhin *et al.*, 2018) e Tecvayli (teclistamabe, da Janssen-Cilag Farmacêutica). Ambos os medicamentos são compostos por anticorpos biespecíficos, com reconhecimento aos antígenos CD3 e BCMA, e receberam aprovação pela Anvisa em 2023. Ademais, o Linvoseltamab (nome comercial Lynozyfic, da Regeneron) é um biespecífico anti-BCMA e anti-CD3 em desenvolvimento, que recebeu aprovação condicional inicial pela agência regulatória da União Europeia. Por fim, o AMG 420, desenvolvido pela Amgen, é um BiTE que combina um anticorpo anti-CD3, baseado no Blinatumomabe (Blinicyto; um fármaco direcionado para a molécula CD19 e tratamento de leucemia linfoblástica aguda), com um anti-BCMA para a eliminação seletiva das células de mieloma (Hopp *et al.*, 2017).

Por fim, o anticorpo escolhido como alvo deste estudo foi o anticorpo quimérico anti-BCMA J22.9-xi (PDB: 4ZFO) (**Figura 6**). Este anticorpo foi obtido por meio da tecnologia de hibridomas (Yokoyama *et al.*, 2006), por meio da imunização de camundongos da linhagem C57BL/6 com o domínio extracelular do BCMA humano. As regiões codificadoras dos domínios variáveis leve e pesado murinos foram clonadas em construções

com os domínios constantes kappa e de IgG1 humanos, o que resultou no fragmento de anticorpo Fab quimérico J22.9-xi, ou “J22” (Tiller et al., 2009). Tal anticorpo demonstrou alta afinidade ao antígeno BCMA humano, e apresentou efeitos citotóxicos e anti-tumorais tanto em ensaios *in vitro*, quanto em ensaios *in vivo* em modelo xenográfico de mieloma múltiplo (Oden et al., 2015). Devido a esses estudos com o anticorpo quimérico anti-BCMA J22.9.xi, além da disponibilidade da estrutura cristalográfica, este anticorpo foi selecionado como objeto de estudo desta dissertação. A fim de estudar fragmentos de anticorpos contra MM, este trabalho visa obter sequências humanizadas a partir do anticorpo murino anti-BCMA J22. O processo de humanização é necessário para a redução do potencial imunogênico das moléculas, uma vez que o anticorpo J22-xi tem origem murina.

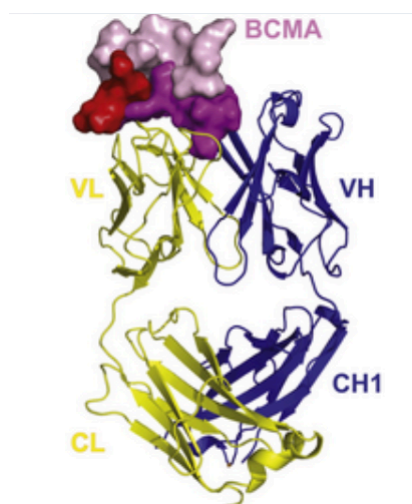


Figura 6: Estrutura do anticorpo J22.9-xi e interação com o BCMA. O esquema apresenta os domínios da cadeia pesada, em azul, e os da cadeia leve, em amarelo, constituindo o Fab com domínios variáveis (VH e VL) e constantes (CH e CL). O domínio extracelular do BCMA também é representado na figura e interage com o Fab do J22. Fonte: Adaptado de Oden *et al.* (2015).

1.4 Terapia Celular com Receptor Quimérico de Antígeno (CAR-T)

Além dos anticorpos terapêuticos, a imunoterapia baseada em células T expressando um receptor quimérico de antígeno (células CAR-T) é uma forma de tratamento promissor contra diversas neoplasias hematológicas, e representa uma importante mudança de paradigma dos recursos terapêuticos contra casos de cânceres hematológicos refratários (Jeryczynski *et al.*, 2021). O processo de geração de células CAR-T começa com a leucoferese e separação de células T $CD3^{+}$ do paciente oncológico, que recebe

quimioterápicos para depleção linfocitária, a fim de criar um ambiente imunológico receptivo às células CAR-T. Então, as células autólogas são geneticamente alteradas para a introdução do receptor quimérico por vetores virais, e passam por processos de cultivo celular para a proliferação das células CAR-T antes da infusão de volta no paciente (Mikkilineni; Kochenderfe, 2017). Assim, a imunoterapia baseada em CAR-T é personalizada, e tem como base a modificação genética *ex vivo* das células T do paciente para expressão de um receptor quimérico contra antígenos tumorais específicos. O termo “quimérico” se refere aos domínios presentes na molécula, que basicamente incluem: um domínio extracelular de reconhecimento ao antígeno (normalmente baseado em fragmentos de anticorpos); elementos espaçadores de membrana e domínio transmembranar; e os domínios intracelulares de ativação da célula T, geralmente compostos pelas cadeias Zeta do CD3 (CD3ζ) do complexo TCR (receptor de células T) e de domínios co-estimulatórios.

O primeiro desenho de células CAR-T foi desenvolvido por Gross, Waks e Eshar em 1989. Inicialmente, um vetor viral foi utilizado para transduzir as células T com um gene quimérico com segmentos codificadores de VH e VL de um anticorpo, unidos aos quatro domínios constantes das cadeias alfa e beta do TCR (receptor de célula T). Esta construção demonstrou reconhecimento antigênico específico e resposta funcional contra células alvo *in vitro*, uma vez que os domínios intracelulares do CD3 foram capazes de ativar o linfócito após interação com o alvo. Desta forma, a ativação das células CAR-T ocorre de maneira independente da apresentação de antígeno pelo complexo principal de histocompatibilidade e evita um dos possíveis mecanismos de evasão tumoral (Feins *et al.*, 2019). Nos anos seguintes, os receptores quiméricos evoluíram em diferentes gerações, incorporando avanços estruturais voltados à otimização da ativação e da eficácia citotóxica das células CAR-T, como: adição de novos domínios intracelulares do CAR, incluindo dois co-estimuladores na 3ª geração, e genes para secreção de citocinas na quarta geração (Jayaraman *et al.*, 2020)

Atualmente, o FDA já aprovou sete imunoterapias de CAR-T para cânceres hematológicos refratários, enquanto diversos ensaios clínicos continuam avaliando o uso de células CAR-T em diferentes contextos clínicos. No caso de imunoterapias contra o MM, o BCMA é o principal alvo estudado, além do CD19, CD20 e CD22 (Lu; Jiang, 2020). Como exemplo, o BCMA é o antígeno-alvo no Abecma™ (idecabtagene vicleucel), medicamento de terapia celular baseada em CAR-T contra mieloma múltiplo recidivante ou refratário (MMRR) aprovada pelo FDA em 2021 (**Tabela 2**). Além disso, o ciltacabtagene autoleucel (cilta-cel, ou Carvykti™) também direcionado ao BCMA recebeu aprovação do FDA em 2022, além da aprovação pela Anvisa no mesmo ano. Esta imunoterapia direcionada ao

BCMA em MMRR utiliza, de forma inovadora, dois domínios de anticorpos de camelídeos (VHH, fragmentos de cadeia pesada de domínio único) para reconhecimento de dois epítomos diferentes do antígeno BCMA. Com a disponibilização do tratamento com células CAR-T anti-BCMA, essa imunoterapia proporciona um período de remissão considerável para os pacientes com MM, que pode ser expandido por meio de transplante de células-tronco hematopoiéticas, radioterapia e outras abordagens terapêuticas complementares (Nasiri *et al.*, 2024).

Apesar de os tratamentos com células CAR-T oferecerem uma alternativa promissora para pacientes com MM, esta neoplasia ainda não é considerada curável. Além disso, a imunoterapia com células CAR-T enfrenta desafios relevantes, especialmente em relação ao acesso limitado para os pacientes e aos efeitos adversos associados à terapia (Nasiri *et al.*, 2024).

Tabela 2: Imunoterapias anti-BCMA para Mieloma Múltiplo Refratário.

Nome	Ensaio Clínico e Fabricante	Composição e Geração do CAR-T	Aprovação pelo FDA	Aprovação pela Anvisa
Idecabtagene vicleucel (bb2121, ide-cel, Abecma)	NCT03361748 (KarMMa-2), Celgene Corporation	2ª geração, com domínio co-estimulatório 4-1BB e scFv anti-BCMA	Aprovado como 3ª linha de tratamento em 2021	Sem aprovação
Ciltacabtagene autoleucel (JNJ-68284528, cilta-cel); Carvykti	NCT04133636 (CARTITUDE-2), Janssen Farmacêutica	2ª geração, com 4-1BB e dois VHH anti-BCMA	Aprovado como 5ª linha de tratamento em 2022	Aprovado como 4ª linha de tratamento em 2022
Orvacabtagene autoleucel (JCARH125, orva-cel)	NCT03430011 (EVOLVE), Celgene Corporation	2ª geração, com scFv humano anti-BCMA	Sem aprovação	Sem aprovação

Fonte: Adaptado de Paul *et al.* (2023)

1.4.1 Exaustão de células CAR-T: agregação molecular

A terapia CAR-T apresenta limitações intrínsecas às células T que devem ser consideradas, a fim de evitar a redução da eficácia do tratamento oncológico. Dentre elas, já foi observado que a exaustão celular de células CAR-T é um dos fatores que impactam negativamente a imunoterapia tanto de tumores líquidos, quanto de tumores sólidos (Delgoffe *et al.*, 2021). A exaustão celular é o termo que designa um conjunto de alterações epigenéticas, fenotípicas e metabólicas dos linfócitos T, que resultam na limitação da resposta imune. Estas células em exaustão têm as capacidades funcionais reduzidas, além da maior expressão de moléculas inibitórias e imunossupressoras, como PD-1, TIM-3 e LAG-3 (Blank *et al.*, 2019). Este estado é observado no contexto de infecções virais crônicas e de neoplasias, em que há a exposição contínua ao antígeno-alvo. A combinação da estimulação constante do antígeno com o ambiente tumoral imunossupressor pode favorecer esta transformação de células previamente ativas em células hiporreativas e disfuncionais (Gumber; Wang, 2022).

Dentre os fatores que também podem induzir o estado de exaustão, a sinalização tônica — ou seja, a ativação celular independente de antígeno — é um dos mais significativos nas imunoterapias com células CAR-T. Neste caso, é hipotetizado que a agregação dos anticorpos de cadeia única (scfv) da porção extracelular resultaria na sinalização tônica e a exaustão celular (Long *et al.*, 2015). Neste estudo sobre a estrutura do CAR, os autores levantaram a hipótese de que interações entre os scFvs anti-GD2 poderiam induzir a agregação dos receptores na superfície celular. De fato, as construções de CARs exibiram auto-agregação na membrana celular, ao contrário do CAR controle anti-CD19 (**Figura 7**). Ademais, as células que apresentaram agregação dos receptores também exibiram fenótipos inibitórios consistentes com exaustão celular, inclusive a redução da eficácia dos efeitos anti-tumorais *in vivo*.

Portanto, considerar a influência da agregação proteica na exaustão celular é de suma importância para o desenvolvimento de imunoterápicos eficazes contra tumores primários e refratários. Dessa forma, este trabalho visa estudar a agregação de fragmentos de anticorpos, aplicáveis para imunoterapias com células CAR-T. Para tal, o processo de aprimoramento de sequências para redução da agregação, desenvolvido nesta dissertação, será denominado “harmonização”.

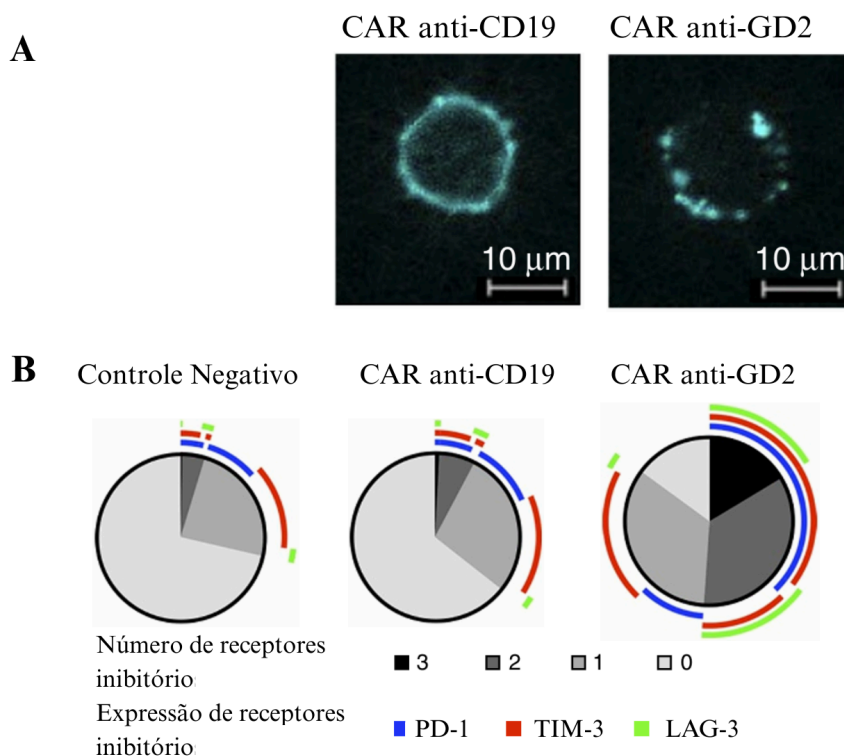


Figura 7: Influência da sinalização tônica na exaustão de células CAR-T. A imagem (A) apresenta a microscopia de fluorescência de células T transduzidas com CAR anti-CD19 (à esquerda) e anti-GD2 (à direita) fusionados à proteína fluorescente azul, com a visível agregação dos receptores anti-GD2. Além da formação dos agregados, o perfil de marcadores de exaustão apresentado em (B) evidencia a maior expressão de receptores inibitórios, a partir da sinalização tônica. Fonte: Adaptado de Long *et al.* (2015)

1.4.2 Otimização de fragmentos de anticorpos para imunoterapias

Considerando a exposição prolongada aos medicamentos utilizados nas terapias tanto de indução quanto de manutenção, já existem estágios refratários da doença não responsivos ao imunomodulador lenalidomide, ao bortezomibe e ao anticorpo daratumumabe (Jeryczynski *et al.*, 2021). Pelo perfil dinâmico de células tumorais, a resistência de MM às imunoterapias precisa ser considerada. Desta forma, os avanços terapêuticos devem focar no controle de progressão do MM, além da otimização das terapias disponíveis, por meio do aprimoramento de seu *design* para aumentar sua eficácia e reduzir a toxicidade.

É notável que as alternativas de construções dos scFvs apresentam particularidades quanto à instabilidade e à agregação, uma vez que são moléculas produzidas de maneira sintética (Condado-Morales *et al.*, 2024). Assim, a tendência à agregação dos scFvs imunoterápicos representa um desafio significativo, uma vez que a otimização da estabilidade estrutural da molécula é essencial para sua funcionalidade. Aliás, a propensão à agregação também é observada no caso de anticorpos biespecíficos, com probabilidades observadas de até 50%, devido à flexibilidade dos fragmentos e a possível troca entre os domínios

intermoleculares (Chen; Zhang, 2021). Apesar destes desafios, os scFvs podem ser otimizados por alterações de formato ou por mutações na sequência primária. Além disso, houve um progresso significativo nas ferramentas computacionais para predição e desenho de novos fragmentos de anticorpo com características biológicas e biofísicas moduladas para redução da agregação (Guo *et al.*, 2025).

Em relação às propostas de engenharia de anticorpos no contexto de receptor quimérico em células CAR-T, a literatura apresenta um cenário de investigação do comportamento dos scFvs nesta circunstância. A seleção de scFvs envolve a avaliação *in vitro* e *in vivo* das capacidades de ligação, a solubilidade e a estabilidade das moléculas nas células CAR-T, uma vez que essas características impactam diretamente nas funções celulares. Dentre os aspectos analisados dos scFvs, a otimização da afinidade do anticorpo está relacionada à atuação seletiva ao alvo, com redução do efeito *off-target* (Duan *et al.*, 2022). Além disso, scFvs distintos podem apresentar propriedades diferentes no contexto do CAR, mesmo que tenham o mesmo antígeno de interesse. Entre eles, a distribuição uniforme na membrana celular ou, em contraste, a disposição em agregados moleculares, que possivelmente resultam da instabilidade da expressão das estruturas membranares. É hipotetizado que esta formação seja induzida pela extensa maquinaria de modificações pós-traducionais de células eucariontes. E, desta forma, influencia negativamente o enovelamento proteico ideal do receptor, além de impactar as funções essenciais de reconhecimento (Fujiwara *et al.*, 2020). Estas observações são corroboradas por outros estudos de células CAR-T, e apoiam a importância da otimização de scFvs para este contexto, como o trabalho de Zhang *et al.* (2023), que identificou que anticorpos distintos – especificamente contra o antígeno carcinoembrionário (CEA), em CARs da terceira geração – afetam diferencialmente a atividade das células CAR-T. Com isso, diferentes estruturas exibiram capacidades de expressão diferenciais, e também obtiveram resultados diversos quanto à afinidade do anticorpo e a habilidade citotóxica das células. Em síntese, a investigação de novas construções de fragmentos de anticorpos possui um potencial robusto de otimização da eficácia de imunoterapias.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

O mieloma múltiplo é uma das neoplasias mais prevalentes na população brasileira e, apesar dos tratamentos disponíveis, ainda não é considerado curável. As células CAR-T representam imunoterapias promissoras no tratamento de tumores hematológicos, mas apresentam limitações que precisam ser exploradas. Diante do exposto, a exaustão celular independente de antígeno é um tema relevante nestas imunoterapias baseadas em células CAR-T, devido à possibilidade de redução da eficácia do tratamento. Há uma demanda pela investigação do potencial de agregação proteica relacionado à sinalização tônica, que já foi observada como uma condição que reduz a atividade antitumoral das células CAR-T.

Assim, esta pesquisa visa contribuir para o aprimoramento de imunoterapias baseadas em CAR-T, focando no estudo de agregação proteica da porção de ligação ao antígeno de anticorpos anti-BCMA contra mieloma múltiplo. Contamos com uma rede de apoiadores e colaboradores no Instituto Nacional de Câncer (INCA, Rio de Janeiro), que apresentam interesse no estudo de moléculas terapêuticas inovadoras, eficazes e aprimoradas para o tratamento de neoplasias. Por fim, o projeto busca colaborar com o desenvolvimento do conhecimento científico nacional, na área de imunoterápicos com a perspectiva de reduzir os custos associados ao tratamento e, no futuro, disponibilizá-lo no Sistema Único de Saúde.

2.2 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a obtenção de novos scFvs anti-BCMA humanizados e *harmonizados*, com menor propensão à agregação proteica, além da caracterização biológica e biofísica destes fragmentos de anticorpos.

2.3 Objetivos específicos

- 1) Obtenção dos fragmentos de anticorpos anti-BCMA:
 - a) Desenho dos scFvs anti-BCMA murino, humanizados e harmonizados;

- b) Análise do potencial de agregação das moléculas *in silico*, por meio do *software* Tango.
- 2) Expressão dos scFvs anti-BCMA em células de bactéria, para análise dos anticorpos em formato solúvel:
 - a) Transformação bacteriana em linhagens de *E. coli* com vetores de expressão induzível dos scFvs;
 - b) Otimização da produção, extração e purificação.
- 3) Caracterização e análise comparativa dos scfv anti-BCMA:
 - a) Análise do tamanho das moléculas purificadas por meio de Exclusão Molecular e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
 - b) Análise da capacidade de ligação ao antígeno BCMA por Citometria de Fluxo com linhagens de células tumorais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho dos fragmentos de anticorpo scFv

O vetor de expressão escolhido para a produção de proteína recombinante em bactérias foi o pET-SUMO (**Figura 8**), com aproximadamente 5,6 kb e com a marca de resistência ao antibiótico canamicina. Os fragmentos de anticorpos no formato scFv foram clonados na ordem VL-Linker- VH, e estão ligados por uma sequência codificadora de um peptídeo *linker* flexível constituído por 15 resíduos de aminoácidos, (GLY₄SER)₃. As sequências são flanqueadas por sítios de restrição das enzimas BamH I e Hind III, além de um sítio de Xho I que será utilizado para a estratégia de síntese dos scFvs. Os genes estão sob controle do promotor T7 e regulação do operador *lac*, componentes relevantes para o alto nível de expressão de proteína recombinante e para o controle induzível da produção dos scFvs, respectivamente. Isto será possível pela presença da proteína repressora *LacI*, sob regulação do promotor *lacI*, que interage com o operador *lac* e inibe a transcrição do gene de interesse, quando não há presença de alo-lactose ou do indutor mimético Isopropil-β-D-tiogalactopiranosose (IPTG, Promega).

Neste vetor, as proteínas de scFvs recombinantes são produzidas como proteínas de fusão, onde na extremidade amino-terminal há uma região de seis histidinas – His-tag – para purificação por cromatografia de afinidade a metal (Ni²⁺, por exemplo), seguida pela região codificadora da proteína Modificadora do tipo Ubiquitina (SUMO) que é fusionada às sequências codificadoras dos scFvs, a fim de aumentar a solubilidade e o enovelamento proteico e, conseqüentemente, a eficiência da expressão heteróloga (Butt *et al.*, 2015). Ademais, os scFvs também apresentam ainda uma sequência de um peptídeo derivado da molécula HA (hemaglutinina, do vírus influenza), ou HA-tag em seu carboxiterminal, para detecção imunológica, além do terminador de transcrição do fago T7 na região 3'.

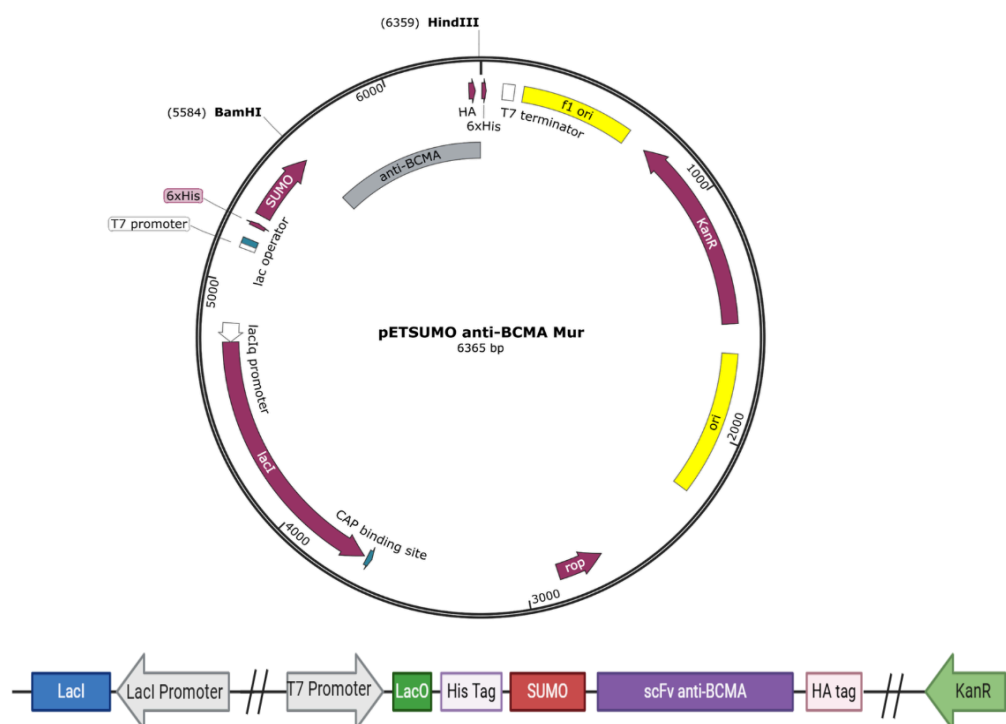


Figura 8: Representação esquemática do vetor pET-SUMO com scFv anti-BCMA Murino. O cassete de expressão simplificado apresenta os componentes de regulação do operon *lac* (promotor e códon da *lacI*, e o operador *LacO*), a resistência a canamicina (KanR), assim como a construção da proteína de interesse. O scFv anti-BCMA está sob controle do promotor do fago T7, e possui a sequência da proteína SUMO (modificadora do tipo ubiquitina). Por fim, o scFv é flanqueado por duas sequências de peptídeos *tag* (ou etiquetas): His-Tag e HA-Tag.

3.1.1 Humanização dos fragmentos de anticorpo anti-BCMA

Inicialmente, foi realizado o processo de humanização do anticorpo, que visa reduzir sua imunogenicidade em organismos humanos, preservando a afinidade e a eficácia terapêutica. Para tal, as regiões de cadeias variáveis leve (IgKV 6-15*01) e pesada (IgHV 4-1*01) do anticorpo foram extraídas do Protein Data Bank (PDB: 4ZFO) e numeradas seguindo o esquema de numeração de Kabat. A numeração de Kabat é um padrão adotado para identificação das regiões determinantes de complementariedade (CDR) em um anticorpo, e é baseada na variabilidade dessas sequências hipervariáveis que são responsáveis pela ligação ao antígeno. Dessa forma, os limites das CDRs das cadeias leve (CDR-L1, L2 e L3) e pesada (CDR-H1, H2 e H3) foram definidos com base na posição dos aminoácidos iniciais e finais de cada sequência. Vale ressaltar que todas as construções, incluindo essa que

contém os domínios variáveis murinos, foram clonadas no mesmo sistema de expressão em bactéria, a fim de possibilitar uma comparação das características físico-biológicas. Esta construção foi chamada de scFv anti-BCMA Murino (**Figura 9**).

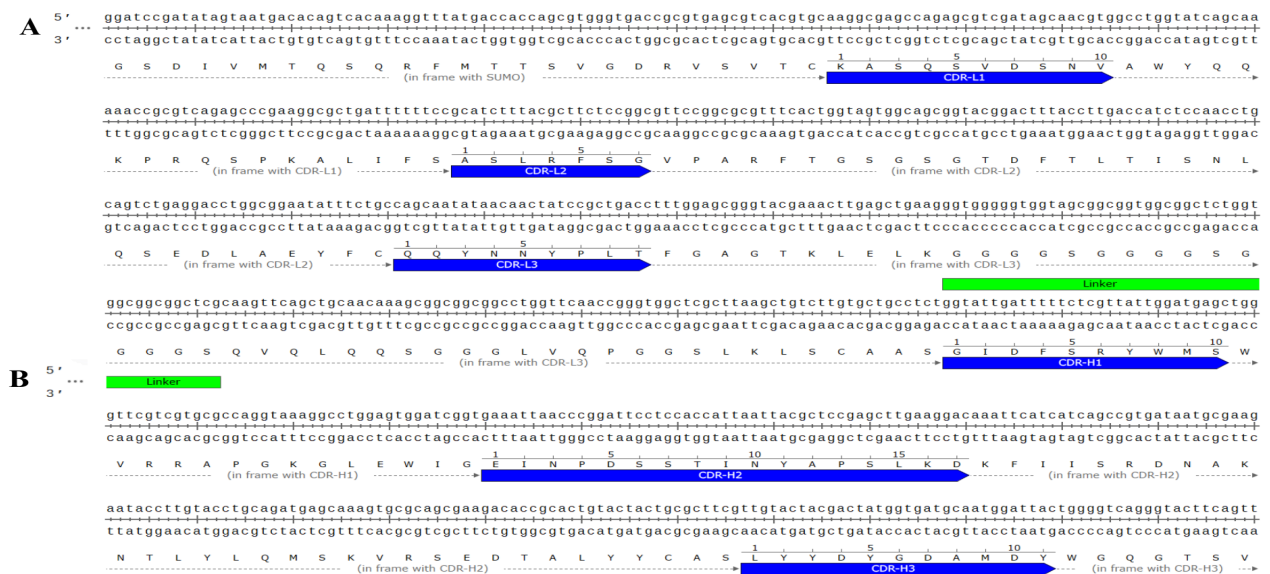


Figura 9: Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do scFv anti-BCMA murino. As CDRs estão destacadas em azul, e o *linker* em verde entre o (A) VL e o (B) VH. Os códons foram otimizados para a expressão em bactéria. Fonte: obtido pelo *software* Geneious.

Em seguida, o programa IgBLAST (NCBI) foi utilizado para identificar sequências germinais de anticorpos humanos com alta similaridade ao J22, permitindo a escolha de sequências mais próximas de anticorpos naturalmente encontrados no repertório humano. Essa abordagem substitui as regiões constantes e de *framework* murinas por sequências humanas, para reduzir a imunogenicidade, além de orientar o design dos anticorpos humanizados e harmonizados. A busca pelo arcabouço humano germinal mais similar aos domínios variáveis murino resultou em sequências de IgK1 do VL com cerca de 66.3% similaridade, e IgH3 do VH com 71,1% ou 65,6%. Em seguida, foi feito o transplante das CDRs murinas para as sequências de arcabouço humanas, e a combinação destes domínios variáveis resultou na construção do scFv anti-BCMA Humanizado.

3.1.2 Harmonização dos scFvs: Análise de agregação *in silico*

Após a obtenção do anticorpo humanizado, as sequências de VL e VH humanizadas e murinas foram utilizadas para análise do potencial de formação de agregados, por meio do *software* TANGO (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004). Este programa apresenta um algoritmo de mecânica estatística capaz de identificar as regiões potenciais formadoras de agregação do tipo β -amilóides a partir de uma sequência peptídica, considerando a estabilidade e os parâmetros físico-químicos da proteína. As análises foram realizadas com as sequências do VL-linker-VH, e não incluem demais domínios do vetor de expressão. Com este *software*, foi observado uma propensão maior do VH humanizado para agregação, em vista disso os fragmentos humanizados codificam o mesmo VL, mas apresentam diferenças no desenho do VH para testar a hipótese inicial de agregação. A partir das análises do VH, a sequência humanizada foi otimizada com mutações direcionadas a reduzir o potencial de agregação de resíduos de aminoácido fora das regiões das CDRs. Este scfv mutado para menor possibilidade de agregação molecular apresenta aminoácidos provenientes ou do murino original, ou de IgH humano similar, e será chamado de scFv anti-BCMA Harmonizado. Além da otimização da sequência para reduzir o potencial de agregar, outra sequência do anticorpo foi desenhada para aumentar o potencial de agregação do anticorpo humanizado, servindo com um controle da metodologia utilizada. Esta construção será chamada de scFv anti-BCMA Caótico, com a finalidade de testar a hipótese em que as modificações no anticorpo Harmonizado não alteram a agregação ou a afinidade pelo antígeno.

A sequência de nucleotídeos dos scFvs foi gerada por transcrição reversa utilizando a ferramenta *Backtranseq* (EMBOSS) e teve seus códons otimizados para a expressão em sistema bacteriano (*Escherichia coli*) pelo Codon Optimization Tool (Integrated DNA Technologies, IDT), com a finalidade de aumentar a eficiência da tradução das proteínas heterólogas. Para a síntese química, alíquotas de 5 μ g do vetor pET-SUMO, provenientes de trabalhos prévios do laboratório (L.S. Rodrigues, 2024), foram enviadas à empresa FastBio. A estratégia de síntese envolveu a substituição do inserto original do plasmídeo pelas sequências dos genes de scFv anti-BCMA, pela digestão inicial com as enzimas de restrição BamH I e Hind III e a inserção da sequência codificadora do scFv Murino ou do scFv Humanizado. Então, o plasmídeo com a sequência Humanizada foi utilizado como base para a segunda etapa de clonagem para gerar os scFvs Harmonizado e Caótico (**Figura 10**). Como todas as construções humanizadas apresentam o mesmo VL, esta etapa de clonagem inseriu os VHs modificados por meio da digestão com as enzimas Xho I e Hind III.

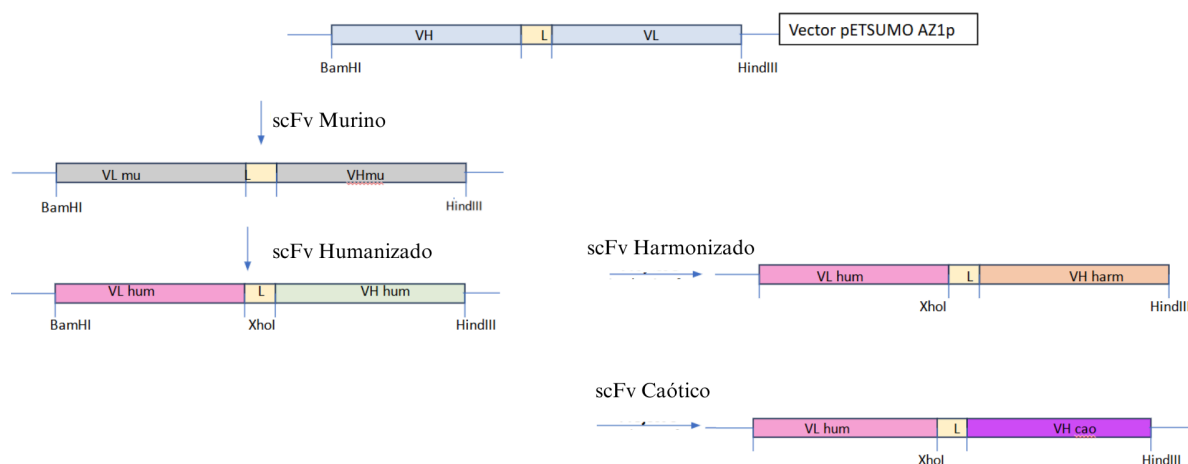


Figura 10: Esquema da síntese dos vetores plasmidiais. A síntese das construções dos scFvs anti-BCMA Murino e Humanizado foram feitas a partir de um pET-SUMO anti-Zika (AZ1p), com a digestão e clonagem nos sítios de Bam HI e Hind III. Então, o vetor com o scFv Humanizado foi utilizado para a subclonagem dos VHS Harmonizado e Caótico, pelos sítios de Xho I e Hind III. Assim, isto resultou em quatro vetores pET-SUMO com os scFvs anti-BCMA.

3.2 Linhagens celulares

3.2.1 Células bacterianas

Para obtenção dos scFvs, duas linhagens de *Escherichia coli* foram selecionadas para a transformação bacteriana, considerando as vantagens específicas de cada uma para a expressão e estabilidade dos scFvs. A fim de amplificar os plasmídeos pET-SUMO com os genes dos scFvs, a linhagem escolhida foi a *E. coli* XL1-BLUE MRF' (Stratagene, California, EUA, cat: 200230), que possui o genótipo: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ \Delta M15 Tn10 (TetR)]$. A XL1-BLUE MRF' apresenta deleção em todos os sistemas de restrição conhecidos da *E. coli* K12, incluindo o gene da subunidade HsdR (para evitar a degradação do plasmídeo não metilado pelo sistema da endonuclease EcoK), além de ser deficiente das enzimas endonuclease A (*endA1*, para aumentar a eficiência da extração plasmidial) e recombinase A (*recA1*, a fim de aumentar a estabilidade do DNA exógeno e impedir recombinação gênica). A escolha desta linhagem foi baseada na finalidade de aumentar a eficiência da introdução de DNA exógeno, uma vez que a *E. coli* XL1-BLUE MRF' dispõe de modificações que evitam a degradação de

plasmídeos introduzidos na bactéria, permitindo que ele permaneça intacto e tenha maior chance de ser replicado e expresso.

Para a otimização de expressão e a produção dos scFvs, a linhagem escolhida foi a *E. coli* SHuffle pLys Y (New England Biolabs, Ipswich, EUA, cat: C3030J), que será referida como SHy ao longo deste trabalho. Esta linhagem foi engenheirada para o enovelamento correto de proteínas com pontes dissulfeto no citoplasma bacteriano (Lobstein *et al.*, 2012), e apresenta o genótipo: Mini^F *lysY* (CamR) / *fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (SpecR, *lacIq*) *ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10*. A *E. coli* SHy foi obtida a partir de linhagens bacterianas com deleção de enzimas redutases, então apresenta vias de redução-oxidação alteradas para a catálise de ligações dissulfeto dentro do citoplasma. Além disso, a SHy expressa constitutivamente uma cópia cromossômica da isomerase de ligação dissulfeto DsbC, enzima que promove a correção de proteínas mal oxidadas, além de ser uma chaperona citoplasmática que auxilia no enovelamento de proteínas. Ademais, SHy apresenta resistência ao antibiótico cloranfenicol, e também expressa uma cópia da RNA Polimerase T7, que permite a transcrição de genes sob controle do promotor do fago T7, ou seja, os scFvs estudados neste trabalho. Nota-se que esta linhagem possui o plasmídeo Mini^F, que expressa uma versão mutante da lisozima T7 sem atividade de lisozima (para prevenir a degradação da peptídeoglicana), mas que preserva sua função repressora sobre a RNA polimerase T7. Diante disto, a *E. coli* SHy foi selecionada para investigar as condições ótimas da expressão das proteínas recombinantes deste projeto.

3.2.2 Cultura de células eucarióticas

As linhagens de células de mamífero utilizadas neste estudo foram: Raji, derivada de linfócitos B de Linfoma de Burkitt, caracterizada pela expressão dos marcadores BCMA, CD19 e CD20; e a linhagem de células de Mieloma Múltiplo U266 (BCRJ: 0240), que expressa BCMA⁺, mas é negativa para CD19 e CD20. Ambas as linhagens foram mantidas em cultura sob condições adequadas de crescimento para viabilizar a análise da interação dos scFvs com o antígeno BCMA nativo presente na membrana plasmática das células.

As linhagens celulares armazenadas em nitrogênio líquido em Solução de Congelamento (90% de Soro Fetal Bovino (SFB, Imunoquímica, RJ, Brasil) e 10% de

Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich)) foram brevemente descongeladas em banho-maria a 37 °C. Então, as células foram adicionadas a 9 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado e centrifugadas a 300 x g por 5 min, para a troca da Solução de Congelamento por meio de cultivo. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado. Em seguida, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² em meio RPMI 1640 (Gibco) com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina, em incubadora (HERACell Vios 160i, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi monitorada por meio de contagem em Câmara de Neubauer via diluição em corante Azul de Tripan 0,4% (Manufacturing Chemists Inc).

3.3 Transformação bacteriana por choque térmico

Inicialmente, os vetores plasmidiais pET-SUMO com as construções dos anti-BCMA scFvs foram transformados na linhagem de *E. coli* XL1-BLUE (Stratagene, Califórnia, EUA, cat: 200230) para o acúmulo de cópias dos plasmídeos. Em seguida, a *E. coli* SHuffle pLys Y (New England Biolabs, Ipswich, EUA, cat: C3030J) foi transformada para a produção dos scFvs. O processo de transformação de ambas as linhagens foi realizado via choque térmico (Maranhão, 2016) .

Inicialmente, uma colônia isolada de *E. coli* foi utilizada para o preparo de um pré-inóculo em 10 mL de meio LB (Peptona 1% (p/v), Extrato de Levedura 0,5% (p/v) e NaCl 1% (p/v), pH 7,0). A cultura foi crescida à 37°C e 200 rpm durante a noite. No dia seguinte, o inóculo foi feito com 1/100 do pré-inóculo e a cultura incubada até atingir uma densidade ótica a 600nm (OD₆₀₀) entre 0,1 e 0,3, em que as células estão na fase exponencial inicial de crescimento. A partir desta etapa, as amostras foram mantidas em gelo ou 4°C. A cultura foi centrifugada a 3000 x g por 15 minutos, e o *pellet* foi lavado com 10 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl₂ 50mM filtrado em membrana 0,22µm). Após uma segunda centrifugação nas condições anteriores, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de CaCl₂ e mantido no gelo por 1 hora. Depois desta incubação, as células bacterianas são consideradas termocompetentes, ou seja, estão aptas a internalizar um DNA exógeno. 500µg dos DNAs plasmidiais sintetizados foram incubados em 100µL de células competentes por, no mínimo, 30 minutos à 4°C. As amostras foram submetidas ao choque térmico de 42°C por 3 minutos, a fim de produzir poros temporários na membrana citoplasmática. Então, 1mL de LB foi

adicionado às amostras para a regeneração à 37°C em agitação leve por 1 hora. Após a regeneração, a cultura celular foi inoculada em placas de petri contendo LB Ágar (Ágar bacteriológico 1,4% (p/v)) com 40 µg/mL de Canamicina, e 25 µg/mL de Tetraciclina (para as cepas de *E. coli* XL1-Blue) ou 10 µg/mL de cloranfenicol (para culturas de *E. coli* SHy), e incubadas à 37°C por 16-20h (*overnight*).

3.4 Extração de DNA plasmidial

A extração plasmidial em pequena escala foi feita com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Cat.:27106) de acordo com as instruções dos fabricantes. Para tal, um inóculo de 10mL das *E. coli* transformadas foi centrifugado a 6800 x g por 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano foi ressuspensionado em 250µL de Buffer P1 em preparação para lise celular em condições alcalinas. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo de microcentrífuga e 250µL de Buffer P2 foram adicionados em uma incubação de até 5 minutos. Então, foram adicionados 350µL do Buffer N3 para a neutralização da lise celular, e para condições de alta concentração de sal. A amostra foi centrifugada a $17.900 \times g$ por 10 minutos a 4°C, em microcentrífuga de bancada, para a limpeza do lisado celular, e o sobrenadante foi transferido para a coluna QIAprep 2.0 e centrifugado por 1 minuto. Esta coluna apresenta membrana de sílica, que permite a purificação seletiva de DNA plasmidial. Foram realizadas duas lavagens com 750µL e 500µL, respectivamente, de Buffer PE por centrifugação a fim de eliminar contaminantes de RNA, proteínas e metabólitos celulares. Por fim, o DNA plasmidial foi eluído da coluna QIAprep 2.0 com água Milli-Q pré-aquecida à 60°C e aliqotado para análises posteriores.

3.5 Quantificação dos ácidos nucleicos purificados

Após a extração, o DNA obtido foi analisado via leitura no espectrofotômetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Inicialmente, o equipamento foi calibrado com 1µL de água ultrapura, então foi realizada a leitura de 1µL da amostra de DNA plasmidial purificado. A pureza das amostras foi avaliada pelas razões de absorbância

A260/A280 e A260/A230 com valores ideais esperados de 1,8 e 2,0, respectivamente, para amostras sem contaminantes de proteína ou compostos orgânicos.

Em seguida, as amostras de DNA purificados foram quantificadas por fluorimetria por meio do equipamento Qubit® Fluorometer (Life Technologies, cat: Q33226). Uma solução de trabalho foi preparada pela diluição do reagente fluorescente Qubit na proporção 1:200 em seu respectivo tampão, e a calibração do equipamento foi realizada com dois padrões de DNA (S1 e S2), conforme o protocolo. Então, foram realizadas três leituras para calcular a média das concentrações das amostras.

3.6 Digestão com enzimas de restrição

Após a extração de ácidos nucleicos, uma alíquota do DNA plasmidial foi utilizada em uma reação com as enzimas de restrição: BamH I-HF (New England Biolabs, cat:R316S) e Hind III (New England Biolab, cat: R0104S) para digestão dupla dos pET-SUMO com as quatro construções de scFv. A reação foi incubada *overnight* a 37°C com os seguintes reagentes: 1X Buffer CutSmart (New England Biolabs, cat: B7204S), 1µL das enzimas, 1µg de DNA e água Milli-Q em quantidade suficiente para 25µL. As enzimas reconhecem sequências únicas nos plasmídeos e geram padrões de fragmentação com um perfil esperado, que foram analisados por eletroforese em gel de agarose. O tamanho esperado dos fragmentos de DNA após a digestão para as quatro construções são de aproximadamente 770 e 5590 pares de base.

3.7 Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

As amostras de DNA purificadas e digeridas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose. Para tal, o gel foi preparado via solubilização da agarose (Sigma-Aldrich) a 1% (m/v) em tampão TAE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0). Então, uma alíquota de brometo de etídio foi adicionada para concentração final de 0,5 µg/mL, e o gel foi solidificado em molde por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi submerso em TAE 1X numa cuba de eletroforese para aplicação das amostras. Tanto o DNA quanto o marcador de peso molecular DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) foram diluídos

em tampão de amostra (Azul de bromofenol 0,25% e Sacarose 40%) na proporção 6:1. Então, o equipamento foi configurado para uma corrida a 100V por cerca de 1 hora. Por fim, os padrões de migração do DNA no gel foram analisados à luz UV no transiluminador UView™ Mini Transilluminator (Bio-Rad, cat:1660531) e fotografados para registro documental.

3.8 Expressão heteróloga dos scFvs em *E. coli*

Após a transformação das linhagens de *E. coli* SHy, os clones produtores foram selecionados pela triagem de crescimento em placas com o indutor ou o repressor da expressão heteróloga. Além disso, a otimização da expressão dos scFvs envolveu o estudo de três concentrações do indutor IPTG (0,5mM, 1mM e 2mM) e de três intervalo de tempo de indução: duas horas, quatro horas ou vinte horas (*overnight*) (**Figura 11**).

3.8.1 Seleção de clones produtores

Para a seleção de clones de *E. coli* SHy transformadas, colônias isoladas foram obtidas por estriamento (semeadura por esgotamento) em placas de LB Ágar (Ágar bacteriológico 1,4% (p/v)) com 30 µg/mL de canamicina e 10 µg/mL de cloranfenicol. Então, cada colônia foi replicada em placas de LB ágar suplementado ou com 1 mM de IPTG, para induzir a expressão, ou com 1% (p/v) de Glicose, para o controle repressivo. As placas foram incubadas a 37°C por 16–18 horas, até o crescimento de colônias visíveis. Neste experimento, foi possível identificar clones produtores, ou seja, que ativam a expressão da proteína recombinante durante a indução. Assim, as colônias que apresentaram crescimento adequado na placa com 1 mM de Glicose 1%, mas não cresceram significativamente na placa com IPTG foram selecionadas para as etapas subsequentes.

3.8.2 Padronização da expressão

Após a seleção dos clones produtores, uma placa de estriamento foi feita em LB Ágar com 40 µg/mL de canamicina, e incubada a 37°C *overnight*. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de Meio TB (em inglês, Terrific Broth: Extrato de levedura 2,4%, Peptona 2%, glicerol 0,4 %) completo com 10% de Tampão Fosfato (K₂HPO₄ 0,72 M,

KH_2PO_4 0,17 M, pH 7,2, filtrado em membrana de 0,22 μm) e com 1% Glicose, para incubação por 16 horas a 37°C e 200 rpm. Então, um mL do pré-inóculo de *E. coli* SHy transformadas foi reservado para estoque dos clones produtores em Glicerol 25%, em freezer a -80°C. O pré-inóculo restante foi dividido em dois inóculos de 30 mL de Meio TB completo com 1% Glicose e 40 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina, para crescimento bacteriano até OD_{600} entre 1,5 e 2, nas mesmas condições descritas anteriormente, a fim de obter uma alta densidade celular e maximizar a biomassa disponível para expressão da proteína após a indução. O próximo passo foi uma centrifugação de 3000 x g por 15 minutos a 30°C, a fim de retirar por completo a glicose do meio. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado e dividido em três alíquotas de 10 mL de meio TB completo para testar as condições de 0,5, 1 ou 2 mM de IPTG. Então, as células foram incubadas a 30°C e 200 rpm com coleta de alíquotas de 1 mL a cada 2 horas de cultivo. Por fim, as alíquotas de indução com 0h, 2h, 4h ou *overnight* foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C para análise das frações solúveis.

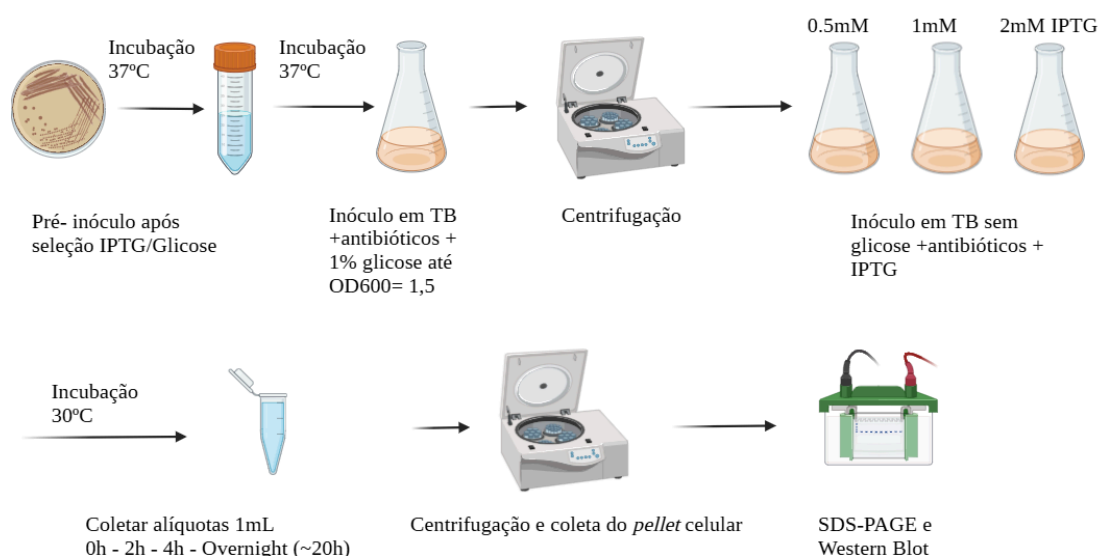


Figura 11: Etapas iniciais da produção em sistema bacteriano. As bactérias SHuffleTM transformadas com os vetores pET-SUMO anti-BMCA foram cultivadas em placas LB Ágar (com antibiótico) e selecionadas pelo crescimento na presença de glicose ou de IPTG. Então, as células foram cultivadas em meio TB até atingir a OD_{600} esperada de 1,5. A partir das culturas com alta densidade celular, o cultivo foi dividido para as condições com concentrações crescentes do indutor de expressão. As análises foram feitas a partir de alíquotas coletadas em tempos distintos, para a eletroforese e gel de proteína e imunodeteção por *western blotting*. Criado no BioRender.

3.8.3 Indução da expressão heteróloga por IPTG em maior escala

Uma colônia de *E. coli* SHy transformada foi obtida a partir de estriamento em placa de LB Ágar com 40 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e 10 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol. A seguir, um

pré-inóculo de 10 mL de meio LB com 40 µg/mL de canamicina e 1% de Glicose foi incubado a 37°C e 200 rpm. No dia seguinte, o pré-inóculo foi adicionado a 200 mL de Meio TB completo, com 1% Glicose e 40 µg/mL de kanamicina até o crescimento bacteriano atingir OD₆₀₀ 1,5 - 2. Então, o IPTG foi adicionado para uma concentração final de 1 mM para indução durante 4 horas a 30°C e 200 rpm. Após esta etapa, a cultura celular foi centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram armazenados em freezer -20 °C para posterior extração e purificação.

3.9 Extração de proteínas citoplasmáticas

A etapa de extração dos scFvs é necessária, uma vez que as proteínas expressas pela bactéria são acumuladas no citoplasma. Os *pellets* bacterianos pós-indução foram descongelados em gelo, e ressuspensos em vórtex com 10-20 mL de Tampão de Ligação (Fosfato de Sódio Monobásico 50mM, NaCl 500mM, pH 8) com 1mM do inibidor de protease PMSF (Fluoreto de Fenilmetanosulfonil, SIGMA, cas: 329-98-6). Então, este extrato bacteriano foi submetido aos métodos enzimáticos e/ou físicos de rompimento celular.

3.9.1 Extração por método enzimático

A lisozima é uma glicosidase com capacidade de hidrolisar componentes da peptidoglicana presente na parede celular bacteriana e, conseqüentemente, lisar as células. Uma solução estoque de 10 mg/mL da Lisozima (SIGMA, cat: 12650-88-3) em Tampão Tris 1M pH 9,5 foi preparada no dia da extração e adicionado ao extrato bacteriano para uma concentração final de 1 mg/mL. Após incubação de 30-45 minutos em gelo, com agitação periódica, o extrato foi ou purificado, ou submetido a uma etapa adicional de extração por sonicação.

3.9.2 Extração por método físico

O Ultrassonicador QSonica Q70 com a probe Microtip foi configurado para cinco ciclos com as seguintes condições: Amplitude 50%, Pulse On-Time 10”, Pulse Off-time

1'20'' e Process time 12'. Cada amostra tem um intervalo de 12 minutos no gelo entre cada ciclo, a fim de evitar o aumento de temperatura da amostra. Então, uma centrifugação com 14000 x g por 40 minutos à 4°C foi realizada para separar as frações solúveis (contendo o esperado das proteínas citoplasmáticas) e insolúveis (com DEBRIS celulares). Por fim, os sobrenadantes foram filtrados em filtro de membrana poliéter sulfona (PES) de 0,22 µm para serem armazenados em freezer a -20°C ou utilizados nas etapas subsequentes de processamento.

3.10 Obtenção dos scFvs anti-BCMA purificados

3.10.1 Purificação por Cromatografia de Afinidade

Além da purificação por kit, as proteínas também foram purificadas por meio de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC, sigla em inglês) via coluna de níquel HisTrap HP 1 mL (Cytiva, cat: GE29-0510-21). Todas as cromatografias foram realizadas no equipamento ÄKTA Pure (Cytiva®). As soluções foram filtradas em membrana de poliéter sulfona (PES) de 0,22µm e desaeradas em equipamento de banho ultrassônico Elmasonic S 40 H (ELMA) durante 30 minutos. O sistema foi configurado para realizar a cromatografia com o Tampão A, de Ligação (Fosfato de Sódio Monobásico 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8) e o Tampão B, de Eluição (Fosfato de Sódio Monobásico 50 mM, NaCl 500 mM e Imidazol 500 mM, pH 8). A etapa de eluição foi configurada para ser realizada de forma isocrática ou por meio de um gradiente linear de concentração de imidazol, variando entre 50 e 500 mM, indicado na Tabela 3. A ordem das etapas e as condições da purificação otimizadas estão listadas sequencialmente na Tabela 4. O *flow through*, contendo proteínas não ligadas à coluna, foi coletado pela válvula de Outlet e as eluições foram coletadas por fracionamento em alíquotas de 1 mL. As amostras que apresentaram picos nas leituras de UV (a 280 nm) foram selecionadas para processamento nas etapas seguintes.

Tabela 3: Padronização da purificação por IMAC.

Etapa	CV da Eluição (Volume de coluna)	% Tampão B	Concentração Imidazol (mM)
1	1	10	50
2	1	20	100
3	1	40	200
4	1	50	250
5	2	60	300
6	2	80	400
7	2	100	500

Tabela 4: Condições otimizadas de purificação por IMAC.

Etapa	Fluxo (mL/minuto)	Volume de Coluna (CV)	Porcentagem Tampão B (%)	Concentração Imidazol (mM)
Equilíbrio	1	2	1	5
Aplicação da amostra	0,5	–	1	5
Lavagem	1	25	4	20
Eluição	1	10	100	500
Equilíbrio	1	5	1	5

3.10.2 Concentração e diálise dos scFvs purificados

A concentração e troca de tampão das amostras de scFvs purificados por afinidade foram realizadas utilizando as unidades de ultrafiltração Amicon™ (Millipore, cat:UFC803024) com membrana de corte de 30 kDa. As amostras foram concentradas por meio de centrifugação a 7500 x g por 30 - 60 minutos a 4°C. Em seguida, este concentrado foi submetido a processos sucessivos de diluição e concentração em tampão PBS (NaCl 135

mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,2), a fim de realizar a troca de tampão para as etapas subsequentes.

3.11 Análise de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

O sistema Mini-Protean Tetra cell, 4-gel System (BioRad) foi utilizado para fazer as análises das proteínas em condições desnaturantes e redutoras. Para tal, dois géis de poliacrilamida com as fases separadora a 12% e concentradora a 4% foram polimerizados com os reagentes listados na ordem indicada na Tabela 5. A preparação de dois géis idênticos permite a análise simultânea das proteínas por diferentes métodos, sendo um utilizado para coloração e o outro para Western Blot. Inicialmente, o sistema foi montado para a preparação de géis com 1 mm de espessura. Os reagentes do gel foram misturados, sendo que o APS e o TEMED são os últimos a serem adicionados à solução por serem os agentes polimerizadores e catalisadores, respectivamente. Após adicionar os reagentes do gel separador nas placas de vidro, uma quantidade arbitrária de Isopropanol 100% foi lentamente acrescentada por cima do gel, a fim de permitir a polimerização nivelada desta fase. Depois de polimerizado, o sistema é então lavado com água destilada para retirar o álcool e para a polimerização do gel concentrador. Em seguida, as placas de vidro contendo os géis são posicionadas em cuba eletroforética vertical, e submergidos em Tampão de Corrida (Tris 125 mM, Glicina 960 mM, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5% e pH 8,3). As amostras a serem analisadas foram fervidas à 100°C em Tampão de amostra (Tris 200 mM, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, Glicerol 20%, Azul de Bromofenol 0,1%, pH 6,8), e então foram incubadas em gelo por um breve período. Após a montagem do sistema, as amostras e o marcador de peso molecular BLUelf Prestained Protein Ladder (GeneDireX, cat:PM008-0500) foram aplicadas no gel e o sistema foi conectado à fonte de alimentação PowerPac High-Current Power Supply (BioRad, Cat.:164-5052). A corrida foi configurada para uma voltagem constante de 120V por aproximadamente 2 horas e meia.

Tabela 5: Reagentes para polimerização do gel de Poliacrilamida.

Reagente	Gel separador 12%	Gel concentrador 4%
Água Milli-Q	3,2 mL	2 mL
Acrilamida/Bis 30%	4 mL	540 µL
1,5 mM Tris-HCl pH 8,8	2,8 mL	–
1 mM Tris-HCl pH 6,8	–	900 µL
SDS 10%	100 µL	40 µL
Persulfato de amônio (APS) 10%	100 µL	20 µL
TEMED	10 µL	6 µL

3.11.1 Coloração do gel por Comassie Blue

Para um dos métodos de coloração, um gel espelho foi submergido em solução corante (Azul de Comassie R-250 0,25% (*p/v*), metanol 30% (*v/v*) e ácido acético glacial 7%). Após 20 horas, o gel foi incubado repetidamente com solução descorante (Metanol 30% (*v/v*) e Ácido acético glacial 7%) até as bandas de proteínas estarem visíveis e o gel translúcido.

3.11.2 Coloração do gel por Nitrato de Prata

Para amostras purificadas, o protocolo de coloração SilverQuest™ (Thermo Fisher Scientific, cat: LC6070) foi utilizado por ter a capacidade de corar nanogramas de proteína. Primeiro, o gel é submerso em Solução de Fixação (40% Etanol, 10% Ácido Acético) por 20 minutos, ou *overnight*, para remover o excesso de detergente do gel. Após uma lavagem por 10 minutos com Solução de 30% Etanol, o gel é incubado na Solução de Sensibilização (1% Sensitizer e 30% Etanol). Depois, há duas etapas de lavagem de 10 minutos cada; a primeira com Solução de 30% Etanol, e a segunda com água ultrapura. Então, o gel é incubado na Solução de Coloração (1% Stainer) por 15 minutos sob abrigo da luz, e lavado por 20-60 segundos com água Milli-Q. Por fim, o gel é incubado com a Solução Reveladora (2,5%

Developer) para reduzir os íons de prata para prata metálica até desenvolver as bandas de proteína esperadas. Para armazenar o gel, é adicionado a Solução de Parada (1% Ácido Acético) e então é feita uma última lavagem com água Milli-Q.

3.12 Imunodeteção por *Western Blotting*

Após a eletroforese, um dos géis espelhos foi usado para imunodeteção das proteínas por *Western Blot*. O gel, seis papeis filtro e a membrana de nitrocelulose foram incubados em Tampão de Transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% (*m/v*), Metanol 20% (*m/v*)), e então o sistema de eletrotransferência semi-seca (TE 77 PWR Semi-Dry Transfer, Amersham Biosciences, Cat: 2408120003) foi montado na seguinte ordem: três papeis filtro, membrana de nitrocelulose 0,2 μ m, um dos géis espelho, e três papeis filtro. As condições de transferência foram 150mV por 1h. Então, a membrana foi incubada por 1h em 10 mL de Solução de Bloqueio (PBS 1X com 0,1% Tween-20 e 5% de leite desnatado) e, após este período, lavada três vezes com PBS-T. O anticorpo primário anti-His (Invitrogen, Cat: A5588) na concentração 1:2.000 em 10 mL de PBS-T, e o anticorpo secundário anti-IgG Mouse conjugado à Fosfatase Alcalina na diluição de 1:2.500 em TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20, pH 8) foram incubados em agitação leve por 1h cada, sendo que foram realizadas três lavagens com PBS-T entre cada incubação dos anticorpos. Para a revelação, a membrana foi brevemente incubada em Tampão da Fosfatase Alcalina (APB, sigla em inglês: 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl e Tris 100 mM, pH 9,4) para o equilíbrio do pH; então 100 μ L de NBT/BCIP(Roche, Cat: 11 681 451 001) foi adicionado à solução com a membrana e coberto com papel alumínio durante 10 minutos, ou até a revelação das bandas de proteína.

3.13 Quantificação de proteínas purificadas

3.13.1 Por fluorimetria

Para a primeira quantificação, o kit de quantificação por fluorimetria Qubit™ Protein BR Assay (Invitrogen Cat. Q33211) foi utilizado. Neste método, as amins das proteínas interagem com o reagente de marcação e resulta em uma fluorescência que é mensurada pelo equipamento. Inicialmente, uma Solução de Trabalho foi preparada com o tampão fornecido pelo kit e com o reagente de marcação na concentração de 1:200, para a diluição das amostras

purificadas e dos padrões de calibração. Então, 5µL das amostras ou 10µL dos dois controles de calibração (Padrão 1: 0 mg/mL BSA e Padrão 2: 10 mg/mL BSA) foram adicionados aos tubos de 0,5 mL (Qubit™ assay tubes, Cat.: Q32856) e completadas com a solução de trabalho para o volume final de 200µL. A leitura no equipamento foi realizada após incubação à temperatura ambiente por 15 minutos, conforme protocolo. A concentração das amostras foi determinada pela média de três leituras.

3.13.2 Por Espectrofotometria

O outro método utilizado para a quantificação foi por meio da absorbância. Para tal, a absorbância a 280 nm das amostras foi quantificada no Espectrofotômetro (Jasco V-530 UV/VIS), após calibração do equipamento com leitura apenas do tampão presente nas amostras. Então, o valor da absorbância foi dividido pelo coeficiente de extinção molar das construções, seguindo a Lei de Lambert-Beer, em que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da amostra:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Sendo que: A = absorbância (sem unidade), ϵ = coeficiente de extinção molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l = caminho óptico (cm) e c = concentração da substância (mol/L).

O coeficiente de extinção molar de cada construção foi calculado utilizando o programa ProtParam (ExPASy Server), sendo eles: scFv anti-BCMA Murino: 1,303 mg/mL; Humanizado: 1,384 mg/mL; Harmonizado: 1,384 mg/mL; e Caótico: 1,385 mg/mL.

3.14 Exclusão Molecular

O fracionamento em coluna de exclusão molecular com a coluna HiLoad® 16/600 Superdex® 75 pg (Cytiva, Ref: 28-9893-33) foi utilizado para avaliar a agregação dos fragmentos de anticorpos purificados por cromatografia de afinidade. A matriz desta coluna é feita de polímeros de agarose-dextrana com 34 µm de tamanho e um volume de coluna de aproximadamente 120mL. Isto possibilita a filtração em gel de alta resolução, com o objetivo de separar proteínas com pesos moleculares entre 3.000-70.000 Da. As cromatografias foram realizadas no equipamento ÄKTA Pure (Cytiva®), em uma sala com temperatura constante de 20 °C.

3.14.1 Padronização da Coluna de Cromatografia

Uma corrida padrão foi realizada com proteínas de massa molecular conhecida, a fim de determinar as frações de eluição correspondentes aos scFvs. Para tal, a proteína ovoalbumina (~45 kDa) foi utilizada em concentrações a 10 mg/mL, pelo tamanho molecular ser próximo ao dos scFvs. As amostras foram dissolvidas em Tampão Fosfato de Sódio (0,2 M pH 6,8) e filtradas em membrana de poliéter sulfona (PES) de 0,22µm. Então, para a coluna HiLoad, 500µL das amostras foram injetadas no equipamento, conforme recomendado pelo manual, a um fluxo de 1 mL/min.

3.14.2 Fracionamento por Exclusão Molecular

As amostras concentradas de anticorpos purificados por afinidade foram submetidas a uma nova etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, com o objetivo de identificar a presença e a distribuição de partículas agregadas. A coluna foi previamente equilibrada com 2 CV de Tampão Fosfato de Sódio e, após cada purificação, a coluna era novamente equilibrada com o mesmo tampão. As amostras foram injetadas no equipamento por meio de capilares, e coletadas via fracionamento em alíquotas de 1 mL. As condições da corrida foram as seguintes:

Tabela 6: Condições das etapas de purificação por exclusão molecular.

HiLoad 16/600		
Etapa	Fluxo (mL/minuto)	Volume de Coluna (CV)
Equilíbrio	1	0,5
Aplicação da amostra	—	—
Eluição	1	1
Equilíbrio	1	3

3.15 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

A distribuição de tamanho das proteínas purificadas foi determinada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Esta técnica de biofísica baseia-se no movimento browniano de moléculas em uma solução, que ocorre pela colisão aleatória destas com componentes do solvente. Assim, as moléculas de menor tamanho se difundem rapidamente, em comparação com moléculas maiores que apresentam taxas de difusão mais lentas. No DLS, um feixe de luz é direcionado a uma parte fixa da amostra, e o espalhamento da luz é detectado para criar um padrão de flutuação de intensidade. Essas flutuações são resultantes do movimento randômico das partículas que passam pela área de incidência do feixe de luz, e variam de acordo com o tempo e com a taxa de difusão das moléculas. Neste caso, partículas menores se difundem mais rapidamente e apresentam mais flutuações de intensidade do espalhamento da luz, enquanto que partículas maiores se comportam de maneira oposta.

O equipamento realiza várias detecções dessas flutuações em um intervalo de nano ou microssegundos, para comparar e quantificar a similaridade entre os padrões de intensidade ao longo do tempo, por meio de uma função de autocorrelação. As partículas pequenas, que se difundem rapidamente, vão apresentar um coeficiente de correlação que varia com rapidez ao longo do tempo. Já as partículas maiores demoram mais tempo para a variação deste coeficiente de autocorrelação, pelo fato de que difundem lentamente pela amostra. Então, o *software* do equipamento utiliza o coeficiente de autocorrelação para determinar o coeficiente de difusão translacional (D_t), que representa a probabilidade de movimentação das moléculas devido ao movimento browniano. Esse valor é então aplicado à equação de Stokes-Einstein para calcular o raio hidrodinâmico (R_h) e o diâmetro em nanômetros das moléculas globulares analisadas.

O equipamento foi configurado para os seguintes parâmetros: temperatura à 25°C; dispersante PBS pH 7,2 (NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) com viscosidade 1,02 e índice de refração 1,332; detecção do espalhamento à 173° *backscatter*. As proteínas purificadas, dialisadas em PBS e quantificadas foram diluídas no mesmo tampão para concentrações de 0,05 - 0,1 - 0,3 e 0,6 mg/mL, a depender do experimento, em cubeta de quartzo 10 mm (PCS8501, para análises de 0,5 mL, ou DTS2145, para experimentos com 0,1 mL de amostra). Então, as amostras foram submetidas a 3 minutos em câmara de vácuo, a fim de eliminar possíveis bolhas na solução. Foram realizadas 7 medições com tempo de coleta de 10 segundos por leitura, a uma temperatura de

25°C. Os resultados foram analisados no Software Zetasizer® (versão 7.10) e estão expressos como diâmetro hidrodinâmico médio (d.nm), a intensidade relativa da luz espalhada por cada população (% Intensidade), quantidade relativa estimada de massa (% Massa) ou número de partículas (% Número) e porcentagem do índice de polidispersidade (Pdl). Vale ressaltar que o Pdl é uma medida de heterogeneidade das partículas, e foi utilizada para analisar a uniformidade das amostras.

3.16 Citometria de Fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada a fim de avaliar a expressão do antígeno BCMA, e também a ligação dos anticorpos em formato de scFv. As linhagens de células humanas Raji e U266 foram caracterizadas com marcações imunogênicas para verificar a presença ou ausência dos antígenos BCMA, CD19 e CD20. Para tal, as culturas celulares foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos e lavadas duas vezes com Tampão FACS (em inglês, Fluorescent Activated Cell Sorting, tampão PBS com 2% de Soro Fetal Bovino e 10mM de EDTA). O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas no mesmo tampão, e 10 µL da solução foram utilizados para contagem em câmara de Neubauer via diluição 1:1 (v/v) em Azul de Tripiano 0,4% (p/v). Após a contagem e identificação da viabilidade celular, $0,5 \times 10^6$ células foram utilizadas para cada condição experimental.

Inicialmente, as células foram incubadas com 20µL do reagente FCR *Binding Inhibitor* (eBioscience cat: 14-9161-73) por 30 minutos à 4°C, para reduzir a potencial coloração de anticorpos não específicos causada pelos receptores IgG presentes na membrana celular. A seguir, as células foram incubadas com os scFvs nas concentrações de 0,5 - 1 - 2 µg (sendo 200 µL de volume final), também por 30 minutos à 4°C. Para as caracterizações, 0,25 µg/ teste do anticorpo anti-human-CD19-PE (eBioscience cat: 12-0199-42), 1:10 (v/v) do anti-human-CD20-FITC (BD Biosciences) e 1µg do anti-BCMA comercial (Thermo Fisher cat: MA5-31673) foram utilizados nas marcações únicas ou duplas.

Em seguida, os anticorpos secundários anti-His Tag-FITC (Invitrogen cat: AD1.1.10) ou anticorpo anti-IgG Murino-FITC (Sigma-Aldrich cat: F0257) na diluição 1:10 (v/v) foram adicionados às amostras adequadas e incubados ao abrigo da luz. Depois, o Tampão FACS foi adicionado em quantidade suficiente para 1 mL, a fim de realizar uma lavagem final e retirar os anticorpos não ligados. Por fim, as células foram ressuspensas em 200µL de tampão de

FACS e transferidas para tubos apropriados para leitura no Citômetro Accuri™ C6 Plus Personal (BD Biosciences).

Os dados obtidos foram analisados por meio do *software* FlowJo e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas para cada marcação em estudo. As estratégias para selecionar as populações de interesse, a partir daqui chamadas de “gates”. As células linfóides foram selecionadas via delimitação do tamanho pela complexidade celular utilizando os parâmetros de dispersão frontal (FSC, do inglês *Forward Scatter*) e dispersão lateral (SSC, do inglês *Side Scatter*), respectivamente. Então, outro gate é selecionado pela análise do gráfico FSC-H (Height, altura) por FSC-A (Área) para identificação de células únicas dentro dos linfócitos. Após a seleção das células únicas e a exclusão de agregados, a identificação de eventos específicos foi realizada utilizando os anticorpos conjugados aos fluoróforos descritos anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 Predição *in silico* do perfil de agregação dos scFvs anti-BCMA

O *Software* Tango considera que a sequência de peptídeos está desnaturada e exposta, então contempla apenas a estrutura primária da proteína. Desta forma, o software indica que determinados segmentos de resíduos de aminoácidos apresentam probabilidade acima de 5%, e são considerados como sequências com um potencial teórico de agregação.

A análise do perfil de agregação do scFv anti-BCMA Murino indicou que este fragmento de anticorpo possui um nível baixo de propensão à agregação, com cerca de 10% na CDR-L2 e na CDR-H2. Porém, o primeiro anticorpo Humanizado analisado apresentou propensão à agregação maior que 20% nos resíduos de aminoácidos 165 a 170, antes da CDR-H2 do VH. Já o segundo Humanizado obteve maior propensão a agregar nos resíduos anteriores à CDR-H3, com potencial maior que 60% para os aminoácidos 217 a 220. As análises do scFv Harmonizado, com as alterações dos aminoácidos do VH para resíduos menos propensos à agregação identificados no anticorpo murino ou provenientes de outros germinais humanos (encontrados pelo IgBlast), resultaram em uma redução do potencial de agregar observado nos scFvs Humanizados. Com isso, as mutações no scFv Harmonizado foram capazes de reverter o potencial de agregação do scFv Humanizado, reduzindo o potencial de agregação do VH para menos de 10%. O anticorpo Caótico foi obtido a partir do conjunto de resíduos de aminoácidos com maior propensão de agregar, identificados nos germinais humanos e no scFv Humanizado. Isto posto, a predição do potencial de agregação do scFv Caótico foi definido como maior que 50% nos resíduos 167 a 169, e também nos resíduos 215 a 220 do VH. Os gráficos gerados pelo *Software* estão apresentados na **Figura 12**.

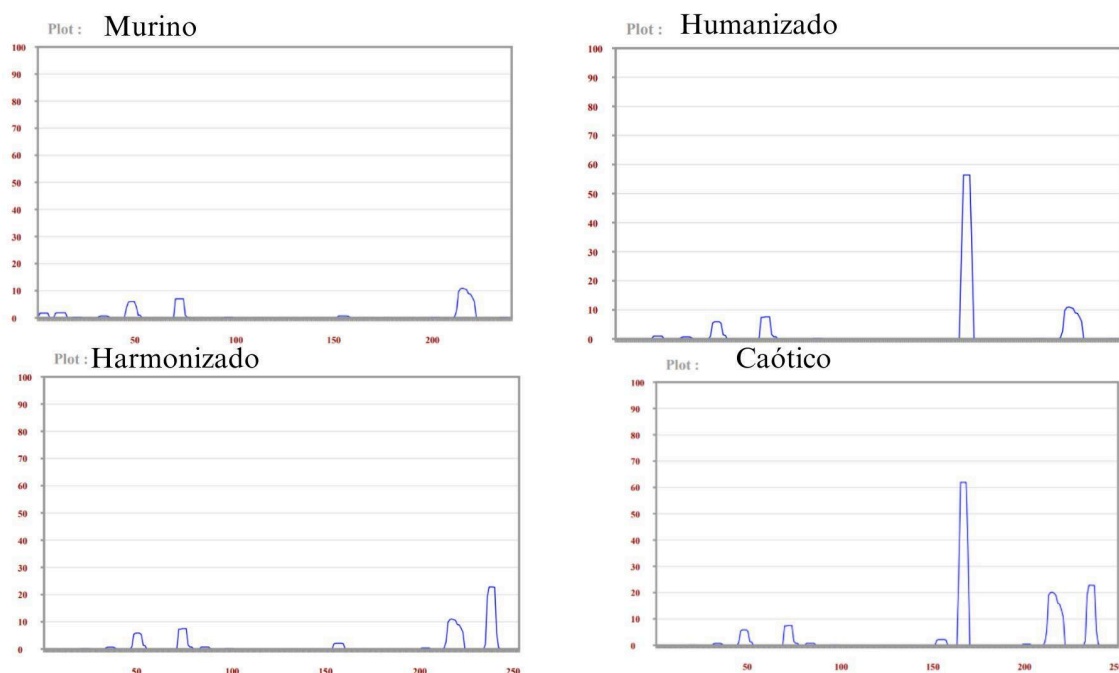


Figura 12: Probabilidade de agregação dos scFvs. As sequências primárias dos scFvs anti-BCMA foram analisadas no *software* Tango, e os gráficos evidenciam as diferenças na propensão a agregar de cada anticorpo. O eixo x apresenta o potencial teórico de agregação em porcentagem, e o eixo y mostra a sequência peptídica (VL-linker-VH) dos anticorpos. O scFv Murino apresentou o máximo da propensão à agregação nas regiões próximas ao carboxi-terminal do VH, com 10%, já o Humanizado apresentou um potencial de 60%. As alterações na sequência de aminoácidos para o scFv Harmonizado possibilitaram a redução do potencial de agregação; enquanto que, para o scFv Caótico, elas reverteram para a maior probabilidade de agregar.

4.2 Otimização da expressão heteróloga dos scFvs em *E. coli*

4.2.1 Obtenção de linhagens de *E. coli* transformadas

Os genes sintetizados no vetor pET-Sumo foram amplificados por meio da transformação por choque térmico na linhagem de *E. coli* XL1-Blue. Então, duas colônias de cada construção foram selecionadas para purificação de DNA e digestão com as enzimas de restrição BamH I e Hind III, a fim de confirmar os clones transformantes. O gel de agarose 1,2% (p/v) da **Figura 13** apresenta as amostras de DNA intacto e digerido das construções dos scFv anti-BCMA, sendo que o tamanho esperado dos fragmentos após a digestão dupla era de aproximadamente 770 pb e 5590 bp. Conforme esperado, ambos os clones de cada construção apresentaram o padrão de bandas previsto. Além disso, foi observado que as amostras de DNA intacto do scFv Murino Clone 2, scFv Humanizado Clone 1 e Clone 2 exibiram bandas com migração mais lenta no gel em comparação aos demais DNAs. Esse padrão sugere diferenças na conformação estrutural, possivelmente indicando que os DNAs com menor mobilidade estão em uma forma menos compacta. Por outro lado, as bandas

intactas de menor tamanho aparente podem corresponder à conformação super enrolada (*supercoiled*) dos plasmídeos, que é a mais indicada para uma transformação bacteriana eficiente (Kimoto; Taketo. 1996).

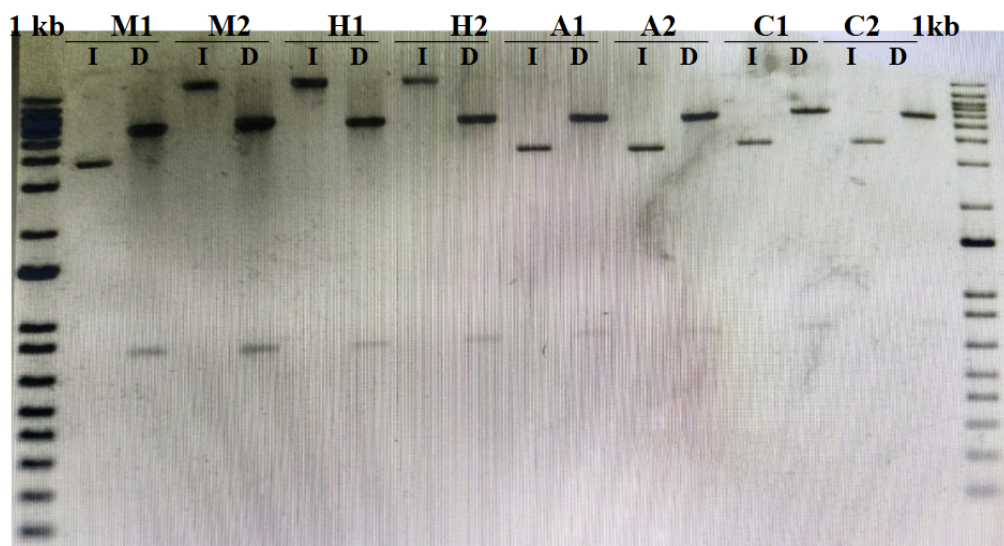


Figura 13: Perfil de restrição dos vetores de expressão dos scFvs recombinantes. Análise por luz ultravioleta de gel de agarose com os DNAs plasmidiais purificados e submetidos à digestão enzimática dupla com BamH I e Hind III. A imagem apresenta dois clones de bactérias *E. coli* transformadas com os plamídios codificadores dos scFvs murino (M1 e M2), Humanizado (H1 e H2), Harmonizado (A1 e A2) e Caótico (C1 e C2), com as amostras divididas em DNAs intactos (I) ou digeridos (D).

A Tabela 7 indica as quantificações do DNA purificado de inóculos a partir de 5 mL de culturas das colônias transformadas. Os clones que exibiram a maior concentração de DNA foram selecionados para a transformação em *E. coli* SHy, sendo eles: Murino Clone 1, Humanizado Clone 1, Harmonizado Clone 2 e Caótico Clone 2.

Tabela 7: Quantificação dos DNAs plasmidiais purificados.

Construção	Concentração (ng/uL)	Construção	Concentração (ng/uL)
scFv Murino C1	72,8	scFv Harmonizado C1	75,4
scFv Murino C2	58,2	scFv Harmonizado C2	92,1
scFv Humanizado C1	105,0	scFv Caótico C1	66,2
scFv Humanizado C2	83,5	scFv Caótico C2	75,0

4.2.2 Comparativos das condições de cultivo celular

Após a confirmação dos plasmídeos, 200 ng do DNA purificado foram utilizados para a transformação de *E. coli* SHy. Os clones transformantes foram selecionados em placas de LB Ágar contendo 1mM do indutor IPTG ou Glicose 1%. Em seguida, as placas foram avaliadas pelo crescimento de colônias em glicose, mas multiplicação reduzida na condição com IPTG. Assim, dois clones que obtiveram esses padrões de crescimento foram selecionados para a otimização da expressão, sendo: scFv Murino Clone 4 e Clone 21; scFv Humanizado Clone 20 e Clone 22; scFv Harmonizado Clone 27 e Clone 28; scFv Caótico Clone 3 e Clone 10.

Para o primeiro teste de produção, as condições testadas foram indução a 30 °C com 0,5 mM, 1 mM ou 2 mM do IPTG por 2h, 4h ou 20h (*overnight*). As alíquotas de cultura celular coletadas em cada intervalo de tempo foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting*. Os resultados deste experimento indicam que a produção de todos os scFvs foi realizada com sucesso, apontando um acúmulo dependente de tempo. Quanto ao scFv Murino (**Figura 14**), o inóculo à 37°C do clone 4 começou com OD₆₀₀ de 0,05 e atingiu a densidade óptica de 1,55 depois de 4 horas e meia. Já o clone 21 atingiu OD₆₀₀ = 1,65 depois de 3 horas e 20 minutos, mas esta diferença de crescimento entre clones pode ser consequência do clone 21 ter iniciado com 0,2 de densidade óptica. Ambos os clones apresentaram expressão consideravelmente maior a partir de 4 horas de indução, com pouca diferença qualitativa em relação à produção *overnight*. Não foi observada distinção de expressão entre as concentrações de IPTG testadas, além da presença dos scFvs ter sido identificada assim que o indutor foi adicionado ao meio (zero horas de indução).

Sobre o scFv Humanizado (**Figura 15**), o inóculo dos dois clones iniciou com 0,2 de densidade óptica e atingiu OD₆₀₀ esperada após 3 horas e 20 minutos. Também foi observado que houve expressão das proteínas desde o início da indução, mas com maior acúmulo das proteínas a partir de 4 horas de indução. Nota-se que há a presença de proteínas heterólogas com tamanho molecular menor que o esperado, com acúmulo observado principalmente na indução *overnight*, possivelmente resultado de degradação proteica.

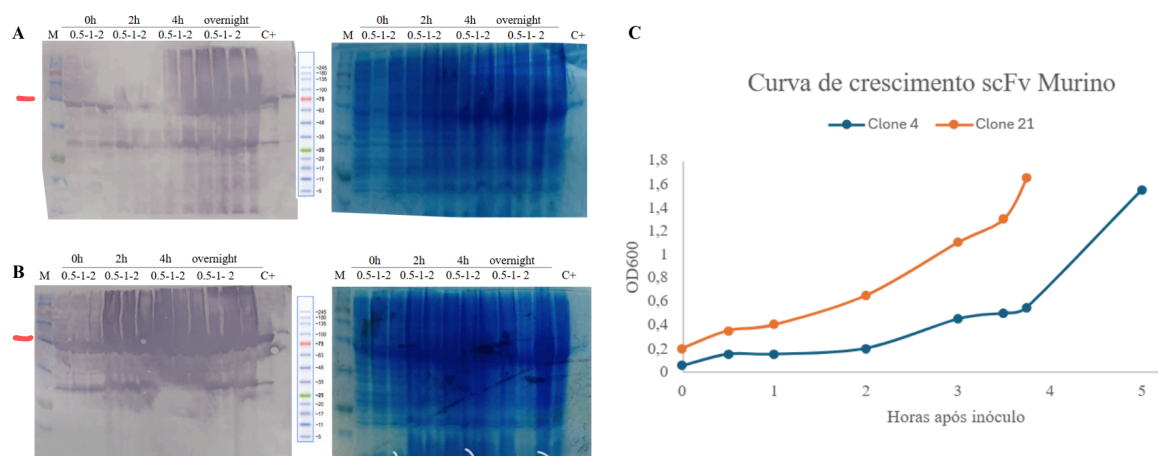


Figura 14: Produção do scFv Murino. Os testes iniciais da padronização do cultivo de SHy transformadas com scFv Murino foram feitos em meio com IPTG a 0,5, 1 ou 2 mM, e por 2h, 4h e 20h (*overnight*). (A) *Western Blot* e SDS-PAGE dos *pellets* celulares nas condições de cultivo dos Clone 4 e do Clone 21, indicado pela linha vermelha. (B). (C) Curva de crescimento dos clones de scFv Murino em meio com glicose, representando amostra única.

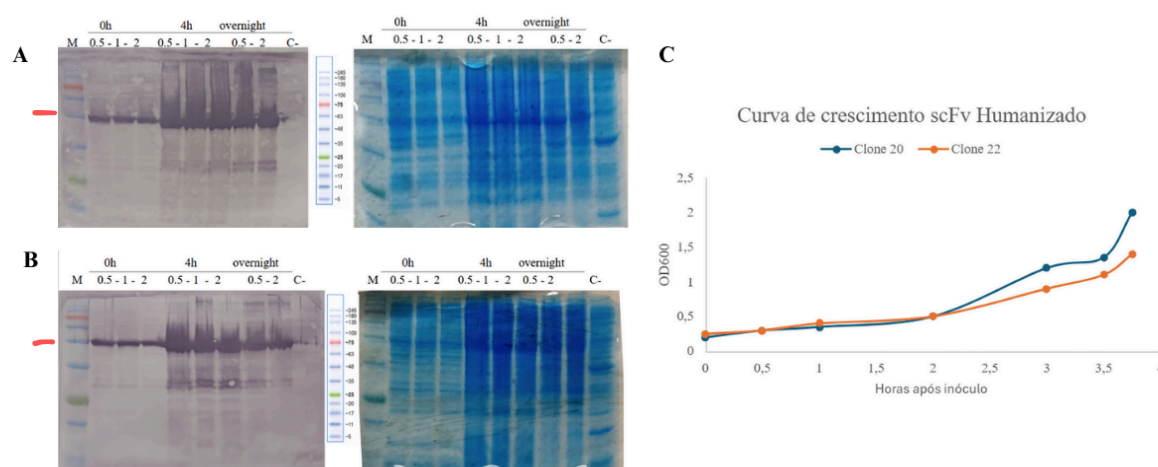


Figura 15: Produção do scFv Humanizado. (A) *Western Blot* e SDS-PAGE dos *pellets* celulares do clone 20 e do clone 22 (B), dos testes iniciais da produção de SHy transformadas com scFv Humanizado, indicado pela linha vermelha, e cultivadas em meio com IPTG 0,5, 1 ou 2 mM e por 2h, 4h e 20h (*overnight*). (C) Curva de crescimento de ambos os clones.

Como não detectamos diferença qualitativa entre 1mM e 2mM de IPTG, a expressão dos scFvs Harmonizado e Caótico foi testada apenas com 0,5 e 1mM do indutor. Quanto ao scFv Harmonizado (Figura 16), o acúmulo dependente do tempo também foi observado em ambas concentrações de IPTG testadas. Consistentemente, a expressão do scFv na incubação *overnight* resultou em um acúmulo mais elevado de proteínas detectadas, o que pode

comprometer a solubilidade e a recuperação da proteína de interesse devido à possível degradação proteolítica ou formação de agregados ao longo do processo de indução. Os inóculos dos clones 27 e 28 do scFv Harmonizado atingiram a densidade óptica esperada com 4 horas de crescimento a 37°C e 250 rpm, sendo que o clone 27 atingiu a densidade óptica esperada em menor tempo em comparação ao clone 28. Esta diferença no crescimento sugere uma maior eficiência na expressão do DNA recombinante ou uma melhor adaptação às condições do meio.

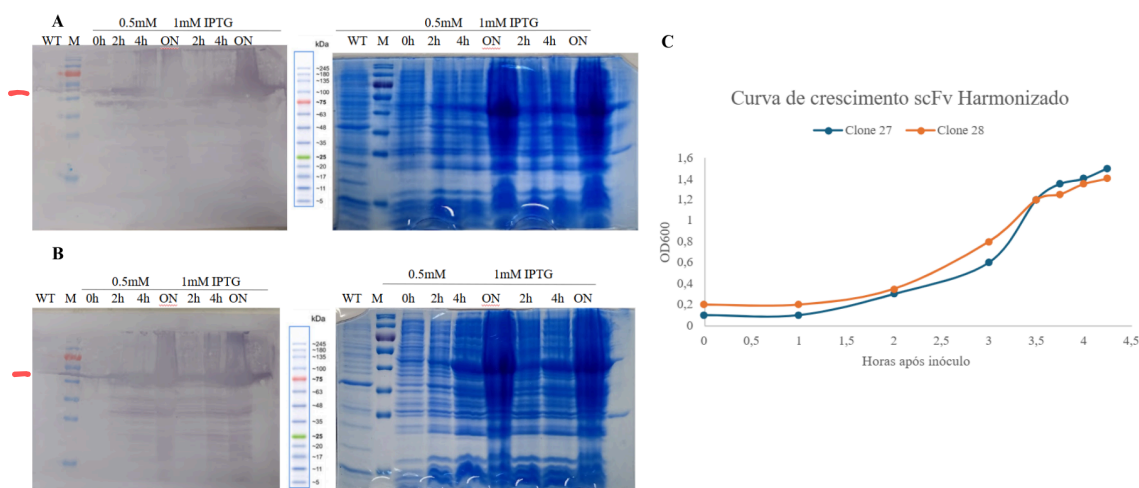


Figura 16: Produção do scFv Harmonizado . Teste da curva de crescimento de SHy transformadas com scFv Harmonizado, indicado pela linha vermelha, e cultivadas em meio com IPTG 0,5, 1 ou 2 mM e por 2h, 4h e 20h (*overnight*). (A) *Western Blot* e SDS-PAGE dos *pellets* celulares nas condições de cultivo do clone 27 e do clone 28 (B). (C) Curva de crescimento dos clones na etapa anterior à indução.

O crescimento bacteriano das SHy transformadas com o scFv Caótico (**Figura 17**) foi o mais demorado entre os anticorpos testados. Os inóculos dos clones 3 e 10 iniciaram com densidade óptica de 0,3 e 0,25, respectivamente, e atingiram a OD₆₀₀ esperada após 5 horas e 20 minutos. Tal impacto na taxa de crescimento pode ser ocasionado pelo impacto da expressão de proteínas com maior tendência à agregação na fisiologia e no metabolismo bacteriano. A análise por *western blotting* indicou que há expressão do scFv de ambos os clones com zero horas de indução, e também que a incubação *overnight* apresenta o maior acúmulo de proteínas. Não houve uma diferença aparente entre 0,5 e 1mM de IPTG, sendo que ambas as concentrações induziram a expressão proteica esperada.

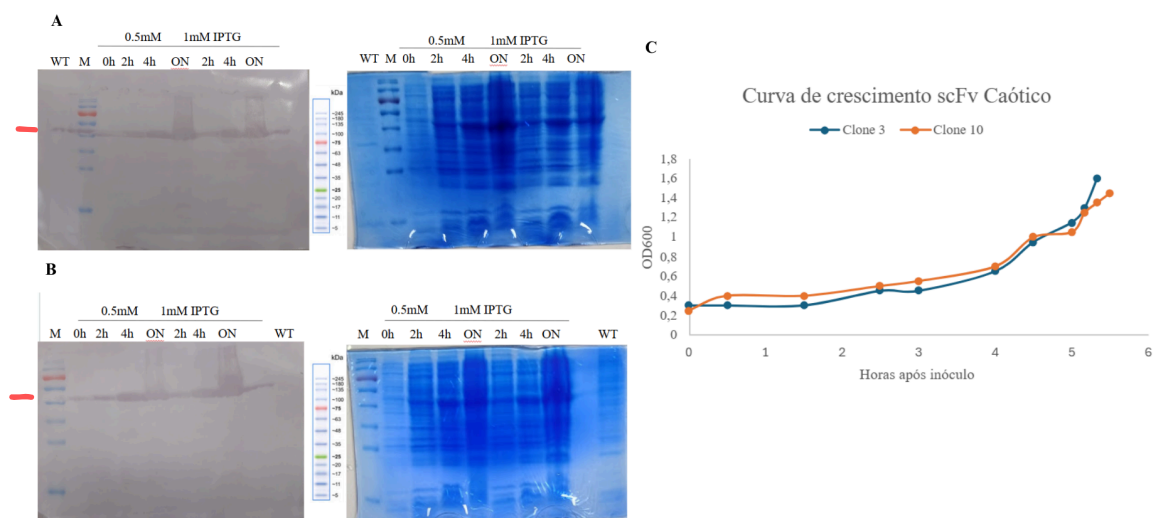


Figura 17: Produção do scFv Caótico. (A) *Western Blot* e SDS-PAGE dos *pellets* celulares dos testes de cultivo do clone 3 e do clone 10 (B), nas condições com IPTG 0,5, 1 ou 2 mM e por 2h, 4h e 20h (*overnight*). (C) Curva de crescimento dos clones evidenciando que as bactérias transformadas com o scFv Caótico, indicado pela linha vermelha, atingiram a OD₆₀₀ esperada após 5 horas de cultivo.

Com base nesses resultados, a condição de produção foi padronizada utilizando 1mM de IPTG e um tempo de indução de 4 horas. A escolha dessa condição considerou a necessidade de equilibrar a produção proteica e a viabilidade celular, uma vez que tempos de incubação mais prolongados podem resultar em efeitos deletérios, como estresse celular e acúmulo de proteínas mal dobradas ou agregadas, comprometendo a qualidade e o rendimento final da proteína recombinante. A seleção dos clones de scFvs foi baseada na eficiência de crescimento, determinada pelo menor tempo necessário para atingir a densidade óptica entre 1,5 e 2. Os clones selecionados para os ensaios subsequentes foram: scFv Murino clone 21, scFv Humanizado clone 22, scFv Harmonizado clone 27 e scFv Caótico clone 10.

4.3 Padronização da Obtenção dos scFvs anti-BCMA recombinantes

4.3.1 Comparativo das condições de extração

Após a otimização da expressão dos scFvs, a etapa subsequente consistiu na padronização da extração de proteínas citoplasmáticas. Em seguida, as frações solúveis e insolúveis foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições

desnaturantes. Conforme a **Figura 18**, ambos os métodos de extração avaliados foram capazes de extrair os scFvs expressos em *E. coli* SHy, mas com rendimentos distintos entre si. A análise qualitativa por eletroforese em gel de poliacrilamida revelou que a extração utilizando apenas lisozima resultou na menor recuperação da proteína de interesse, um resultado de acordo com o esperado. A extração por sonicação resultou em um aumento considerável na detecção do scFv por *Western Blot*, sendo a segunda condição mais eficiente. Com isso, a condição com maior acúmulo de proteína observado na fração solúvel foi a extração por lisozima mais sonicação. O maior rendimento aparente da extração com ambos os métodos foi observado tanto pelo *Western Blot*, quanto pela coloração com Comassie Blue. Assim, esta condição otimizada será utilizada para a extração das proteínas heterólogas nos experimentos subsequentes.

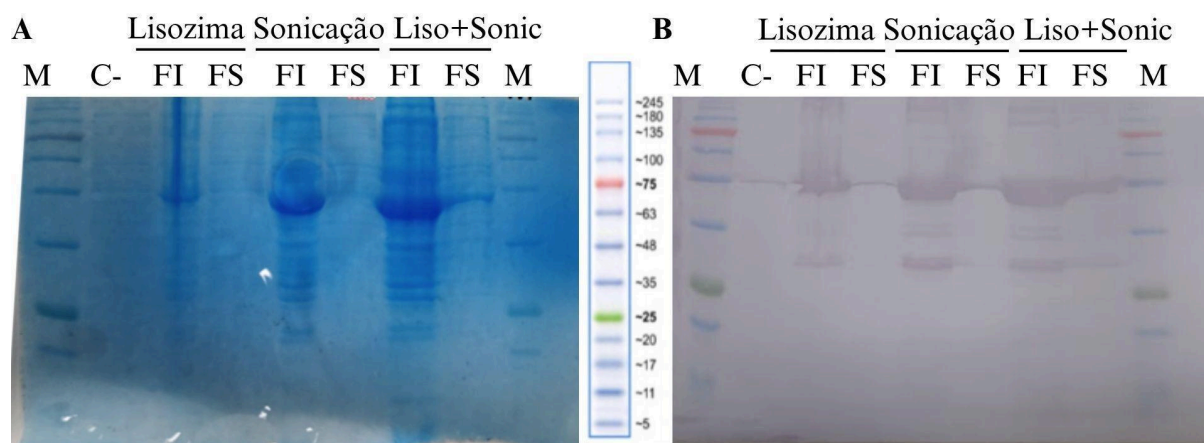


Figura 18: Otimização da extração das proteínas heterólogas. (A) Gel de poliacrilamida redutor e **(B)** *Western Blot* das extrações com lisozima (0,5 mg/mL), sonicação, ou ambos métodos (Liso+Soni). A imagem apresenta as frações insolúveis (FI) e frações solúveis (FS) após extração de uma produção *overnight* do scFv Murino com 1 mM de IPTG, indicado pela linha vermelha, além do controle negativo (C-) e o marcador (M) de proteínas.

Também foi observado que os scFvs estavam presentes nas frações insolúveis após extração, mas em menor intensidade do que nas frações solúveis correspondentes. Isto indica que as proteínas de interesse estão majoritariamente na fração solúvel. Observou-se que o controle negativo também apresentou uma banda no tamanho esperado para o scFv, embora em menor intensidade quando comparado à condição de extração selecionada. Esse resultado pode estar associado à lise celular parcial causada pelo processo de congelamento e descongelamento do *pellet* bacteriano.

4.3.2 Otimização da purificação por Cromatografia de Afinidade

Após a padronização das condições de extração, a etapa seguinte foi a otimização do protocolo de purificação. Vale ressaltar que os scFvs apresentam a cauda de histidina (His-tag) na extremidade amino-terminal, permitindo sua purificação por cromatografia em resina de íons metálicos imobilizados (IMAC) devido à sua alta afinidade pelo níquel. Inicialmente, a otimização da purificação foi realizada modulando as concentrações de imidazol em cada etapa do protocolo. A inclusão de imidazol nas etapas de ligação e de lavagem reduz a adsorção inespecífica de proteínas à resina de níquel, enquanto seu aumento na fase de eluição favorece a recuperação seletiva das proteínas de interesse. Isso é possível pois o imidazol livre em solução também tem capacidade de ligação ao níquel, e compete diretamente com a cauda de histidina dos scFvs pelos sítios de ligação no metal.

A fim de permitir o escalonamento da purificação, além de otimizar o rendimento da purificação, o sistema de cromatografia líquida ÄKTA pure™ foi utilizado. Para o primeiro experimento, os *pellets* celulares de produções de 50mL do scFv Murino e do scFv Humanizado foram ressuspensos em Tampão de Lise, para a extração com lisozima seguida pela sonicação. Então, o teste de purificação foi realizado com as seguintes condições: equilíbrio da coluna HisTrap com 5mM de imidazol, lavagem com 10 mM, e um gradiente de imidazol na etapa de eluição. As alíquotas foram coletadas por fracionamento e foram enumeradas de acordo com a concentração de imidazol: 1 e 2 de 50 mM, 3 e 4 de 100 mM, 5 e 6 de 200 mM, 7 e 8 de 250 mM, 9, 10, 11 e 12 de 300 mM, 13, 14, 15 e 16 de 400 mM e 17, 18, 19, 20 de 500 mM. Esse ajuste gradativo da concentração de imidazol tem como objetivo otimizar a recuperação da proteína de interesse, tornando a eluição mais eficiente, reduzindo a diluição da amostra e minimizando a presença de contaminantes inespecíficos. A presença dos scFv anti-BCMA nas alíquotas da eluição foi inicialmente analisada por Dot-Blot (**Figura 19B**), assim como o *flow through* das etapas de ligação e lavagem. Em seguida, uma eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blotting* (**Figura 19A**) foi realizada para avaliar a pureza da eluição dos scFvs nas concentrações testadas.

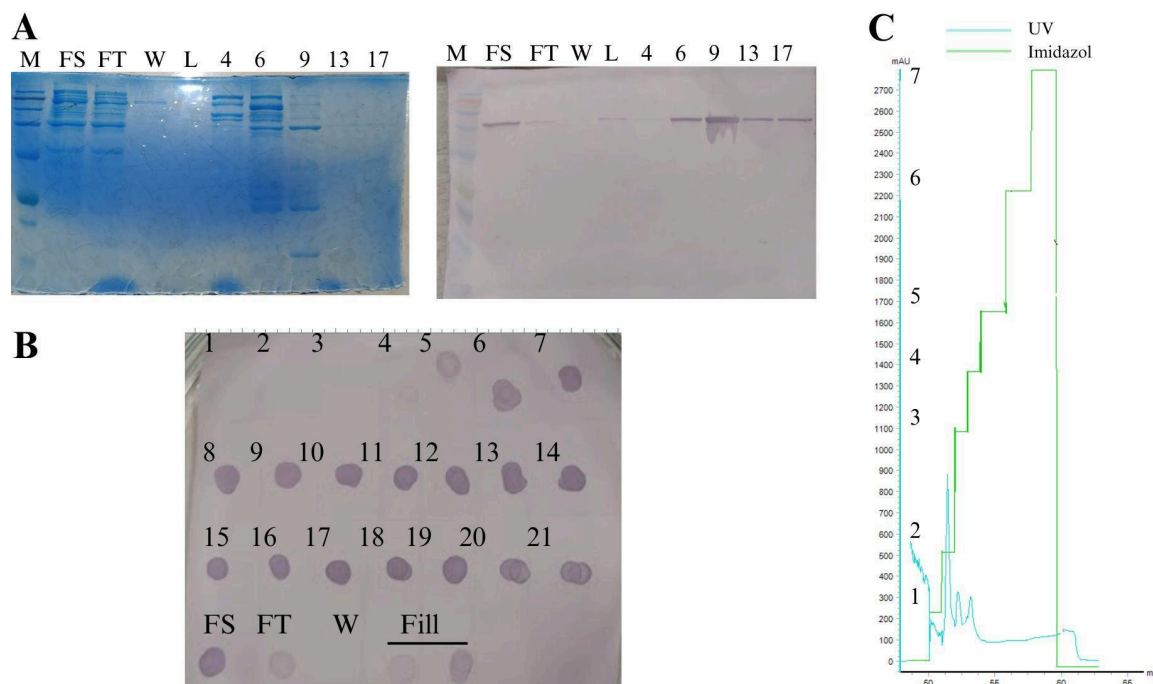


Figura 19: Avaliação da purificação do scFv Murino por IMAC. (A) *Western Blot* e SDS-PAGE, apresentando as amostras de *flow through* (FT); lavagem com 10mM de imidazol (W); lavagem automática do sistema (L); e alíquotas da eluição, sendo: 4 (100 mM); 6 (200 mM); 9 (300 mM); 13 (400 mM); 17 (500 mM). (B) *Dot-Blot* de todas as alíquotas coletadas durante a eluição com concentrações crescentes de imidazol. (C) Cromatograma da purificação durante a etapa da eluição, com a detecção das proteínas por luz ultravioleta (em azul) e as concentrações de imidazol em verde: 50 mM (1), 100 mM (2), 200 mM (3), 250 mM (4), 300 mM (5), 400 mM (6) e 500 mM (7)).

A análise do *flow through* indicou que há uma perda limitada dos scFvs durante a etapa de ligação. No entanto, os cromatogramas da purificação do scFv Murino e Humanizado demonstram que contaminantes inespecíficos são eliminados da coluna na etapa de lavagem, uma vez que não há detecção pelo *Western Blot*. Ainda assim, a presença de baixos níveis de proteínas inespecíficas sugere que modificações no protocolo, especialmente na etapa de lavagem, poderiam otimizar ainda mais a pureza final do produto. Considerando estes resultados, as concentrações de imidazol foram estabelecidas como 5mM para a etapa de ligação e 20mM na lavagem. Quanto à etapa de eluição, as proteínas de interesse foram recuperadas a partir de 100mM de imidazol, sendo detectadas em todas as concentrações subsequentes. O scFv Murino foi eluído em maior proporção a partir de 200mM de imidazol, sendo que as eluições com 300mM apresentaram menos proteínas inespecíficas. O scFv Humanizado (**Figura 20**) apresentou padrões similares ao scFv Murino durante a etapa da lavagem, e também obteve um pico de eluição com imidazol a 200mM. Porém, a análise por *Western Blot* indicou que o acúmulo do scFv Humanizado ocorre a partir de 300mM, com detecção majoritariamente a partir de 400mM de imidazol.

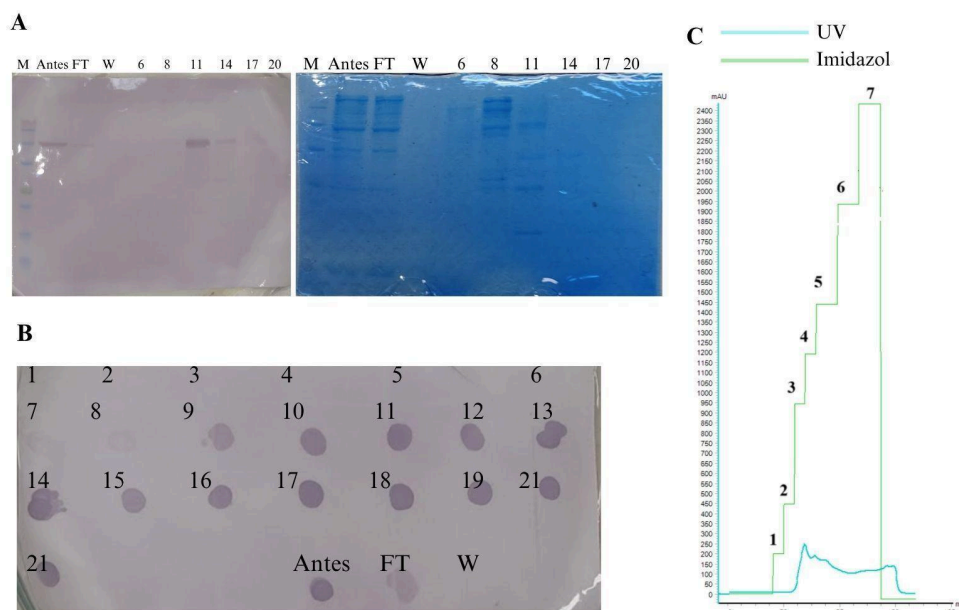


Figura 20: Avaliação da purificação de scFv Humanizado por IMAC. (A) *Western Blot* e SDS-PAGE das amostras de *flow through* (FT); lavagem com 10mM de imidazol (W); e eluição, sendo: alíquotas 6 (200mM); 8 (250mM); 11 (300mM); 14 (400mM); 17 e 20 (500mM). (B) *Dot-Blot* das alíquotas de 1 mL coletadas durante a eluição, enumeradas de 1 a 21. (C) Cromatograma da eluição, com a detecção das proteínas por luz ultravioleta em azul, e as concentrações de imidazol em verde, sendo: 50 mM (1), 100 mM (2), 200 mM (3), 250 mM (4), 300 mM (5), 400 mM (6) e 500 mM (7).

A fim de analisar a concentração das amostras purificadas pelo método em etapas, as alíquotas da eluição foram divididas em dois grupos para realizar a diálise e troca do tampão de eluição para PBS. Assim, esta análise do rendimento da purificação das proteínas recombinantes foi feita com as frações eluídas com 50 a 250 mM de imidazol (denominadas "A"), e aquelas entre 300 e 500 mM de imidazol (denominadas "B"). Como esperado, as amostras da eluição "A" dos scFvs apresentaram maior concentração de proteínas, uma vez que os scFv são gradualmente eluídos à medida que a concentração de imidazol aumenta, conforme apresentado na Tabela 8. A concentração da eluição "A" do scFv Murino foi de 1,7 mg/mL, enquanto a amostra "B" teve apenas 32 µg/mL. O scFv Humanizado obteve a segunda maior concentração nas eluições "A", com 1,33 mg/mL, e com 325 µg/mL na eluição "B".

Tabela 8: Concentração obtida dos scFvs anti-BCMA Murino e Humanizado (50 mL)

Construção	Eluição	Volume total (mL)	Concentração (µg/mL)	Quantidade total de proteína purificada (µg)
scFv Murino	A	0,9	1.700	1.530
	B	1,25	32	40
scFv Humanizado	A	0,3	1.330	399
	B	1,5	325	487,5

Estas alíquotas também foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western Blot, e a expressão da proteína de interesse foi observada em todas as amostras. De maneira interessante, as eluições “A” do scFv Murino e Humanizado apresentaram proteínas maiores que o esperado no gel corado com prata (**Figura 21**). Isto pode indicar que proteínas agregadas ou inespecíficas foram purificadas nestas condições. O rendimento obtido nesta produção foi relativamente baixo, indicando a necessidade de otimização para melhorar a recuperação da proteína de interesse. Ademais, a separação da eluição em múltiplas frações (“A” e “B”) comprometeu o rendimento total, dispersando a proteína purificada em concentrações menores. Considerando que as amostras “A” apresentaram maior concentração final de proteínas purificadas, mas as amostras “B” continham as proteínas de interesse no tamanho esperado, os próximos experimentos serão conduzidos com a coleta das frações de eluição com a concentração fixa de 500mM de imidazol. Além disso, o aumento da escala de produção foi considerada como uma abordagem para aumentar o rendimento e melhorar a eficiência da purificação.

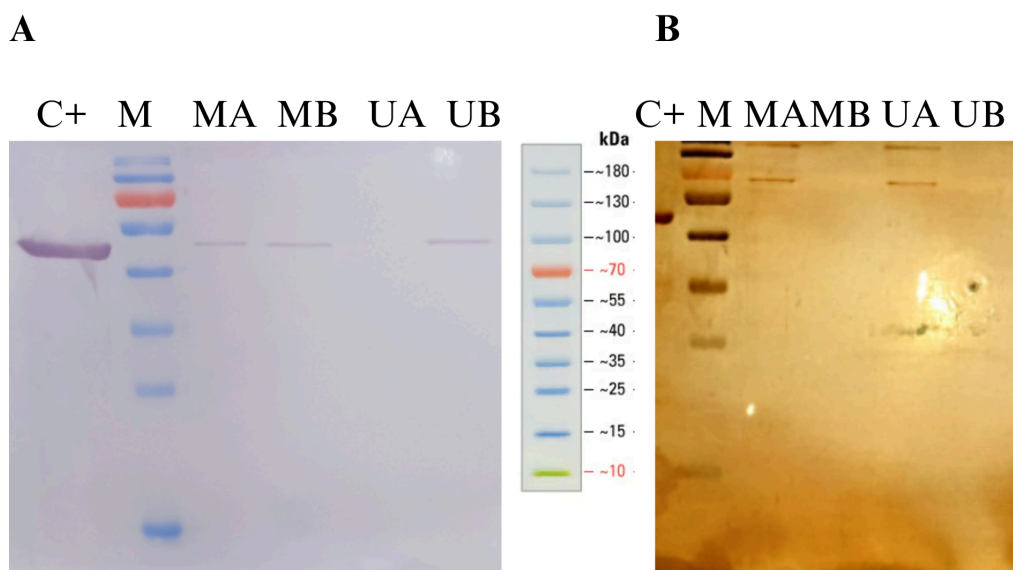


Figura 21: Análise da purificação em pequena escala dos scFvs Murino e Humanizado. *Western blot* (A) e SDS-PAGE corado com nitrato de prata (B) das amostras de scFvs purificados de uma produção de 50 mL, com o tamanho esperado de 45 kDa. As amostras dos scFvs Murino (“M”) e Humanizado (“U”) foram agrupadas como eluição “A” (50 a 250 mM de imidazol) e eluição “B” (300 a 500 mM), a fim de realizar a diálise e a quantificação, com a evidente perda de proteínas com este método de purificação.

4.4 Escalonamento da produção dos scFvs

4.4.1 Produção em escala de 100 mL

Diante da variabilidade observada no rendimento das produções com 50 mL de meio de cultura, o experimento subsequente foi realizado utilizando um volume duas vezes maior. Essa abordagem teve como objetivo avaliar o impacto do aumento da escala na expressão e recuperação da proteína de interesse. Inicialmente, as quatro construções de scFv foram inoculadas em 100 mL de meio TB Completo sob as condições experimentais previamente otimizadas. No entanto, apenas o scFv murino e o scFv Humanizado apresentaram crescimento adequado, e também atingiram a densidade óptica esperada (1,65 e 1,8, respectivamente) com 2h de incubação. Ainda assim, o experimento foi conduzido conforme planejado, com 4h de indução com 1mM de IPTG à 30 °C. Após a indução, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* bacteriano obtido foi armazenado e posteriormente submetido à extração proteica, conforme protocolo otimizado. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação. Em seguida, as proteínas de interesse foram purificadas por cromatografia de afinidade ao Níquel, no equipamento Akta, com as etapas de lavagem e eluição a 20mM e 500mM de Imidazol, respectivamente. As alíquotas da fração solúvel (FS),

do *flow through* (FT), da lavagem e das eluições foram analisadas por Dot-Blot, a fim de avaliar a presença dos scFvs após a purificação. Como a **Figura 22** apresenta, os scFvs Murino e Harmonizado foram detectados nas etapas de ligação e de lavagem da coluna, indicando que há perda das proteínas de interesse. Não obstante, ambos scFvs foram purificados com sucesso, sendo que são eluídos a partir da terceira alíquota de eluição.

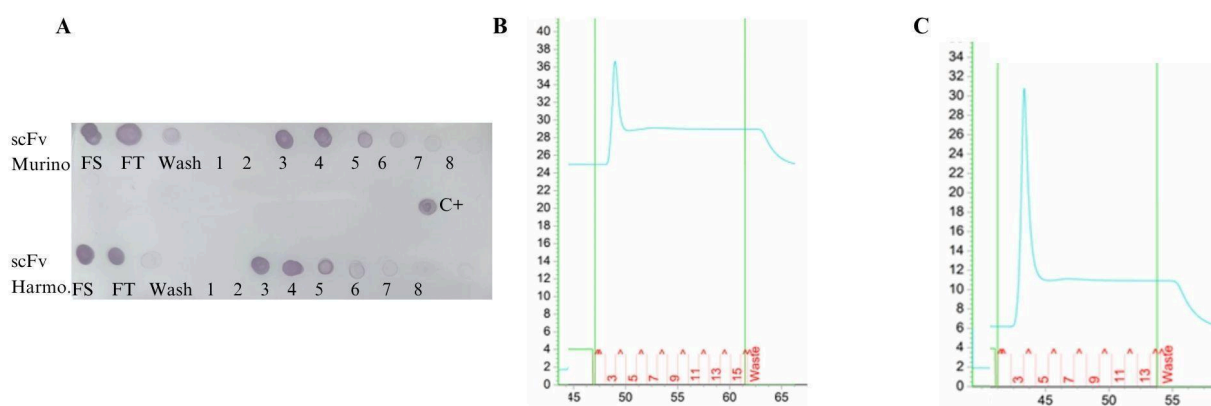


Figura 22: Otimização da purificação dos scFvs por IMAC (A) Dot-Blot das alíquotas dos scFvs Murino e Harmonizado, apresentando as frações solúveis (FS), o *flow through* (FT), a lavagem (Wash), e as alíquotas 1 a 8 da eluição. **(B)** Cromatogramas das purificações de uma produção em média escala com 100 mL, com o foco na eluição dos scFvs, que ocorre majoritariamente nas frações 3 a 5.

As alíquotas 3 a 8 foram concentradas e dialisadas em filtros de ultrafiltração Amicon®Ultra-4 com ponto de corte de 30 kDa (Merck, Alemanha), em ciclos de centrifugação até o volume final aproximado de 1mL. Então, as amostras dialisadas foram quantificadas pelo método QuBit®, e a média de três leituras resultou na concentração final de 0,83 mg/mL do scFv Murino e 1,2 mg/mL do scFv Harmonizado. Os rendimentos dessa produção são apresentados na Tabela 9.

De maneira interessante, a produção de 100 mL do scFv Harmonizado resultou em um rendimento superior ao do scFv Murino. Com isso, o rendimento final obtido foi de 12 mg de proteína por litro de cultura, do Harmonizado, e 8,3 mg por litro, do scFv Murino. Uma possível explicação para essa diferença pode estar na densidade óptica no momento da indução, que variou entre as condições testadas. No experimento atual, o scFv Harmonizado foi induzido com OD₆₀₀ de 1,8, enquanto o scFv Murino foi induzido com OD₆₀₀ de 1,65. Essa variação na densidade celular pode ter impactado a eficiência da expressão, influenciando o rendimento final das proteínas de interesse. Diante disso, os resultados indicam que a ampliação da escala de produção, aliada à indução em uma OD₆₀₀ mais elevada, contribui para um aumento no rendimento final dos scFvs.

Tabela 9: Rendimento da produção dos scFvs anti-BCMA Murino e Harmonizado (100mL).

Construção	Volume total (mL)	Quantificação por QuBit®		Quantificação por espectrofotometria	
		Concentração (mg/mL)	Rendimento (mg por litro)	Concentração (mg/mL)	Rendimento (mg por litro)
scFv Murino	1	0,83	8,3	0,13	1,3
scFv Harmonizado	1	1,2	12	0,34	3,4

É importante destacar que as proteínas foram quantificadas adicionalmente por espectrofotometria a 280 nm, a fim de viabilizar e padronizar os experimentos de caracterização biofísica. Como resultado, as concentrações obtidas foram inferiores às quantificadas pelo método QuBit®. Especificamente, o scFv Murino apresentou concentração de 0,13 mg/mL por este método, e o scFv Harmonizado apresentou ter 0,34 mg/mL. A substituição do método de quantificação de proteína do QuBit pela espectrofotometria revelou discrepâncias entre essas duas abordagens, com variações de 3,5 a 6 vezes na concentração estimada. Com isso, os rendimentos finais dos scFv Murino e Harmonizado reduziram para 1,3 e 3,4 mg de proteína por litro de cultura, respectivamente. Considerando a necessidade de maior precisão para as caracterizações biofísicas, as próximas produções serão quantificadas por espectrofotometria a 280nm.

4.4.2 Produção em escala de 200 mL

A produção em média escala foi realizada com 200mL de meio TB com os clones previamente selecionados de *E.coli* SHy transformadas com os scFvs. Os *pellets* celulares foram coletados após centrifugação da cultura celular de 4h de indução com 1 mM de IPTG, e foram submetidos a extração proteica com lisozima e sonicação. As frações solúveis foram purificadas com sucesso por cromatografia de afinidade ao Níquel com a coluna HisTrap no sistema HPLC, nas condições otimizadas estabelecidas anteriormente. Os cromatogramas

estão apresentados na **Figura 23** e apresentaram o perfil esperado para as purificações, com um pico de absorbância a partir da fração 3 da eluição com 500 mM de Imidazol.

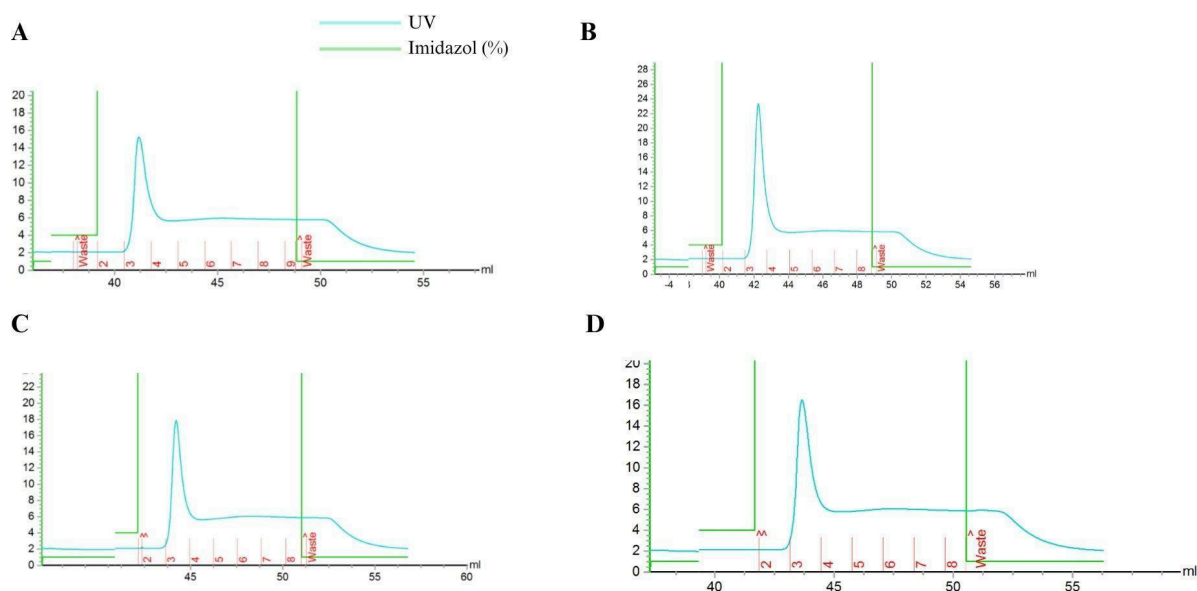


Figura 23: Purificação dos scFvs produzidos em maior escala. A imagem apresenta os cromatogramas durante a eluição das produções com volume de 200 mL dos scFvs Murino (A), Humanizado (B), Harmonizado (C) e Caótico (D). Nota-se que a eluição ocorre a partir da fração 3 para os quatro anticorpos testados.

O gel corado com Comassie Blue e o *Western Blot* indicados na **Figura 24** apresentam as alíquotas das frações de lavagem e de eluição dos scFvs purificados. Nota-se a ausência de bandas específicas dos scFvs nas frações de lavagem, indicando pouca ou limitada perda dos anticorpos durante esta etapa, apesar da detecção de UV observada nos cromatogramas. Além disso, as quatro amostras das purificações dos scFvs apresentam bandas com tamanho esperado de aproximadamente 45 kDa. No entanto, tanto o *Western Blot* quanto o gel corado por Comassie Blue exibiram bandas de tamanho molecular menor que o esperado. Isto indica uma possível degradação proteica, pela detecção dessas proteínas menores no *Western Blot*. Não obstante, estas amostras purificadas foram submetidas à concentração e diálise em sistema Amicon, a fim de realizar as caracterizações biofísicas. Como o valor de corte de peso molecular do sistema utilizado foi de 30 kDa, é esperado que essas proteínas com menor tamanho sejam eliminadas das amostras.

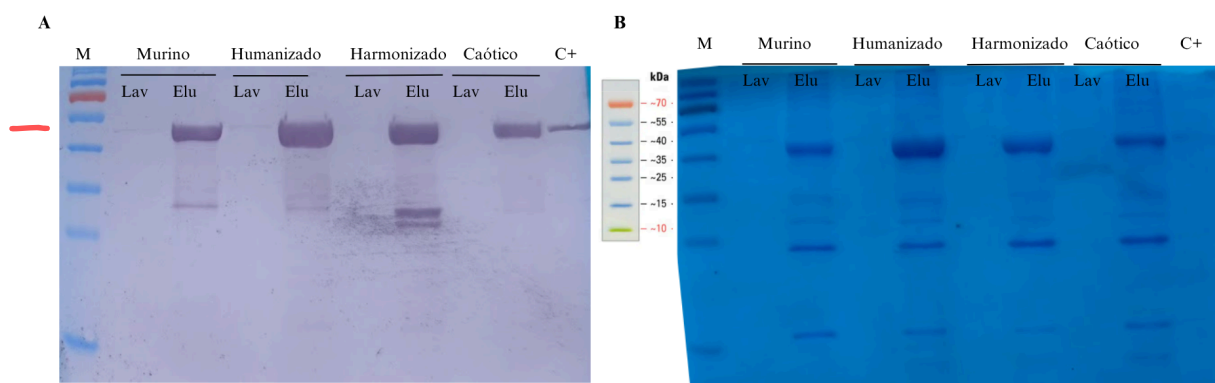


Figura 24: Imunodeteção dos scFvs purificados. (A) *Western Blot*, com anticorpos anti-His tag e (B) Gel corado com Coomassie Blue, com controle positivo, dos anticorpos purificados a partir de produções de 200 mL. As amostras de cada scFv foram divididas entre as aliquotas da lavagem e da eluição, e apresentam a eficiência obtida nestas etapas, além da purificação específica. O tamanho esperado dos anticorpos é aproximadamente 45 kDa, indicado pela linha vermelha, e com isso, as bandas observadas estão na faixa condizente com o peso molecular dos scFvs. Há detecção de moléculas menores, possivelmente resultado da degradação das proteínas. A linha vermelha indica o tamanho esperado de 45 kDa dos scFvs.

A quantificação das produções dos scFvs em 200mL de cultura foi realizada exclusivamente por espectrofotometria, conforme metodologia previamente estabelecida. A média da concentração final de três produções está apresentada na Tabela 10, assim como o rendimento final das produções. Como o volume final das amostras de scFv purificadas após a diálise foi de aproximadamente 1mL, o rendimento médio foi calculado a partir da quantidade total de proteína em relação ao volume inicial de 200mL da cultura bacteriana.

O scFv Harmonizado apresentou o maior rendimento entre as construções testadas, alcançando 4mg por litro de cultura, enquanto o scFv Caótico obteve o menor rendimento, atingindo apenas metade desse valor. Já os scFvs Murino e Humanizado mostraram desempenhos intermediários, com rendimentos de 3 mg e 3,4 mg por litro, respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas a fatores como estabilidade estrutural, solubilidade e impacto da expressão da proteína no metabolismo bacteriano, influenciando tanto o crescimento celular quanto a eficiência da produção heteróloga. Em particular, o menor rendimento observado para o scFv Caótico pode estar associado a uma maior propensão à agregação, resultando em menor disponibilidade da proteína funcional. Já o scFv Harmonizado, que obteve o maior rendimento final, possivelmente apresentou menor propensão à agregação, conforme predito *in-silico*, o que favoreceu sua solubilidade e permitiu uma recuperação mais eficiente após a produção bacteriana.

Tabela 10: Rendimento médio da produção dos scFv anti-BCMA.

Construção	Concentração final (mg/mL)	Rendimento médio (mg por litro)
scFv anti-BCMA Murino	0,6	3
scFv anti-BCMA Humanizado	0,68	3,4
scFv anti-BCMA Harmonizado	0,8	4
scFv anti-BCMA Caotico	0,4	2

4.5 Análise do Perfil de Agregação por Exclusão Molecular

4.5.1 Padronização da cromatografia

A padronização do perfil de eluição na Coluna de Superdex HiLoad 75 pg permitiu a identificação do volume e a fração esperados da eluição das proteínas de interesse. Inicialmente, uma corrida teste foi realizada com 10 mg/mL de Ovoalbumina diluída em Tampão Fosfato, por possuir um tamanho molecular de 45 kDa, que é próximo aos scFvs. A detecção de múltiplos picos de absorbância no comprimento de onda de 280 nm (faixa do ultravioleta) na purificação sugere a presença de três isoformas da Ovoalbumina. Diante desta análise, foi determinado que moléculas com aproximadamente 45kDa são eluídas com aproximadamente 70 mL de Tampão Fosfato (**Figura 25**).

Com isto definido, partiu-se para a otimização da corrida para os scFv. Para tal, dois volumes de amostra foram testados com o scFv anti-BCMA Murino: 100µL ou 500µL, ambos na concentração de 0,6 mg/mL. Então, foi estabelecido que 500µL seriam aplicados no equipamento, devido à maior diferenciação de picos no cromatograma. Depois, as concentrações de 0,6 mg/mL e 0,96 mg/mL foram testadas, e as condições otimizadas para a Superdex HiLoad foram: 500µL a 0,9 mg/mL. Esta etapa de otimização foi relevante pelo fato de que não havia tanta disponibilidade das amostras purificadas.

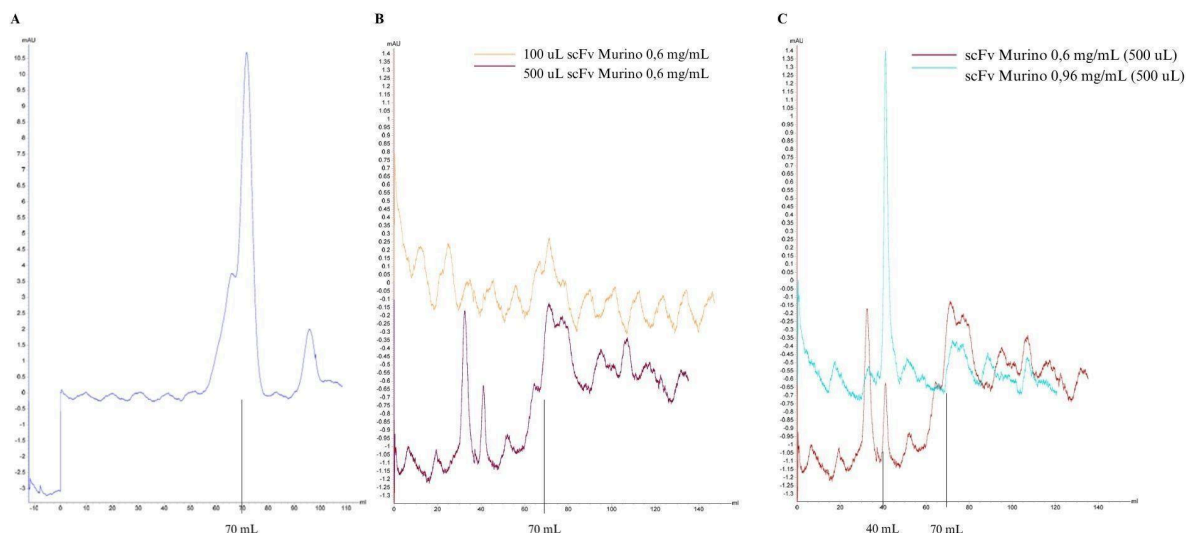


Figura 25: Padronização da cromatografia de exclusão molecular. Cromatogramas da padronização da coluna de exclusão molecular Superdex HiLoad. (A) Corrida teste com Ovoalbumina 10mg/mL. (B) Gráficos da otimização do volume de aplicação das amostras, sendo testados 100 µL (linha laranja) e 500 µL (linha vermelha). (C) Corrida teste da concentração necessária para a exclusão molecular das amostras, com as condições testadas: 0,6 mg/mL (linha vermelha) e 0,96 mg/mL (linha azul). A partir desta padronização, as exclusões subsequentes foram realizadas com 500 µL de amostra a aproximadamente 1 mg/mL. Por fim, o volume de eluição esperado para os scFvs é de 70 mL.

4.5.2 Exclusão Molecular dos scFvs anti-BCMA

A exclusão molecular demonstrou que os scFvs apresentam perfis distintos de eluição, ou seja, diferem quanto à presença de agregados. Os scFvs Murino, Humanizado e Caótico apresentaram picos de detecção a 280 nm nas frações de ~40 mL da eluição, o que representa moléculas de maior massa molecular e indica que a proporção de agregados é maior que a de moléculas monoméricas. A exclusão molecular do scFv Humanizado demonstrou a presença de agregados e também de partículas menores, na fração eluída com 70 mL, evidenciando um perfil de agregação variável e similar às amostras de scFv Caótico. Apesar da presença desta fração de 40 mL durante a purificação do scFv Harmonizado, estas amostras apresentaram a detecção superior de partículas menores ou monoméricas em 70 mL de eluição. Na comparação dos cromatogramas dos scFv Murino com os scFv Harmonizado, nota-se a purificação distinta com 40 mL e 70 mL de eluição, respectivamente.

Diante do exposto, os cromatogramas da exclusão molecular indicaram uma diferença quantitativa das frações agregadas e monoméricas entre os scFvs testados (**Figura 26**), sendo que o Harmonizado apresentou a maior proporção de proteínas com menor tamanho molecular. Assim, estes resultados preliminares corroboram a hipótese inicial de redução da

formação de agregados proteicos, modulado pela harmonização do fragmento de anticorpo anti-BCMA.

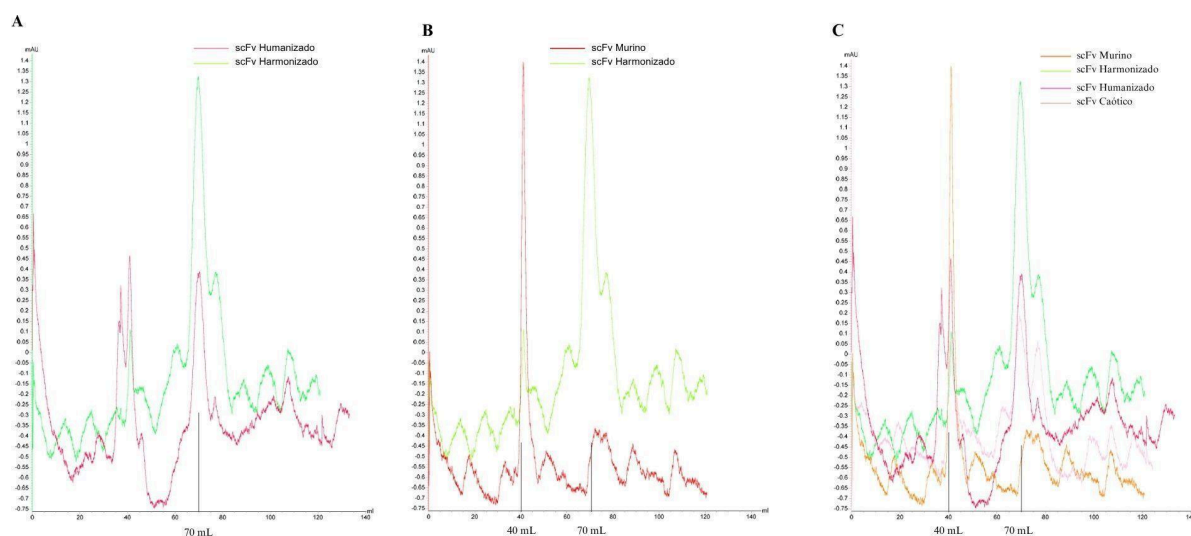


Figura 26: Comparação do perfil de exclusão molecular entre os scFvs. Comparação dos cromatogramas das exclusões moleculares dos scFvs: **(A)** Humanizado (rosa) e Harmonizado (verde); **(B)** Murino (vermelho) e Harmonizado (verde); e **(C)** Murino (laranja), Humanizado (rosa escuro), Harmonizado (verde) e Caótico (rosa claro). As linhas verticais denotam os volumes de eluição esperados de 40 mL e 70 mL, no eixo horizontal dos gráficos. Fonte: obtido no *software* UNICORN 6.3.

4.6 Análise do perfil de agregação por Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

4.6.1 Padronização inicial do protocolo

As amostras de scFv purificadas foram analisadas por *Dot-Blot*, a fim de avaliar o reconhecimento específico nas frações da eluição para prosseguir com a concentração e diálise no Tampão PBS. Em seguida, os scFvs dialisados foram quantificados por espectrofotometria de absorção molecular no UV-visível, como estabelecido anteriormente, e as amostras foram diluídas para normalizar a concentração de cada anticorpo para 0,1 mg/mL. Foram realizadas sete leituras das amostras do DLS, sendo que cada leitura representa uma média de 13 registros da dispersão dinâmica das partículas no equipamento. Assim, a média foi calculada com base nessas 7 leituras, que apresentaram três populações de partículas com tamanhos diferentes em cada variante de scFvs (Tabela 11).

Em relação às populações de partículas menores (P1) observadas, o scFv Humanizado apresentou o maior diâmetro molecular hidrodinâmico entre as variantes dos anticorpos, com

51,57 nm. Esse diâmetro molecular equivale a mais de 3 vezes o diâmetro da população P1 do scFv Harmonizado, de 15,41 nm de diâmetro. Vale ressaltar que o diâmetro hidrodinâmico molecular da maior partícula detectada (P3) nas amostras de scFv Harmonizadas apresentam apenas diâmetro de 47,02 nm, que é menor que o P1 do scFv Humanizado. Como predito, as amostras de scFv Humanizado exibiram as maiores tendências a agregar, apresentando diâmetros hidrodinâmico molecular na maior população P3, de ~150 nm, representando 42% do total das partículas detectadas com um maior índice de Polidispersão ou heterogeneidade molecular. Já as amostras de scFv Murino apresentaram partículas com tamanho entre 21,43 nm (P1, 16% do total das partículas) e 94,03 nm (P3, 43% das partículas identificadas), que sugerem um potencial de agregação intermediário deste anticorpo. Curiosamente, as amostras do scFv Caótico apresentaram partículas entre 25,79 nm (P1), 40,93 nm (P2) e 90 nm (P3) de diâmetro hidrodinâmico molecular, sendo que P1 caracteriza 22% do total das partículas analisadas. Estes resultados indicam que os anticorpos Murino e Caótico possuem tendências à agregação equivalentes entre eles e inferiores ao Humanizado, no entanto, a variante harmonizada apresentou a menor tendência a agregar, observação que está em correspondência com o desenho molecular realizado (Tabela 11).

Tabela 11: Resultados do DLS dos scFvs.

Construção	Pico	Diâmetro (nm)	Estimativa MW (kDa)	Intensidade (%)	Massa (%)	Pd (%)	Polidispersão
scFv anti-BCMA Murino	P1	21,43 ± 1,361	865,7 ± 131,9	1,1	16,1	6,2	Monodisperso
	P2	64,97 ± 8,225	1,16e+4 ± 1,21e+3	9,5	28,6	13,7	Monodisperso
	P3	94,03 ± 14,25	2,75e+4 ± 4,79e+3	52,9	42,6	14,7	Monodisperso
scFv anti-BCMA Humanizado	P1	51,57 ± 6,503	6,75e+3 ± 1,01e+3	3,9	21,9	13,9	Monodisperso
	P2	118,5 ± 20,49	4,73e+4 ± 1,25e+4	52,1	23	18,7	Monodisperso
	P3	149,2 ± 74,08	8,12e+4 ± 3,18e+4	43,9	41,9	31,8	Polidisperso
scFv anti-BCMA Harmonizado	P1	15,41 ± 2,363	406,1 ± 253,6	0,6	20,2	14	Monodisperso
	P2	27 ± 2,836	1,49e+3 ± 247,8	1,9	27	10,4	Monodisperso
	P3	47,02 ± 7,673	5,44e+3 ± 574,6	6,6	32,4	16,2	Monodisperso
scFv anti-BCMA Caótico	P1	25,79 ± 0,89	1,33e+3 ± 158,7	2,3	22,1	3,4	Monodisperso
	P2	40,93 ± 3,52	3,93e+3 ± 168,3	1,3	8,6	8,5	Monodisperso
	P3	89,78 ± 7,82	2,47e+4 ± 2,22e+3	11,8	13,7	8,5	Monodisperso

A **Figura 27** apresenta os gráficos de distribuição de partículas de cada amostra (com o tamanho hidrodinâmico expresso em diâmetro no eixo x e o número de partículas detectadas no eixo y) no experimento de DLS. Ao comparar os scFv Humanizado e Murino, nota-se a formação de populações moleculares muito similares, com uma leve tendência do Humanizado a apresentar partículas ligeiramente maiores (Fig. 27A e Tabela 11). Isto evidencia que o processo de humanização do anticorpo mantém ou incrementa ligeiramente a

tendência de agregação do scFv. A comparação dos resultados entre os anticorpos Murino e Harmonizado, observa-se que o processo de harmonização diminuiu o tamanho e a propensão à agregação das três populações (Fig. 27B e Tabela 11). Essas diferenças são mais observáveis quando comparamos os resultados entre os anticorpos Humanizado e Harmonizado (Fig 27C e Tabela 11). Estes últimos resultados corroboram a hipótese inicial de que o desenho do scFv Harmonizado reduziria consideravelmente o potencial de agregação proteica da molécula. É importante enfatizar que os resultados da harmonização do anticorpo também geraram diferenças até na comparação com o scFv Murino original. Por fim, o scFv Caótico (Fig 27D e Tabela 11) apresentou um perfil variável de agregação, com a amplitude do tamanho das partículas similar às detecções do scFv Murino. À vista disso, este resultado evidencia que a agregação experimental é influenciada consideravelmente pela sequência primária da proteína.

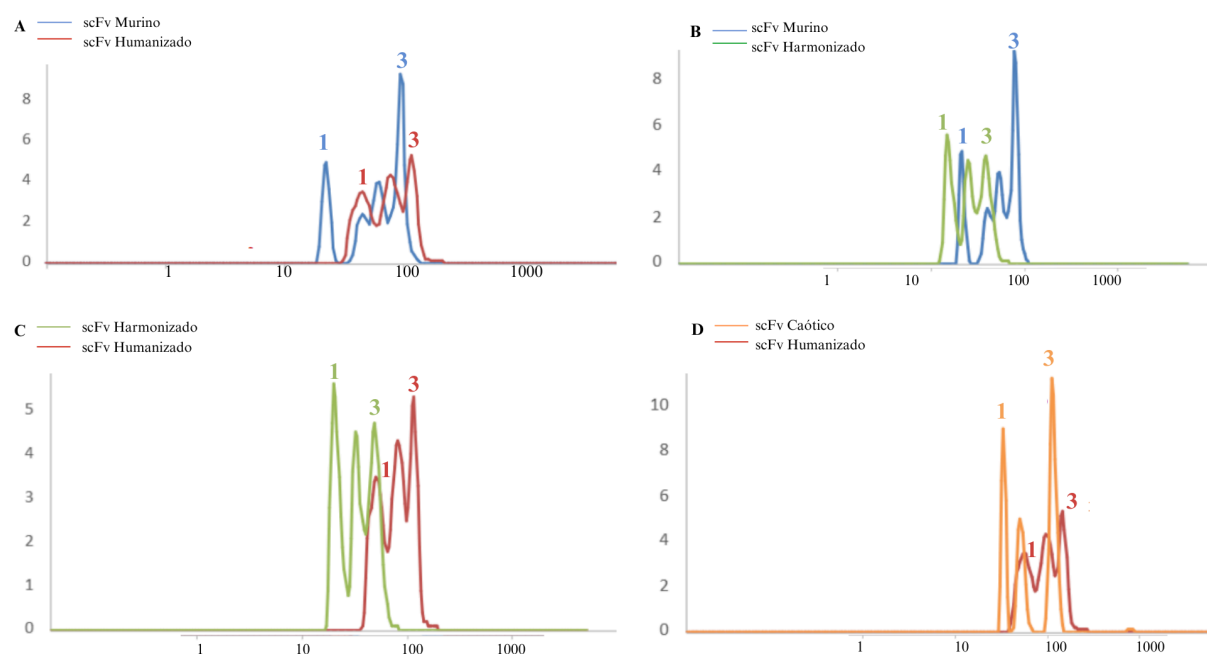


Figura 27: Determinação do tamanho hidrodinâmico dos scFvs por DLS. Dados provenientes do experimento de DLS dos scFvs descritos na Tabela 11, com os picos 1 e 3 especificados. A imagem apresenta os gráficos de tamanho (em nanômetros) e o número de partículas detectadas, sendo que as comparações foram feitas em duplas e evidenciam a redução hipotetizada do tamanho dos scFv Harmonizados. (A) scFv Murino (azul) e scFv Humanizado (vermelho); (B) scFv Murino (azul) e scFv Harmonizado (verde); (C) scFv Harmonizado (verde) e scFv Humanizado (vermelho); e (D) scFv Caótico (laranja) e scFv Humanizado (vermelho).

4.6.2 Estudo da influência das concentrações dos scFvs na agregação

A fim de estudar a influência das concentrações dos anticorpos na propensão a agregar, um experimento foi realizado com a variação das concentrações finais dos scFvs em PBS: 0,6 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL. A leitura no equipamento de DLS foi realizada depois de incubação *overnight* a 4 °C das amostras, nas mesmas condições descritas anteriormente, com cinco repetições, mas em microcubeta de quartzo de 50 nm de caminho óptico. As amostras de scFv Murino a 0,05 mg/mL obtiveram as leituras de menor partícula para este anticorpo – com ~18 nm representando 7,7% do total de partículas detectadas – enquanto que as concentrações de 0,1 e 0,3 mg/mL exibiram partículas superiores a 60 nm, sendo essas as concentrações em que as partículas apresentaram maior homogeneidade de tendência a agregação (**Figura 28**). A maior concentração de 0,6 mg/mL demonstrou que o scFv Murino apresentava partículas de tamanho intermediário entre 27 nm e 48 nm de diâmetro, representando 15,9% e 15,3% do número total de partículas, respectivamente. De maneira similar, as leituras com 0,3 mg/mL de scFv Murino detectaram partículas entre 31 e 64 nm de diâmetro. Curiosamente, a concentração de 0,1 mg/mL apresentou partículas polidispersas de 163 nm, correspondendo a 41,5% do total de partículas, o que corrobora os dados do DLS anterior. Também foram detectadas partículas maiores que 1000 nm, porém esses picos foram considerados sinais de partículas contaminantes nas análises, como microbolhas de ar. Dessa forma, foi demonstrado que, no scFv Murino, o incremento das concentrações acima de 0,05 mg/mL promove a agregação molecular em partículas de aproximadamente 30 nm de diâmetro hidrodinâmico.

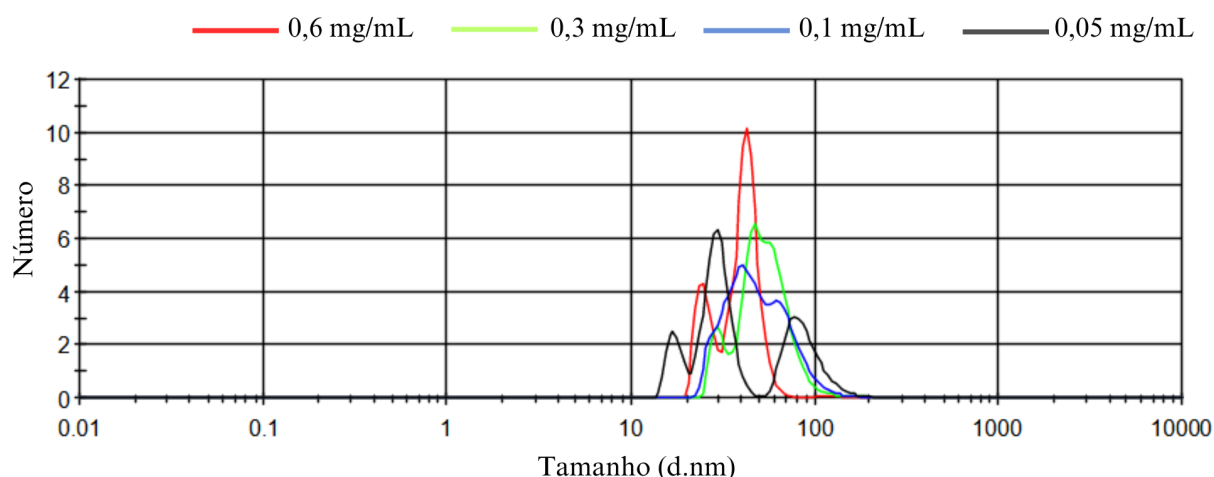


Figura 28: Análise da agregação do scFv Murino em função da concentração. O gráfico apresenta a detecção de partículas do anticorpo murino em concentrações crescentes de 0,05 mg/mL (preto), 0,1 mg/mL (azul), 0,3 mg/mL (verde) e 0,6 mg/mL (vermelho). O aumento da concentração – especialmente 0,6 mg/mL – apresentou um aumento esperado no tamanho de partículas, ao mesmo tempo que a redução para 0,05 mg/mL permitiu a observação de agregados com menor tamanho hidrodinâmico.

Tabela 12: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Murino.

Concentração (mg/mL)	Picos	Tamanho (nm)	Massa (%)
0,6	1	27	15,9
	2	44,8	52
0,3	1	31	11,1
	2	64,9	51,7
0,1	1	163	41,5
	2	1140	43,4
0,05	1	18,6	7,7
	2	32,5	38,9

A análise do scFv Humanizado (**Figura 29**) revelou que na concentração de 0,6 mg/mL, 75% do número total de partículas apresentam um diâmetro de 42 nm, e cerca de 11% das partículas são maiores que 150 nm de diâmetro hidrodinâmico. A variação de tamanho também foi identificada na concentração de 0,3 mg/mL, sendo que a distribuição variou entre 29,6 nm (31% das partículas) e 54 nm (51% das partículas), ou seja, com

predominância de partículas mais agregadas. Nas concentrações mais baixas, como 0,1 mg/mL, observou-se uma proporção majoritária de partículas a partir de 35 nm (66,4%), com uma menor fração de 149 nm correspondendo a 12,5% do total das partículas. Já em 0,05 mg/mL, houve a detecção das menores partículas, com tamanho a partir de 27 nm até partículas com 98 nm de diâmetro, ambas representando 26% das partículas detectadas. Nota-se que o menor tamanho de partículas do scFv Humanizado foi de 27 nm na menor concentração de 0,05 mg/mL. Esses resultados sugerem uma distribuição parcialmente homogênea de tamanho do scFv Humanizado, com predominância de partículas acima de 35 nm em todas as condições testadas, além de uma redução de tamanho dos agregados para 27 nm na menor concentração de 0,05 mg/mL. À vista disso, o anticorpo humanizado obteve resultados similares ao original murino, conforme predito nos experimentos iniciais de DLS.

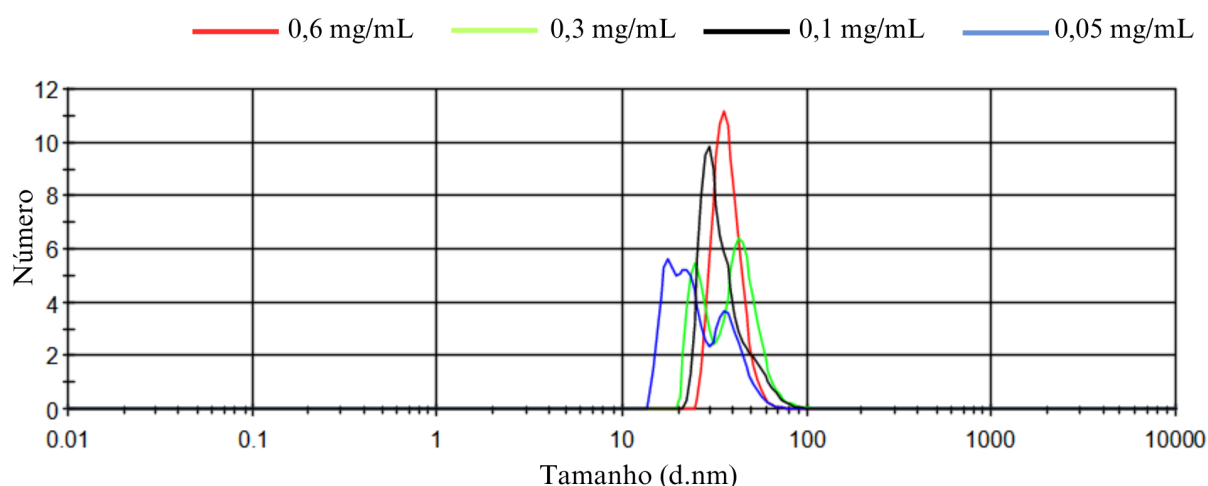


Figura 29: Análise da agregação do scFv Humanizado em função da concentração. O gráfico apresenta a detecção de partículas do anticorpo humanizado em concentrações crescentes de 0,05 mg/mL (azul), 0,1 mg/mL (preto), 0,3 mg/mL (verde) e 0,6 mg/mL (vermelho). Os dados mostram que o scFv Humanizado tem maior homogeneidade de tamanho hidrodinâmico detectado em amostras de 0,6 a 0,1 mg/mL. Ademais, as menores partículas do anticorpo foram detectadas na concentração de 0,05 mg/mL, indicando que a formação de agregados é influenciada pela concentração da amostra deste scFv.

Tabela 13: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Humanizado.

Concentração (mg/mL)	Picos	Tamanho (nm)	Massa (%)
0,6	1	42,8	75,5
	2	156,3	11,4
0,3	1	29,6	31
	2	54	51,4
0,1	1	35,6	66,4
	2	149	12,5
0,05	1	27	26,2
	2	98	26,1

Já as análises das amostras de scFv Harmonizado (**Figura 30**) indicaram que esses anticorpos formaram predominantemente partículas com diâmetro inferior a 30 nm em todas as concentrações analisadas, sugerindo uma menor tendência à agregação conforme hipotetizado. Na concentração de 0,6 mg/mL, a maioria das partículas estava na faixa de 31 nm, correspondendo a 73% das partículas, enquanto 10,8% apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 16 nm e 5,2% com 29 nm. Assim, o scFv Harmonizado exibiu a maior proporção de partículas abaixo de 32 nm nesta concentração, em contraste aos resultados dos scFvs Murino e Humanizado a 0,6 mg/mL. Para concentrações de 0,3 mg/mL, 64% das partículas tinham 23 nm de diâmetro, com uma fração menor de 78 nm (23% de partículas). Nota-se que o Harmonizado obteve o menor diâmetro de partícula nesta concentração, em comparação aos outros scFvs testados. Em 0,1 mg/mL, foram observados diâmetros entre 25,7 e 31 nm, representando 15% e 38% da massa, respectivamente. A menor concentração (0,05 mg/mL) obteve resultados semelhantes, com partículas majoritariamente de 32 nm (44,7% das partículas) e uma fração de 19,5 nm (37,1%). Diante desses resultados, o scFv Harmonizado apresentou moléculas com os menores diâmetros, inclusive em todas as concentrações estudadas. Com isso, os dados do DLS do anticorpo Harmonizado apoiam a

hipótese de redução da tendência à agregação proteica, com base nos ajustes das sequências realizados no anticorpo humanizado.

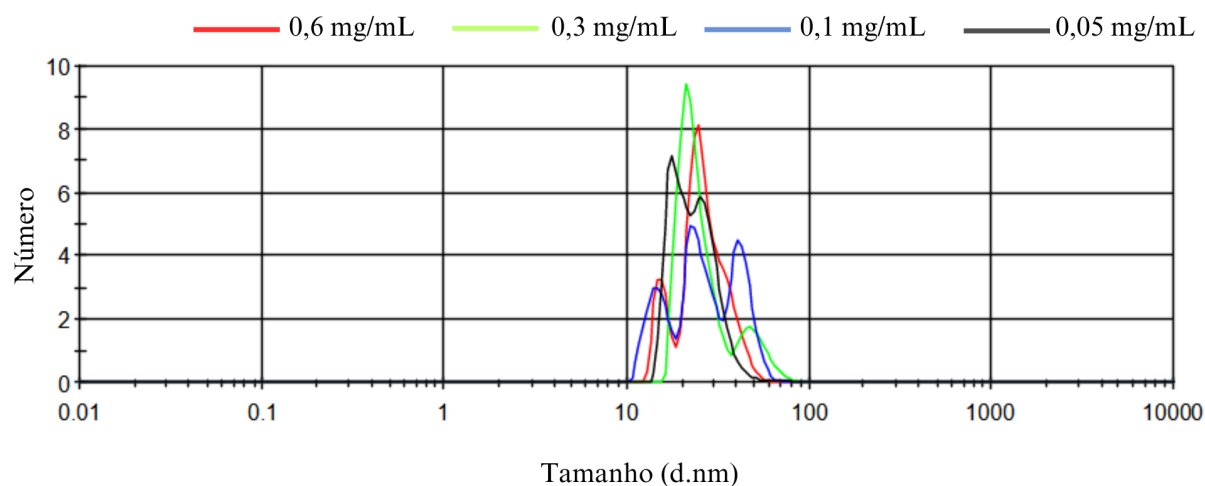


Figura 30: Análise da agregação do scFv Harmonizado em função da concentração. O gráfico apresenta a detecção de partículas do anticorpo harmonizado em concentrações crescentes de 0,05 mg/mL (preto), 0,1 mg/mL (azul), 0,3 mg/mL (verde) e 0,6 mg/mL (vermelho). Observa-se que este anticorpo apresentou uma distribuição de partículas majoritariamente menores em todas as concentrações testadas, o que sustenta a hipótese da redução de agregação predita pela alteração da sequência primária do scFv Harmonizado.

Tabela 14: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Harmonizado.

Concentração (mg/mL)	Picos	Tamanho (nm)	Massa (%)
0,6	1	16,2	10,8
	2	31	73
0,3	1	23,5	64,3
	2	78,1	23,7
0,1	1	25,7	15,3
	2	31	37,9
0,05	1	19,5	37,1
	2	32,5	44,7

As análises do scFv Caótico (**Figura 31**), como controle negativo de desenho molecular, evidenciaram uma distribuição de partículas heterogêneas com um deslocamento

para maiores tamanhos de partículas. As concentrações de 0,6 e 0,3 mg/mL apresentaram frações acima de 32 nm e abaixo de 64 nm de diâmetro hidrodinâmico, sendo que houve uma predominância de agregados superiores a 200 nm em 0,3 mg/mL (59% das partículas). Inesperadamente, a concentração de 0,6 mg/mL apresentou a menor partícula detectada dos scFvs, com 14 nm de diâmetro, porém esta fração representa apenas 7,5% das partículas e está em contradição com às demais leituras do scFv Caótico realizadas. O padrão de partículas maiores que ~40 nm se manteve nas concentrações mais baixas (de 0,1 e 0,05 mg/mL), onde mais de 60% das partículas correspondia a tamanhos acima dos 200 nm. Isto sugere que a proteína mantém o potencial de agregação mesmo em condições diluídas. No geral, foi possível detectar majoritariamente partículas maiores nas amostras de scFv Caótico, o que sustenta a hipótese inicial de agregação predita para este anticorpo.

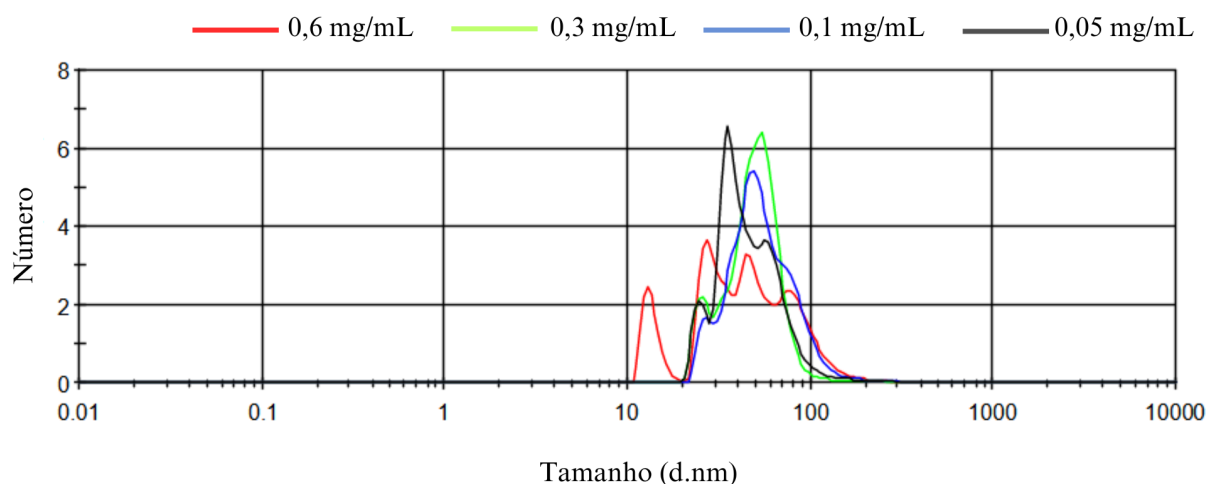


Figura 31: Análise da agregação do scFv Caótico em função da concentração. O gráfico apresenta a detecção de partículas do anticorpo caótico em concentrações crescentes de 0,05 mg/mL (preto), 0,1 mg/mL (azul), 0,3 mg/mL (verde) e 0,6 mg/mL (vermelho). A variação da concentração deste anticorpo teve, aparentemente, pouca influência no tamanho das partículas, uma vez que a maioria das detecções foram de aproximadamente 100 nm. A concentração de 0,6 mg/mL mostrou leituras de partículas de 10 nm, em contradição com o esperado pelos experimentos anteriores com os outros scFvs. Gráficos obtidos no *software* ZetaSizer.

Tabela 15: Parâmetros de agregação por DLS em diferentes concentrações do scFv Caótico.

Concentração (mg/mL)	Picos	Diâmetro (nm)	Massa (%)
0,6	1	14	7,5
	2	34	23,2
0,3	1	68	7,8
	2	226	59,3
0,1	1	59	5,4
	2	226	60,2
0,05	1	39	6,2
	2	226	37,6

4.7 Capacidade de Ligação ao BCMA por Citometria de Fluxo

4.7.1 Citometria com a linhagem celular Raji

As células vivas e únicas foram identificadas pelos gráficos de FSC x SSC (*Forward Scatter* e *Side Scatter*, respectivamente) e FSC-A x FSC-H (*Forward Scatter*, da área pela altura), respectivamente, demonstrados na **Figura 32**. A presença de duas populações de linfócitos foi identificada no controle não marcado, e um *gate* foi estabelecido para excluir a autofluorescência de ambas as populações de células. Esta duplicação da população de células Raji foi observada em outros experimentos do grupo de pesquisa, e foi considerada como artefato do cultivo desta linhagem. Inicialmente, a amostra de controle positivo de ligação com um anticorpo anti-BCMA comercial demonstrou que essa linhagem celular apresenta o antígeno alvo dos scFvs, como esperado. As construções de scFvs anti-BCMA previamente purificadas foram testadas na concentração de 1 µg/ por teste, e foram detectados por anticorpo anti-His Tag conjugado ao fluoróforo FITC. A linhagem celular Raji foi utilizada de maneira preliminar para avaliar a capacidade de ligação ao BCMA presente

na membrana de linfócitos. Foi observado que todos os fragmentos de anticorpo apresentaram ligação ao BCMA, sendo que o scFv anti-BCMA Murino apresentou a maior porcentagem de 23,6%. Os scFvs Harmonizado e Caótico obtiveram a segunda maior porcentagem de ligação, com detecção de 21,5%. Já o anticorpo scFv Humanizado exibiu 19,8% de ligação ao BCMA e, apesar de ter sido o menor valor obtido, foi capaz de ligar especificamente ao antígeno-alvo.

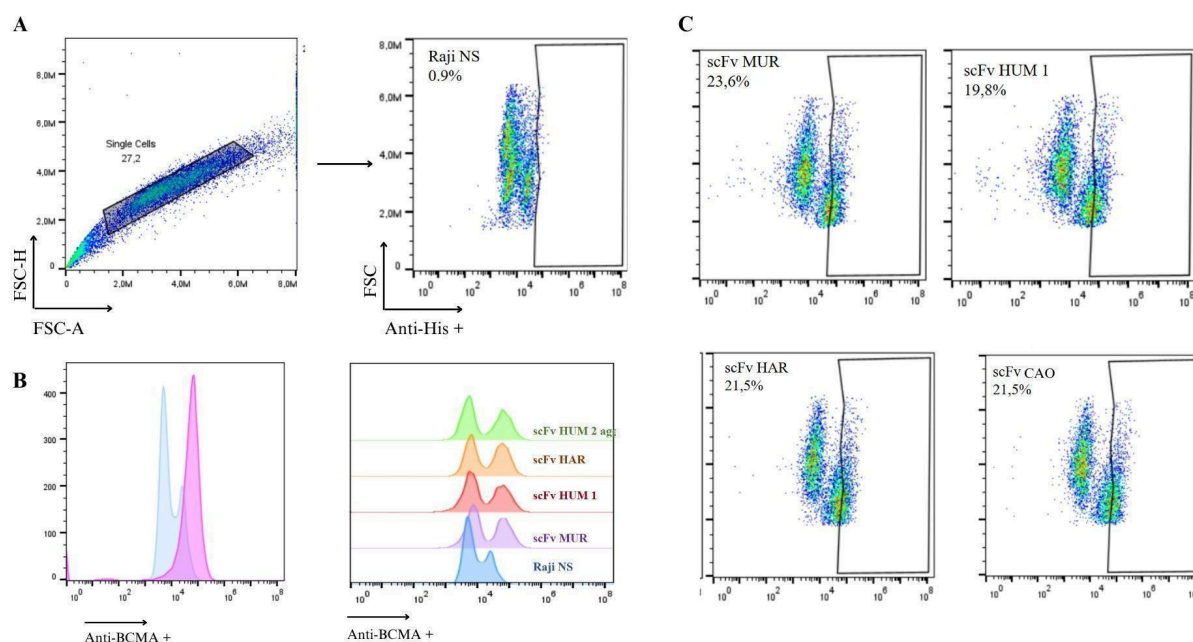


Figura 32: Reconhecimento do antígeno BCMA em células Raji. A citometria de fluxo foi realizada com anticorpos fluorescentes anti-His tag, além do anti-BCMA comercial como controle positivo. **(A)** Os gates para a seleção da população de células únicas está apresentado à esquerda, e para a seleção das células não marcadas (NS) com anti-His à direita. **(B)** O gráfico à esquerda mostra a presença do antígeno BCMA, por meio da ligação do anticorpo comercial; já o gráfico à direita apresenta a detecção da ligação específica dos quatro scFvs anti-BCMA desta pesquisa. **(C)** Os gráficos de *scatter plot* mostram que os scFvs foram capazes de ligar ao alvo, sendo detectados: 23,6% para o Murino, 19,8% do Humanizado, 21,5% para os Harmonizado e Caótico.

O fato do scFv Humanizado ter revelado um potencial para agregação com as análises *in-silico* pode estar relacionado com a menor capacidade de ligação observada neste experimento, uma vez que o scFv Harmonizado expressa o mesmo arcabouço humano, mas com alterações específicas para reduzir este potencial de agregação. De maneira interessante, o scFv Caótico apresentou a mesma capacidade de ligação que o scFv Harmonizado, e esta relação será continuamente examinada nas próximas citometrias de fluxo. Posto isso, foi determinado que os scFvs anti-BCMA produzidos na *E. coli* SHy apresentam capacidade de ligação ao BCMA em linhagens tumorais de células semelhantes a linfoblastos, o que representa um achado promissor para a validação funcional desses anticorpos.

4.7.2 Citometria com a linhagem celular U266

4.7.2.1 Avaliação inicial de ligação em células tumorais

Os experimentos iniciais com a linhagem celular de MM envolveram a caracterização das células pela análise da presença dos antígenos BCMA, CD19 e CD20. Primeiramente, as células foram avaliadas com base nas propriedades de tamanho e granulosidade pelo gráfico, FSC x SSC. Esta análise inicial demonstrou que a linhagem apresenta duas populações distintas: células de tamanho intermediário e com poucos grânulos, chamadas de “linfocíticas”, e células com muitos grânulos intracelulares, a partir daqui chamadas de “granulocíticas”. Considerando isto, três gates foram estabelecidos: população “granulocítica”, população menos granulosa (“linfocítica”) e população com todas as células (“all cells”) (**Figura 33**). É importante ressaltar que, neste ensaio preliminar, os scFvs foram analisados como amostras única.

Tanto a população “granulocítica” quanto a “all cells” não expressam o antígeno CD-19, uma vez que não foi detectada a ligação de nenhum dos dois anticorpos anti-CD19 conjugados ao fluoróforo APC. No entanto, observou-se um leve deslocamento na população “linfocítica” em relação ao controle não marcado, possivelmente devido a uma ligação inespecífica do anticorpo. Este deslocamento também foi observado quando utilizamos o anticorpo anti-CD19 conjugado a ficoeritrina (PE). Nenhuma das populações analisadas expressa o antígeno CD-20, pois o anticorpo anti-CD20 conjugado a FITC não apresentou diferença de ligação em relação à amostra controle. Porém, todas as populações exibiram sinal positivo quando avaliadas com o anticorpo primário Rituximab e o secundário anti-IgG murino. Esse resultado sugere uma possível ligação inespecífica do Rituximab, uma vez que não é esperado que a linhagem U266 expresse CD19 ou CD20.

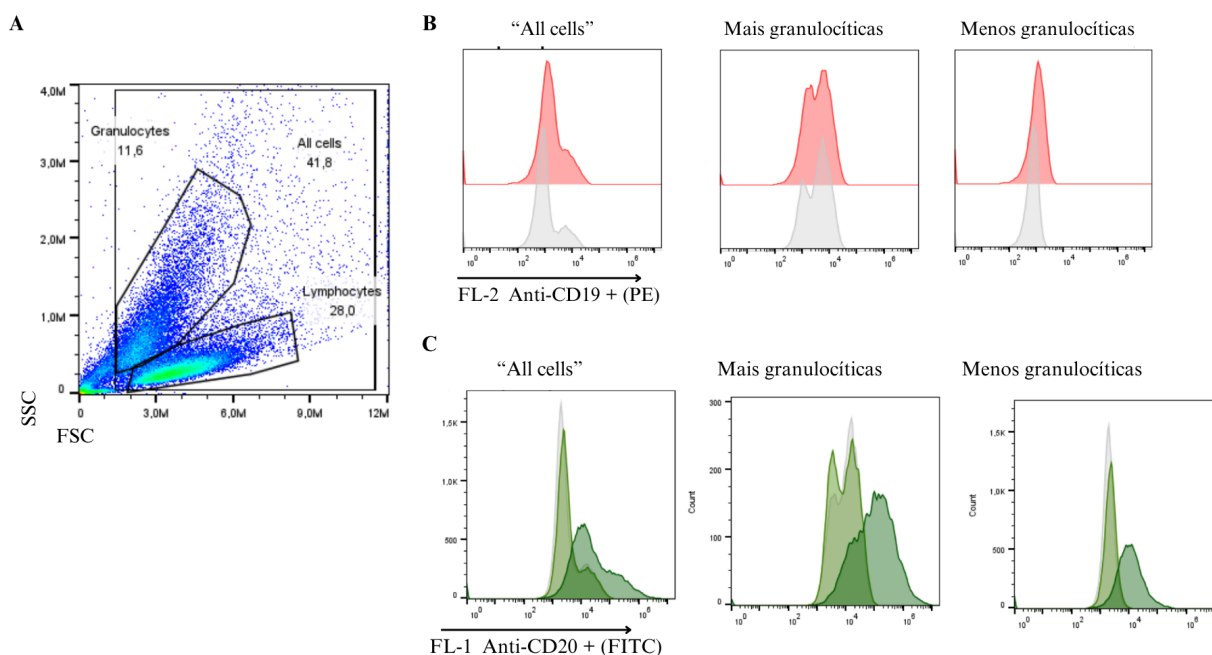


Figura 33: Análise fenotípica das células de mieloma múltiplo U266. (A) Citometria de fluxo das células U266, com os três gates selecionados como: “All cells”, composto pela população mais granulosa, ou “Granulocítica”, e menos granulosa ou “Linfocítica”. (B) Gráficos da detecção com anticorpo anti-CD19 conjugado a PE nas três populações de células. (C) Detecção do antígeno CD20 com anticorpo FITC nas três populações estudadas.

O anticorpo anti-BCMA comercial utilizado para avaliar a expressão do antígeno nessa linhagem revelou que as três populações expressam o BCMA, com a menor MFI observada na população linfocítica (3671) e a maior na granulocítica (16362). De maneira interessante, o anti-BCMA comercial obteve menor MFI em relação aos scFvs na população “granulocítica” (**Figura 34**). Quanto à ligação dos scFvs produzidos neste trabalho, foi observado que todos apresentaram capacidade de ligação – na concentração de 1 μ g – em todas as populações analisadas. Também foi possível identificar que a interação dos anticorpos variou entre as populações com diferentes características de granulosidade. Na população mais granulosa, os valores de MFI foram mais elevados para os scFvs Murino (38392) e Caótico (38081), seguidos pelo Humanizado (33576) e Harmonizado (27406). Esses resultados podem estar relacionados à maior expressão do antígeno BCMA na população “granulocítica”, como evidenciado pela maior ligação do anticorpo anti-BCMA comercial. Já na população “linfocítica”, os valores de MFI foram consideravelmente menores para todas as construções, com o scFv Humanizado apresentando a maior MFI (4096), seguido pelo Murino e Caótico (3701) e, por fim, o Harmonizado (3223).

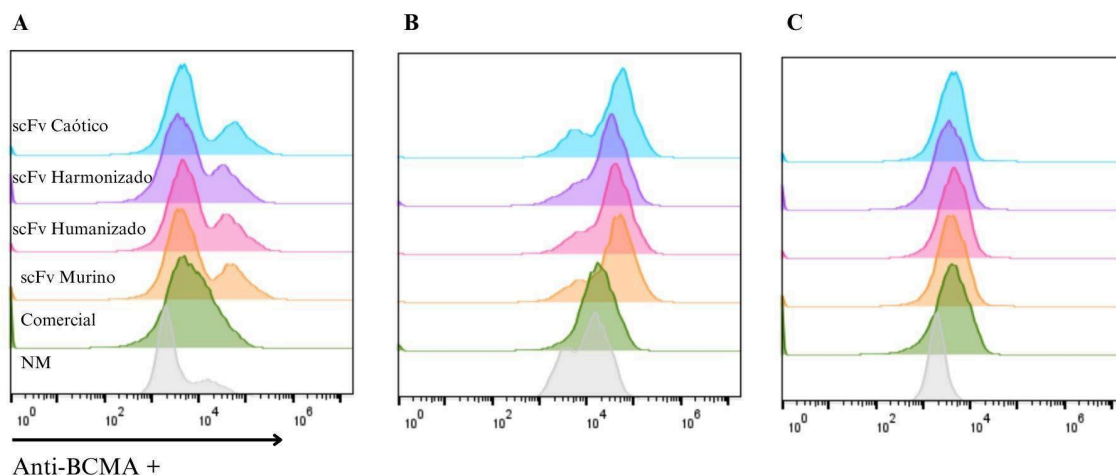


Figura 34: Ligação dos scFvs em células de mieloma múltiplo U266. Citometria de fluxo das células U266 com os anticorpos anti-BCMA comercial (verde), Murino (laranja), Humanizado (rosa), Harmonizado (roxo) e Caótico (azul). As populações analisadas estão apresentadas em (A) “all cells”, (B) “mais granulocíticas” e (C) “menos granulocíticas”.

Tabela 16: Intensidade de Fluorescência Média (MFI) dos scFvs.

	“All Cells”	“Granulocíticas”	Linfocíticas”
Amostra	MFI	MFI	MFI
Não marcada	2.273	10.725	1.848
Anti-BCMA comercial	5.646	16.362	3.671
scFv Murino	5.555	38.392	3.701
scFv Humanizado	6.074	33.576	4.096
scFv Harmonizado	4.819	27.406	3.223
scFv Caótico	5290	38.081	3.701

Com este experimento, a linhagem U266 foi brevemente caracterizada, com a confirmação da expressão do BCMA e a presença de CD19 e CD20 nestas células. Apesar de não ser possível avaliar a diferença estatística neste experimento, todas as construções de scFvs foram capazes de se ligar especificamente ao antígeno-alvo. Nota-se que o scFv Harmonizado aparentou ter a menor ligação entre os anticorpos testados neste experimento. Como foi identificado que as três populações expressam o antígeno BCMA, os próximos experimentos serão realizados com base na população “all cells”.

4.7.2.2 Análise do reconhecimento antigênico em função da concentração dos anticorpos recombinantes

Em seguida, foi realizada uma titulação dos fragmentos de anticorpos a fim de determinar a concentração necessária para a detecção da ligação ao antígeno BCMA. As condições testadas incluíram 0,5, 1 e 2 µg de anticorpo por ensaio (**Figura 35**), sendo cada condição avaliada em triplicata para a análise estatística por ANOVA One-Way seguida do pós-teste de Tukey. Os resultados também permitiram comparar as diferentes construções, identificando o scFv com melhor desempenho na interação com o antígeno em linhagens tumorais de MM. O anti-BCMA comercial apresentou a maior intensidade de fluorescência média, o que confirma a presença do antígeno-alvo na membrana das células da linhagem U266 como esperado. Isto pode ser explicado pelo fato de que a detecção do anticorpo comercial foi realizada com o anticorpo secundário diferente dos fragmentos de anticorpos neste experimento, e não propicia uma comparação direta entre essas amostras. Com isto, as análises de diferença estatística entre os fragmentos de anticorpos foram feitas entre si, desconsiderando a ligação do anticorpo comercial às células.

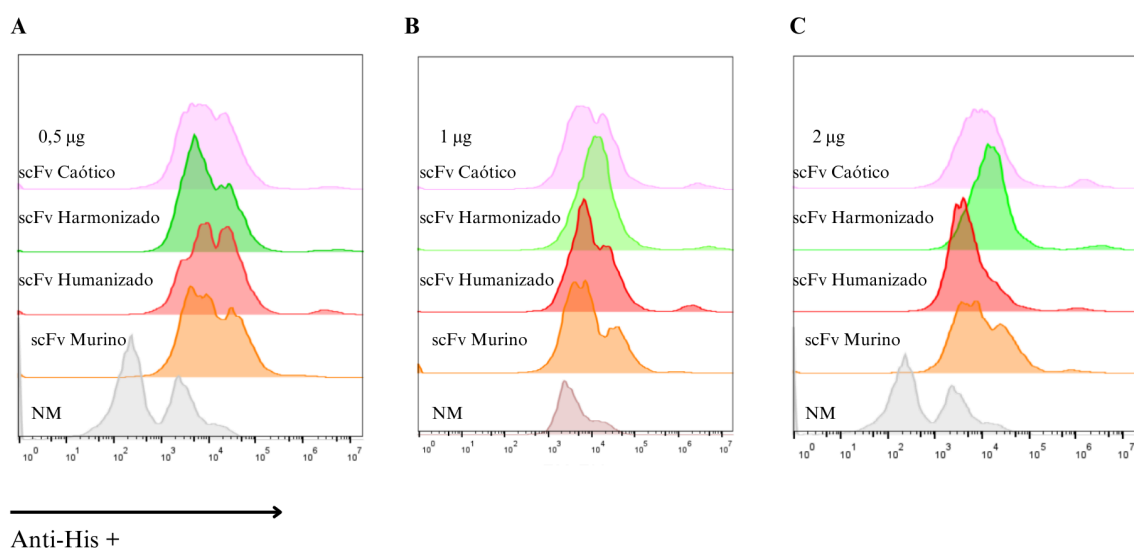


Figura 35: Capacidade de ligação dos scFvs em diferentes concentrações. Citometria de fluxo com as células U266 da titulação com as concentrações de 0,5 µg (**A**), 1 µg (**B**) e 2 µg (**C**) dos scFv anti-BCMA Murino (laranja), Humanizado (vermelho), Harmonizado (verde) e Caótico (rosa).

Tabela 17: Intensidade Média de Fluorescência (MFI) da citometria com diferentes concentrações dos scFvs.

	0,5 µg	1 µg	2 µg
Amostra	MFI	MFI	MFI
Anti-BCMA comercial	38541	40939	41990
scFv Murino	8346	7893	7680
scFv Humanizado	8855	8201	6070
scFv Harmonizado	10454	12014	15782
scFv Caótico	8614	8930	10171

Dados apresentam a média de triplicatas experimentais.

Inicialmente, todos os anticorpos apresentaram ligação específica na concentração de 0,5 µg sem diferença estatística ($p > 0,05$) (**Figura 36**). Já na concentração de 1 µg, o scFv Harmonizado demonstrou a maior intensidade de fluorescência média (MFI, sigla em inglês) com diferença significativa com $p < 0,01$ em relação aos anticorpos Murino e Humanizado, e também com diferença de $p < 0,05$ em relação ao scFv Caótico. Nota-se que, nesta concentração, o scFv Caótico obteve uma MFI similar aos anticorpos Humanizado e Murino. Por sua vez, o scFv Harmonizado na concentração de 2 µg apresentou uma diferença altamente significativa ($p < 0,001$) em relação aos scFvs Murino e Humanizado, e também em relação ao scFv Caótico ($p < 0,01$). Curiosamente, o anticorpo Caótico obteve a segunda maior MFI na condição com 2 µg, e apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao scFv Humanizado.

Estes resultados sugerem a hipótese de que a harmonização, ou seja, a redução do potencial de agregação do anticorpo, pode estar relacionada com a capacidade de ligação ao antígeno-alvo, uma vez que o scFv Harmonizado apresentou a maior MFI em duas das três condições testadas. A observação da ligação do anticorpo Caótico em 2 µg foi um resultado não esperado, e indica que a manipulação teórica da sequência de anticorpos pode resultar em alterações conformacionais, que podem tanto reduzir quanto aumentar a afinidade pelo antígeno.

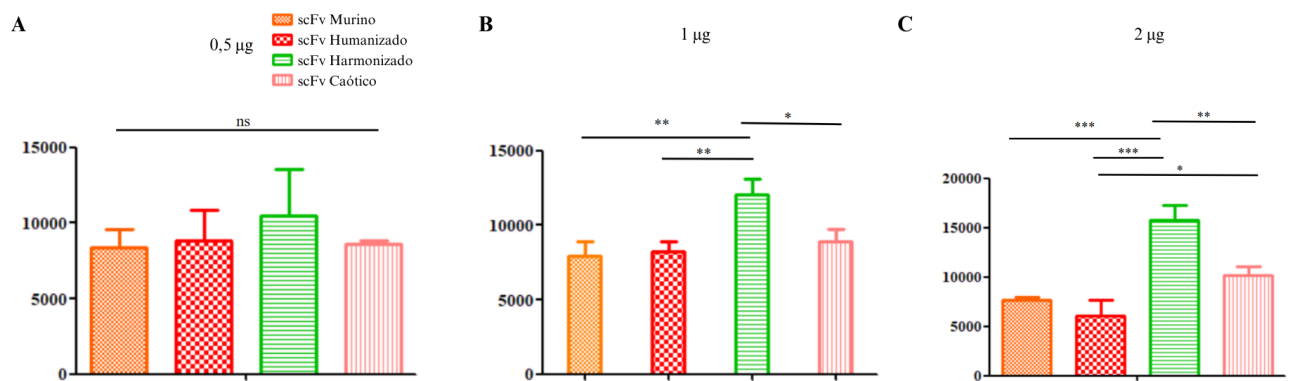


Figura 36: Ligação específica dos scFvs anti-BCMA em células alvo. Análises da Intensidade de Fluorescência Média (MFI) da citometria de fluxo com células U266 da titulação com (A) 0,5 µg, (B) 1 µg e (C) 2 µg dos scFvs Murino (laranja), Humanizado (vermelho), Harmonizado (verde) e Caótico (rosa). Estatística feita com ANOVA One-Way e pós-teste de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

5. DISCUSSÃO

As neoplasias são o conjunto de doenças que mais afligem a população mundial, segundo dados da Organização Mundial da Saúde. Diante das características multifatoriais dos tratamentos oncológicos, a patologia pode reduzir drasticamente a expectativa de vida dos pacientes. Entre os cânceres hematológicos, o mieloma múltiplo (MM) afeta as células plasmocitárias, ou seja, linfócitos B produtores de anticorpos. O prognóstico dos pacientes com MM é complexo, e pode variar de meses a décadas. Em vista disso, o câncer ainda é uma das doenças cuja cura é considerada como potencialmente incerta, com diversos elementos que complicam a remissão dos tumores (Engelhardt *et al.*, 2024). Apesar disso, o cenário de terapias oncológicas está em constante evolução, e requer abordagens técnico-científicas inovadoras para o aumento da eficácia das terapias.

Os medicamentos utilizados contra câncer devem eliminar as células tumorais replicantes a fim de garantir a efetividade do tratamento, além de apresentarem características farmacológicas pertinentes, porém com mínimos danos aos tecidos saudáveis. A medicina de precisão com terapias direcionadas representa a junção destas qualidades, sendo um avanço significativo das alternativas de tratamento contra múltiplas neoplasias (Kannampuzha *et al.*, 2023). Dentre os recursos terapêuticos da medicina de precisão, os anticorpos estão entre os mais impactantes.

Os anticorpos, como moléculas mediadoras do sistema imune, correspondem a uma classe de medicamentos altamente relevantes. Desde a introdução do primeiro anticorpo monoclonal terapêutico (mAb), o anti-CD3 OKT3, o desenvolvimento de mAbs teve um crescimento expressivo nas últimas décadas. Devido à alta especificidade dos anticorpos, os imunoterápicos são alvos de estudo contra inúmeras doenças oncológicas, infecciosas e autoimunes (Lyu *et al.*, 2022). Com isso, é estimado que o mercado global de mAbs terapêuticos ultrapasse 400 bilhões de dólares até 2028 (Global Marketing Insight, 2023). Este avanço econômico também reflete a evolução da pesquisa e do desenvolvimento (P&D) de novas tecnologias de imunoterápicos anti-tumorais. Assim, os produtos derivados dos mAbs incluem *designs* mais eficientes e com menor imunogenicidade, como os fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFvs) (Muñoz-López *et al.*, 2022).

A partir disto, e considerando que a humanização dos fragmentos de anticorpos utilizados em terapias CAR-T é um fator relevante para a redução da imunogenicidade dessas células (Sternier; Sternier, 2021), esta pesquisa realizou o desenho e as análises biofísicas de

novas construções de scFv anti-BCMA. O scFv anti-BCMA Murino é completamente baseado na estrutura do J22, enquanto o scFv Humanizado foi gerado a partir do processo de transplante de CDRs murinas originais para sequências de *frameworks* humanos. Com base nas análises de sequência do anti-BCMA Humanizado, geramos duas versões com mutações pontuais nos VHs: scFv Harmonizado e scFv Caótico. Estas alterações foram realizadas a fim de reduzir ou aumentar, respectivamente, o potencial teórico de agregação da proteína, por meio de análises no algoritmo Tango (Site: tango.crg.es/). Com isso, nossa hipótese principal foca no impacto dessas alterações nas sequências primárias na agregação molecular dos fragmentos de anticorpos scFv anti-BCMA, em vista do contexto maior de otimização de terapias com células CAR-T.

Apoiado nisso, o trabalho de Di Mambro (2020) realizou a humanização *in-silico* bem-sucedida de um scFv anti-fúngico, e indica que as construções com a sequência VL-linker-VH apresentaram maior solubilidade em comparação à orientação VH-linkerI-VL (Di Mambro *et al.*, 2021). Assim, as modificações da estrutura primária dos scFvs apresentadas neste trabalho são similares aos dados encontrados na literatura. Inclusive, os efeitos das alterações na sequência de aminoácidos dos scFvs são evidentes no trabalho de Landoni *et al.* (2021). O estudo identificou que os receptores quiméricos com scFvs modificados apresentaram uma distribuição homogênea na membrana celular, indicando redução da agregação proteica. Além disso, o trabalho também apresenta que as alterações são suficientes para impactar positivamente a eliminação de células tumorais pelas células CAR-T em modelo *in vivo*.

Diante do fomento a P&D (pesquisa e desenvolvimento) de imunoterápicos na área de neoplasias hematológicas, este trabalho apresentou a otimização da expressão de novos scFvs contra MM em sistema bacteriano. Isto pois o sistema de expressão em bactérias apresenta diversas características desejáveis para a obtenção de proteínas heterólogas, e é um dos métodos mais estudados desde a introdução da insulina humana recombinante na década de 1980. A taxa de crescimento acelerado com baixo custo de produção, o genoma facilmente manipulável e a alta produtividade são algumas das propriedades interessantes do sistema de produção bacteriano. No caso da expressão de imunoglobulinas, a linhagem bacteriana utilizada necessita de alterações para aumentar a estabilidade e o enovelamento de proteínas no citoplasma, especialmente para a formação das pontes dissulfeto dessas proteínas (Rashid, 2022). Assim, a linhagem de *E. coli* SHuffle® utilizada neste trabalho é frequentemente associada à obtenção de anticorpos.

A expressão de imunoglobulinas documentada no trabalho de Waraho-Zhmayev (2018) corrobora as observações desta pesquisa, uma vez que os anticorpos quiméricos foram expressos com sucesso no citoplasma bacteriano. No trabalho, dois mAbs contra HER2 e VEGF foram purificados de produções com a otimização das concentrações do indutor, com resultados a partir de 0,1mM, além da temperatura de indução a 30°C (Charoenpun *et al.*, 2018). A purificação de scFvs por métodos cromatográficos também é documentada, sendo que o trabalho de Shin *et al.* (2020) utilizou o método de Coluna Ni-NTA. Este método foi testado inicialmente durante a otimização dos scFvs deste trabalho, mas gerou resultados insatisfatórios de rendimento em comparação à purificação por HPLC. O trabalho de Shin (2020) obteve 1mg de proteína purificada de 4g de *pellet* bacteriano, sendo que os scFvs anti-BCMA desta pesquisa atingiram entre 2 e 4 mg de proteína por litro de cultura bacteriana. Portanto, a otimização da obtenção dos scFvs deste projeto foi concluída de maneira satisfatória. Nota-se que, dentre os scFvs testados, o anti-BCMA Caótico apresentou o menor rendimento da purificação. Uma vez que todas as construções possuem a proteína SUMO, a fim de permitir a expressão solúvel e o dobramento correto (Butt *et al.*, 2005), isto pode indicar que as alterações na sequência afetaram negativamente tanto a produção da proteína de interesse pela bactéria, quanto a etapa de obtenção e purificação. Assim, ainda há a necessidade de testar o possível impacto da SUMO no rendimento da produção e na formação de agregados, por meio da remoção desta proteína e purificação dos scFvs em próximos experimentos.

O estudo de Oden *et al.* (2015) identificou que o J22, anticorpo murino quimérico, apresenta a capacidade de ligação ao BCMA *in vitro* em concentrações de 500 ng até 5 ng, via ensaios de citometria de fluxo com células de MM. Esta observação corrobora os dados referentes aos quatro scFvs anti-BCMA desenhados nesta pesquisa, inclusive o baseado no murino original, uma vez que identificamos as afinidades ao BCMA a partir de 500 ng. No entanto, a comparação entre os anticorpos humanizados permitiu a identificação de diferenças significativas apenas a partir de 1 µg. Notadamente, o scFv Harmonizado foi a construção com maior detecção da MFI, possivelmente pelas mutações efetuadas nos resíduos de aminoácidos adjacentes ou dentro das CDRs. Nesta linha, as análises de citometria da construção de scFv Caótico indicaram que o fragmento apresenta a capacidade de ligação significativamente maior que o scFv Humanizado, nas concentrações de 2 µg. Mesmo que esta observação não tenha sido esperada, é hipotetizado que a propensão a formar agregados moleculares – observados no scFv Caótico pelos estudos anteriores – tenha causado um aumento do sinal e da detecção do anticorpo pelo método de imunofluorescência utilizado. A

partir disso, concluímos que a conservação de aminoácidos murinos singulares nas sequências humanizadas pode influenciar no aumento da especificidade do anticorpo. Adicionalmente, isto corrobora a hipótese de que o processo de harmonização do anticorpo impacta positivamente na função da proteína em ensaios *in vitro*.

Ainda sobre a ligação específica ao antígeno alvo, este trabalho também investigou a afinidade dos scFvs das linhagens tumorais de mieloma múltiplo: as células Raji, de linfoma de Burkitt. Apesar de não ser a linhagem alvo deste trabalho, as células Raji expressam o BCMA, que foi detectado por meio de anticorpo comercial anti-BCMA. Desta forma, esta linhagem, além de conveniente, é adequada para os ensaios preliminares de citometria de fluxo. Conforme observado, os scFv anti-BCMA purificados neste trabalho apresentaram ligação ao BCMA presente em células de mais de uma linhagem tumoral. Isto é um indicativo da aplicação múltipla de anticorpos terapêuticos, com um potencial amplo de funcionalidades clínicas.

Recentemente, o grupo de pesquisa que identificou o J22 publicou a humanização do anticorpo (Marino; Daumke, 2024). O estudo inseriu cerca de 40 mutações no anticorpo murino original, além de novas mutações específicas dentro das CDRs, com análises de cristalografia de raio-X. Em comparação à humanização de Marino e Daumke (2024), o scFv desenvolvido nesta pesquisa apresenta seis resíduos de aminoácidos distintos no VH, indicando que o processo de humanização pode ocasionar a conservação de sequências germinais humanas encontradas em altas frequências, chamadas de Zona de Vernier no estudo citado. Não obstante, foram identificados cerca de 20 aminoácidos diferentes entre os VL humanizados, o que mantém o aspecto de inovação em ambos os estudos. Ademais, os autores indicam que uma alanina (A46) na região de *framework* 2 do VL é essencial para a formação de um “bolsão” hidrofóbico com os aminoácidos Y36, L47 e F55, que interagem diretamente com o BCMA. Considerando isso, a humanização do scFv anti-BCMA desta pesquisa manteve a A46 e, possivelmente, evitou a disrupção de um dos sítios fundamentais de reconhecimento ao alvo pelo anticorpo. Isto pôde ser identificado pela ligação específicas dos scFvs anti-BCMA deste estudo em linhagens tumorais, fato que é corroborado pela literatura (Oden *et al.*, 2015). Por fim, o estudo de Marino e Daumke (2024) não avalia as demais características biofísicas dos fragmentos do J22, especialmente a agregação teórica ou experimental destas proteínas.

Diante desta questão, Long *et al.* (2015) observou que os ectodomínios, os fragmentos de anticorpos, e os endodomínios (especificamente o sítio do co-estimulador, 41BB ou CD28), influenciam na atividade citotóxica, proliferativa e de produção de citocinas das

células CAR-T. Neste estudo do grupo, determinadas construções de receptores quiméricos – como o CD28 e as regiões de *framework* – resultaram no aumento de marcadores de exaustão celular no cultivo *ex-vivo*, além da redução da atividade citotóxica *in vivo*. Considerando esta sinalização tônica associada à exaustão celular, a agregação dos fragmentos de anticorpos é observada como um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento deste fenótipo. Ademais, todos os componentes do receptor quimérico são mutáveis e permitem a introdução de modificações que potencializam a imunoterapia. Excepcionalmente, os CARs com o anti-CD19 (FMC63) foram as únicas construções estudadas atualmente que não apresentaram essas características desvantajosas de agregação e exaustão (Jayaraman *et al.*, 2020). Em suma, a engenharia dos anticorpos é relevante para o aprimoramento da terapia em células CAR-T a fim de evitar redução da eficácia da imunoterapia.

Em relação à hipótese inicial deste trabalho, as construções de anticorpos anti-BCMA apresentaram perfis distintos de formação de agregados pelas análises de exclusão molecular (EM) e espalhamento dinâmico da luz (DLS). A EM possibilitou a identificação inicial da agregação dos scFvs anti-BCMA, indicando que o processo de harmonização do anticorpo – ou seja, a redução da agregação teórica – gerou os resultados esperados de redução da formação de agregados. Inclusive, os scFvs Harmonizados apresentaram partículas menores que o scFv baseado no anticorpo murino original. Esta diferença aparente também é evidenciada pela comparação do Harmonizado com o scFv Humanizado, que apresentou moléculas majoritariamente maiores pela detecção na EM. Ademais, as análises do scFv Caótico indicam que as alterações para aumentar a agregação tiveram um efeito variado. Pela avaliação da EM, esta construção apresentou partículas tanto de maior massa molecular, quanto de menor massa em proporções similares.

A modificação de fragmentos de anticorpos, a fim de reduzir a agregação, é amplamente estudada. Por exemplo, o grupo de Yamauchi *et al.* (2019) identificou que scFvs no formato cíclico apresentam maior estabilidade na manutenção da estrutura monomérica nas análises por DLS, em contraste ao scFv linear. Em comparação à outros scFvs da literatura, o trabalho de de Aguiar *et al.* (2021) observou que um scFv anti-FGF2, baseado em um anticorpo inteiro, gerou a formação de partículas de aproximadamente 100 nm. Quanto às observações do DLS, as partículas dos scFvs apresentaram cerca de 20 nm até 90 nm, além do fato de a concentração da amostra influenciar a agregação das proteínas. Porém, de maneira interessante, o tamanho observado das partículas dos scFvs Harmonizados foi notadamente menor que as outras construções, com majoritariamente 15 a 30 nm, e apresentou uma distribuição homogênea com a variação da concentração. Sobre as

construções com o scFv Caótico, os resultados do DLS corroboram a hipótese da maior formação de agregados. Isto pois as partículas detectadas nessas amostras estavam principalmente nas faixas de 30 a 90 nm, com agregados maiores que 100 nm. A partir destas análises, identificamos que as alterações previstas para as sequências primárias do anti-BCMA Humanizado impactaram, de fato, na formação de agregados moleculares. Por fim, o resultado da harmonização do anticorpo, baseada na predição teórica de agregação, resultou em proteínas com menor propensão a formar agregados, além de preservar a capacidade principal de ligação específica ao antígeno alvo. Isto é um fator essencial, uma vez que o *design* de anticorpos exige que as mutações para otimização da estrutura estejam atreladas à manutenção da seletividade e da baixa imunogenicidade da molécula (Pang *et al.*, 2025).

Considerando os variados métodos de engenharia de fragmentos de anticorpos na literatura, um deles é a estratégia de adição de pontes dissulfeto no conector (*linker*), a fim de “grampear” os domínios variáveis (Boucher *et al.*, 2023). Os scFvs com esta característica (chamados pelo estudo de “spFv”) apresentaram resultados promissores, pois demonstraram maior estabilidade em situações de estresse térmico, o que reduz o potencial de agregação das moléculas. Ademais, estes spFvs também mantiveram a capacidade de ligação específica ao antígeno, e a estrutura cristalizada reforça que houve a manutenção dos domínios necessários para reconhecimento do alvo. Assim, o aprimoramento das características biofísicas de scFvs é um caminho relevante para o desenvolvimento de moléculas terapêuticas com qualidades superiores de eficácia, segurança e produção. Diante disso, estratégias de engenharia da molécula do CAR-T são uma das opções viáveis para evitar o comprometimento funcional e, consequentemente, a progressão da patologia. O desenho de moléculas CAR otimizadas é determinante para as propriedades desejadas na terapia, sendo possível a manipulação em todos os domínios no receptor (Fu *et al.*, 2024). Assim, a engenharia de anticorpos é uma das ferramentas investigadas entre as condições que ocasionam o fenótipo de exaustão celular. A evolução de anticorpos quiméricos para fragmentos parcial ou totalmente humanos possibilitou a redução da imunogenicidade e o aumento da eficácia de imunoterapias. Além das abordagens convencionais *in vitro*, as metodologias *in-silico* possuem um potencial considerável no aperfeiçoamento das propriedades biológicas dos anticorpos, como a afinidade específica e a agregação molecular (Li *et al.*, 2023). Com isso, o desenho racional de anticorpos com o auxílio de ferramentas computacionais, e validadas experimentalmente, é um dos caminhos para otimização de imunoterapias que requerem mais investigações.

6. CONCLUSÃO

Considerando o avanço na incidência e na mortalidade de neoplasias mundialmente, a busca por modalidades de tratamento é constante. No contexto de cânceres hematológicos, o mieloma múltiplo (MM) é uma patologia severa, e que ainda não é considerada curável. Entre as intervenções clínicas, a imunoterapia baseada em células T com receptor quimérico de antígeno (CAR-T) é uma das mais promissoras. Diante da necessidade de investigar a otimização desta terapia, a busca por novos medicamentos envolve diversos componentes das células CAR-T. Especificamente sobre os domínios de reconhecimentos de células tumorais, fundamentado em fragmentos de anticorpos, as moléculas de cadeia única (scFv) são altamente moduláveis, e a redução do potencial de agregação pode impactar positivamente no aprimoramento da atividade antitumoral das células CAR-T.

Em vista aos nossos objetivos iniciais de obtenção de novos fragmentos de anticorpos anti-BCMA, concluímos que foi possível otimizar tanto a expressão, quanto a purificação das proteínas no sistema bacteriano de produção heteróloga. Os vetores plasmidiais utilizados nesta pesquisa mostraram-se moduláveis, pela indução com IPTG, e atingiram o objetivo desejado de estabelecer um protocolo aprimorado para produção dos scFvs. Além disso, as construções desenhadas dos quatro scFvs anti-BCMA foram analisadas *in-silico* no que se refere à agregação molecular, e conseguimos realizar a validação experimental por duas metodologias: exclusão molecular (EM) e espalhamento dinâmico da luz (DLS). Nosso processo de humanização e harmonização do anticorpo anti-BCMA J22.9-xi (PDB: 4ZFO) foi capaz de gerar novas versões com a função desejada, uma vez que os quatro scFvs apresentaram ligação específica ao antígeno alvo nas análises preliminares por citometria de fluxo. Satisfatoriamente, os scFvs anti-BCMA Harmonizados apresentaram a maior ligação, estatisticamente significativa, em relação aos anticorpos originais Murino e Humanizado à 1 e 2 µg na citometria com células de MM. Ademais, nossa construção de um anticorpo teoricamente mais predisposto a agregar (o scFv Caótico) gerou resultados heterogêneos quanto à formação de agregados, com grande amplitude de tamanho das partículas observadas pela EM e pelo DLS. De maneira interessante, ele obteve diferença significativa na capacidade de ligação às células alvo na concentração de 2 µg, em relação ao scFv Humanizado. Isto pode ser investigado em outros experimentos de ligação, como ensaios imunoenzimáticos. Não obstante, nossa hipótese inicial de modificação na sequência primária dos nossos fragmentos de anticorpos anti-BCMA, a fim de modular a agregação, foi

confirmada de maneira satisfatória. Nota-se que ainda podemos aprofundar os conhecimentos da estrutura dos nossos fragmentos de anticorpos, com o auxílio de *softwares* de modelagem *in-silico*. Além do mais, adicionar outras metodologias, como ultracentrifugação analítica, são caminhos interessantes para examinar ainda mais as características biofísicas dos scFvs.

Diante do aspecto de prova de conceito deste trabalho, é fundamental continuarmos com mais análises biológicas e biofísicas, para estabelecer e quantificar nossa hipótese de harmonização dos anticorpos. Especialmente, é necessário investigar o comportamento dos fragmentos de anticorpos humanizados e harmonizados no formato de receptor quimérico em culturas de células humanas. Além da validação da expressão dos anticorpos em células de mamífero, avaliar as características funcionais é primordial, por meio de ensaios de atividade citotóxica contra células tumorais. Por fim, a oligomerização dos scFvs no formato de CAR também é algo a ser investigado, com o propósito de corroborar a predisposição (ou não) de formarem agregados moleculares e de influenciarem nas funções biológicas das células CAR-T.

REFERÊNCIAS

CONDADO-MORALES et al. A comparative study of the developability of full-length antibodies, fragments, and bispecific formats reveals higher stability risks for engineered constructs. **mAbs**, v. 16, n. 1, 4 out. 2024.

4ZFO: J22.9-xi: Chimeric Mouse/human Antibody Against Human BCMA (CD269). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4ZFO>>. Acesso em: jan. 2023.

AGARWALLA, P. et al. Bioinstructive implantable scaffolds for rapid in vivo manufacture and release of CAR-T cells. **Nature Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1250–1258, 1 ago. 2022.

AHMAD, Z. A. et al. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

Antibody Therapy Market Share | Global Forecast, 2023 – 2032. Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/antibody-therapy-market>>. Acesso em: nov. 2024.

ATTAL, M. et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10214, p. 2096–2107, 7 dez. 2019.

BLANK, C. U. et al. Defining “T cell exhaustion”. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 11, p. 665–674, 1 nov. 2019.

BOLKUN et al. Involvement of BAFF and APRIL in Resistance to Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Cancer**, v. 7, n. 14, p. 1979–1983, 1 jan. 2016.

BOUCHER, L. E. et al. “Stapling” scFv for multispecific biotherapeutics of superior properties. **mAbs**, v. 15, n. 1, p. 2195517, 2023.

BUTT, T. R. et al. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n. 1, p. 1–9, set. 2005.

CAR T-cell Therapy for Multiple Myeloma. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/treating/car-t-cell-therapy.html>>. Acesso em: jan. 2023.

CHAMES, P. et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 2, p. 220–233, 28 abr. 2009.

CHAROENPUN, P. et al. Production of bioactive trastuzumab and chimeric anti-VEGF antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 185, p. 012003, 30 ago. 2018.

CHEN, S. et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. **JAMA Oncology**, v. 9, n. 4, 23 fev. 2023.

CHEN, S. W.; ZHANG, W. Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies. **Antibody Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 73–88, 1 abr. 2021.

CHICAYBAM, L. et al. Transposon-mediated generation of CAR-T cells shows efficient anti B-cell leukemia response after ex vivo expansion. **Gene Therapy**, v. 27, n. 1-2, p. 85–95, 9 jan. 2020.

CHIU, A. et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL. **Blood**, v. 109, n. 2, p. 729–739, 7 set. 2006.

CURADO, M. P. et al. Epidemiology of multiple myeloma in 17 Latin American countries: an update. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 5, p. 2101–2108, 24 mar. 2018.

D'AGOSTINO, M.; BOCCADORO, M.; SMITH, E. L. Novel Immunotherapies for Multiple Myeloma. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 12, n. 4, p. 344–357, ago. 2017.

DANIYAN, A. F. O.; BRENTJENS, R. J. At the Bench: Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for the treatment of B cell malignancies. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 6, p. 1255–1264, 27 out. 2016.

DAY, E. S. et al. Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for Binding to the TNF Family Receptors BAFFR/BR3 and BCMA. **Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1919–1931, 22 jan. 2005.

DE AGUIAR, R. B. et al. Generation and functional characterization of a single-chain variable fragment (scFv) of the anti-FGF2 3F12E7 monoclonal antibody. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 14 jan. 2021.

DEAGLIO, S. et al. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 1, p. 395–402, jan. 1998.

DELGOFFE, G. M. et al. The role of exhaustion in CAR T cell therapy. **Cancer Cell**, v. 39, n. 7, p. 885–888, jul. 2021.

DENG, H. et al. Efficacy of Humanized Anti-BCMA CAR T Cell Therapy in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Patients With and Without Extramedullary Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 5 ago. 2021.

DIRKS, J. et al. Insights into B-cell ontogeny inferred from human immunology. **European Journal of Immunology**, v. 53, n. 6, 5 abr. 2023.

DOGAN, A. et al. B-cell maturation antigen expression across hematologic cancers: a systematic literature review. **Blood Cancer Journal**, v. 10, n. 6, jun. 2020.

Drug therapy for multiple myeloma. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: jan. 2023.

DUAN, Y. et al. Tuning the ignition of CAR: optimizing the affinity of scFv to improve CAR-T therapy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 1, 29 dez. 2021.

ELGUETA, R.; DE VRIES, V. C.; NOELLE, R. J. The immortality of humoral immunity. **Immunological Reviews**, v. 236, n. 1, p. 139–150, 15 jun. 2010.

ENGELHARDT, M. et al. Functional cure and long-term survival in multiple myeloma: how to challenge the previously impossible. **Haematologica**, v. 109, n. 8, 15 fev. 2024.

FEINS, S. et al. An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. **American Journal of Hematology**, v. 94, n. S1, p. S3–S9, 18 fev. 2019.

FERNANDEZ-ESCAMILLA, A.-M. et al. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1302–1306, 12 set. 2004.

FERRER, G. et al. B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL. **British Journal of Haematology**, v. 164, n. 4, p. 570–578, 18 nov. 2013.

FU, B. et al. Mechanisms and salvage treatments in patients with multiple myeloma relapsed post-BCMA CAR-T cell therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 22 out. 2024.

FUJIWARA, K. et al. Impact of scFv structure in chimeric antigen receptor on receptor expression efficiency and antigen recognition properties. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 2, p. 350–357, 25 jun. 2020.

GHERMEZI, M. et al. Serum B-cell maturation antigen: a novel biomarker to predict outcomes for multiple myeloma patients. **Haematologica**, v. 102, n. 4, p. 785–795, 29 dez. 2016.

GONZÁLEZ, D. et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3112–3121, 1 nov. 2007.

GOULET, D. R.; ATKINS, W. M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 1, p. 74–103, 1 jan. 2020.

GROSS, G.; WAKS, T.; ESHHAR, Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 24, p. 10024–10028, 1 dez. 1989.

GUMBER, D.; WANG, L. D. Improving CAR-T immunotherapy: Overcoming the challenges of T cell exhaustion. **eBioMedicine**, v. 77, p. 103941, mar. 2022.

GUO, Y. et al. A Convenient Strategy for Studying Antibody Aggregation and Inhibition of Aggregation: Characterization and Simulation. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 4, p. 534–534, 19 abr. 2025.

HIPP, S. et al. A novel BCMA/CD3 bispecific T-cell engager for the treatment of multiple myeloma induces selective lysis in vitro and in vivo. **Leukemia**, v. 31, n. 8, p. 1743–1751, 27 dez. 2016.

HOYOS, V. et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. **Leukemia**, v. 24, n. 6, p. 1160–1170, 1 jun. 2010.

HU, Y. et al. Mechanisms of resistance to CAR-T cell therapy in multiple myeloma: latest updates from the 2024 ASH annual meeting. **Experimental Hematology and Oncology**, v. 14, n. 1, 26 mar. 2025.

JALLOUK, A. P. et al. Allogeneic and other innovative chimeric antigen receptor platforms. **Clinical Hematology International**, v. 6, n. 3, 27 set. 2024.

JAYARAMAN, J. et al. CAR-T design: Elements and their synergistic function. **EBioMedicine**, v. 58, 1 ago. 2020.

JERYCZYNSKI et al. Stratification for RRMM and Risk-Adapted Therapy: Sequencing of Therapies in RRMM. **Cancers**, v. 13, n. 23, p. 5886–5886, 23 nov. 2021.

JOSEPH, N. S. et al. Long-Term Follow-Up Results of Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone Induction Therapy and Risk-Adapted Maintenance Approach in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 17, p. 1928–1937, 10 jun. 2020.

KALOS, M. et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 95, p. 95ra73–95ra73, 10 ago. 2011.

KANNAMPUZHA, S. et al. Novel biomolecules in targeted cancer therapy: a new approach towards precision medicine. **Medical Oncology**, v. 40, n. 11, 7 out. 2023.

KIMOTO, H.; TAKETO, A. Studies on electrotransfer of DNA into Escherichia coli: effect of molecular form of DNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1307, n. 3, p. 325–330, jul. 1996.

KUEHL, W. M.; BERGSAGEL, P. L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 175–187, mar. 2002.

LAKSHMAN, A. et al. Prognostic significance of interphase FISH in monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Leukemia**, v. 32, n. 8, p. 1811–1815, 30 jan. 2018.

LANDGREN, O. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5412–5417, 2018.

LANDONI, E. et al. Modifications to the Framework Regions Eliminate Chimeric Antigen Receptor Tonic Signaling. **Cancer immunology research**, v. 9, n. 4, p. 441–453, 5 fev. 2021.

LAURENT, S. A. et al. γ -secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 11 jun. 2015.

LEDERGOR, G. et al. CD4+ CAR T-cell exhaustion associated with early relapse of multiple myeloma after BCMA CAR T-cell therapy. **Blood advances**, v. 8, n. 13, p. 3562–3575, set. 2024.

LESOKHIN, A. M. et al. A Phase I, Open-Label Study to Evaluate the Safety, Pharmacokinetic, Pharmacodynamic, and Clinical Activity of PF-06863135, a B-Cell

Maturation Antigen/CD3 Bispecific Antibody, in Patients with Relapsed/Refractory Advanced Multiple Myeloma. **Blood**, v. 132, n. Supplement 1, p. 3229–3229, 29 nov. 2018.

LI, J. et al. Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 247, p. 125733–125733, 1 ago. 2023.

LIN, P. et al. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 121, n. 4, p. 482–488, abr. 2004.

LOBSTEIN, J. et al. SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, 8 maio 2012.

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

LONIAL, S. et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 7, p. 621–631, 13 ago. 2015.

LU, J.; JIANG, G. The journey of CAR-T therapy in hematological malignancies. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, 8 out. 2022.

LYU, X. et al. The global landscape of approved antibody therapies. **Antibody Therapeutics**, v. 5, n. 4, p. 233–257, 6 set. 2022.

MACKAY, F. et al. BAFF and APRIL: a Tutorial on B Cell Survival. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 231–264, 28 nov. 2003.

MAMBRO, T. D. et al. Development and in vitro characterization of a humanized scFv against fungal infections. **PLoS ONE**, v. 17, n. 10, p. e0276786–e0276786, 31 out. 2022.

MARINO, S. F.; DAUMKE, O. Structure-based humanization of a therapeutic antibody for multiple myeloma. **Journal of Molecular Medicine**, v. 102, n. 9, p. 1151–1161, 25 jul. 2024.

MATEOS, M.-V. et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 5, p. 438–447, 1 ago. 2013.

MCCARTHY, P. L. et al. Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 29, p. 3279–3289, 10 out. 2017.

MELENHORST, J. J. et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. **Nature**, v. 602, n. 7897, p. 503–509, 2 fev. 2022.

MELO, A. N. **Observatório de Oncologia» Epidemiologia do Mieloma Múltiplo e distúrbios relacionados no Brasil.** Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/epidemiologia-do-mieloma-multiplo-e-disturbios-relacionados-no-brasil/>>. Acesso em: fev. 2023.

Mieloma múltiplo - Observatório de Oncologia. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/c/estudos/cancer-de-sangue/mieloma-multiplo>>. Acesso em: 3 fev. 2025.

MIKKILINENI, L.; KOCHENDERFER, J. N. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. **Blood**, v. 130, n. 24, p. 2594–2602, 14 dez. 2017.

MINNIE, S. A.; HILL, G. R. Immunotherapy of multiple myeloma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 4, p. 1565–1575, 9 mar. 2020.

Multiple myeloma. Globocan 2020. The Global Cancer Observatory. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/35-Multiple-myeloma-fact-sheet.pdf>>. Acesso em: 3DC.

MUÑOZ-LÓPEZ, P. et al. Single-Chain Fragment Variable: Recent Progress in Cancer Diagnosis and Therapy. **Cancers**, v. 14, n. 17, p. 4206, 30 ago. 2022.

NOVAK, A. J. et al. Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. **Blood**, v. 103, n. 2, p. 689–694, 15 jan. 2004.

O’CONNOR, B. P. et al. BCMA Is Essential for the Survival of Long-lived Bone Marrow Plasma Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 1, p. 91–98, 5 jan. 2004.

O’DONNELL, E. K. et al. Quality of life, psychological distress, and prognostic perceptions in patients with multiple myeloma. **Cancer**, v. 128, n. 10, p. 1996–2004, 15 fev. 2022.

Observatório de Oncologia. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/cancer-como-a-primeira-cao-de-morte-nos-municipios-brasileiros-em-2015/>>. Acesso em: 10 fev. 2025.

ODEN, F. et al. Potent anti-tumor response by targeting B cell maturation antigen (BCMA) in a mouse model of multiple myeloma. **Molecular Oncology**, v. 9, n. 7, p. 1348–1358, 1 ago. 2015.

OFFIDANI, M. et al. Belantamab Mafodotin for the Treatment of Multiple Myeloma: An Overview of the Clinical Efficacy and Safety. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 15, p. 2401–2415, 2021.

PALUMBO, A. et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 26, p. 2863–2869, 10 set. 2015.

PANG, G. et al. A synthetic heavy chain variable domain antibody library (VHL) provides highly functional antibodies with favorable developability. **Protein Science**, v. 34, n. 4, 18 mar. 2025.

PAUL, B.; RODRIGUEZ, C.; USMANI, S. Z. BCMA-Targeted Biologic Therapies: The Next Standard of Care in Multiple Myeloma Therapy. **Drugs**, v. 82, n. 6, 12 abr. 2022.

RAJKUMAR, S. V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **The Lancet. Oncology**, v. 15, n. 12, p. e538-548, 1 nov. 2014.

RAJKUMAR, S. V. Multiple Myeloma: 2020 Update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 5, 24 mar. 2020.

RASHID, M. H. Full-length recombinant antibodies from *Escherichia coli*: production, characterization, effector function (Fc) engineering, and clinical evaluation. **mAbs**, v. 14, n. 1, 26 ago. 2022.

RICHARDSON, P. G. et al. Bortezomib or High-Dose Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2487–2498, 16 jun. 2005.

SANCHEZ, E. et al. The clinical significance of B-cell maturation antigen as a therapeutic target and biomarker. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 4, p. 319–329, 7 mar. 2018.

SHAH, N. et al. B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. **Leukemia**, v. 34, n. 4, p. 985–1005, 13 fev. 2020.

SHAPIRO-SHELEF, M.; CALAME, K. Regulation of plasma-cell development. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 230–242, 1 mar. 2005.

SHIN, J. et al. Characterization of a single chain variable fragment of nivolumab that targets PD-1 and blocks PD-L1 binding. **Protein Expression and Purification**, v. 177, p. 105766, jan. 2021.

SIMÃO, F. **Custo do câncer no SUS**. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/estudos/tratamento-em-oncologia/2024/custo-do-cancer-no-sus/>>. Acesso em: dez. 2024.

SMITH, E. et al. CD34-Selected Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Relapsed, High-Risk Multiple Myeloma. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 258–267, fev. 2016.

SPENCER, A. et al. Consolidation Therapy With Low-Dose Thalidomide and Prednisolone Prolongs the Survival of Multiple Myeloma Patients Undergoing a Single Autologous Stem-Cell Transplantation Procedure. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 11, p. 1788–1793, 10 abr. 2009.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T Cell therapy: Current Limitations and Potential Strategies. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–11, 6 abr. 2021.

TAI, Y.-T. et al. Novel anti-B-cell maturation antigen antibody-drug conjugate (GSK2857916) selectively induces killing of multiple myeloma. **Blood**, v. 123, n. 20, p. 3128–3138, 15 maio 2014.

TAI, Y.-T.; ANDERSON, K. C. Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma. **Immunotherapy**, v. 7, n. 11, p. 1187–1199, nov. 2015.

TAO, Z. et al. Impact of T cell characteristics on CAR-T cell therapy in hematological malignancies. **Blood Cancer Journal**, v. 14, n. 1, 3 dez. 2024.

The Antibody Society. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in regulatory review. Disponível em: <<https://www.antibodysociety.org/antibody-therapeutics-product-data/>>. Acesso em: jul. 2024.

TILLER, T.; BUSSE, C. E.; WARDEMAN, H. Cloning and expression of murine Ig genes from single B cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 350, n. 1-2, p. 183–193, out. 2009.

Tratamento para câncer: Anvisa ratifica segurança da terapia CAR-T e autoriza sequência de estudo. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/ciencias/tratamento-para-cancer-anvisa-ratifica-seguranca-da-terapia-car-t-e-autoriza-sequencia-de-estudo/>>. Acesso em: jan. 2025.

VEILLETTE, A.; GUO, H. CS1, a SLAM family receptor involved in immune regulation, is a therapeutic target in multiple myeloma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 168–177, 1 jun. 2013.

VIDAL, T. J.; FIGUEIREDO, T. A.; PEPE, V. L. E. O mercado brasileiro de anticorpos monoclonais utilizados para o tratamento de câncer. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 12, 29 nov. 2018.

WALKER, B. A. et al. APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 23 abr. 2015.

WANG, C. et al. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: History, status and promise. **Heliyon**, v. 9, n. 11, p. e21776, 1 nov. 2023.

XU, S.; LAM, K.-P. . B-Cell Maturation Protein, Which Binds the Tumor Necrosis Factor Family Members BAFF and APRIL, Is Dispensable for Humoral Immune Responses. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 12, p. 4067–4074, 15 jun. 2001.

YAMAUCHI, S. et al. Cyclization of Single-Chain Fv Antibodies Markedly Suppressed Their Characteristic Aggregation Mediated by Inter-Chain VH-VL Interactions. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2620, 18 jul. 2019.

YOKOYAMA, W. M. Production of Monoclonal Antibodies. **Current Protocols in Cytometry**, v. 37, n. 1, 1 jul. 2006.

ZHONG, X.-S. et al. Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8⁺ T cell-mediated tumor eradication. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 18, n. 2, p. 413–20, 2010.