



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Desenvolvimento e caracterização de anticorpos
humanos com potencial neutralizante do vírus Zika**

Renato Kaylan Alves de Oliveira França

Brasília

2020

Renato Kaylan Alves de Oliveira França

**Desenvolvimento e caracterização de anticorpos
humanos com potencial neutralizante do vírus Zika**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para a obtenção do Título de Mestre em Biologia Molecular.

Brasília

2020

Renato Kaylan Alves de Oliveira França

**Desenvolvimento e caracterização de anticorpos
humanos com potencial neutralizante do vírus Zika**

Trabalho desenvolvido no laboratório de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido e da Profa. Dra. Andréa Queiroz Maranhão.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo de Macedo Brígido (Presidente da Banca)

Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Membro titular)

Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (Membro titular)

Dr. Napoleão Fonseca Valadares (Membro suplente)

“Isso de ser exatamente o que se é ainda vai nos levar além”

(Paulo Leminski)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, sempre ao meu lado, com sua proteção e bênção, dando-me força, felicidade e sabedoria para seguir meus sonhos e superar todas as dificuldades na minha caminhada.

À minha família, pelo apoio em minhas decisões e ao conforto nas horas de alegria e de tristeza. Mãe, você foi fundamental no meu trabalho, com seus conselhos, com sua preocupação, com seu suporte e ajuda, nos dias de muito trabalho, e de descanso também, e na luta com a minha enfermidade, a Artrite reumatóide. São incontáveis as vezes em que você me ajudou e socorreu, nos momentos de muita dor. É sempre confortante, ter em minha casa, o seu apoio, você é certeza alguém muito importante em minha vida. A minha vó Zezé que sempre rezou por mim e teve preocupação comigo. Ao meu tio Rodrigo, sempre buscando a me ajudar em minha formação e carreira, e torcendo por mim. Aos meus padrinhos e minha tia Angela pelo apoio. A realização desse trabalho não seria possível sem a minha família.

Ao professor Marcelo Brígido e à professora Andréa Maranhão, por conceder-me essa grande oportunidade de trabalho e de aprendizado. Vocês foram mais do que orientadores, foram amigos que me deram tanto conhecimento, e auxiliaram-me também na minha evolução como pessoa e profissional. Nunca esquecerei os dias em que vocês foram ao laboratório para ensinar-me a fazer experimentos. Foram muitos dias de conversa e de ensinamento na bancada comigo. Obrigado pela confiança, pela paciência, porque sei que sou agoniado, pela grande disponibilidade e preocupação, e pelo enorme aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Molecular, obrigado pelo apoio sempre. Jacy, minha grande amiga, obrigado por todos os momentos de ajuda, de conversa, de festas, de viagem e de trabalho sem fim. Foram tantos dias de ajuda em experimentos de dia e de noite, foram tantos conselhos e foram tantos momentos de comemoração e diversão. Agradeço muito por nossa amizade, realmente, você foi a pessoa que mais contribuiu para realização desse trabalho. Em cada experimento, em cada viagem ao Rio de Janeiro, em cada apresentação e em cada PCR do macaco, eu pude contar com sua verdadeira amizade. A Manuela, pela grande ajuda nos planejamentos e na escrita, pelas conversas e conselhos, pelos momentos de alegria e pela amizade sincera que levo para vida. Manu, você sempre desejou o meu sucesso, e sou muito grato a isso. Ao Luís, sempre disposto a me ajudar e sempre aberto para conversar. Luís, obrigado por sua enorme torcida, pelas melhores conversas e socorro nos dias de dor, que não conseguia nem andar, você é um verdadeiro e querido amigo. À Isabel,

pelo grande ensinamento, sempre que precisei, tirando a minhas dúvidas que não eram poucas, eu aprendi muito com você, que é uma inspiração para mim. Aos meus estagiários, Matheus e Ana Luísa, que me ajudaram tanto nos experimentos. Ao meu amigo Phil, pelos momentos de muita felicidade e descontração, sempre disposto a fazer o bem para o próximo. Aos meus outros amigos de Laboratório pela grande amizade: Amanda, Vitor, Mariana, Ana, Lucas, Maria José e Rafael. A Maria José do Laboratório de Bioinformática, pela ajuda nas análises de sequenciamento.

Aos diferentes professores e alunos que me ajudaram na condução dos experimentos. À professora Janice, pela grande disponibilidade, sempre solícita, e pela ajuda na purificação das proteínas. À professora Lucimeire, pela ajuda na realização dos experimentos de neutralização, disponibilizando seu laboratório, reagentes e orientação. Obrigado professora por me receber tão bem em Goiânia. A Cris que me ajudou muito nesses experimentos de neutralização, disponibilizando enorme tempo a mim. Ao professor Bergmann, por disponibilizar seu laboratório, orientação, reagentes e paciência. Ao Bruno, do laboratório de Virologia, pela ajuda com os vírus.

Aos membros da banca pela disponibilidade, interesse e participação nessa defesa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular da UnB, pelo apoio financeiro e tecnológico.

E a todos os outros que contribuíram direta ou indiretamente a para realização desse trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| ADE | <i>Antibody-dependent enhancement</i> |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato |
| BCR | Receptor da célula B |
| Da | Dalton |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| EMA | European Medicines Agency (Europa) |
| Fab | Fragmento de ligação ao antígeno |
| Fc | Fragmento cristalizável |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> (EUA) |
| FL | <i>Loop</i> de fusão |
| <i>g</i> | Força gravitacional |
| IFN | <i>Interferon</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo |
| LB | Meio de cultura Luria-Bertani |
| mAb | Anticorpo monoclonal |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| NBT | Nitro-azul-tetrazólio |
| D.O. | Densidade óptica |
| ori | Origem de replicação |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCR | Reação em cadeia de polimerização |
| PEG | Polietilenoglicol |

| | |
|----------|--|
| pb | Par de base |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Rotação por minuto |
| SB | Meio de cultura <i>Super Broth</i> |
| scFv | Fragmento variável de cadeia única |
| SDS | Sódio Duodecil Sulfato |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| TB | Meio de cultura <i>Terrific Broth</i> |
| TBS | Salina tamponada com Tris |
| Th | Linfócito T <i>helper</i> |
| U | Unidade enzimática |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Representação esquemática da estrutura do vírus Zika. | 3 |
| Figura 2. Representação esquemática do ciclo viral do virus Zika. | 7 |
| Figura 3. Esquema da estrutura de um anticorpo e de seus fragmentos..... | 11 |
| Figura 4. Genes dos domínios proteicos das imunoglobulinas | 14 |
| Figura 5. Ciclo viral dos fagos filamentosos..... | 35 |
| Figura 6. Esquema das etapas metodológicas | 43 |
| Figura 7. Cassete de expressão de Fab no vetor de Phage Display | 45 |
| Figura 8. Mapa do Vetor pGEM-T..... | 51 |
| Figura 9. Peptídeos correspondentes ao <i>loop</i> de fusão..... | 60 |
| Figura 10. Representação do <i>loop</i> de fusão no envelope viral..... | 61 |
| Figura 11. Esquema da seleção de <i>Phage Display</i> | 62 |
| Figura 12. Amplificação de VH e VL | 64 |
| Figura 13. Análise de restrição dos clones recombinantes..... | 65 |
| Figura 14. Famílias gênicas dos VH mais enriquecidos | 69 |
| Figura 15. Famílias gênicas dos VL mais enriquecidos | 69 |
| Figura 16. Análise de mutações dos anticorpos mais enriquecidos | 70 |
| Figura 17. Sequência codificadora dos anticorpos recombinantes..... | 71 |
| Figura 18. Vetor de expressão dos anticorpos recombinantes | 72 |
| Figura 19. Análise da clonagem no vetor de expressão | 73 |
| Figura 20. Análise das combinações de VH e VL..... | 74 |
| Figura 21. Análise da produção em <i>Shuffle pLys Y</i> | 75 |
| Figura 22. Análise da produção em <i>BL21 pLys S</i> | 76 |
| Figura 23. SDS-PAGE da Purificação dos scFv AZ6m e AZ3m..... | 77 |
| Figura 24. Western-blot da Purificação dos scFv AZ6m e AZ3m..... | 79 |
| Figura 26. Western-blot da Purificação do scFv AZ1p..... | 79 |
| Figura 27. Ligação dos anticorpos ao <i>loop</i> de fusão viral..... | 81 |
| Figura 28. Ligação dos anticorpos ao vírus Zika | 82 |
| Figura 29. Ensaio de neutralização da infecção por vírus Zika..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados..... | 21 |
| Tabela 2. Titulação dos fagos | 63 |
| Tabela 3. Análise de diversidade das populações de anticorpos | 66 |
| Tabela 4. Estatística geral do sequenciamento <i>Illumina</i> | 67 |
| Tabela 5. Enriquecimento dos anticorpos pela análise da cadeia pesada..... | 68 |
| Tabela 6. Enriquecimento dos anticorpos pela análise da cadeia leve | 68 |
| Tabela 7. Combinação de VH e VL para construção dos scFv | 71 |
| Tabela 8. Avaliação do rendimento da produção e purificação dos anticorpos | 80 |
| Tabela 9. Análise da ligação ao vírus Zika..... | 83 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| SUMÁRIO..... | XI |
| RESUMO | XIV |
| ABSTRACT | XV |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 Vírus zika | 1 |
| 1.1.1 A infecção por vírus Zika..... | 1 |
| 1.1.2 Estrutura e relação filogenética..... | 2 |
| 1.1.3 Ciclo viral..... | 5 |
| 1.1.4 Resposta imune de anticorpos..... | 7 |
| 1.2 Anticorpos..... | 11 |
| 1.2.1 Estrutura de imunoglobulinas e ontogenia de células B | 11 |
| 1.2.2 Anticorpos terapêuticos..... | 19 |
| 1.2.3 Engenharia de anticorpos | 26 |
| 1.2.4 Sistemas de expressão de anticorpos | 28 |
| 1.2.5 Expressão de anticorpos em bactérias..... | 29 |
| 1.2.6 Anticorpos neutralizantes ao vírus Zika..... | 31 |
| 1.3 <i>Phage Display</i> : apresentação de anticorpos em fagos..... | 34 |
| 1.3.1 Bibliotecas de anticorpos e seleção..... | 34 |
| 1.3.2 Etapas pós seleção..... | 37 |
| 2. Justificativa..... | 40 |
| 3. Objetivos..... | 42 |
| 3.1 Objetivo geral | 42 |
| 3.2 Objetivos específicos | 42 |
| 4. Delineamento experimental..... | 43 |
| 5. Materiais e Métodos | 44 |
| 5.1 Linhagens celulares e virais | 44 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.2 | Preparo de células eletrocompetentes | 44 |
| 5.3 | Transformação e amplificação da biblioteca | 45 |
| 5.4 | Seleção de fagos..... | 46 |
| 5.5 | Titulação de fagos | 47 |
| 5.6 | Extração de DNA plasmidial | 48 |
| 5.6.1 | Minipreparação | 48 |
| 5.6.2 | Midipreparação | 48 |
| 5.7 | Amplificação dos domínios variáveis..... | 49 |
| 5.8 | Eletroforese em gel de agarose | 49 |
| 5.9 | Eluição e purificação de fragmentos de DNA | 50 |
| 5.10 | Clonagem ao vetor pGEM-T..... | 50 |
| 5.11 | Transformação por choque elétrico..... | 51 |
| 5.12 | Digestão com enzima de restrição..... | 52 |
| 5.13 | Sequenciamento Sanger | 52 |
| 5.14 | Sequenciamento Illumina..... | 52 |
| 5.15 | Análise do sequenciamento Illumina | 52 |
| 5.15.1 | Avaliação da diversidade gênica..... | 53 |
| 5.15.2 | Avaliação das mutações das sequências | 53 |
| 5.16 | Desenho de genes | 53 |
| 5.17 | Análise das combinações dos domínios variáveis..... | 54 |
| 5.18 | Transformação e seleção de clones produtores | 54 |
| 5.19 | Expressão heteróloga de anticorpos recombinantes..... | 55 |
| 5.20 | Extração dos anticorpos recombinantes | 55 |
| 5.21 | Purificação dos anticorpos recombinantes | 55 |
| 5.22 | Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 56 |
| 5.23 | Western-blot: imunodeteção de proteínas | 56 |
| 5.24 | Limpeza e quantificação dos anticorpos recombinantes | 57 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.25 | Avaliação da pureza | 57 |
| 5.26 | Ensaio de imunoabsorção enzimática..... | 57 |
| 5.26.1 | Ensaio de ligação ao peptídeo viral..... | 57 |
| 5.26.2 | Ensaio de ligação ao vírus..... | 58 |
| 5.27 | Ensaio de neutralização..... | 58 |
| 6. | Resultados..... | 60 |
| 6.1 | Desenho do antígeno..... | 60 |
| 6.2 | Seleção dos anticorpos por <i>Phage Display</i> | 61 |
| 6.3 | Análise monoclonal da seleção..... | 63 |
| 6.4 | Análise policlonal da seleção..... | 66 |
| 6.5 | Desenho de genes..... | 70 |
| 6.6 | Análise da presença das combinações VH e VL | 73 |
| 6.7 | Expressão e purificação dos anticorpos recombinantes..... | 74 |
| 6.8 | Ligação dos anticorpos ao antígeno viral..... | 81 |
| 6.9 | Atividade neutralizante dos anticorpos..... | 83 |
| 7. | Discussão..... | 85 |
| 8. | Conclusão e perspectivas..... | 94 |
| 9. | Referências | 96 |
| 10. | Anexo..... | 107 |

RESUMO

A infecção pelo vírus Zika está associada a complicações neurológicas e a anomalias congênitas e é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo, que ainda não possui abordagens profiláticas e terapêuticas eficazes estabelecidas. Entre as estratégias de tratamento, o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais humanos engenheirados se ressaltou por sua alta afinidade, maior especificidade, segurança farmacológica e sua maior capacidade protetora. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de anticorpos específicos para o *loop* de fusão do domínio II do envelope viral, região que exerce função na liberação do RNA viral no citoplasma, durante a infecção, e é altamente conservado entre os Flavivírus. Para isso, desenvolvemos anticorpos humanos específicos, utilizando a tecnologia de *Phage Display*. A seleção foi realizada em 4 ciclos de seleção contra o *loop* de fusão do vírus, usando duas estratégias de eluição dos fagos específicos: com pH ácido, e com o antígeno viral, livre e em excesso, competindo pela ligação ao anticorpo. A análise do progresso de seleção revelou que houve enriquecimento de anticorpos específicos ao antígeno viral. Os anticorpos que poderiam apresentar maior afinidade foram engenheirados no formato de scFv (Fragmento variável de cadeia única), e três deles foram produzidos em altos níveis, em sistema heterólogo de células bacterianas, e purificados, por cromatografia de afinidade em coluna de Níquel. Foi demonstrado que os anticorpos recombinantes selecionados e produzidos apresentaram capacidade de ligação ao antígeno viral, na sua forma isolada e na sua conformação nativa na partícula do vírus Zika. Também foi mostrado que os anticorpos foram capazes de neutralizar a infecção por vírus Zika *in vitro*. Esses dados evidenciam o potencial neutralizante dos anticorpos humanos desenvolvidos nessa pesquisa e revelam a relevância deles no desenvolvimento de metodologias eficientes e seguras de tratamento de infecções por vírus Zika e de outros Flavivírus.

Palavras-chave: Vírus Zika. Anticorpos. Neutralização. *Phage Display*.

ABSTRACT

Infection with the Zika virus is associated with neurological complications and congenital abnormalities and it is considered a public health problem worldwide that does not have prophylactic and therapeutic approaches applied yet. Among the treatment strategies, the development of new engineered human monoclonal antibodies, which stand out for their high affinity, greater specificity, pharmacological safety and their high protective capabilities. The aim of this work is to develop a single chain variable fragment of antibody specific to the fusion *loop* of the viral envelope domain II, region that plays a role in the release of viral RNA in the cytoplasm, during infection, and it is highly conserved among Flaviviruses, in order to neutralize the Zika virus infection. We achieve that using Phage-Display technology, with a human antibody gene library. The selection was carried out in 4 selection cycles against immobilized synthetic peptides, using two elution strategies: one, with acidic pH, and the other, with excess mimetic peptides, competing for binding to the antibody. Deep sequencing of selected VH and VL domains revealed there was an enrichment of specific antibodies to the viral antigen. The VH and VL sequences mostly enriched at the fourth cycle was selected for designing seven different scFv (single chain variable fragment) molecules. Three of them were overproduced, in heterologous system of bacterial cells, and purified by Nickel column affinity chromatography. We demonstrated that selected and produced recombinant antibodies showed ability to bind to viral antigen, in its isolated form and in its native conformation in the whole Zika virus particle. It was also shown the antibodies were able to neutralize Zika virus infection *in vitro*. These data evidenced the potential neutralizing activity of the recombinant human antibodies developed in this research, and revealed their relevance on the development of efficient and safe methods of treating infections by Zika virus and other Flaviviruses.

Keywords: Zika virus. Human Antibodies. Neutralization. *Phage Display*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS ZIKA

1.1.1 A infecção por vírus Zika

O Vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae*, a qual inclui também o vírus da Febre amarela (YFV), o vírus da Dengue (DENV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da Encefalite japonesa (JEV). O vírus Zika possui como genoma uma molécula de RNA de cadeia simples de polaridade positiva e é transmitido por mosquitos competentes do gênero *Aedes*, semelhante a outros *Flavivirus* (Elgner *et al.*, 2018), e por outras formas de transmissão já bem documentadas, como a transmissão perinatal e sexual. O Vírus Zika foi primeiro isolado em 1947, de um primata não-humano, o macaco *Rhesus*, na Floresta Zika em Uganda. Os primeiros casos de infecção em humanos foram detectados em 1954 na Nigéria, e até o ano de 2007 haviam sido relatados apenas 14 casos de infecção humana, restritos à África e ao Sudeste asiático. Nesse mesmo ano, houve uma epidemia em Yap na Micronésia, em que aproximadamente três quartos da população foram infectados, entretanto a maioria não desenvolveu sintomas (Javed, *et al.*, 2017; Shankar *et al.*, 2017; Ferraris *et al.*, 2019).

O primeiro caso de transmissão sexual foi reportado, em 2008, nos Estados Unidos (Basile *et al.*, 2017), e a evidência dessa forma de transmissão é reforçada pela detecção do vírus Zika no sêmen até 6 meses depois do aparecimento dos sintomas, mesmo na ausência de viremia (Sharma *et al.*, 2020). Em 2013, houve um novo surto, na Polinésia Francesa, no qual é estimado que 11% da população contraiu a doença, com alguns casos de sintomas severos. Não se sabe exatamente como e quando o vírus avançou para a América do Sul. Os primeiros casos de transmissão autóctone no Chile, ocorreram em 2014, e no nordeste do Brasil, em 2015. No Brasil, é estimado que 1,3 milhão de pessoas foram infectadas até o final de 2015, sendo a maior epidemia de vírus Zika já registrada, com alto índice de casos de microcefalia (Culshaw *et al.*, 2018). Nesse mesmo ano e no ano de 2016, foi identificada transmissão local, incluindo sexual e vertical, nos Estados Unidos e em 45 outros países do continente americano; e, mais tarde, foram reportados casos de infecção importados na Europa, além de recorrência da doença em países da África e da Ásia (Song *et al.*, 2018).

A infecção por vírus Zika é, na maioria dos casos, assintomática e os principais sintomas apresentados, após um período de incubação de 3 a 10 dias, são febre, dor de cabeça, conjuntivite, exantema, mialgia e artralgia, a qual pode persistir no paciente mesmo após a diminuição da viremia. Entretanto há evidências de que a infecção está relacionada com complicações neurológicas, tal como a Síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite e má-formações congênitas, como microcefalia, principalmente pela capacidade do vírus de infectar células neuronais progenitoras (Stettler *et al.*, 2016; Pierson & Diamond, 2018). Tem sido cada vez mais investigada a denominada Síndrome Congênita do vírus Zika (CZS), na qual o Sistema Muscular esquelético e o Sistema Nervoso Periférico de fetos são afetados além do Encéfalo. A associação com microcefalia foi primeiro suspeitada durante o surto no Pernambuco, Brasil, durante o qual, estudos mostraram que 97% dos neonatos com microcefalia apresentaram IgM específicos ao vírus Zika e títulos de RNA viral. (Hughes *et al.*, 2016; Miranda-Filho *et al.*, 2016; Basile *et al.*, 2017).

Estudos controlados com pacientes que apresentaram Síndrome de Guillain-Barré, durante o surto de infecção na Polinésia Francesa, mostraram evidências circunstanciais da ligação entre a infecção por vírus Zika e essa doença neurológica, com 98% dos pacientes apresentando IgM e/ou IgG ZIKV-específicos (Basile *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018). RNA viral já foi identificado no fluído amniótico, urina, sêmen, leite materno, e outros fluidos corporais além do soro, mas ainda não está claro se todos eles podem contribuir para a transmissão do vírus. A infecção por vírus Zika foi considerada em 2016 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema de saúde pública mundial que não possui uma vacina aprovada e terapias específicas (Wu *et al.*, 2017; Pierson & Diamond, 2018). Assim, tornou-se necessário o desenvolvimento de medidas eficientes de profilaxia, tratamento e orientação para controlar a doença e garantir a saúde pública.

1.1.2 Estrutura e relação filogenética

A estrutura do vírus Zika tem sido determinada e estudada, principalmente, por meio da combinação de microscopia crioeletrônica com dados experimentais de difração de raios-x usando cristalografia das proteínas virais na presença ou não de moléculas de anticorpos. Resultados dessa combinação mostraram que o vírus Zika é uma partícula de diâmetro de 500 Å composta de um núcleo denso icosaédrico e uma bicamada lipídica envolvendo-o. O genoma compreende-se de uma sequência de ~10,800 nucleotídios de RNA que codifica uma poliproteína (3423 aminoácidos) que é clivada em 3 proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), proteína pré-membrana (prM) e proteína do envelope (E) com 122, 178 e 500 aminoácidos

respectivamente; e de sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (**Figura 1**) (Liu *et al.*, 2019). A proteína NS3 apresenta função no processamento da poliproteína e atividade de helicase e de NTPase. NS1 exerce papel na replicação viral e na ativação da imunidade inata, e, frequentemente, se mostra como antígeno solúvel, secretado na corrente sanguínea, interagindo com componentes do sistema imune. NS5 é a maior e mais conservada proteína não estrutural e atua no processo de transcrição do RNA. As demais proteínas não estruturais estão envolvidas na montagem do vírus e na inibição da resposta imune antiviral (Sirohi *et al.*, 2016; Zeidler *et al.*, 2017; Zonetti *et al.*, 2018).

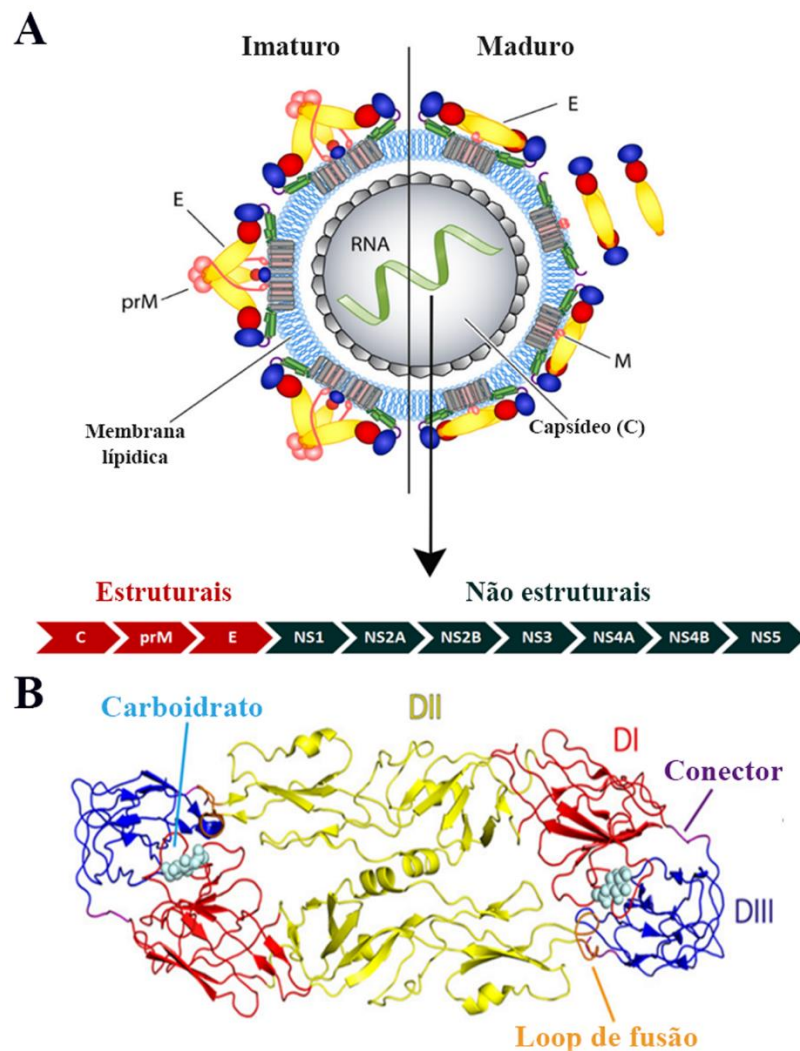


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do vírus Zika. (A) Partícula do vírus Zika, mostrando o genoma viral (molécula de ssRNA), capsídeo e envelope (proteínas E e M, membrana lipídica e carboidratos). Em vermelho, domínio I; em amarelo, domínio II; e em azul, domínio III da glicoproteína E. O vírus possui 180 moléculas da proteína E, organizada em 90 dímeros. (B) Esquema da glicoproteína E, destacando os seus domínios proteicos e o *loop* de fusão, situado no DII. Adaptado de Heinz & Stiasny, 2017.

O capsídeo icosaédrico é pequeno e pouco organizado, e fornece espaço suficiente para o genoma, a ele associado, e é envolvido pelo envelope, de modo que há poucas ligações entre essas estruturas, diferente do que ocorre em outros vírus. O envelope viral é constituído por duas camadas internas e concêntricas de fosfolipídeos e por uma concha proteica externa formada por ectodomínios da proteína Membranar (M) (proteína membranar em partículas maduras e pré-membrana em imaturas) e regiões da glicoproteína E (180 cópias) organizada em 90 dímeros, os quais apresentam determinantes proteicos para a ligação do vírus à célula hospedeira e para respostas imunes humorais. Por isso, a glicoproteína E é considerada o principal componente antigênico, bastante explorado no desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. A proteína E contém folhas β antiparalelas e interligadas por pequenos e longos *loops* as quais formam três domínios: Domínio I, que representa a porção amino-terminal e influencia o tropismo viral; Domínio II, que compreende a região de dimerização e o *loop* de fusão, e Domínio III com função de ligação a receptores celulares, na etapa inicial de infecção viral (Sirohi *et al.*, 2016; Heinz & Stiasny, 2017; Rathore & St John, 2020).

O *loop* de fusão, com 14 resíduos de aminoácidos, é uma região altamente conservada entre os Flavivirus, responsável pela fase tardia de infecção, na qual o vírus interage com a membrana endossomal, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Quando a partícula viral está em um ambiente de pH neutro, a proteína E se organiza em homodímeros arrajados paralelamente à superfície viral, de modo que o peptídeo de fusão não é acessível, inteiramente, ao meio externo. Entretanto quando a partícula se encontra na vesícula endossomal tardia, em que o microambiente apresenta um pH ácido, ocorre uma reorganização estrutural do envelope viral; o domínio II é deslocado e o *loop* de fusão é exposto e inserido na membrana lisossomal. Após a formação do contato do *loop* de fusão, a proteína E passa a se organizar em trímeros, resultando na expansão da partícula viral, e em seguida, o domínio III rotaciona para criar contatos adicionais dos trímeros, aproximando as membranas viral e lisossomal e formando o poro lipídico de fusão que permite a liberação do genoma viral para o citoplasma. Apesar de toda essa modificação na estrutura do vírus, o peptídeo de fusão aparentemente possui conformações semelhantes no pH neutro e no pH ácido, mas seu posicionamento no envelope é alterado (Modis *et al.*, 2004; Stiasny & Heinz, 2006; Zonetti *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a estrutura do vírus Zika não é estática, e sofre um fenômeno de “respiração viral” que expõe, de forma transiente, antígenos importantes para os mecanismos de entrada do vírus na célula e para o reconhecimento por anticorpos protetivos e anticorpos

não neutralizantes. Esse fenômeno ocorre devido à dinamicidade das proteínas virais, que apresentam uma flexibilidade conformacional, importante para os processos do ciclo viral. (Sirohi *et al.*, 2017).

Análises filogenéticas revelaram três principais linhagens do vírus Zika: africana ocidental (incluindo o primeiro vírus isolado em Uganda), africana oriental e asiática. A linhagem asiática parece ter evoluído da linhagem africana oriental e depois migrou para as Américas. A diferença na sequência da proteína E entre essas linhagens é baixa, aproximadamente 6%. Apesar da baixa variabilidade entre as linhagens, são reportados casos de mutação do vírus Zika sob pressão da passagem *in vitro* e ação de anticorpos neutralizantes em ensaios de neutralização por redução de placa (PRNT) e em ensaios com camundongos *IFNAR*^{-/-} e primatas não humanos (Heinz & Stiasny, 2017).

A similaridade antigênica entre Flavivirus é um atributo que emergiu da similaridade gênica entre eles. Na análise filogenética dos Flavivirus, o vírus Zika é mais próximo dos sorotipos de Dengue, entre todos os outros Flavivirus, apresentando aproximadamente 55% de identidade. O vírus Zika, ainda, apresenta 50% e 40% de identidade com os vírus do Nilo ocidental e vírus da Febre amarela, respectivamente. Epítomos que só se formam quando a proteína E está na conformação de dímeros são caracterizados como trechos da superfície viral que são conservados entre o vírus Zika e os 4 sorotipos de Dengue, e podem conduzir a uma reação cruzada de anticorpos (Heinz & Stiasny, 2017; Liu *et al.*, 2019). Análise dos resíduos de aminoácidos conservados na sequência da proteína do Capsídeo revelou que essa região também é um indicador de similaridade filogenética do gênero *Flavivirus* (Faustino *et al.*, 2019). A sequência hidrofóbica do *loop* de fusão parece ser o único epítomo que é conservado entre todos os Flavivirus, entretanto o grau de exposição dessa região varia substancialmente entre os vírus (Modis *et al.*, 2004; Dai *et al.*, 2016). As proteínas não estruturais, NS1 e NS5, apresentam também epítomos conservados entre alguns integrantes desse gênero. Essas relações de similaridade antigênica geram respostas imunes que se configuram como reações cruzadas com características protetivas ou patológicas (Poonsiri *et al.*, 2018; Batista *et al.*, 2020).

1.1.3 Ciclo viral

Uma variedade de células permissíveis ao vírus zika tem sido identificada. Essa variedade inclui células do sistema nervoso central e periférico, como células progenitoras neurais, microglia e astrócitos; células do nervo óptico e da retina, células renais, células mieloides do sistema imune, trofoblastos e outras células da placenta, fibroblastos e queratinócitos da pele, células dos testículos como célula de Leydig, células do sistema

reprodutor feminino; e outros tipos celulares. Esse tropismo diversificado é devido a uma diversidade de receptores com os quais as diferentes linhagens de vírus Zika interagem e a uma variabilidade de “paisagens” de glicanos associados ao envelope (Sirohi *et al.*, 2017). Em cada um dos tipos celulares, fatores dos tecidos hospedeiros parece influenciar o processo de replicação do vírus e a patogenicidade da infecção (Song *et al.*, 2017).

A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre pela endocitose mediada por receptores que interagem com o domínio III da proteína E e/ou lipídeos associados a ele. Diferentes receptores, como Axl, Mer, Tyro3, DC-SIGN e TIM1, de diferentes tipos celulares, podem estar envolvidos nessa interação. Após a endocitose, a acidificação do pH da vesícula endocítica conduz a transição de uma organização do envelope em dímeros para trímeros estáveis levando, posteriormente, a rearranjos da proteína E, deslocamento do domínio III e exposição do *loop* de fusão, que fornecem energia para a fusão das membranas viral e endossomal, mediada pela inserção do *loop* de fusão na bicamada lipídica da membrana endossomal, e para a liberação do genoma no citoplasma. O complexo de replicação é formado pelas proteínas virais NS3 e NS5 juntamente com proteínas da célula hospedeira. A molécula de RNA, recém-sintetizada, serve como molde para a síntese das proteínas virais que se inicia no citoplasma e continua nas membranas do retículo endossomal (co-tradução). No lúmen do retículo endossomal (RE) com um pH neutro, a molécula de RNA combina-se com a proteína do capsídeo para formar o nucleocapsídeo (**Figura 2**), o qual caminha para a montagem da partícula viral (Sager *et al.* 2018; Saiz *et al.*, 2018; Baz & Boivin, 2019).

No RE, ocorrem processamento das proteínas virais e a montagem das partículas imaturas, com heterodímeros de prM e E, as quais transitam, posteriormente, ao Complexo de Golgi. Na rede trans-Golgi, onde há um pH ligeiramente ácido, glicanos são adicionados às proteínas virais, e ocorre uma reorganização das proteínas do envelope e a clivagem da proteína prM em M, pela ação de proteases-como-furina. A partir de então as partículas são maduras, com capacidade infectante, que saem da célula por meio da via de exocitose (**Figura 2**). Entretanto falhas nesse processo pode levar a produção de partículas subvirais, parcialmente maduras, que têm implicações biológicas, incluindo a neutralização por anticorpos e a patogênese da doença (Heinz & Stiasny, 2017).

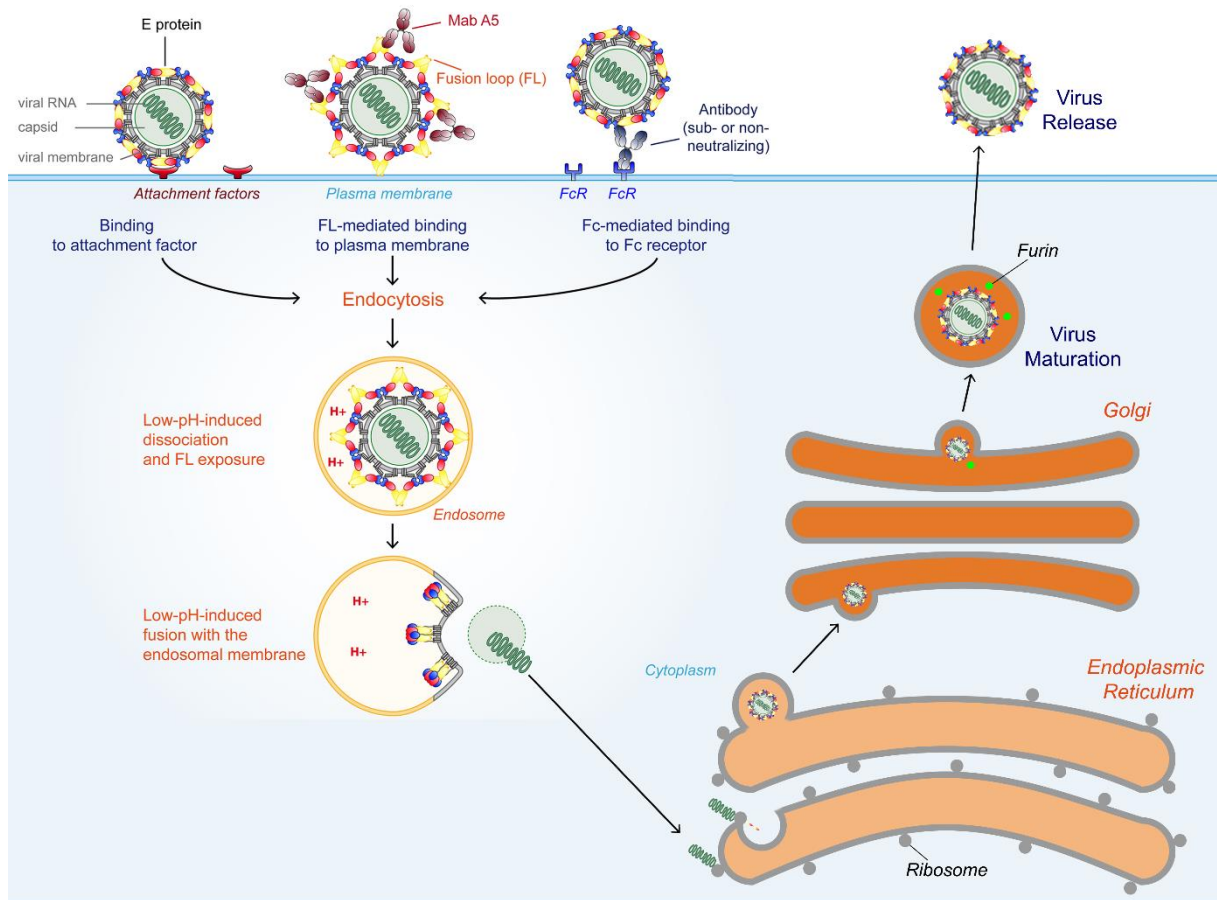


Figura 2. Representação esquemática do ciclo viral do vírus Zika. São destacadas três formas diferentes de entrada do vírus na célula hospedeira. Uma entrada comum, pela interação do domínio III da proteína E com receptores específicos (*attachment factors*) e duas formas de entrada alternativa mediadas por anticorpos, que contribuem para a reação de ADE. Todas as três resultam na endocitose da partícula viral. Na vesícula endocítica, o pH ácido induz modificações no envelope viral que resultam na fusão das membranas endossomal e viral, por meio do *loop* de fusão, e na liberação do genoma viral no citoplasma. A molécula de RNA serve como molde para a síntese das proteínas do vírus que seguem para a montagem da partícula. Modificações no vírus imaturo, desencadeadas por mudanças no pH e enzimas, como furina, conduzem a transição para uma forma viral madura que é liberada da célula por exocitose. Ao longo de todo o ciclo viral, as proteínas do vírus Zika ficam expostas a microambientes com diferentes pH, os quais exercem papel fundamental nas etapas do processo do ciclo viral. Para simplificar o esquema, a proteína membrana não foi representada. Adaptado de Haslwanter *et al.*, 2017.

1.1.4 Resposta imune de anticorpos

A proteína E, a proteína prM e a proteína não estrutural NS1, que é secretada, são os principais alvos de anticorpos específicos ao vírus Zika. Entretanto, a grande maioria dos anticorpos anti-prM e anti-NS1 não são neutralizantes, e podem contribuir para patogenicidade da infecção (Culshaw *et al.*, 2018).

A infecção com um flavivírus desencadeia a produção de anticorpos policlonais espécie-específicos e de reação cruzada. Anticorpos ligantes a diferentes flavivírus são capazes de

promoverem tanto a neutralização da infecção, quanto de aumentar a captura de vírus pelas células por rotas difentes do processo natural de infecção celular, como a captura de vírus ligados a anticorpos, em alguns tipos celulares, por meio do reconhecimento da porção Fc dos anticorpos pelo receptor de Fc (FcR) e a posterior endocitose dos imunocomplexos (anticorpos-vírus) (**Figura 2**), levando a uma produção de vírus fortemente amplificada. Essa criação de rotas alternativas de entrada da partícula viral a células pelos anticorpos subneutralizantes, durante infecções secundárias de Flavivirus, resulta no aumento dos níveis de replicação viral e da patogenicidade da infecção, que constituem um fenômeno denominado de reação de estimulação dependente de anticorpo, ADE (do inglês, *Antibody-dependent enhancement*) que tem dificultado o desenvolvimento de vacinas eficazes (Stettler *et al.*, 2016; Haslwanter *et al.*, 2017). A reação de ADE tem sido associada a quadros clínicos mais graves em infecções secundárias de alguns flavivírus e a infecções congênitas por vírus Zika (Heinz & Stiasny, 2017).

Diferentes estudos têm sido conduzidos para compreender os efeitos de anticorpos, provenientes de células B de memória, de reação cruzada em exposições subsequentes a Flavivírus. Muitos deles reportaram que a opsonização do vírus com anticorpos fracamente neutralizantes leva ao aumento da produção viral e de mediadores pró-inflamatórios e à supressão da resposta imune antiviral, agravando o quadro clínico da doença (Wen *et al.*, 2019; Rathore & St John, 2020). ADE em infecções por vírus Zika e outros Flavivirus, já foi reportada tanto em experimentos *in vitro* de infecção de células que expressam receptores de Fc, quanto em experimentos com humanos, de vacinação com flavivírus (Chan *et al.*, 2016; Katzelnick *et al.*, 2017), e com camundongos suscetíveis a doença (Bardina *et al.*, 2017; Rathore *et al.*, 2019), nos quais foi mostrado que anticorpos específicos para YFV, DENV e WNV são capazes de amplificar a infecção por ZIKV, levando a manifestações mais graves da doença. Pelos resultados desses experimentos, ADE é apontada como uma das principais causas de formas severas de infecção de Dengue e da baixa proteção induzida por vacinas dirigidas aos sorotipos de Dengue; e aumenta a importância do desenvolvimento de terapias eficazes, especialmente em regiões com histórico de surtos de infecções por outros Flavivirus (Dejnirattisai *et al.*, 2016).

A reação de ADE pode implicar em formas severas de Dengue, como síndrome de choque-Dengue e Dengue hemorrágica, e pode facilitar o desenvolvimento de complicações associadas à infecção por vírus Zika, como microcefalia; principalmente por permitir a entrada do vírus em células que normalmente não são permissíveis, tanto por meio de anticorpos específicos para a proteína E, quanto para outras regiões, como a proteína M, a qual é apontada

como potente antígeno de reação de exarcebação da doença (Heinz & Stiasny, 2017; Martín-Acebis, 2018; Rathore *et al.*, 2019). A preocupação pela reação cruzada não protetiva tem crescido, em áreas endêmicas de infecções por Flavivirus, devido à medição da existência de anticorpos não neutralizantes decorrentes de imunização natural (transferência de anticorpos maternos e eventos anteriores de infecção por Flavivirus). Tem sido apontado também que receptores de Fc neonatais podem contribuir para a transcitose de imunocomplexos pela barreira placentária (Heinz & Stiasny, 2017). Desse modo, a reação de ADE vai muito além do aumento da captura celular de partículas virais. Sinalização mediada por Fc γ R pode suprimir respostas celulares de imunidade inata antiviral, reduzindo a expressão de moléculas de defesa celular, como oxido nítrico, e de citocinas inflamatórias, como interferon; e aumentando a expressão e secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Martín-Acebes, *et al.* 2018).

Novas formas de reação de ADE independente de receptores de Fc têm sido apontadas. A ligação de anticorpos não neutralizantes ao vírus Zika pode induzir modificações na estrutura da partícula viral, como a dissociação dos dímeros da proteína E, expondo o *loop* de fusão de forma precoce que permite a interação do vírus diretamente com a membrana celular, que contribui para o processo de endocitose da partícula (**Figura 2**). Diferentes testes mostraram que a ligação de anticorpos monoclonais, como o mAb A5 específico ao domínio II, é capaz de alterar a conformação dos DII e DIII, resultando na exposição do *loop* de fusão e posterior endocitose alternativa (Haslwanter *et al.*, 2017).

Ao mesmo tempo, vários estudos mostram neutralização cruzada do vírus Zika pela resposta humoral policlonal de pacientes com exposições prévias a Flavivirus ou por anticorpos monoclonais derivados do repertório imune deles. A neutralização cruzada resultou na inibição potente da infecção e na indução rápida de respostas imunes, como maturação de afinidade, contra Flavivirus heterólogos (Heinz & Stiasny, 2017; Malafa *et al.*, 2020). Robbiani, e colaboradores, mostraram um perfil de proteção à infecção por vírus Zika, em pacientes que haviam um histórico prévio de infecção por DENV1, por anticorpos capazes de ligar a ambos os vírus (Robbiani *et al.*, 2017). Foi demonstrado também que a presença de um anticorpo neutralizante potente é capaz de abolir a amplificação da doença, como mostrado que a reação de ADE gerada por soro/plasma policlonal e anticorpos monoclonais pouco neutralizantes foi completamente bloqueada por um anticorpo monoclonal altamente neutralizante, específico para o domínio III (Sttetter *et al.*, 2016) ou pela presença de anticorpos IgM protetivos (Malafa *et al.*, 2020). Essas descobertas levantam a importância dos anticorpos terapêuticos em pessoas com histórico de vacinação ou infecções heterólogas de Flavivirus e de estudos futuros para a

compreensão mais ampla do papel da resposta imune mediada por anticorpos a diferentes Flavivirus.

A neutralização do vírus por anticorpos envolve inibições do ciclo viral, como o bloqueio da ligação viral aos receptores membranares, a inibição da internalização, a interferência nos processos de mudança conformacional necessários para a fusão membranar ou para a montagem da partícula, o impedimento da saída do vírus da célula hospedeira e a inativação de moléculas de virulência. Outros mecanismos de neutralização da infecção são devidos à função efetora dependente da porção Fc, como a depuração de RNA, proteínas e partículas virais por interação com o sistema complemento ou com fagócitos (fagocitose dependente de anticorpo); a destruição de células infectadas por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) e por complemento (citotoxicidade dependente do complemento, CDC); e a ativação de vias de liberação de moléculas pró-inflamatórias e antivirais. Além disso, o reconhecimento de imunocomplexos por células do sistema imune, como células dendríticas e macrófagos, pode induzir fortes respostas imunes celulares e humorais antivirais (Pierson *et al.*, 2008; Pelegrin *et al.*, 2015; Murin *et al.*, 2019; Krammer, 2019).

A demonstração do potencial de neutralização de diferentes anticorpos monoclonais impulsiona a ideia de terapias de imunização passiva, que têm um importante histórico na terapia de infecções virais. Vários estudos apontaram que imunoterapia passiva é capaz de tratar e prevenir, eficientemente, infecções sintomáticas de vírus Zika. O potencial da imunidade de reação cruzada de desencadear proteção ou patologia depende do perfil, da qualidade e da magnitude das respostas imunes induzidas pelos anticorpos. A reação de ADE é um fator que deve ser considerado no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos e de vacinas para infecções por Flavivirus, devido à possibilidade do aumento da produção viral e da redução da resposta antiviral. Diferentes abordagens têm sido testadas para desviar o perfil de ADE para um perfil de proteção cruzada em infecções heterogênicas desses vírus, pelo qual seriam possíveis o bloqueio da replicação viral e a diminuição da carga viral (Yang *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2020).

1.2 ANTICORPOS

1.2.1 Estrutura de imunoglobulinas e ontogenia de células B

Imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos, são elementos importantes na resposta imune humoral de vertebrados. Elas são glicoproteínas que atuam pela ligação a moléculas, marcando-as, inibindo-as (McConnell, 2019) e recrutando células e outras moléculas do sistema imune (Krammer, 2019). Os anticorpos são expressos na superfície da membrana celular de células B, ou linfócitos B, ou são secretados por elas. A estrutura típica de uma imunoglobulina do tipo G, a mais comum, é estável, mas flexível, e é uma molécula oligomérica composta de duas cadeias polipeptídicas pesadas e de duas cadeias leves ligadas entre si por interações não covalentes e ligações dissulfetos (**Figura 3**) (Chiu *et al.*, 2019).

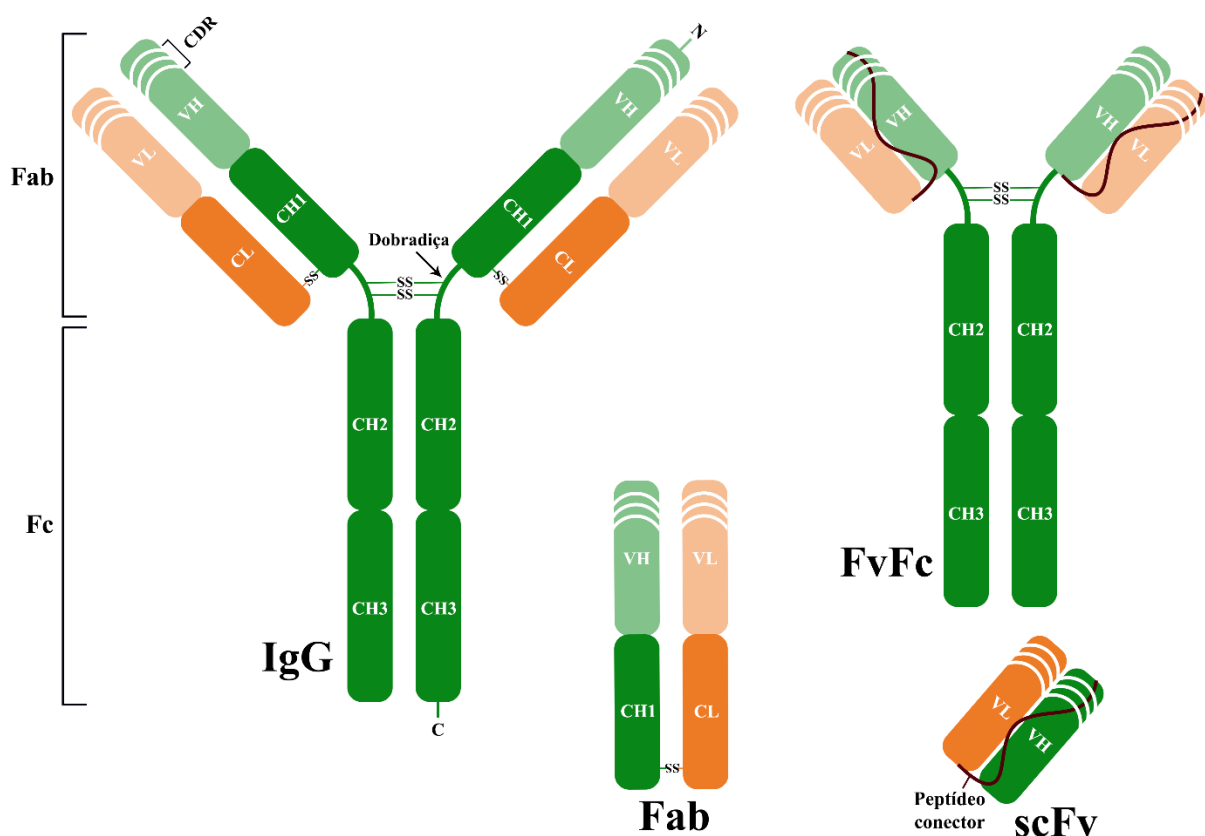


Figura 3. Esquema da estrutura de um anticorpo e de seus fragmentos. Estrutura de uma molécula de imunoglobulina IgG, destacando os seus domínios proteicos que formam duas porções: Fab, fragmento de ligação ao antígeno, e Fc, fragmento cristalizável, responsável pela interação do anticorpo a elementos da resposta imune. Os três principais fragmentos de anticorpo são mostrados: FvFc (construção contendo o Fc ligado a dois scFv) ou scFvFc, scFv (fragmento variável de cadeia única) e Fab. Peptídeo conector: sequências repetidas de Glicinas e Serina. Dobradiça: fornece flexibilidade conformacional ao Fab.

Em vertebrados, há cinco classes diferentes, funcionalmente, de cadeia pesada: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA; que interagem com duas classes de cadeia leve: $Ig\kappa$ (kappa) e $Ig\lambda$ (lamda). Essas cadeias são constituídas por unidades estruturais que são domínios proteicos, cada um composto de sete folhas betas antiparalelas, conectadas por *loops*. Tipicamente, as cadeias leves são compostas por um domínio proteico variável (situado na extremidade amino-terminal), que varia substancialmente entre cada molécula de imunoglobulina, e um domínio constante, igual para todas as imunoglobulinas de uma mesma classe. Já as cadeias pesadas de IgG são compostas por um domínio variável e três domínios constantes. Esses domínios se organizam para formar dois fragmentos que possuem funções distintas: 2 fragmentos de ligação ao antígeno, Fab (do inglês, *fragment antigen-binding*) e 1 fragmento cristalizável, Fc (do inglês, *fragment crystallizable*), responsável pelo recrutamento de células e outras moléculas do sistema imune. Os fragmentos Fab são conectados ao fragmento Fc, por meio de uma região polipeptídica chamada de dobradiça (do inglês, *hinge*), responsável pela flexibilidade da estrutura do anticorpo e que influencia a capacidade de reconhecimento de epítomos espacialmente próximos (**Figura 3**) (Haakenson *et al.*, 2018).

O Fc tem uma função adaptadora, associando o Fab, que é polimórfico, a um componente do sistema imune desencadeando importantes respostas imunes (**Figura 3**). O reconhecimento de anticorpos pela ligação do Fc a um tipo de receptor de Fc (expresso em diferentes células efectoras do sistema imune, como macrófagos, algumas células dendríticas, células NK, linfócitos e mastócitos) ativa modificações na atividade celular e sinaliza para a secreção de citocinas e enzimas específicas. Essa ativação pode levar à fagocitose de patógenos e células infectadas, à destruição de células infectadas pela liberação de granzinas e perforinas, à liberação de histamina e eicosanoídes, à secreção de citocinas, ao aumento da apresentação antigênica, e a outros processos da resposta imunológica. Além disso, o anticorpo e imunocomplexos (anticorpo-antígeno) podem interagir, via porção Fc, com o sistema complemento ativando processos imunes relevantes, como a destruição de patógenos e a lise de células infectadas (Goulet & Atkins, 2019).

O Fab é uma porção estável e relativamente autônoma, formada por uma cadeia leve combinada com o domínio variável da cadeia pesada (VH) e com o primeiro domínio constante da cadeia pesada (CH1). Cada domínio variável de um anticorpo possui três regiões de hipervariabilidade, as quais são denominadas de região determinante de complementaridade, CDR (do inglês, *complementarity determining region*) e correspondem a três (CDR1, CDR2 e CDR3) dos *loops* que interligam as folhas β dos domínios (**Figura 3**). As CDRs são

responsáveis pela grande diversidade de anticorpos que permite a ligação a uma larga diversidade de antígenos existentes. A interação das três CDRs do domínio variável da cadeia leve (VL) com as três CDRs do domínio variável da cadeia pesada (VH) forma uma estrutura dinâmica, denominada de paratopo, que é o sítio de ligação do anticorpo a uma região específica do antígeno, denominada de epítopo. Desse modo, cada molécula de anticorpo IgG possui dois Fab, cada um contendo o mesmo paratopo, ligante ao mesmo epítopo. As três CDRs do VH geralmente realizam o contato mais significativo com o epítopo e exercem papel mais prominente na ligação ao antígeno. Em algumas espécies de vertebrados, o paratopo é formado apenas pelas CDRs do VH, que costumam ser mais longas do que as de humanos. Estudos recentes têm mostrado que o paratopo dos anticorpos não é estático, apresentando um dinamismo conformacional que reconfigura o sítio de ligação ao antígeno e que constitui um fator não convencional de diversificação dos anticorpos (Chiu & Gilliland, 2016; Haakenson *et al.*, 2018; Kanyavuz *et al.*, 2019).

Cada VH é codificado por três segmentos gênicos: variável (V_H), de diversidade (D_H) e de acoplamento ou junção (J_H); enquanto que cada VL é codificado por um segmento variável (V_L) e por um segmento de junção (J_L). Os segmentos gênicos de VH estão localizados em um mesmo *locus* (no cromossomo 14), enquanto que os de VL estão localizados em dois *loci*, kappa e lamda (nos cromossomos 2 e 22, respectivamente) (**Figura 4**). A diversidade do repertório de imunoglobulinas é gerada por diferentes fatores envolvidos do desenvolvimento dos anticorpos nos órgãos linfoides, e o primeiro fator é a existência de diferentes segmentos gênicos, V, D e J, no genoma, e a recombinação V(D)J que ocorre para a expressão dos VH e VL. Essa diversidade de segmentos gênicos foi gerada ao longo da evolução, por eventos de duplicação gênica, seguidos de mutação (Kanyavuz *et al.*, 2019).

Durante a ontogenia das células B que ocorre continuamente no organismo, células progenitoras dos linfócitos B (LB) se diferenciam em célula pró-B no órgão linfóide primário, medula óssea. Na célula pró-B, ocorre um fenômeno de recombinação genética, catalisado por uma maquinaria de enzimas (que inclui as enzimas RAG1 e RAG2), no *locus* da cadeia pesada, no qual um segmento gênico V, entre todos os existentes na sequência de DNA, é unido a um segmento gênico D e um segmento J, entre todos existentes, de forma aleatória e de modo que os segmentos situados entre os segmentos “escolhidos”, são eliminados do genoma daquela célula. Esse fenômeno é chamado de recombinação V(D)J, e após ele, os segmentos VDJ escolhidos, transcritos em pré-RNA, são unidos a um segmento constante de cadeia de IgM (C_μ) ou IgD (C_δ), aleatoriamente, durante o processamento do pré-RNA para gerar um mRNA

maduro (**Figura 4**). Além da diversidade dos segmentos gênicos, a união dos segmentos para a formação do domínio variável contribui para a variabilidade dos anticorpos, pois durante essa união, deleções e inserções ocorrem frequentemente na CDR3, que se situa exatamente nas junções dos três segmentos gênicos, pela ação de diferentes enzimas que participam da recombinação gênica, como a transferase deoxinucleotidil (TdT). Essa variabilidade adicional aos anticorpos, decorrentes da adição ou remoção de nucleotídeos nas junções dos segmentos, é mais comum na cadeia pesada do que na cadeia leve e é denominada de diversidade juncional. A diversidade juncional é o segundo fator de diversidade dos anticorpos e explica também o fato de que a CDR3 é a CDR com maior variabilidade (Fear, 2013; Smith, 2019 A; Ministro *et al.*, 2020).

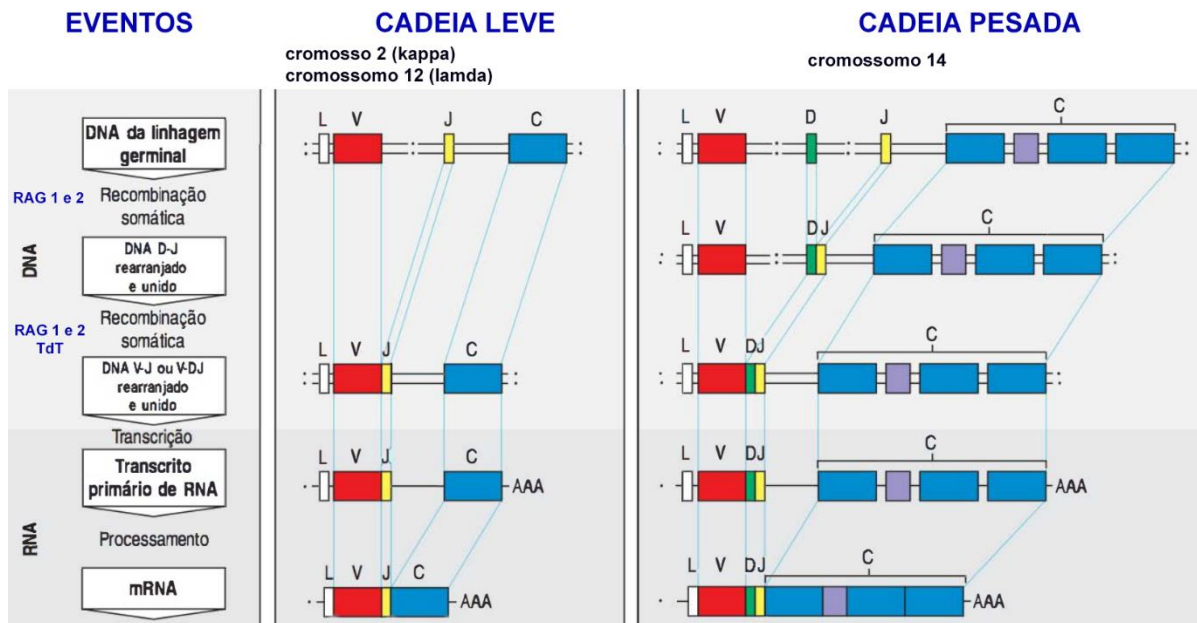


Figura 4. Genes dos domínios proteicos das imunoglobulinas. Representação da organização genômica dos segmentos gênicos codificadores dos domínios variáveis e constantes da cadeia leve e da cadeia pesada das imunoglobulinas. São destacados também os eventos de recombinação V(D)J e do processamento do transcrito durante o processo de transcrição e tradução das cadeias proteicas. RAG 1 e 2: gene 1 ou 2 de ativação da recombinação, que atuam na recombinação V(D)J. TdT: transferase deoxinucleotidil. Adaptado de Kenneth *et al.*, 2012.

A partir desse mRNA maduro uma cadeia pesada de imunoglobulina, IgM ou IgD, é traduzida e expressa na superfície da célula B em desenvolvimento, que agora passa a ser uma célula pré-B, na forma de um receptor de membrana, chamado de pré-BCR (do inglês, *cell-B receptor*), pois ainda não contém uma cadeia leve definitiva. Para a formação dessa

imunoglobulina de membrana, é necessária a expressão de uma cadeia leve substituta (constituída das proteínas $\lambda 5$ e V-preB), que não é variável e que combina com a cadeia pesada recém-sintetizada. A célula pré-B, com o pré-BCR, é selecionada quanto à sua capacidade de reconhecimento do antígeno. Na medula óssea, antígenos próprios são apresentados à célula pré-B, de modo que se o pré-BCR não consegue reconhecer o antígeno ou se reconhece, mas com uma ligação de grande intensidade, a célula falha no processo de seleção. Caso ocorra uma falha na seleção, a célula inicia um novo processo de recombinação V(D)J no *locus* da cadeia pesada no outro cromossomo 14, entretanto se a célula falhar novamente, ela não recebe sinais de sobrevivência celular e morre por apoptose (seleção negativa). Em função de um controle epigenético, apenas um dos alelos do *locus* de imunoglobulina é expresso de cada vez, ficando o segundo alelo silenciado. Tal característica é denominada de exclusão alélica a qual garante a especificidade de um clone a um dado antígeno apenas. Somente aquelas células pré-B que reconheceram fracamente o antígeno apresentado, são selecionadas, recebendo estímulos para sobrevivência e para um novo evento de recombinação (seleção positiva) (Cambier *et al.*, 2007; Winkler & Martensson, 2018; Schwickert *et al.*, 2019; Zehentmeier *et al.*, 2019)

No novo evento de recombinação genética, uma cadeia leve é expressa, pela combinação de um segmento V com um segmento J de um dos dois *loci* de cadeia leve em um dos dois cromossomos. Da mesma forma da recombinação da cadeia pesada, a junção de um segmento V_L com um segmento J_L , exclui, do genoma, os segmentos situados entre os segmentos “escolhidos”, e depois esse par V_L - J_L é combinado com um segmento constante kappa ($C\kappa$) ou lamda ($C\lambda$) durante o *splicing* do pré-RNA, dependendo de qual *locus* sofreu a recombinação. O mRNA maduro é usado para a síntese de uma nova cadeia leve que substitui a cadeia pré-leve, combinando com a cadeia pesada selecionada anteriormente, para a formação do BCR na célula B, agora chamada de célula B imatura. O novo BCR passa por outra fase de seleção pelo reconhecimento de antígenos próprios, no qual, novamente, apenas as células B imaturas que reconheceram fracamente o antígeno continuam para a próxima fase de desenvolvimento. Entretanto, agora, se a célula falhar na seleção, ela pode “tentar” expressar uma cadeia leve do locus diferente (κ ou λ) ou do mesmo locus, mas no outro cromossomo. Assim a cadeia leve tem 4 chances de conseguir passar pela seleção. Além disso ela pode passar por um processo de edição de V_L , no qual a sequência do V_L é novamente recombinada, formando um novo V_L que pode ser novamente selecionado. Essa edição também pode ocorrer no V_H , mas é raro. Caso falhe em todas as tentativas, a célula sofre apoptose. Todos os eventos envolvidos na seleção durante a ontogenia de células B, como a recombinação genética e a

sobrevivência ou apoptose celular, são coordenados por sinalizações celulares desencadeadas pela ligação ao antígeno ou a moléculas estimulatórias presentes no nicho celular da medula óssea, e essas sinalizações constituem a tolerância central (Winkler & Martensson 2018; Riley *et al.*, 2018; Petkau & Turner, 2019; Meffre & Connor, 2019).

As células B imaturas, expressando um BCR funcional, que passaram pelos dois eventos de seleção saem da medula e migram para o baço, onde terminam o processo de maturação tornando-se células B maduras, *naives* (que tem a capacidade de reconhecer um antígeno, mas ainda não foram ativadas pelo reconhecimento antigênico) (Zheng *et al.*, 2018). As células B podem residir no baço ou podem migrar para outros órgãos linfóides secundários. Essas células B maduras (ou células B foliculares) coexpressam IgM e IgD, por meio de *splicing* alternativo que combina os segmentos VDJ tanto ao segmento constante C μ quanto ao C δ , e situam-se em nichos especializados dos órgãos linfóides secundários, chamados de folículos. Algumas células B imaturas não se diferenciam em células B foliculares e tornam-se células B da zona marginal (IgM⁺ IgD^{low}). Outras populações de células B se diferenciam das células B foliculares e da zona marginal quanto ao processo de desenvolvimento e quanto à expressão gênica. Essas outras populações, como as células B1, exercem também papel nas respostas imunológicas e na regulação delas, como, por exemplo, na produção rápida de anticorpos contra microorganismos em tecidos particulares, como o peritônio. (Yam-Puc *et al.* 2019).

Nos órgãos linfóides secundários, as células B maduras podem reconhecer, via BCR, um antígeno solúvel ou um antígeno carregado por um macrófago ou por uma célula dendrítica. Seja qualquer forma de reconhecimento, esse antígeno geralmente está em sua conformação nativa, intacta e não processada por células. A partir desse reconhecimento, a célula B da zona marginal pode sofrer estímulo de proliferação e diferenciação em plasmócitos de vida curta, que são células, com citoplasma grande e com muitas organelas necessárias para síntese e secreção de anticorpos. Durante essa diferenciação, as imunoglobulinas sintetizadas pela célula B perdem a porção proteica responsável pelo atracamento da glicoproteína na membrana celular, permitindo sua secreção. Os plasmócitos gerados são de vida curta, geralmente permanecendo no organismo apenas enquanto o antígeno está presente, e são capazes apenas de secretar IgM específicos ao antígeno reconhecido. Entretanto, a diferenciação dessas células B da zona marginal, que reconheceram o antígeno, em células B de memória de vida longa, ou em plasmócitos secretores de imunoglobulinas de classes diferentes (troca de classe), mesmo que incomum, já foi descrita. A resposta imune humoral gerada por essas células B geralmente são respostas a antígenos polissacarídeos, lipídicos ou de ácidos nucleicos e essa resposta é

denominada de resposta T-independente, porque não depende de células T (Roulland *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2018; Cyster & Allen, 2019; Yam-Puc *et al.* 2019).

Em outros contextos imunológicos, células B foliculares, após o reconhecimento antigênico, saem do folículo e migram para a região extrafolicular, onde elas interagem com células T que foram ativadas anteriormente com o mesmo antígeno reconhecido pela célula B. Os dois linfócitos previamente ativados interagem por meio de diferentes receptores, e essa interação leva a estímulos para ambas células. A célula T induz modificações, via ligante de CD40 (CD40L ou CD154) e via receptor de citocina, na célula B a qual inicia um novo evento de recombinação gênica, conhecido como troca de classe, que é catalizado pela enzima deaminase induzida por ativação (AID) e que substitui o segmento gênico constante por outro segmento, podendo ser C γ (IgG), C ϵ (IgE) ou C α (IgA), dependendo de qual estímulo de citocina recebeu da célula T. Durante o processo de troca de classe, que ocorre a nível do processamento do pré-RNA, há perda definitiva dos genes codificadores de C μ e C δ e o éxon VDJ é unido a um novo segmento constante. A citocina INF γ , secretada pelo linfócito Th1 (linfócito T *helper* 1), induz a troca de classe para IgG; a citocina IL-4, secretada pelo linfócito Th2, induz a troca de classe para IgE e IgG4; e a citocina TGF- β e outras citocinas, secretadas pelo linfócito Th e outros tipos celulares, induzem a troca de classe para IgA (McHeyzer-Williams *et al.*, 2011; Oleinika *et al.*, 2018; Cyster & Allen, 2019; Kanyavuz *et al.*, 2019. Ministro *et al.*, 2020).

A célula B que sofreu troca de classe, pode se diferenciar precocemente em plasmócitos de vida curta na região extrafolicular ou podem retornar ao folículo e iniciar um processo denominado de reação de centro germinal, no qual as respostas imunes de células B aumenta em intensidade e em efetividade, pela geração de anticorpos de alta afinidade. Na verdade, as células B extrafoliculares que interagiram com a célula T têm capacidade limitada de completar o processo de troca de classe. Na reação de centro germinal, que ocorre de forma mais lenta, as células B sofrem uma troca de classe extensiva, completando o processo de troca iniciado pela interação com as citocinas, e proliferam rapidamente, formando uma região distinta no folículo, denominada de centro germinal. Durante essa proliferação, a taxa de mutação nos genes codificadores dos domínios variáveis aumenta em torno de mil vezes em relação a taxa normal. Esse aumento da taxa de mutação leva a substituições pontuais de alguns nucleotídeos da sequência de VH e VL, pela ação da enzima AID, as quais são chamadas de hipermutação somática e resultam em mutações nas proteínas de anticorpos que podem não ter efeitos (mutações neutras), podem diminuir a afinidade dos anticorpos, a atividade deles ou

impossibilitam a produção deles (mutações negativas); ou podem aumentar a afinidade dos anticorpos que sofreram troca de classe (mutação positiva), efeito denominado de maturação de afinidade (McHeyzer-Williams *et al.*, 2011; Suan *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2019; Ministro *et al.*, 2020).

Os vários clones de células B, expressando imunoglobulinas de novas classes que sofreram hipermutação somática, passam por um intenso processo de seleção clonal, chamada de seleção de afinidade, gerado pelas populações foliculares de células dendríticas e de células T. Nessa seleção, apenas as células B, em que o processo de hipermutação somática resultou em anticorpos de maior afinidade, são selecionadas positivamente e recebem estímulos de proliferação e sobrevivência. Ao final da seleção clonal, há células B expressando anticorpos de alta afinidade e com capacidade de gerar respostas imunes mais potentes, as quais podem se diferenciar em plasmócitos de vida longa residentes da medula óssea ou células B de memória, que circulam pelo organismo e permanecem neles por longos períodos de tempo, podendo variar entre alguns meses até toda a vida do organismo. A resposta imune gerada pela reação de centro germinal e a resposta extrafolicular, após estímulos da célula T, são conhecidas como resposta imune T-dependente, pois necessitam do contato com o linfócito T, e são geradas contra antígenos peptídicos (Karrar & Graham, 2018; Tabasinezhad *et al.*, 2019).

Desse modo, além da diversidade genética e da diversidade juncional, a troca de classe, a hipermutação somática e a seleção de afinidade contribuem para a variabilidade de anticorpos e levam a respostas imunes humorais de maior amplitude e a memória imune. A memória imune é importante pois possibilita a montagem de uma resposta imune mais rapidamente e de maior magnitude em contatos secundários com o antígeno (Liu & Wu, 2018; Cyster & Allen, 2019).

A resposta imune humoral a infecções leva a produção de anticorpos de diferentes classes, IgM, IgA, IgE e IgG, e de diferentes afinidades e avides a epitopos distintos, por isso é uma resposta policlonal, onde clones de células B expressando anticorpos diferentes são selecionados e expandidos, na presença do antígeno. Entretanto, os efeitos desses anticorpos variam dependendo da ação deles, podendo levar a um efeito de imunoproteção ou a um efeito de imunopatogênese. Em infecções por vírus, a imunoproteção pode ser gerada pelo simples bloqueio do vírus, interrompendo alguma etapa do ciclo viral, ou por mecanismos efetores desencadeados pelo fragmento Fc do anticorpo que interage com células do sistema imune ou com o sistema complemento. Ambas interações levam a destruição da partícula viral, a destruição de células infectadas ou a amplificação de outras respostas imunológicas (Goulet & Atkins, 2019). A imunopatogênese, em infecções virais, é gerada por reações de ADE, em que

se aumenta a entrada do vírus em células e tecidos e a replicação viral, e em que respostas imunes antivirais são suprimidas e respostas imunes que contribuem para a infecção são ativadas (Martín-Acebes *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2020).

1.2.2 Anticorpos terapêuticos

O uso de anticorpos no tratamento de doenças tem como base explorar as características dessas moléculas de especificidade única e alta afinidade a um dado antígeno para reverter efeitos de uma doença ou bloquear algum mecanismo da patogênese. A utilização de anticorpos terapêuticos começou com a soroterapia, que consiste na utilização do soro ou plasma de um organismo que teve contato com um antígeno de interesse e gerou uma resposta imune policlonal protetiva à presença dele. O plasma ou soro desse primeiro organismo contém diferentes anticorpos protetivos e a ideia da soroterapia é realizar a transferência deles a um organismo que está acometido com a enfermidade, realizando uma imunização passiva. Sendo assim essa imunoterapia não resultará em memória imune, mas atuará, no mesmo momento, para a resolução da doença. A soroterapia foi estabelecida oficialmente, no final do século XIX, quando Behringer e Kitasato administraram um soro isolado de animais imunizados com a toxina diftérica em um garoto acometido com a doença, promovendo a cura dele (Gao *et al.*, 2018; Alpaugh & Cicchetti, 2019).

Com isso foi levantado o potencial terapêutico dos anticorpos, referidos como “balas mágicas”, que poderiam ser manipulados para atingirem alvos específicos. Entretanto o sistema imune é um sistema engajado em promover a homeostase do organismo, elaborando respostas imunes celulares e humorais policlonais, ou seja, são gerados diferentes clones de células T e B, cada um deles específicos a um epitopo diferente do antígeno ou dos antígenos presentes. Esses clones atuam de maneira diferente na resposta imune, podendo exercer um papel imunoprotetor, imunopatogênico ou neutro, e essas características do Sistema Imune definem também a soroterapia, sendo assim são estabelecidos o potencial terapêutico e as limitações desse tipo de imunoterapia (Maranhão *et al.*, 2015; Fercher *et al.*, 2017).

A ideia do uso de anticorpos na terapia foi impulsionada com o desenvolvimento, por Milstein e Kohler, de anticorpos monoclonais, ou seja, usar uma solução de anticorpos terapêuticos que, diferentemente da soroterapia, são todos específicos a um mesmo epitopo, isso porque todos eles são derivados de uma mesma célula B, um mesmo clone. Isso só foi possível, pelo desenvolvimento da tecnologia de hibridoma, que consiste na imunização de um camundongo com um antígeno de interesse. Esse camundongo desenvolve uma resposta imune policlonal à presença do antígeno, e, então, células B são isoladas do baço murino e são

fusionadas *in vitro* a células de mieloma para imortalização. Os diferentes clones, produtores de anticorpos, isolados e imortalizados são separados, por diferentes métodos, de modo que cada clone fica isolado dos demais e é cultivado para a produção dos anticorpos. Os anticorpos de cada clone são testados quanto a sua função e aquele clone que expressa um anticorpo com capacidade efetora desejada é selecionado para o uso na terapia (Singh *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2020).

A descoberta do hibridoma e a possibilidade da utilização dos anticorpos monoclonais gerou grande euforia para o desenvolvimento de imunoterapias mais eficientes, isso porque, teoricamente, com a manipulação da resposta imune humoral seria possível desenvolver um anticorpo a qualquer antígeno desejado, bastando para isso ter o antígeno. Além disso, essa imunoterapia seria mais eficaz do que a soroterapia, pois é monoclonal, usando o melhor anticorpo gerado pela resposta imune e que foi selecionado. De fato, em termos de ligação e resolução da doença específica, os anticorpos monoclonais foram mais eficientes do que os anticorpos policlonais da soroterapia, a qual contém um conjunto de anticorpos protetivos e não protetivos com afinidades e capacidades efetoras variáveis. Entretanto esses anticorpos, por serem de origem murina, ao serem inoculados em humanos geravam uma resposta imune contra eles, considerados estranhos pelo Sistema imune do organismo.

Essa resposta é conhecida como resposta *Human anti-mouse antibodies* (HAMA) ou doença do soro, pois também repetia o mesmo problema da soroterapia que utilizava soro de organismos imunizados não humanos, na qual era montada uma resposta imune contra os anticorpos inoculados. A doença do soro novamente dificultou a imunoterapia pois diminuía a segurança dela por causa dos efeitos colaterais dessa resposta imune montada, como a tempestade de citocinas, que consiste na grande produção de citocinas pró-inflamatórias e na consequente inflamação exarcebada, a qual poderia levar a morte dos pacientes. Além disso, essa resposta imune levava à neutralização dos anticorpos monoclonais, resultando na perda de função. Não obstante, alguns poucos anticorpos monoclonais murinos foram utilizados na clínica, mas seu uso contínuo em doenças crônicas era dificultado, como o anticorpo monoclonal murino anti-CD3, muromonabe (OKT3), usado na prevenção de rejeição aguda de transplantes, por imunossupressão (**Tabela 1**) (Maranhão *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2019).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados. Principais anticorpos aprovados para uso terapêutico em humanos nos Estados Unidos (FDA) e na Europa (EMA). Método: tecnologia utilizada para a obtenção do anticorpo monoclonal. ^a: anticorpo conjugado a uma molécula auxiliar à função efetora.

| Nome | Formato | Alvo | Principal indicação | Método | Ano de aprovação |
|--------------|-----------------|------------------------------------|--|------------------------|------------------|
| Muronomabe | IgG2a murino | CD3 | Rejeição de transplantes | Hibridoma | 1986 |
| Abciximabe | Fab quimérico | Receptores GPIIb/IIIa | Prevenção de coágulos em angioplastias | Hibridoma | 1994 |
| Edrecolomabe | IgG2a murino | EpCAM | Câncer colorretal | Hibridoma | 1995 |
| Rituximabe | IgG1 quimérico | CD20 | Linfoma não-Hodgkin | Hibridoma | 1997 |
| Daclizumabe | IgG1 humanizado | IL2R | Rejeição de transplantes | Hibridoma | 1997 |
| Palivizumabe | IgG1 humanizado | Vírus sincicial respiratório (RVS) | Prevenção de infecção respiratória viral | Hibridoma | 1998 |
| Infliximabe | IgG1 quimérico | TNF- α | Doença de Crohn e Artrite Reumatóide | Hibridoma | 1998 |
| Trastuzumabe | IgG1 humanizado | HER2 | Câncer de mama | Hibridoma | 1998 |
| Gemtuzumabe | IgG4 humanizado | CD33 | Leucemia mielóide | Hibridoma | 2000 |
| Alemtuzumabe | IgG1 humanizado | CD52 | Leucemia linfocítica crônica | Hibridoma | 2001 |
| Adalimumabe | IgG1 humano | TNF- α | Doença de Crohn e Artrite Reumatóide | <i>Phage Display</i> | 2002 |
| Omalizumabe | IgG1 humanizado | IgE | Asma | Hibridoma | 2003 |
| Cetuximabe | IgG1 quimérico | EGFR | Câncer colorretal | Hibridoma | 2004 |
| Bevacizumabe | IgG1 humanizado | VEGF | Câncer colorretal | Hibridoma | 2004 |
| Natalizumabe | IgG4 humanizado | Integrina $\alpha 4$ | Esclerose múltipla | Hibridoma | 2004 |
| Ranibizumabe | Fab humanizado | VEGF-A | Degeneração macular | <i>Phage Display</i> | 2006 |
| Panitumumabe | IgG2 humano | EGFR | Câncer colorretal | Camundongo transgênico | 2006 |
| Eculizumabe | IgG2 humanizado | C5 | Hemoglobinúria paroxística noturna | Hibridoma | 2007 |
| Ustekinumabe | IgG1 humano | IL-12/23 | Psoríase | Camundongo transgênico | 2009 |
| Canakinumabe | IgG1 humano | IL-1 β | Síndrome periódica associada à criopirina (CAPS) | Camundongo transgênico | 2009 |

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados. Continuação.

| Nome | Formato | Alvo | Principal indicação | Método | Ano de aprovação |
|---------------|-----------------|------------------------------------|---|------------------------|-------------------------|
| Golimumabe | IgG1 humano | TNF- α | Artrite reumatoide e psoriática, Espondilite anquilosante | <i>Phage Display</i> | 2009 |
| Ofatumumabe | IgG1 humano | CD20 | Leucemia | Camundongo transgênico | 2009 |
| Tocilizumabe | IgG1 humanizado | IL-6 | Artrite reumatoide | Hibridoma | 2009 |
| Denosumabe | IgG2 humano | RANK-L | Osteoporose | Camundongo transgênico | 2012 |
| Belimumabe | IgG1 humano | Estimulador de linfócito B (BLyS) | Lúpus Eritematoso Sistêmico | <i>Phage Display</i> | 2011 |
| Ipilimumabe | IgG1 humano | CTLA-4 | Melanoma | Camundongo transgênico | 2011 |
| Brentuximabe | IgG1 quimérico | CD30 | Linfoma | Hibridoma | 2011 |
| Raxibacumabe | IgG1 humano | Bactéria <i>Bacillus anthracis</i> | Infecção por Antrax | <i>Phage Display</i> | 2012 |
| Ramacirumabe | IgG1 humano | VEGFR2 | Câncer gástrico | <i>Phage Display</i> | 2014 |
| Siltuximabe | IgG1 quimérico | IL-6 | Doença de Castleman | Hibridoma | 2014 |
| Nivolumabe | IgG4 humano | PD-1 | Melanoma | Camundongo transgênico | 2014 |
| Vedolizumabe | IgG1 humanizado | Integrin $\alpha 4\beta 7$ | Colite ulcerativa, Doença de Crohn | Hibridoma | 2014 |
| Pembrolizumab | IgG4 humanizado | PD-1 | Melanoma | Hibridoma | 2014 |
| Blinatumomabe | Fab murino | CD19, CD3 | Leucemia | Hibridoma | 2014 |
| Evolocumabe | IgG2 humano | PCSK9 | Hipercolesterolemia familiar | Camundongo transgênico | 2015 |
| Dinotuximabe | IgG1 quimérico | Glicolípido GD2 | Neuroblastoma | Hibridoma | 2015 |
| Idarucizumabe | Fab humanizado | Anti-coagulante Dabigatran | Efeito reverso ao dabigatran | Hibridoma | 2015 |
| Secukinumabe | IgG1 humano | IL-17 | Psoríase | Camundongo transgênico | 2015 |
| Mepolizumabe | IgG1 humanizado | IL-5 | Asma | Hibridoma | 2015 |

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados. Continuação.

| Nome | Formato | Alvo | Principal indicação | Método | Ano de aprovação |
|----------------|------------------------------|--|---|------------------------|-------------------------|
| Daratumumabe | IgG1 humano | CD38 | Esclerose múltipla | Camundongo transgênico | 2015 |
| Bezlotoxumabe | IgG1 humano | Enterotoxina B de <i>Clostridium difficile</i> | Infecção por <i>Clostridium difficile</i> | Camundongo transgênico | 2016 |
| Atezolizumabe | IgG1 humanizado | PD-L1 | Câncer de bexiga | <i>Phage Display</i> | 2016 |
| Brodalumabe | IgG2 humano | IL-17R | Psoríase em placas | Camundongo transgênico | 2017 |
| Dupilumabe | IgG4 humano | IL-4R | Dermatite Atópica | Camundongo transgênico | 2017 |
| Inotuzumabe | IgG4 humanizado ^a | CD22 | Leucemia linfoblástica aguda | Hibridoma | 2017 |
| Guselkumabe | IgG1 humano | IL-23R | Psoríase | <i>Phage Display</i> | 2017 |
| Emicizumabe | IgG4 humanizado | Fator IXa, Fator X | Hemofilia A | Hibridoma | 2017 |
| Gemtuzumabe | IgG4 humanizado ^a | CD33 | Leucemia mieloide aguda | Hibridoma | 2017 |
| Erenumabe | IgG2 humano | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina | Prevenção de enxaqueca | Camundongo transgênico | 2018 |
| Burosumabe | IgG1 humano | FGF23 | Osteomalacia | Camundongo transgênico | 2018 |
| Lanadelumabe | IgG1 humano | Caliceína plasmática | Angioedema hereditário | <i>Phage Display</i> | 2018 |
| Mogamulizumabe | IgG1 humanizado | CCR4 | Micose fúngica ou síndrome de Sézary | Hibridoma | 2018 |
| Ravulizumabe | IgG2 humanizado | C5 | Hemoglobinúria paroxística noturna | Hibridoma | 2018 |
| Cemiplimabe | IgG4 humano | PD-1 | Carcinoma de células escamosas cutâneas | Camundongo transgênico | 2018 |
| Ibalizumabe | IgG4 humanizado | Proteína CD4 | Infecção por HIV | Hibridoma | 2018 |
| Emapalumabe | IgG1 humano | Interferon-gama (INF- γ) | Linfo-histiocitose hemofagocítica | <i>Phage Display</i> | 2018 |
| Moxetumomabe | IgG1 murino ^a | CD22 | Leucemia de células pilosas | <i>Phage Display</i> | 2018 |

Tabela 1. Anticorpos monoclonais aprovados. Continuação.

| Nome | Formato | Alvo | Principal indicação | Método | Ano de aprovação |
|----------------|---|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|------------------|
| Caplacizumabe | Nanoanticorpo Biespecífico humanizado | Fator de von Willebrand | Púrpura trombocitopênica | Hibridoma | 2018 |
| Risankizumabe | IgG1 humanizado | IL-23 | Psoríase em placas | Hibridoma | 2019 |
| Polatuzumabe | IgG1 humano ^a | CD79b | Linfoma difusivo de células B | Hibridoma | 2019 |
| Romosozumabe | IgG2 humanizado | Esclerostina | Osteoporose pós- menopausa | Hibridoma | 2019 |
| Crizanlizumabe | IgG2 humanizado | CD62 | Anemia falciforme | Hibridoma | 2019 |
| Enfortumabe | IgG1 humano ^a | Nectina-4 | Câncer de bexiga | Camundongo transgênico | 2019 |
| Brolucizumabe | scFv humanizado | VEGF-A | Degeneração macular | Hibridoma | 2019 |
| Teprotumumabe | IgG1 humano | IGF | Doença ocular associada à tireóide | <i>Phage Display</i> | 2020 |
| Sacituzumabe | IgG1 humanizado ^a | TROF-2 | Câncer de mama triplo- negativo | Hibridoma | 2020 |
| Inebilizumabe | IgG1 humanizado | CD19 | Neuromielite óptica | Hibridoma | 2020 |

IL: interleucina. CD: Cluster of Differentiation. TNF- α : citocina pró-inflamatória. INF: Interferon. EpCAM: molécula de adesão celular epitelial. HER2: Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular. VEGFR2: receptor tipo 2 de VEGF. RANK-L: Ativador de receptor do fator nuclear kappa- ligante. PCSK9: Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9. PD1: proteína de morte celular programada 1. PD-L1: Ligante de morte programado 1. FGF23: Fator de crescimento de fibroblasto 23. IGF: Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina. TROF-2: Antígeno da superfície celular de trofoblastos 2.

Tempos depois, a imunoterapia com anticorpos monoclonais foi restimulada com o advento da tecnologia do DNA recombinante que permitiu a modificação da estrutura dos anticorpos monoclonais a fim de diminuir a imunogenicidade deles, sem alterar a especificidade. A primeira modificação foi a substituição dos domínios constantes das cadeias leve e pesada por domínios constantes humanos, gerando anticorpos quiméricos. Diferentes anticorpos quiméricos foram desenvolvidos e utilizados para diversas doenças, conferindo uma imunoterapia mais segura, como o anticorpo Rituximabe, um dos anticorpos monoclonais de

maior impacto na clínica, específico à molécula membrana de células B, CD20, ainda hoje utilizado para imunoterapia de linfomas não-hodgkin, por imunossupressão. Outro anticorpo monoclonal quimérico, com importância clínica até hoje, é o Infiximabe, específico à citocina pró-inflamatória TNF- α (**Tabela 1**). Ainda sim, esses anticorpos geravam efeitos colaterais decorrentes de uma resposta imune, conhecida como *human anti-chimeric antibodies* (HACA) (Almagro *et al.*, 2018; Goulet & Atkins, 2019).

O próximo passo dado para reduzir a resposta gerada pela presença de anticorpos “estranhos”, foi tornar a estrutura deles quase toda humana, por um processo denominado Humanização, no qual, apenas as CDRs, que formam o paratopo, permanecia murina. Para isso, eram identificados os domínios variáveis humanos com sequência mais similar à dos domínios variáveis murinos originais e as CDRs murinas eram transplantadas, *in silico*, aos domínios humanos, substituindo as CDRs humanas. Assim, eram desenhados anticorpos monoclonais, em que mais de 90% de sua estrutura era humana, diminuindo ainda mais a imunogenicidade. Muitos anticorpos humanizados terapêuticos foram desenvolvidos, pouco a pouco substituindo os anticorpos murinos e quiméricos, e continuam sendo um dos principais imunofármacos (denominação dos anticorpos usados na imunoterapia) gerados, como o anticorpo Trastuzumabe (Herceptin) específico ao receptor HER2, usado no tratamento de câncer de mama (**Tabela 1**). Contudo, apesar da menor imunogenicidade, ainda era detectada uma resposta *human anti-humanized antibodies* (HABA) (Singh *et al.*, 2017; Chiu *et al.*, 2019).

A fim de eliminar essas respostas que dificultavam o uso dos anticorpos terapêuticos, foram desenvolvidas metodologias que possibilitassem a obtenção de anticorpos monoclonais totalmente humanos. Ao longo do tempo, três metodologias de obtenção de anticorpos humanos se destacaram. A primeira delas é a adaptação da tecnologia de hibridoma usando camundongos transgênicos, que tiveram os seus genes codificadores de imunoglobulinas substituídos por genes codificadores de imunoglobulinas humanas, possibilitando a geração de anticorpos humanos pela mesma sequência metodológica adotada no hibridoma original. Muitos anticorpos humanos gerados por essa metodologia já foram aprovados para o uso no tratamento de diferentes doenças (Kumar *et al.*, 2019. Lu *et al.*, 2020).

Outra metodologia de grande destaque, que foi tema do prêmio Nobel de Química de 2018, é a tecnologia do *Phage Display*, que envolve a construção de bibliotecas de anticorpos expressos na superfície de fagos filamentosos a partir de repertórios, imunes ou sintéticos, de anticorpos isolados de humanos. Essas bibliotecas são submetidas a um processo de seleção, semelhante a seleção de afinidade da reação de centro germinal, em que os anticorpos com

maior afinidade a um antígeno específico de interesse são selecionados em ciclos repetidos com aumento da força de seleção, de modo a permitir a maturação ou a modificação da afinidade deles. Essa técnica de evolução molecular resulta em anticorpos de grande afinidade e já propiciou o desenvolvimento de importantes anticorpos terapêuticos, como o anticorpo Adalimumabe ou Humira, o anticorpo de maior valor econômico, atualmente, entre todos os produtos biológicos terapêuticos, que tem especificidade à citocina pró-inflamatória TNF- α e que teve aprovação, em 2002, para uso no tratamento de Artrite Reumatoide e Doença de Crohn (**Tabela 1**). Outro fator de destaque dessa metodologia frente às outras é a maior velocidade do desenvolvimento dos anticorpos que ela oferece (Kumar *et al.*, 2019; Mimmi *et al.*, 2019).

A outra metodologia envolve o isolamento de células B de memória do sangue periférico de pessoas imunizadas e a imortalização dessas células por meio da infecção com vírus Epstein-Barr (EBV). Essas células B imortalizadas são cultivadas e seus anticorpos selecionados quanto à capacidade de ligação ao antígeno estudado e à função efetora de interesse. A partir das células selecionadas, é possível isolar os genes dos anticorpos selecionados para caracterização futura e uso terapêutico. Nenhum anticorpo terapêutico desenvolvido por essa técnica foi aprovado ainda, entretanto ela tem gerado anticorpos promissores, principalmente, anticorpos neutralizantes de diferentes infecções virais, como a causada por HIV (Chiu & Gilliland, 2016; Medonza *et al.*, 2018).

Os imunofármacos têm importante impacto no tratamento eficiente de diferentes doenças, especialmente, doenças com maiores valores de mortalidade anual, como doenças cardíacas, cancer, doenças inflamatórias e infecções. A principal prova disso é o anticorpo monoclonal Adalimumabe (anti-TNF- α). Além disso, diversas pesquisas têm sido conduzidas para o aprimoramento das capacidades e segurança dos anticorpos monoclonais, como a modificação da estrutura típica de imunoglobulina, para gerar formatos inovadores com melhores competências (Grilo & Mantalaris, 2019; Lu *et al.*, 2020).

1.2.3 Engenharia de anticorpos

Com a tecnologia do DNA recombinante e os avanços da engenharia genética foi possível também a manipulação dos genes codificadores de anticorpos a fim de moldar a estrutura dos anticorpos monoclonais para torná-los mais convenientes para uma finalidade específica, sem perder a afinidade. As estratégias destinadas ao estudo e desenvolvimento de anticorpos com estruturas inovadores configuram a engenharia de anticorpos. Além de viabilizar a alteração da estrutura para diminuir a imunogenicidade ou para evitar alguma

resposta não desejada, como a reação de ADE, a engenharia de anticorpos permitiu criar formatos inovadores para impulsionar o efeito terapêutico, como a conjugação de toxinas ao anticorpo visando a destruição de células específicas (como células cancerígenas), ou a formação de anticorpos biespecíficos, com cada um dos paratopos específico para um epitopo diferente, explorando novas formas de atuação na resolução da doença. Alguns desses novos anticorpos já foram aprovados para tratamento (**Tabela 1**) (Chiu *et al.*, 2019; Labrijn *et al.*, 2019).

Foi possível também a construção de fragmentos de anticorpos, em que algumas porções da imunoglobulina original são removidas, para facilitar o processo de produção ou amplificar os efeitos biológicos. Por exemplo, é possível produzir anticorpos que contêm apenas a porção Fab ou ainda anticorpos com apenas os domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, ligados por um peptídeo conector (*linker*), que são produzidos na forma de uma única cadeia de proteína (scFv, do inglês *single chain variable-fragment*) (**Figura 3**). Esses anticorpos possuem um tempo de vida menor do que anticorpos normais, o que pode ser interessante dependendo da proposta de terapia; conseguem penetrar mais rapidamente em tecidos biológicos e barreiras celulares, têm a capacidade maior de penetração em estruturas antigênicas complexas, carecem da porção Fc, que pode ser importante por exemplo na neutralização de infecções virais; e facilitam o processo de produção. Anticorpos inteiros geralmente são expressos em cultura de células eucariotas, principalmente em células de mamíferos, pois essas moléculas exigem uma maquinária celular complexa para a realização das modificações pós-traducionais necessárias para o enovelamento correto delas. Entretanto os fragmentos de anticorpos Fab e scFv permitem a produção em células procaríotas, pois são estruturas mais simples que não necessitam de uma maquinaria de produção celular complexa. Tal característica facilita o processo de expressão heteróloga, permitindo resultados mais rápidos e em maior quantidade na produção (Bagheri *et al.*, 2017; Goulet & Atkins, 2019; Diebolder *et al.*, 2020).

Outro formato que tem ganhado grande destaque é o formato derivado do scFv, o FvFc, em que dois scFv são ligados a um Fc, permitindo explorar algumas características do scFv e permanecendo a função efetora do anticorpo dependente de Fc (**Figura 3**), quando essa função é necessária para a imunoterapia, como anticorpos cuja ação biológica envolve respostas imunes de ADCC e CDC. Assim como o scFv, e diferente do Fab e Ig inteira, ele é uma construção monocistônica, mas que permanece a característica de dimerização. Alguns outros formatos envolvem a utilização de apenas o domínio variável da cadeia pesada, VH, ligado a

porção Fc ou não (*nanobodies*) (Weiss & Verrips, 2019; Chiu *et al.*, 2019; Jovčevska & Muyldermans, 2019).

Assim, a manipulação dos genes de imunoglobulinas permitiu superar problemas encontrados na utilização de alguns anticorpos monoclonais, aumentar as capacidades terapêuticas deles e permitiu novas estratégias de desenvolvimento e produção de imunofármacos, como a expressão heteróloga em células bacterianas.

1.2.4 Sistemas de expressão de anticorpos

Anticorpos podem ser produzidos em diferentes sistemas de expressão heteróloga e a escolha do sistema depende da finalidade proposta para ao anticorpo e a estrutura dele pretendida (anticorpo inteiro, FvFc e outros fragmentos de anticorpos). Além da aplicação e do formato, outros fatores da produção influenciam na escolha, como produtividade, facilidade de expressão, enovelamento correto da molécula proteica, metodologias de purificação e custo da produção (Maranhão *et al.*, 2015).

As células de mamíferos são as mais utilizadas para anticorpos terapêuticos, pois diminuem os efeitos de imunogenicidade pela proximidade genética, e possibilitam a produção de formatos maiores e que exigem modificações pós-traducionais, como a adição de glicanos. Entretanto a produção em células de mamíferos possui complexidade no cultivo das células, necessidade de grande quantidade do vetor de expressão, dificuldades no estabelecimento de expressão adequada nas culturas e exige grandes custos para gerar um rendimento de produção suficiente. Outras alternativas da produção de anticorpos, permanecendo a capacidade de enovelamento correto, com as modificações pós-traducionais, são a expressão em células vegetais e de inseto e a utilização de animais transgênicos, como cabras. Todavia, limitações são encontradas nesses sistemas tal como dificuldades na transfecção ou transformação das células, dobramento incorreto das proteínas e diferenças no padrão de adição de modificações pós-traducionais (Hunter *et al.*, 2019; Satheeshkumar, 2020).

As células de leveduras surgiram como uma alternativa bastante eficaz na produção de anticorpos por consistirem de um sistema simples de expressão, com facilidades no cultivo e na manipulação genética, com uma maquinaria celular complexa, permitindo modificações como glicosilação, e com altos níveis de rendimento de produção com baixos gastos no processo. Pelas características da atividade celular, é possível também o processamento eficiente de peptídeo sinal e da proteína heteróloga, aumentando os níveis de secreção e de solubilidade dos anticorpos. Entre as células mais utilizadas para a expressão de anticorpos, as

mais bem estabelecidas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Contudo, há desvantagens como a alta proteólise devido à secreção de proteases no sobrenadante e as diferenças no processamento pós-traducional em comparação com o de células de mamífero (Ayyar *et al.*, 2017; Liu & Huang, 2018).

As células bacterianas são um sistema de expressão vantajoso de anticorpos cujo formato não exige um processamento proteico complexo, como scFv, principalmente na triagem inicial de anticorpos. Isso porque essas células possuem a capacidade de produzir em grande quantidade, uma grande capacidade replicativa, condições de cultivo simples, técnicas de manipulação e modificação bem estabelecidas e requerem quantidades mínimas de DNA. Além disso, propiciam uma metodologia de expressão mais rápida e mais flexível, acelerando o processo de desenvolvimento de anticorpos monoclonais, com os menores custos, e permitindo facilmente muitas modificações no processo de produção, como alteração de temperatura e escala de produção. Entretanto, também há problemas com degradação e agregação proteica, que diminuem a quantidade de proteína correta e solúvel (Gupta & Shukla, 2016; Liu *et al.*, 2019).

1.2.5 Expressão de anticorpos em bactérias

Para a transcrição e tradução corretas do anticorpo, independente de qual sistema de expressão escolhido, é necessário que o gene do anticorpo seja colocado em um contexto de transcrição adequado, com promotores e outras sequências regulatórias, marca de seleção e vetores propícios. Entre alguns vetores de expressão empregados na produção em células bacterianas, há os vetores pET, que contêm os genes de anticorpos inseridos após o promotor do fago T7 cuja RNA-polimerase gera altos níveis de transcrição. A expressão com esses vetores exige a utilização da linhagem compatível a eles, DE3 (*Escherichia coli*), que contém em seu genoma o gene da RNA-polimerase do fago T7 sob regulação do promotor *lacUV5*. Desse modo, é possível regular a expressão das proteínas heterólogas, pela adição ou não de um indutor do *operon lac*, como alolactose ou IPTG (Kuipers *et al.*, 2017; Studier, 2018; Angius *et al.*, 2018)

Embora a expressão com células DE3 gera altos níveis de produção, a expressão em grande quantidade pode ser tóxica a células, especialmente a expressão de anticorpos. Para reduzir esse problema, foram desenvolvidas linhagens celulares, *pLys E*, que contém um plasmídeo adicional *pLys*, que sintetiza uma lisozima bifuncional, que atua diminuindo a transcrição de genes transcritos pela RNA-polimerase T7, interferindo na etapa de iniciação da transcrição. Entretanto o uso de uma lisozima também pode impactar no cultivo das células,

pois a enzima atua também na degradação da parede celular. Para contornar essa característica, outras linhagens celulares foram desenvolvidas, como a *pLys S*, que expressa baixo nível de lisozima, e a *pLys Y*, na qual a função da lisozima de quebra das ligações da parede celular foi deletada (Rosano & Cecarelli, 2014; Kuipers *et al.*, 2017; Borkotoky & Murali, 2017)

Pensando na redução da degradação e agregação proteica, problemas frequentes na produção com células bacterianas, algumas alternativas foram criadas. A linhagem bacteriana *BL21* é deficiente nas principais proteases celulares, oferecendo um sistema com menor possibilidade de degradação de proteínas heterólogas. A linhagem *Shuffle*, derivada da *BL21*, sofreu uma série de modificações adicionais em seu proteoma para apresentar um citoplasma mais oxidante, que favorece o enovelamento de proteínas com ligações dissulfetos, como anticorpos (Liu & Huang, 2018; Rosano *et al.*, 2019).

Além do desenvolvimento de linhagens mais propícias à expressão de anticorpo em bactérias, o desenho do cassete de expressão com peptídeos ou proteínas adicionais tem gerado melhorias no rendimento de produção. O vetor pET-SUMO traz a inovação do uso da proteína SUMO adicionada a proteínas heterólogas como uma sequência etiqueta (*tag*). A proteína modificadora tipo ubiquitina SUMO (do inglês, *small ubiquitin-like modifier*) atua em diferentes processos celulares de organismos eucariotos, como regulação transcricional, ciclo celular e transporte de proteínas, e na engenharia genética, tem a função de auxiliar o processo de enovelamento de proteínas heterólogas, aumentar a solubilidade e melhorar a estabilidade delas, permitindo maiores níveis de expressão correta na forma solúvel. A SUMO é mais vantajosa do que outras *tag* de solubilidade como a Tioredoxina e MPB (*Maltose binding protein*), pois a remoção dela só ocorre por meio da ação de uma protease específica, as SUMO proteases, o que evita a clivagem inespecífica de proteína heteróloga em tratamentos pós-expressão e a clivagem não desejada por proteases presente na células bacterianas, que frequentemente ocorre em culturas com algumas linhagens, como *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2018; Heinrich *et al.*, 2019; Ryu *et al.*, 2020).

Outro incremento na produção de anticorpos em bactérias é o uso de peptídeos sinais que direciona a secreção das proteínas para o espaço periplasmático, ambiente oxidante situado entre as membranas externa e interna de bactérias Gram-negativas, o qual contém moléculas, semelhantes a chaperonas, que auxiliam no dobramento proteico. Isso permite o aumento da concentração da proteína na forma solúvel. Porém, muitos trabalhos têm mostrado que a eficiência desse transporte em bactérias gram-negativas é baixa, resultando na diminuição da disponibilidade de proteína solúvel, porque mesmo que uma alta quantidade de anticorpo é

gerada na célula, a capacidade de migração para o periplasma esbarra na capacidade dos canais proteicos da membrana plasmática de proceder esse trânsito (Liu & Huang, 2018).

Muitas inovações biotecnológicas e linhagens celulares foram desenvolvidas para melhorar a expressão de anticorpos nos diferentes sistemas de expressão, superando as limitações encontradas em cada uma delas. O resultado delas foi a melhoria e a aceleração do processo de produção que têm permitido o desenvolvimento, em um curto prazo, de um grande número de anticorpos com diversas abordagens terapêuticas. Apesar do estabelecimento de metodologias de melhoria e protocolos padrões de produção, cada anticorpo têm uma sequência única de aminoácidos, resultando em problemas únicos durante a expressão heteróloga, e exigindo que a expressão seja otimizada para obter resultados adequados, independente de qual sistema de expressão adotado.

1.2.6 Anticorpos neutralizantes ao vírus Zika

Diversos anticorpos monoclonais com propriedade neutralizante da infecção por vírus Zika já foram descritos na literatura. Esses anticorpos são classificados, de acordo com os seus epitopos virais, que se encontram principalmente em um dos três domínios da glicoproteína E ou em estruturas tridimensionais formadas por dois desses domínios. O anticorpo Z006, específico ao Domínio III (DIII), apresenta valor de IC_{50} 13,3 μ M (IC_{50} - concentração em que se é observada metade da neutralização máxima) e foi isolado por *single cell* de células B de memória de pacientes que tiveram perfil neutralizante da infecção. Esse anticorpo apresentou ainda neutralização cruzada com DENV1, mas não com outros flavivírus. Embora o Z006 apresenta um dos melhores valores de ligação e neutralização já reportados, ele não foi capaz de neutralizar efetivamente a infecção *in vivo* (Keeffe *et al.*, 2018; Van Ronpay *et al.*, 2020), semelhante ao observado com outros anticorpos monoclonais (Wang *et al.*, 2016; Barba-spaeth *et al.*, 2016). Diferentemente desses anticorpos, ZV-67, um anticorpo murino específico ao DIII, e ZKA 190, anticorpos humanos anti-DIII, apresentaram valores de IC_{50} 0,95 η M e 80 μ M, respectivamente, e tiveram eficácias *in vivo* (Zhao *et al.*, 2016; Settler *et al.*, 2016; Esquivel *et al.*, 2019). Nenhum anticorpo específico ao domínio I, já desenvolvido, foi capaz de neutralizar ZIKV (Dai *et al.*, 2018).

Anticorpos, de origem murina ou humana, específicos ao *loop* de fusão, no Domínio II, um antígeno altamente conservado, são os principais responsáveis pela neutralização cruzada de flavivírus. Entretanto esses anticorpos apresentam atividade neutralizante de baixa potência para vírus Zika, em comparação com os anticorpos neutralizantes específicos para outras regiões, com valores de IC_{50} acima de 1,5 μ M (Barba-spaeth *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2016). Uma

explicação para esse fato é que alguns desses anticorpos foram isolados de pacientes recuperados de infecção por YFV ou isolados por seleção *in vitro* a antígenos desse vírus, pelo qual apresentaram importante perfil neutralizante, e já é bem estabelecido que embora o *loop* de fusão é conservado entre os flavivírus, o grau de exposição e a conformação dele varia, substancialmente, entre os diferentes vírus. Outra característica importante do *loop* de fusão é que, em pH neutro, ele apresenta pouca acessibilidade por causa de sua sobreposição por interfaces dos domínios I e III (Heinz & Stiasny, 2017). No entanto, o dinamismo do fenômeno de “respiração viral”, com alterações transientes da conformação viral, e a ligação de anticorpos monoclonais podem induzir modificações na estrutura da proteína E e conduzir à exposição do *loop* de fusão, mesmo em um contexto sem acidificação do pH. Além disso, os anticorpos podem ser endocitados juntamente com o vírus ou sozinhos, e podem inibir a fusão membranar na vesícula endocítica, necessária para completar o ciclo viral. Essas considerações podem explicar o fato de que anticorpos monoclonais anti-*loop* de fusão foram capazes de neutralizar eficientemente a infecção de ZIKV (2A10G6) e de YFV (5A) em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Dai *et al.*, 2016; Haslwanter *et al.*, 2017; Heinz & Stiasny, 2017; Agrelli *et al.*, 2019).

Alguns anticorpos neutralizantes só se ligam ao antígeno na conformação do envelope organizada em dímeros, isso por que os epitopos deles são dependentes do enovelamento nativo da proteína E, sendo que alguns deles não são capazes de ligar a proteína E recombinante e são caracterizados funcionalmente apenas em ensaios de neutralização. Esses anticorpos também, frequentemente, apresentam reação cruzada a alguns flavivirus, principalmente entre ZIKV e DENV. Mesmo assim, esse grupo apresenta alguns potentes anticorpos neutralizantes, como ZKV-117 (Stettler *et al.*, 2016; Hasan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017), embora apresentam também alguns anticorpos sem eficácia em ensaios *in vivo* (Barba-Spaeth *et al.*, 2016)

Uma grande dúvida sobre anticorpos monoclonais neutralizantes do vírus Zika é se esses anticorpos são capazes de proteger mulheres grávidas e proteger contra transmissão sexual e congênitas. Um estudo com macacos *Rhesus* grávidas mostrou que a administração profilática de dois anticorpos monoclonais neutralizantes, com modificações da porção Fc, em conjunto, foi capaz de limitar a transmissão vertical e de reduzir a carga viral, entretanto ainda foi detectada uma viremia alta nas mães e pequeno efeito patológico em tecidos fetais (Van Ronpay *et al.*, 2020). Outro experimento com macacos *Rhesus*, revelou que a administração profilática de vetores engenheirados para expressão *in vivo* de um anticorpo monoclonal, com Fc modificado, conseguiu, em 4 dos 5 macacos testados, reduzir a carga viral para níveis próximos de 100 cópias de RNA viral/mL e os danos patológicos, mesmo em concentrações baixas de

anticorpo (Esquivel *et al.*, 2019). Em ambos experimentos, não foi detectado reação de ADE pelos anticorpos. Em ensaios com camundongos grávidas, anticorpos monoclonais foram capazes de efetivamente evitar transmissão vertical e danos nos tecidos fetais relacionados aos vírus (Dai *et al.*, 2018).

Apesar dos resultados promissores dos anticorpos neutralizantes de proteger de forma eficaz contra a infecção por vírus Zika e outros Flavivirus, devido à taxa de mutação desses vírus, um *cocktail* de diferentes anticorpos monoclonais específicos a epítomos distintos é requerido para prevenir evasão viral. Além disso, a engenharia desses anticorpos pode impulsionar as suas capacidades neutralizantes (Dai *et al.*, 2018; Keefe *et al.*, 2018). Anticorpos neutralizantes podem ser modificados por engenharia genética para evitar a reação de ADE, como a remoção ou a modificações pontuais de resíduos na região Fc, para abolir a interação do anticorpo com FcR, tornando possível uma terapia mais segura. Além disso, a engenharia de anticorpos pode aumentar a capacidade de neutralização, como a construção de moléculas inovadoras, combinando, por exemplo, dois anticorpos neutralizantes em uma única estrutura (Wang *et al.*, 2017; Van Ronpay *et al.*, 2020).

1.3 PHAGE DISPLAY: APRESENTAÇÃO DE ANTICORPOS EM FAGOS

1.3.1 Bibliotecas de anticorpos e seleção

A tecnologia do *Phage Display* foi introduzida em 1985, quando George Smith mostrou que proteínas poderiam ser expressos na superfície de fagos filamentosos sem impedir a atividade infectante dos vírus e sem perder a atividade da proteína. Poucos anos depois, em 1990, McCafferty e colaboradores mostraram que também era possível apresentar fragmentos de anticorpos na superfície de fagos, de modo a permitir a ligação desses anticorpos a um antígeno específico. Explorando as características da infecção de células bacterianas pelos fagos e a apresentação de proteínas ligadas ao capsídeo viral, foi desenvolvido, por Gregory P. Winter, uma metodologia de geração de bibliotecas de fagos, expressando uma grande diversidade de anticorpos, e de seleção de anticorpos com afinidade a um antígeno de interesse (*panning*), “pescando” eles no mar de diversidade da biblioteca (Sioud, 2019; Mimmi *et al.*, 2019)

Tradicionalmente, no *Phage Display*, são utilizados fagos filamentosos pertencentes ao gênero *Inovirus*, que são vírus cujo genoma é uma molécula de DNA de cadeia simples e que infectam células bacterianas Gram-negativa, por meio da ligação ao *pilus* sexual (presente nas células portadoras do plasmídeo F). O vírus tem um formato cilíndrico longo com o genoma sendo envolvido por várias cópias da proteína VIII do capsídeo a qual se enrola na molécula de DNA. O capsídeo é formado também por cópias das proteínas III e VI em uma extremidade e pelas proteínas VII e IX na outra extremidade (**Figura 5**) (Ledsgaard *et al.*, 2018). O ciclo viral, que não é lítico, inicia pela interação da proteína III com a fímbria de conjugação da bactéria que resulta na internalização do genoma no citoplasma, onde o DNA viral serve como cópia para a síntese de uma fita complementar, resultando em uma molécula de DNA de fita dupla, no estágio *supercoiled*, que é a forma replicativa. Essa forma replicativa sofre transcrição, para a síntese das proteínas virais, e replicação por circo-rolante contínuo, coordenada pela proteína II até que se acumule uma quantidade de proteína V suficiente para converter a forma de dsDNA *supercoiled* em ssDNA circular. O DNA de fita simples ligado à proteína V, no final do ciclo celular, é transportado para a membrana plasmática (pelo peptídeo sinal) e atravessa-a, por extrusão. No periplasma, o DNA é envolvido pelas proteínas estruturais durante a montagem (coordenada pelas proteínas pI, pIV e pXI) da partícula viral que é liberada para o meio externo (**Figura 5**), sem lise celular (Ledsgaard *et al.*, 2018).

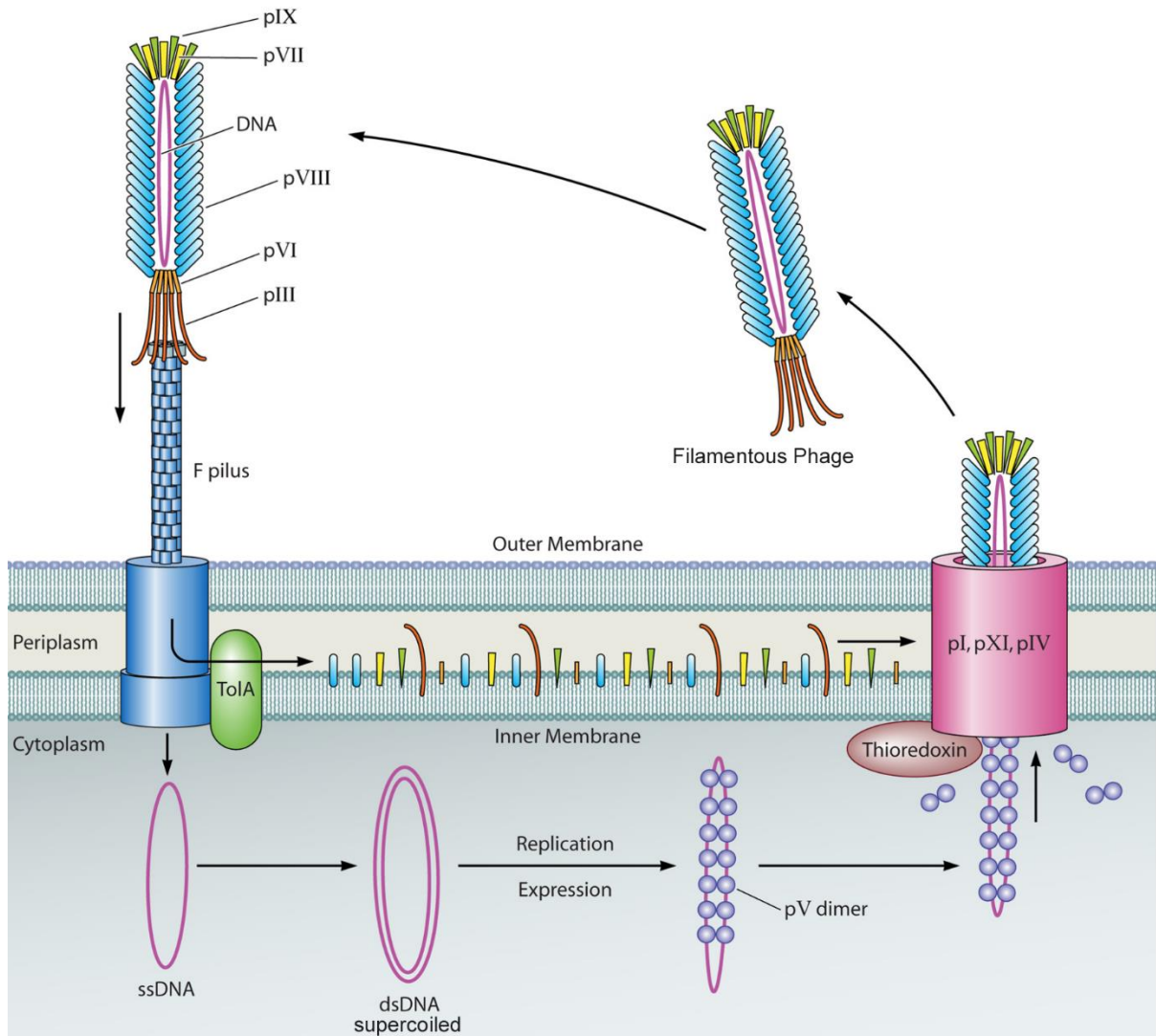


Figura 5. Ciclo viral dos fagos filamentosos. Representação de um fago filamentosos (*Filamentous Phage*) do gênero Inovirus com suas proteínas estruturais pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX. O ciclo viral, que não é lítico, incia com a ligação do vírus ao *pilus* sexual (F). O genoma, ssDNA (DNA de fita simples) é internalizado e serve como molde para a síntese de uma fita complementar, resultando em uma molécula de dsDNA (DNA de fita dupla) *supercoiled* que é a forma replicativa. Uma vez que há o acúmulo de pV suficiente, esta proteína se liga ao DNA convertendo-o em ssDNA, o qual atravessa a membrana plasmática e ocorre a montagem da partícula viral coordenada pelas proteínas pI, pXI e pIV. Modificado de: Huang *et al.*, 2012).

O trabalho desenvolvido por Smith, em 1985, foi mostrar que uma proteína poderia ser inserida no capsídeo, fusionada ao gene da proteína estrutural pIII, sem comprometer a função dela no processo de infecção e, ao mesmo tempo, permitindo que essa proteína exógena seja incorporada na montagem da partícula viral, de forma acessível ao reconhecimento molecular (era apresentada) (Ledsgaard *et al.*, 2018). As bibliotecas de anticorpos podem ser geradas a partir do isolamento do repertório imune de humanos, ou outros organismos, saudáveis ou que foram imunizados previamente. Os genes dos anticorpos isolados, por reação de PCR, são

fusionados ao gene de uma das proteínas do capsídeo viral. Principal e tradicionalmente, duas proteínas são usadas, a proteína III (pIII) e a proteína VIII (pVIII). A proteína VIII, por ter muitas cópias no capsídeo viral, permite a apresentação de mais proteínas, entretanto o grau de apresentação correta de proteínas grandes sem comprometer o vírus é baixo, por isso, a proteína III, originalmente utilizada por Smith, é geralmente a mais utilizada, embora novas abordagens têm permitido a apresentação de moléculas grandes fusionadas a pVIII (Woods, 2019; Ministro *et al.*, 2020).

Os genes dos anticorpos fusionados ao gene da proteína viral são clonados em um vetor apropriado para a produção das partículas de fagos de fusão em células bacterianas. Diversas estratégias têm sido geradas para a expressão das bibliotecas e uma delas, que tem permitido a manipulação eficiente dos genes virais, é o uso de fagomídeos. Fagomídeos são plasmídeos com a origem de replicação bacteriana, uma origem de replicação de fagos e uma sequência sinal de empacotamento do DNA de fita simples. Nesse sistema, as células são infectadas também com um fago *helper* que fornece todas as outras proteínas virais para a montagem do vírus e a replicação do DNA viral. A exigência do fago *helper* para completar o ciclo viral permite o controle da produção dos fagos apenas em momentos desejados sem impactar no rendimento da produção, pois o fago *helper* contém mutações que dificultam o empacotamento do seu próprio material genético, sendo assim, durante a montagem da partícula viral, o DNA proveniente do fagomídeo é revestido preferencialmente. Com os fagomídeos, existe a possibilidade da proteína de fusão se propagar na forma de plasmídeos permitindo abordagens diversas de seleção de anticorpos em fagos (Shim, 2017).

É possível também gerar bibliotecas de anticorpos totalmente sintética, por meio do desenho e incorporação de mutações em uma sequência de anticorpo original *in silico* ou pela introdução de mutações por PCR com DNA-polimerases de baixa fidelidade para a introdução de erros na sequência de DNA de anticorpos. As duas metodologias geram alteração randômica do paratopo e a criação de novos anticorpos, e com elas, é possível gerar bibliotecas com um maior número de anticorpos e alcançar níveis maiores de maturação de afinidade, resultando em anticorpos de altíssima afinidade ao antígeno (Almagro *et al.*, 2019; Sioud, 2019).

A biblioteca de fagos contendo, normalmente, mais de 10^9 anticorpos expressos em sua superfície são submetidos a ciclos de seleção de afinidade a um antígeno específico, em que a cada ciclo, a força de seleção (adstringência) é aumentada por diferentes métodos, de modo a permitir a maturação da afinidade dos anticorpos, em um processo de evolução molecular que pode ocorrer totalmente *in vitro* ou *in vivo*. Essa seleção artificial assemelha-se ao processo de

seleção de afinidade que ocorre no centro germinal durante a progressão da resposta T-dependente e resulta, a cada ciclo, em anticorpos com maior afinidade ao antígeno. Diferentes abordagens de seleção podem ser usadas para selecionar os anticorpos, usando o antígeno imobilizado, extratos celulares, células inteiras e organismos vivos, em diferentes protocolos de isolamento de anticorpos específicos e remoção de anticorpos não específicos (Alfaleh *et al.*, 2017; Hemadou *et al.*, 2018; Bashir & Paeshuyse, 2020).

Em cada ciclo de seleção, os fagos são incubados com o antígeno de interesse em plataformas diversas. Os fagos não ligantes são removidos por lavagem e os fagos ligantes, que permanecem após as lavagens, são eluídos, por metodologias distintas, e amplificados pela infecção de uma cultura de células bacterianas para a realização de um novo ciclo. Ciclos contínuos de seleção/amplificação são realizados, e os anticorpos selecionados são enriquecidos ao longo dos ciclos, ou seja, a frequência deles aumenta na população, ao mesmo tempo que a frequência dos anticorpos não ligantes ou de baixa afinidade diminui, reduzindo a diversidade da biblioteca selecionada. Ao final da seleção, uma análise do progresso dela e dos anticorpos enriquecidos é realizada pela avaliação da atividade desses anticorpos ou pelo sequenciamento das populações selecionadas (Aghebati-Maleki *et al.*, 2016; Smith, 2019; Xu *et al.*, 2020).

O *Phage Display* tem grande impacto no desenvolvimento de anticorpos porque propicia a obtenção de anticorpos totalmente humanos e se destaca de outras técnicas que também geram anticorpos humanos, porque permite uma seleção, mais simples, mais rápida e de maior controle, de anticorpos contra todos os tipos de antígenos, mesmo aqueles de grande complexidade, antígenos próprios ou não imunogênicos, já que também pode ser realizado sem a imunização prévia de um organismo. Além disso, ela possibilita a otimização dos anticorpos monoclonais, por exemplo, pela maturação da afinidade por mutagênese, resultando em anticorpos de alta afinidade (Kumar *et al.*, 2019). Diferentes anticorpos terapêuticos, obtidos por *Phage Display*, já tiveram seu uso aprovados na clínica (**Tabela 1**).

1.3.2 Etapas pós seleção

Durante a etapa de *panning*, é possível monitorar o enriquecimento dos anticorpos, por meio da mensuração dos títulos de fagos que entram na seleção e os títulos de fagos que são eluídos, avaliando a razão de enriquecimento a cada ciclo de seleção, e por meio da análise da variação da diversidade ao longo da seleção, por diferentes abordagens. Espera-se que em um experimento de seleção, haja uma redução da diversidade de anticorpos à medida que os anticorpos de maior afinidade são enriquecidos. O acompanhamento do enriquecimento fornece a segurança de que a seleção foi procedida eficientemente e é seguido pela análise do progresso

da seleção e pela identificação dos anticorpos que apresentam maior afinidade ao antígeno alvo (Frei & Lai, 2016; Frenzel *et.al.*, 2017).

Ao longo das décadas, foram reportadas diferentes maneiras de analisar a seleção, dependendo do sistema de seleção empregado, da biblioteca de anticorpos utilizada e do antígeno de interesse. Entretanto, dois métodos destacam-se pela qualidade dos resultados que oferecem: uma análise monoclonal de uma amostragem dos anticorpos selecionados e uma análise policlonal das sequências de toda a população de anticorpos.

A partir da população de fagos selecionados ou usando culturas dos anticorpos selecionados solúveis, é avaliada a ligação específica de clones individuais ao antígeno imobilizado em um ensaio de ELISA. Nesse ELISA monoclonal, a ligação de 30 a 100, ou mais, clones escolhidos ao acaso é comparada entre si e com um controle negativo, e aqueles fagos com os maiores valores de absorvância são considerados os que apresentam funcionalmente, em sua superfície, anticorpos de maior afinidade. Os clones positivos para a análise de ligação são submetidos a uma reação de sequenciamento do tipo Sanger, para determinar as sequências dos anticorpos de maior afinidade. (Bagheri *et al.*, 2017; Fahimi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). Nesse tipo de análise de *Phage Display*, investiga-se o fenótipo, atividade, dos anticorpos e depois se determina o genótipo deles. A desvantagem dessa forma de análise é que ela não permite explorar a população de anticorpos em profundidade, vendo apenas uma pequena parcela da população de clones, o qual pode não incluir todos anticorpos de maior afinidade, além disso limita a análise, não possibilitando a visão completa da diversidade da biblioteca ao longo da seleção, nem o estudo da magnitude da seleção e do enriquecimento (Noh *et al.*, 2019).

Sequenciamento de alto rendimento fornece uma ferramenta de análise rápida da seleção e de identificação direta dos anticorpos mais enriquecidos, com maior afinidade, sem necessitar de uma etapa de expressão deles. Além da rapidez na análise, é possível estudar, com alta resolução, a biblioteca de anticorpos antes da seleção e toda a população de anticorpos com capacidade de ligar ao antígeno alvo em cada ciclo, investigando a diversidade original da biblioteca, identificando todos os anticorpos que enriqueceram, os mais enriquecidos e os raros na população, e determinando a proporção de aumento da frequência deles ao longo de toda a seleção. Isso é possível, porque são utilizadas tecnologias de sequenciamento, denominadas de sequenciamento de nova geração, NGS (do inglês *Next-Generation sequencing*), as quais permitem sequenciar um grande número de sequências, na ordem de milhões, em uma mesma reação de sequenciamento (Christiansen, 2015; Barreto *et al.*, 2019). A interpretação dos

resultados de NGS de bibliotecas de anticorpos de *Phage Display* exige o uso de uma ferramenta de bioinformática especializada em calcular o enriquecimento de domínios variáveis em uma seleção de *Phage Display*. Diferentes ferramentas para essa finalidade são descritas na literatura, como o recente pipeline ATTILA (Maranhão *et al.*, 2020).

Apesar de propiciar a avaliação de todos os anticorpos em todos os ciclos de forma profunda, dois grandes problemas advêm na análise de biopanning por sequenciamento. O primeiro corresponde ao ruído encontrado nas sequências finais identificadas resultante do processo de sequenciamento ou da reação de amplificação dos genes. Entretanto pipelines mais precisos de isolamento de bibliotecas de DNA para sequenciamento e programas de análise bioinformática mais poderosos têm sido produzidos para superar os artefatos introduzidos por erros de PCR e sequenciamento. O segundo trata-se da limitação da metodologia de sequenciamento de alta performance, que embora permite o sequenciamento de milhões de sequências, só consegue ler, adequadamente, até 400 pares de base. Portanto, essa análise exige que os domínios variáveis da cadeia pesada e leve dos anticorpos, cujo tamanho varia de 300 a 400 pares de base, sejam amplificados e sequenciados separadamente, resultando na perda do par VH e VL dos anticorpos mais enriquecidos.

Desse modo, após a identificação dos domínios variáveis que aumentaram em frequência, é necessária uma estratégia para combiná-los a fim de recuperar os paratopos de maior afinidade ao antígeno de interesse para a expressão e caracterização futura dos anticorpos. Recentemente, estudos têm sido realizados para fornecer um método de sequenciamento sem perder o par VH e VL dos anticorpos. Na análise do processo de seleção por sequenciamento de alto rendimento, determina-se primeiro o genótipo dos anticorpos e depois se caracteriza o fenótipo deles (Turner *et al.*, 2016; Hemadou *et al.*, 2017; Noh *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por vírus Zika pode levar a complicações clínicas graves, como a doença autoimune, Síndrome de Guillain-Barré, e a Síndrome Congênita do vírus Zika, em infecções de grávidas, em que ocorre anormalidades no sistema nervoso central e periférico de fetos e recém-nascidos, como microcefalia severa, problemas oculares, epilepsia, artrogripose e anormalias motoras. Além disso, a possibilidade de reação de ADE, que amplifica a infecção viral e conduz ao aparecimento de sintomas mais graves tanto em infecções com ZIKV, quanto em infecções por outros Flavivirus, aumenta a preocupação com essas doenças. Apesar de ser um problema de saúde pública mundial, ainda não existem vacinas e tratamentos específicos aprovados. Ademais, o sucesso das abordagens, profiláticas e terapêuticas em desenvolvimento, é dificultado principalmente por causa da reação de ADE e dos mecanismos de evasão da resposta imune, como mutações nas regiões alvos de reconhecimento imune e alterações conformacionais. Dessa forma, o desenvolvimento de terapias eficientes se faz necessária para o controle de doenças por Flavivirus (Heinz & Stiasny, 2017; Pierson & Diamond, 2018; Nelson *et al.*, 2020).

Anticorpos monoclonais são uma relevante alternativa para o tratamento de infecções, em razão de sua alta afinidade e especificidade única ao antígeno viral, e dos mecanismos de neutralização exercidos por eles que conduzem, competentemente, ao bloqueio do ciclo viral, a neutralização de fatores de virulência e a amplificação de respostas imunes antivirais. Além disso, dois outros fatores destacam a importância dos anticorpos monoclonais: as características da imunização passiva que pode levar a transferência vertical da imunoproteção, a efeitos profiláticos e a proteção cruzada; e a possibilidade de modelar as suas estruturas para aumentar a sua segurança farmacológica ou para impulsionar sua estabilidade e suas habilidades de ligação e de neutralização (Pelegrin *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2020). Entre os métodos de obtenção de anticorpos monoclonais, o *Phage Display* se destaca por ser uma tecnologia que permite, em um processo de evolução molecular, a seleção mais rápida e mais fácil de anticorpos totalmente humanos e de grande afinidade contra antígenos diversos, mesmo antígenos não imunogênicos ou tóxicos, em abordagens diversas, com maior facilidade para engenheirar a estrutura para alcançar formatos mais adequados dependendo da finalidade pretendida (Kumar *et al.*, 2019).

Na proposta de desenvolvimento de anticorpos terapêuticos, a escolha do antígeno e do formato do anticorpo é fundamental para atingir os objetivos definidos. O *loop* de fusão do

domínio II da proteína E de Flavivirus é um antígeno candidato, devido ao seu papel no processo de infecção e por ser a região mais conservada entre os Flavivirus, com alto grau de identidade em seus genomas (Stiasny & Heinz, 2006; Sihori *et al.*, 2016). Anticorpos recombinantes do tipo fragmento variável de cadeia única, scFv, específicos ao *loop* de fusão podem ser uma alternativa eficiente para ingressar na terapia da infecção de ZIKV e outros Flavivirus, devido à sua maior capacidade de explorar epítomos virais estruturalmente restritos (Goulet & Atkins, 2019), como o FL, e devido à sua ausência de Fc, que evita a reação de ADE.

Nesse contexto, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos com formatos inovadores, específicos ao FL, e com potencial neutralizante pode configurar uma abordagem terapêutica relevante, segura e mais eficaz que pode controlar a infecção do vírus Zika e, cruzadamente, de outros Flavivirus, reduzindo a possibilidade de reações não desejadas, modelando de forma benéfica as respostas imunes do hospedeiro e superando outras dificuldades encontradas no enfrentamento de seus mecanismos de patogenicidade.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter anticorpos monoclonais humanos específicos ao *loop* de fusão do envelope de Flavivirus e caracterizar a sua ligação ao antígeno viral e a sua capacidade de neutralização da infecção pelo vírus Zika.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar anticorpos humanos com afinidade ao *loop* de fusão por meio da tecnologia do *Phage Display*, usando duas estratégias de seleção e uma análise moderna de alta profundidade;
- Produzir e purificar os anticorpos selecionados, em formatos convenientes e em um contexto de expressão adequado e proficiente;
- Avaliar a ligação dos anticorpos recombinantes ao antígeno viral usado na seleção e à partícula do vírus Zika;
- Avaliar o potencial dos anticorpos de neutralizar a infecção por vírus Zika em células suscetíveis.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A figura 6 representa todas as etapas realizadas para o desenvolvimento e caracterização de anticorpos recombinantes específicos ao vírus Zika.

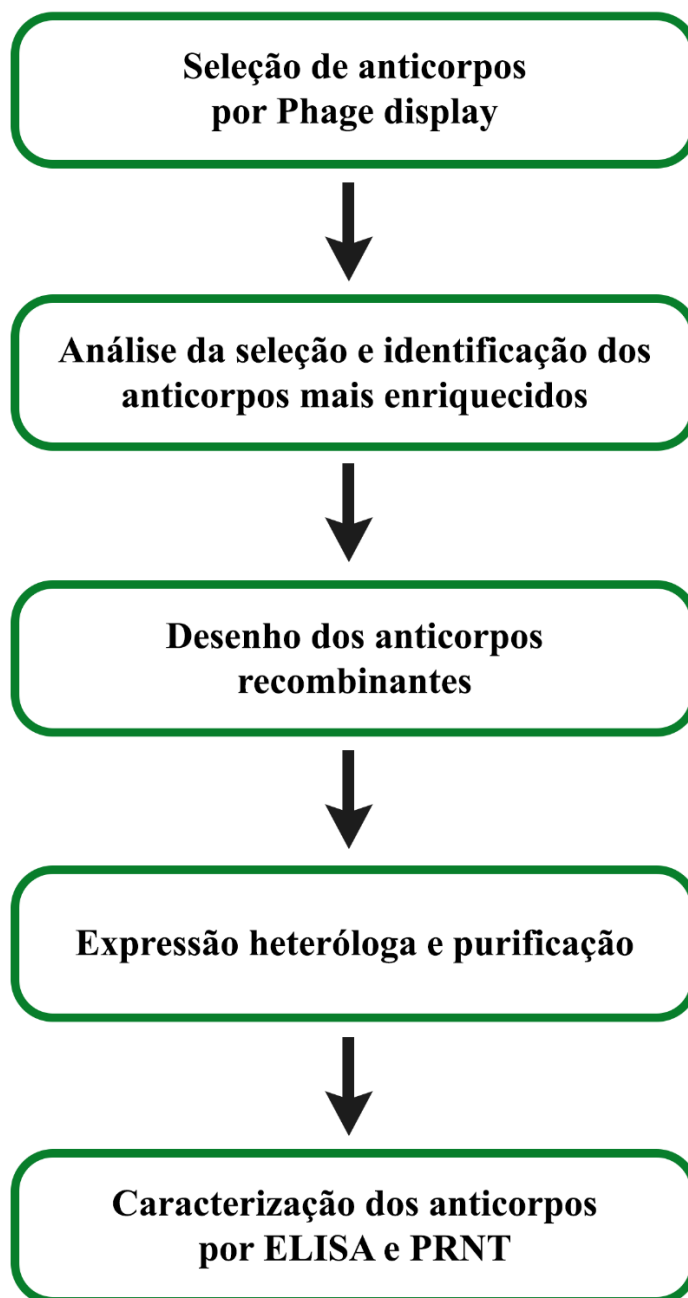


Figura 6. Esquema das etapas metodológicas seguidas, nesse trabalho, para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-vírus Zika.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LINHAGENS CELULARES E VIRAIS

Células de *Escherichia coli* linhagem *XLI-BLUE MRF'* (Stratagene, California, EUA, cat: 200230), com resistência a tetraciclina, foram crescidas para os experimentos de transformação, transfecção e extração de DNA plasmidial. Células de *Escherichia coli* linhagem *Shuffle pLys Y* (New England Biolabs, Ipswich, EUA, cat: C3030J) e linhagem *BL21 pLys S* (Promega, Madison, EUA, cat: L119B) compatíveis a vetores pET (DE3), foram cultivadas, para a expressão dos anticorpos recombinantes.

Células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) linhagem *Vero* foram cultivadas para os ensaios de neutralização por redução de placas (PRNT) com os anticorpos recombinantes. Vírus Zika linhagem asiática PE243 (GenBank [MF352141](#)) foi utilizado para os ensaios de imunoabsorção enzimática, ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e para os ensaios de neutralização.

5.2 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES

Uma colônia isolada de *XLI-BLUE MRF'* foi inoculada em 5 ml de meio SB (Peptona bacteriológica 3%, Extrato de Levedura 2%, MOPS 1%, pH 7,0) com 10 µg/mL tetraciclina, e a cultura foi incubada durante à noite a 250 rpm e 37 °C. 0,5 mL dessa cultura foi inoculado em 500 mL de meio SB contendo 2,5 mL de solução estoque de glicose 2 M e 2,5 mL de solução estoque de Mg 2 M (MgCl₂ 1 M e MgSO₄ 1 M). O inóculo foi incubado, a 250 rpm e 37 °C, até atingir uma densidade óptica (D.O.) a 600 nm de 0,7 a 0,9 (meio da fase exponencial). A partir desse ponto, tomou-se o cuidado de resfriar a cultura e todas as soluções e materiais utilizados. As células foram centrifugadas a 3000 \times g e 4 °C por 20 min e, em seguida, foram ressuspendidas em 100 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e centrifugadas novamente a 3000 \times g e 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento foi repetido mais duas vezes, uma segunda vez com 100 ml de glicerol 10%, e uma terceira vez com 25 ml de glicerol 10%. Ao final, as células foram ressuspendidas para uma densidade óptica a 600 nm de 250 a 280, com glicerol 10%. As células eletrocompetentes foram aliqüotadas em amostras de 120 µL e congeladas em banho de álcool/gelo seco e mantidas a -80 °C.

5.3 TRANSFORMAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA

Células *XLI-BLUE MRF'* eletrocompetentes (eficiência de $\sim 1 \times 10^9$ CFU/ μ g) foram transformadas por eletroporação com uma biblioteca pComb3XSS de *Phage Display*, contendo genes de fragmentos de anticorpos humanos no formato Fab fusionados ao gene da proteína III do capsídeo de fagos (**Figura 7**), de tamanho estimado de $1,7 \times 10^8$ formas diferentes, gerada a partir de células B de sangue periférico de humanos (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005). Foram conduzidos 5 choques elétricos, usando, em cada um deles, 100 μ L de células previamente incubadas com 1 μ L da biblioteca. A eletroporação foi realizada com cubetas elétricas de 0,2 cm e com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV; 25 μ F e 200 Ω . Imediatamente após o choque elétrico, a cubeta foi lavada com 3 mL de meio SOC (Bactotriptona 2%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,06%, KCl 0,02%, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, pH 7,0) e os 15 mL finais foram juntados e incubados a 250 rpm e 37 °C, por 1,5 h. Aos 15 mL de células transformadas, foram adicionados 35 mL de meio SB pré-aquecido (37 °C), contendo 10 μ L de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL, 100 μ L de solução estoque de tetraciclina 5 mg/mL e 1 mL de solução estoque de glicose 50%, e a cultura foi incubada a 300 rpm e 37 °C, por 1 h. Em seguida, 15 μ L de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL foram adicionados e a cultura foi incubada a 300 rpm e 37 °C, por mais 1 h.

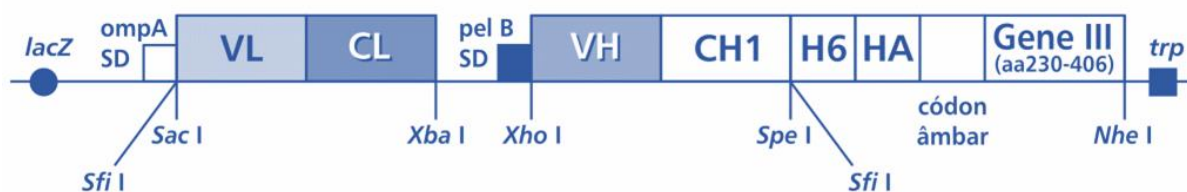


Figura 7. Cassete de expressão de Fab no vetor de Phage Display. Cassete de expressão de Fabs, fusionados ao gene III do fago filamentoso M13, contido no fagomídeo pComb3XSSFab utilizado na seleção do *Phage Display*. H6 e HA correspondem à sequência de seis histidinas e à sequência dos aminoácidos 98 a 106 da proteína hemaglutinina, respectivamente. O códon âmbar é um códon de terminação (UAG). Adaptado de Dantas-Barbosa, 2004.

Dois mL de fago *helper* VCSM13 (10^{12} a 10^{13} pfu/mL) e 148 mL de meio SB pré-aquecido (37 °C), contendo 75 μ L de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL, 300 μ L de solução estoque de tetraciclina 5 mg/mL e 3 mL de solução estoque de glicose 50%; foram adicionados à cultura de células, a qual foi incubada, em seguida, a 300 rpm e 37 °C, por 1,5 h,

para a geração da biblioteca de anticorpos expressos na superfície de fagos. Posteriormente, 280 μL de solução estoque de kanamicina 50 mg/mL foram adicionados e a cultura foi incubada a 300 rpm e 37 °C, durante à noite.

5.4 SELEÇÃO DE FAGOS

Uma placa de ELISA NUNC PoliSorp de fundo plano 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 456529) foi sensibilizada com 100 μL de Estreptavidina 95 ηM (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 21122) em TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) a 37 °C, por 1 h, e em seguida, a placa foi lavada três vezes com 200 μL de TBST (TBS com 0,1% de *Tween-20*) e 100 μL de antígeno viral 1,7 μM (*loop* de fusão do Vírus Zika conjugado a uma molécula de biotina) em TBS foram adicionados. A placa foi incubada a 37 °C, por 1 h, e depois lavada três vezes com 200 μL de TBST. O bloqueio foi realizado com 150 μL de albumina sérica bovina 1 % (Bovine Serum Albumin – BSA) (SigmaAldrich, St. Louis, EUA) em PBST 3% em TBS a 4 °C, durante à noite.

A cultura de fagos de fusão foi centrifugada a 3000 $\times g$ e 4 °C por 15 min. Os fagos contidos no sobrenadante foram precipitados por meio da adição de 8 g de PEG-8000 e 6 g de NaCl e do agitação a 300 rpm e 37 °C por 5 min, e em seguida, a mistura foi incubada no gelo por 30 min. O sistema foi centrifugado a 15000 $\times g$ e 4 °C por 15 min. Os fagos foram ressuspensos com 2 mL de solução de BSA 1% em TBS e 100 μL da solução de fagos amplificados e ressuspensos (*input*) foram adicionados, em duplicata, à placa de ELISA. A placa foi incubada a 37 °C por 1,5 h.

Os fagos não ligantes foram removidos com um número de lavagens variável (5 no primeiro ciclo de seleção, 10 no segundo ciclo e 15 nos terceiro e quarto ciclos) com 200 μL de TBST, realizando em cada lavagem, 5 pipetagens vigorosas (*up/down*) e uma incubação de 5 min. Os fagos ligantes foram eluídos (*output*) por meio de duas estratégias de eluição: uma, usando 100 μL de solução de Glicina-HCl 100 mM pH 2,2, neutralizada, em seguida, com 6 μL de solução neutralizante (Tris-base 2 M); e outra, usando uma solução de 100 μL do mesmo peptídeo viral (2,7 μM), mas sem biotina. Ambas eluições foram feitas em duplicatas, e com uma incubação da solução de eluição por 10 min, seguida de 10 pipetagens vigorosas (*up/down*).

Para reamplificar os fagos eluídos (*output*) e realizar um novo ciclo de seleção, 2 mL de uma cultura de *XLI-BLUE* com densidade óptica a 600 nm de 1,0 foram infectados com 100

μL de fagos eluídos por 15 min à temperatura ambiente. As células infectadas foram adicionadas a 6 mL de meio SB pré-aquecido (37 °C), contendo 1,6 μL de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL, 12 μL de solução estoque de tetraciclina 5 mg/mL e 160 μL de solução estoque de glicose 50%, e incubadas por 1 h a 300 rpm e 37 °C. Em seguida, 2,4 μL de carbenicilina 100 mg/mL foram adicionados e seguiu-se a 300 rpm e 37 °C, por mais 1 h.

92 mL de meio SB pré-aquecido (37 °C), contendo 1 mL de fago *helper* VCSM13 (10^{12} a 10^{13} pfu/mL), 46 μL de solução estoque de carbenicilina 100 mg/mL, 184 μL de solução estoque de tetraciclina 5 mg/mL e 2 mL de solução estoque de glicose 50%; foram adicionadas à cultura de células que foi incubada, em seguida, a 300 rpm e 37 °C por 1,5 h. Posteriormente, 140 μL de solução estoque de Kanamicina 50 mg/mL foram adicionados e a cultura foi crescida a 300 rpm e 37 °C, durante à noite.

No dia seguinte, a cultura de fagos amplificados foi centrifugada a $3000 \times g$ e 4 °C, por 15 min. A precipitação dos fagos foi realizada como descrito anteriormente, mas usando 6 g de PEG-8000 e 3g de NaCl e os fagos foram ressuspensos com 1 mL de solução de BSA 1% em TBS e 100 μL da solução de fagos aplicados (*input*) foram adicionados à placa de ELISA, sensibilizada e bloqueada previamente como descrito anteriormente, para a realização de um novo ciclo de seleção. Repetiu-se esse procedimento de seleção (ligação e reamplificação) ao longo de 4 ciclos.

5.5 TITULAÇÃO DE FAGOS

Para cada ciclo de seleção, 2 mL de células de *XLI-BLUE MRF'*, a uma densidade óptica (D.O.) a 600 nm de 1,0; foram infectados com 100 μL de fagos eluídos à temperatura ambiente por 15 min. Após esse tempo, 100 μL de diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} das células infectadas foram plaqueadas em meio LB ágar (Peptona bacteriológica 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, Ágar 1,5%, pH 7,0) contendo carbenicilina e glicose para concentrações finais de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1%, respectivamente, a fim de titular os fagos eluídos (*output*). As placas foram incubadas a 37 °C, durante à noite.

Para cada ciclo de seleção, 100 μL de células (*XLI-BLUE MRF'* com D.O. a 600 nm de 1,0) foram infectadas, à temperatura ambiente, por 15 min; com diluições de 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} de fagos amplificados e ressuspensos (*input*). As células foram plaqueadas em meio LB ágar, nas mesmas condições anteriores, para titulação dos fagos amplificados. As placas foram incubadas a 37 °C, durante à noite.

5.6 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

5.6.1 Minipreparação

Extração de DNA plasmidial em pequena escala foi realizado com QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha, cat:27106). Células contendo cópias do plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5 mL de meio LB (Peptona bacteriológica 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0) a 250 rpm e 37 °C, durante à noite. No dia seguinte, as células foram centrifugadas a 7000 $x g$ e à temperatura ambiente por 10 min, e ressuspensas com 250 μL de Buffer P1. 250 μL de Buffer P2 foram adicionados e o sistema foi misturado por inversão 10 vezes e incubado no gelo por 4 min. 350 μL de Buffer N3 foram adicionados e o sistema foi misturado por inversão 10 vezes, incubado no gelo por 10 min e, em seguida, centrifugado a 17900 $x g$ e 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi transferido à coluna QIAprep 2,0 spin que foi centrifugada a 17900 $x g$ e 4 °C por 1 min. A coluna foi lavada com 750 μL de Buffer PE, 2 vezes, com um tempo de incubação de 1 min seguido de centrifugação a 17900 $x g$ e 4 °C por 1 min. O DNA foi eluído com 30 μL de H₂O Milli-Q pré-aquecida (60 °C) por incubação de 5 min seguida de centrifugação a 17900 $x g$ e 4 °C por 4 min. O DNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

5.6.2 Midipreparação

Extração de DNA plasmidial em média escala foi realizado com QIAprep Spin Midiprep kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha, cat: 12145). Células contendo cópias do plasmídeo de interesse foram cultivadas em 5 mL de meio LB a 300 rpm e 37 °C, por 8 h. 200 μL dessa cultura foram adicionados em 100 mL de meio LB e incubado a 300 rpm e 37 °C por 16 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 7000 $x g$ e à temperatura ambiente, por 10 min, e ressuspensas com 5 mL de Buffer P1. 5 mL de Buffer P2 foram adicionados e o sistema foi misturado por inversão 10 vezes e incubado no gelo por 4 min. 5 mL de Buffer P3 foram adicionados e o sistema foi misturado por inversão 10 vezes, incubado no gelo por 10 min e centrifugado a 12000 $x g$ e 4 °C por 1 h. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo, desprezando o sedimento, e centrifugado novamente 12000 $x g$ e 4 °C por 30 min.

O sobrenadante foi transferido à coluna QIAGEN-tip 100, previamente equilibrada com 4 mL de Buffer QBT, e foi permitido passar pela resina da coluna por gravidade. A coluna foi lavada com 10 mL de Buffer QC, 2 vezes, por gravidade. O DNA foi eluído com 5 mL de Buffer QF pré-aquecido (60 °C) e, em seguida, precipitado com 3,5 mL de isopropanol e 30 μL de Glycoblue 15 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: AM9516) por

centrifugação a 20000 $x g$ e 4 °C por 30 min. O sedimento foi lavado com 2 mL de etanol 70% gelado, sem ressuspender, e centrifugado a 20000 $x g$ e 4 °C por 10 min, e, em seguida, secado por exposição ao ar por 10 min. O DNA precipitado foi ressuspensionado com 100 μL de H₂O Milli-Q e analisado por eletroforese em gel de agarose.

5.7 AMPLIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS

Usando como molde o DNA da biblioteca naive (biblioteca antes da seleção) de anticorpos pComb3XSSFab de *Phage Display*, e das subpopulações de anticorpos de cada ciclo de seleção, os domínios variáveis da cadeia pesada (VH) e da cadeia leve (VL) foram amplificados, separadamente, por reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador *Veriti 96 well* (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA, cat: 4375786). Os seguintes oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados: oligonucleotídeo senso LeadVH (5'-GCTGCCCAACCAGCCATGGCC-3') e oligonucleotídeo anti-senso VH_rev (5'-CGATGGGCCCTTGGTGGAGGC-3') para cadeia pesada, e oligonucleotídeo senso VKappa (5'-GGGCCAGGCGGCCGAGCTC-3') e oligonucleotídeo anti-senso VKappa_rev (5'-AAGACAGATGGTGCAGCCACAGT-3') para cadeia leve. Esses nucleotídeos são específicos para as regiões de sequências líder (*ompA* e *pelB*) imediatamente antes dos segmentos gênicos VH e VL (*Vkappa*) e para as regiões iniciais dos segmentos dos domínios constantes CH1 e CK (*Ckappa*) (Figura 1). Para a reação, utilizaram-se 2 U de *Platinum™ Taq DNA Polimerase* (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 10966-030, produto inclui Tampão de PCR e solução MgCl₂), solução conjunta de dNTP 1mM (250 μM de cada tipo de dNTP) (Sinapse Inc.; São Paulo, Brasil, cat: P9061), Tampão de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, KCl 500 mM), solução MgCl₂ 2,5mM, iniciadores 0,4 μM e DNA molde (~25 ng), em volume final de 50 μL . A ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 27 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 65 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1,5 min; extensão final a 72 °C por 5 min.

5.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

DNA plasmidial, produtos de amplificação e fragmentos de digestão com enzimas de restrição foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose. Géis de Agarose, em diferentes concentrações, foram preparados em Tampão Tris-acetato (TAE) e corados com 0,5 $\mu g/mL$ de Brometo de etídio. As amostras, em tampão de amostra 1X (Tris 50 mM pH 7,6; azul de bromofenol 0,05% ou xileno cianol 0,05%; glicerol 6%; EDTA 10 mM)

foram aplicados no gel de agarose que foi submetido a uma voltagem de 25 V (géis para purificação de fragmentos de DNA) ou 70 V.

5.9 ELUIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

A eluição de fragmentos de DNA de gel de agarose e a purificação deles foi realizada com QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha, cat: 28704), bandas de DNA de interesse foram excisadas do gel e dissolvidas em 6 Volumes de Buffer QG, por meio de incubação a 50 °C por 10 min. 1 Volume de isopropanol foi adicionado à mistura que foi homogenizada e transferida, em seguida, para coluna QIAquick spin. A coluna foi centrifugada a 17900 $x g$ e à temperatura ambiente, por 1 min, e lavada, depois, com 500 μL de Buffer QG. A coluna foi lavada novamente com 750 μL de Buffer PE, por incubação por 5 min seguida de centrifugação a 17900 $x g$ e à temperatura ambiente, por 1 min. O DNA foi eluído com 30 μL de H₂O Milli-Q pré-aquecida (60 °C), por incubação por 5 min seguida de centrifugação a 17900 $x g$ e à temperatura ambiente, por 4 min.

5.10 CLONAGEM AO VETOR PGEM-T

Os segmentos de DNA, purificados, dos Domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve dos anticorpos da biblioteca *naive* e das subpopulações dos ciclos de seleção foram clonados no vetor pGEM-T (Promega, Madison, EUA, cat:3600) (**Figura 8**).

Para a ligação ao vetor, 100 ηg dos segmentos de DNA foram adenilados com 1 U de *Platinum™ Taq DNA* Polimerase, Tampão de PCR 1X, dATP 0,6 mM; a 72 °C por 30 min. 20 ηg do DNA adenilado foi ligado a 50 ηg de vetor pGEM-T, a uma razão molar, inserto:vetor, de 3:1, usando 3 U de T4 DNA ligase e Buffer da T4 ligase 1X, em um volume final de 10 μL . Foi preparado um controle negativo consistido da reação de ligação sem inserto. As reações de ligação ocorreram à temperatura ambiente, por 1 h, seguida por uma incubação a 4 °C, durante à noite.

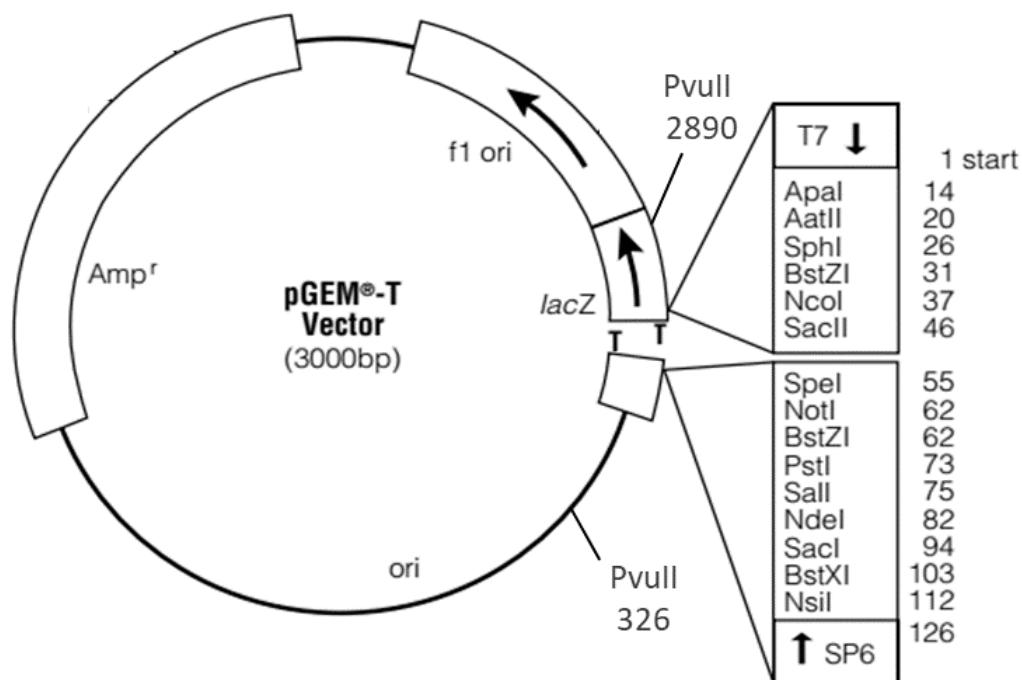


Figura 8. Mapa do Vetor pGEM-T. Representação gráfica do vetor pGEM-T (Promega, Madison, EUA) utilizado para clonagem dos domínios variáveis dos anticorpos selecionados para sequenciamento. Os sítios múltiplos de clonagem estão inseridos no gene LacZ, codificador da enzima β -galactosidase. Adaptado de © 2020 Promega Corporation.

5.11 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE ELÉTRICO

100 μ L de células *XLI-BLUE MRF'* eletrocompetentes foram misturadas a 1 ou 2 μ L de sistema de ligação e transferidas para uma cubeta de eletroporação pré-resfriada, Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes, 0.2 cm gap (Biorad, California, EUA, cat: #1652086). O pulso elétrico foi realizado com os seguintes parâmetros elétricos: 2,5 kV; 25 μ F; 200 Ω . Imediatamente após a eletroporação, a cubeta foi lavada 3 vezes com 1 mL de meio SOC e as células foram recuperadas a 250 rpm e 37 °C, por 1,5 h. Diferentes volumes de células transformadas foram semeados em meio LB ágar contendo ampiciplina 200 μ g/mL, com IPTG 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, cat: I6758) e com X-GAL 80 μ g/mL (Ludwig biotech, CAS: 7240-90-6), e o sistema foi incubado a 37 °C, durante à noite, para seleção azul/branco de colônias transformadas.

A eficiência da ligação e transformação foi avaliada pela contagem de colônias brancas e azuis nas placas das amostras e do controle negativo. Colônias brancas foram consideradas como sendo as células que foram transformadas com o inserto ligado ao vetor de forma correta. Colônias brancas escolhidas aleatoriamente foram crescidas em meio LB para extração de DNA

plasmidial, o qual foi submetido, posteriormente, a uma análise com a enzima de restrição *PvuII* (New England Biolabs Inc.; Ipswich, EUA, cat: R0151S) para confirmar a clonagem.

5.12 DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Digestão de DNA plasmidial com enzima de restrição foi realizada para confirmação da clonagem de genes a vetores específicos. Aproximadamente, 200 a 300 ng de DNA plasmidial foram incubados com 10 ou 20 U de enzima de restrição e NEB Buffer 1 X adequado (New England Biolabs Inc.; Ipswich, EUA), em volume final de 40 µL, por 2 a 4 h a 37 °C. Após esse período, as digestões foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

5.13 SEQUENCIAMENTO SANGER

Amostras de DNA plasmidial purificados foram sequenciados por meio de sequenciamento automático de Sanger bidirecional, em Helixxa Bases for Life, São Paulo, Brasil. A amplificação da região desejada foi realizada usando iniciadores para o promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') e para o promotor SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGA-3'). Os resultados foram analisados no editor de alinhamento de sequências BioEdit (versão 7.2).

5.14 SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve dos anticorpos da biblioteca naive e das subpopulações selecionadas foram sequenciados por meio do sistema Miseq, com tamanho de leitura de 2 x 250 pb e cobertura de 1 milhão de reads, da plataforma Illumina, em Myleus Biotecnologia, Minas Gerais. A amplificação foi realizada por meio dos mesmos iniciadores utilizados na amplificação dos domínios a partir dos plasmídeos extraídos, com o uso dos adaptadores 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG G-3' para os iniciadores senso e 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-3' para os iniciadores anti-senso.

5.15 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO ILLUMINA

A qualidade dos *reads* foi verificada com o programa FASTQC e os resultados do sequenciamento foram analisados com a ferramenta automatizada de análise de imunoglobulinas, ATTILA, desenvolvida pelo grupo de Imunologia Molecular da Universidade de Brasília (Maranhão *et al.*, 2020). Esse programa analisa as saídas do sequenciamento,

filtrando e agrupando as sequências dos domínios variáveis da cadeia pesada (VH) e leve (VL) com base nas definições de CDRs e *frameworks* (**Anexo**). Depois da filtragem, é realizada uma análise de enriquecimento, estabelecendo a frequência de cada sequência de domínio variável em cada ciclo de seleção avaliado. No final do processamento, o programa gera um relatório contendo a variação da frequência de cada sequência (*fold-change*) entre os ciclos de seleção e a biblioteca antes da seleção (ciclo 0). Além disso é fornecido a sequência de aminoácidos de cada domínio, com as CDRs identificadas e com sua classificação *germline*. Nesse trabalho, foi analisada a variação da frequência dos domínios entre o último ciclo de seleção (ciclo 4) e a biblioteca antes da seleção do *Phage Display*.

5.15.1 Avaliação da diversidade gênica

Foi realizada a análise da diversidade gênica dos grupos de VH e de VL mais enriquecidos nas duas seleções, a partir da definição das famílias gênicas dos 15 domínios variáveis, de ambas cadeias peptídicas, com maiores valores de *fold-change* obtida pela saída do ATTILA. A classificação *germline* foi confirmada com alinhamento no programa IgBLAST, seguindo o sistema de definição de domínio V de KABAT.

5.15.2 Avaliação das mutações das sequências

Foi analisada a divergência das sequências de VH e VL, mais enriquecidos, em relação às suas respectivas sequências germinais pela definição do grau identidade obtida por meio do alinhamento das sequências no banco de sequências de imunoglobulinas, IgBLAST.

5.16 DESENHO DE GENES

A partir das sequências de domínios variáveis das cadeias pesada e leve mais enriquecidos ao longo do processo de seleção do *Phage Display*, fragmentos de anticorpos de cadeia única, scFv (do inglês *single chain variable fragment*), humanos foram desenhados estrategicamente. A combinação dos VH com os VL foi realizada com base nos valores de enriquecimento e na classificação *germline*. As sequências recombinantes foram elaboradas com o uso de códons preferenciais da linhagem B de *Escherichia coli* e com o uso de sequências etiquetas (*tags*): cauda poli-histidina (sequência de seis histidinas na porção aminoterminal) e peptídeo HA (epitopo de hemaglutinina do vírus Influenza, com sequência de YPYDVPDYAS, na porção carboxiterminal). Os fragmentos de DNA codificando os anticorpos foram sintetizados quimicamente e foram clonados no vetor de expressão heteróloga pET-SUMO (GenOne, Rio de Janeiro, Brasil), que é compatível com linhagens DE3 e contém a proteína SUMO (forma SMT3 de *Saccharomyces cerevisiae*, e situada na porção aminoterminal) cuja

função, na engenharia genética, é de facilitar o dobramento proteico e aumentar a solubilidade de proteínas heterólogas. Após a clonagem, os vetores de expressão heteróloga foram multiplicados em larga escala e obtidos por Midipreparação de extração de DNA plasmidial.

5.17 ANÁLISE DAS COMBINAÇÕES DOS DOMÍNIOS VARIÁVEIS

Foi verificado se as combinações dos VH e VL mais enriquecidos, realizadas para a construção dos scFv, existiam originalmente na biblioteca de anticorpos expressos na superfície de fagos. Para isso, foi realizada uma reação de PCR para amplificar os pares VH-VL tendo como DNA molde a biblioteca de anticorpos, por meio do uso de iniciadores específicos para as CDR3 dos VL, como oligonucleotídeos senso, e iniciadores específicos para as CDR3 dos VH, como oligonucleotídeos anti-senso.

5.18 TRANSFORMAÇÃO E SELEÇÃO DE CLONES PRODUTORES

Uma colônia isolada de *Shuffle pLys Y* foi inoculada em 5 mL de meio LB e crescida, durante à noite, a 250 rpm e 37 °C. 500 µL da cultura foi diluída em 50 mL de meio LB e incubada a 350 rpm e 37 °C até atingir uma densidade óptica (a 600 nm) entre 0,1 e 0,3. As células foram resfriadas no gelo e, em seguida, baixadas por centrifugação a 3000 x g e 4 °C, por 15 min, e ressuspendidas em 10 mL de solução de CaCl₂ 50 mM gelada por agitação suave no gelo. A mistura foi centrifugada novamente sobre as mesmas condições anteriores e o sedimento de células foi ressuspendido gentilmente com 1 mL de solução de CaCl₂ 50 mM gelada e, então, mantido no gelo por 1 hora, para tornar as células competentes.

100 µL de células competentes foram incubadas, no gelo por 45 min, com 300 ng de vetor de expressão pET-SUMO carregando os genes codificantes dos scFv sintetizados. O sistema foi submetido ao choque térmico, de 42 °C por 3 min, e, imediatamente depois, 1 mL de meio SOC foi adicionado. As células transformadas foram incubadas a 250 rpm e 37 °C, por 1,5 h, e em seguida, semeadas em meio 2 xYT ágar (Peptona bacteriológica 1,6%, Extrato de Levedura 1,0%, NaCl 0,5%, Ágar 1,5%, pH 7,0) contendo Kanamicina 40 mg/mL e glicose 1% para crescerem a 37 °C, durante à noite.

Para a seleção de clones bons produtores, colônias de células transformadas foram repicadas em duas placas, uma contendo meio 2xYT ágar, Kanamicina 15 mg/mL, Cloranfenicol 5 mg/mL e glicose 1%, e outra contendo meio 2xYT ágar, Kanamicina 15

mg/mL, Cloranfenicol 5 mg/mL e IPTG 1 mM. As placas foram incubadas a 37 °C, durante à noite.

5.19 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Colônias que cresceram muito na placa de seleção com glicose e que, ao mesmo tempo, cresceram pouco na placa de seleção com IPTG foram inoculadas em 5 mL de meio TB (2,4% de extrato de levedura; 2,0% de peptona bacteriológica; 0,4% de glicerol; 17 mM de KH₂PO₄; 72 mM de K₂HPO₄) com glicose 1%, Kanamicina 15 µg/mL, Cloranfenicol 5 µg/mL e cultivadas a 250 rpm e 37 °C, durante à noite. 2 mL da cultura foi diluída em 200 mL de meio TB, contendo glicose 1%, e o inóculo foi incubado a 300 rpm e 37 °C até atingir uma densidade óptica (a 600 nm) de 2,0. Após essa densidade, a cultura foi centrifugada a 3000 x g e à temperatura ambiente, por 20 min, e o sedimento de células foi ressuscitado com 200 mL de meio TB contendo IPTG 1 mM. A expressão heteróloga dos anticorpos recombinantes foi induzida a 200 rpm e 25 °C, por 2, 4 e 16 horas. Após essa incubação, a cultura de células foi centrifugada a 9000 x g e 4 °C por 15 min.

5.20 EXTRAÇÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

O sedimento de células, após a indução da expressão heteróloga, foi ressuscitado com 20 mL de tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 40 mM; NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM) e submetido a sonicação no processador ultra-sônico Q700 (QSONICA, Newtown, Connecticut, EUA). Foram realizados 3 ciclos de sonicação, com intervalos de 12 min, entre eles. Em cada ciclo de seleção, a mistura de células foi sonicada, a uma amplitude de 50, por 8 pulsos de 10 segundos, com intervalos de 1 minuto e 20 segundos. Durante todo o processo de sonicação, as células foram mantidas no gelo, para evitar superaquecimento. A temperatura foi monitorada para não ultrapassar 20 °C. Ao final, a fração solúvel (sobrenadante) foi separada da fração insolúvel (sedimento) por meio de centrifugação a 14000 x g e 4 °C, por 2 horas.

5.21 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

A fração solúvel do extrato de células, contendo os anticorpos recombinantes produzidos, foi filtrada com filtro de seringa, poro 0,22 µm (MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, EUA, cat: SLFG025LS) e aplicada na coluna Ni-NTA spin (QIAGEN, Hilden, Alemanha, cat: 31014) equilibrada previamente com 600 µL de tampão de ligação (NaH₂PO₄ 40 mM, NaCl 0,5 M) contendo Imidazol 10 mM (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, cat: 12399).

O sistema foi centrifugado a $270 \times g$ e 4°C por 5 min. A resina da coluna foi lavada 3 vezes com $600 \mu\text{L}$ de tampão de ligação com Imidazol 50 mM, por centrifugação a $890 \times g$ e 4°C por 2 min. As proteínas ligantes foram eluídas 2 vezes com $300 \mu\text{L}$ de tampão de eluição (NaH_2PO_4 40 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM), por centrifugação a $890 \times g$ e 4°C por 2 min. Foram utilizadas 3 colunas para cada amostra de fração solúvel para evitar saturação da resina da coluna, e, ao final, as frações eluídas das colunas da mesma amostra foram juntadas.

5.22 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Proteínas foram analisadas em gel vertical de poliacrilamida, N’N’-bis-metilenoacrilamida: acrilamida em razão 1:19, 40%, (Ambion, Austin, Texas, EUA, cat: AM9022), em condições desnaturantes e redutoras. Para isso, as amostras foram incubadas a 100°C por 10 min em tampão de amostra 1X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS 2%; β -mercaptoetanol 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%), e depois mantidas no gelo até a aplicação no gel de poliacrilamida (Concentrador 5% e Separador 12%). A corrida foi realizada em voltagem de 100 V por 3 h, com tampão de corrida 1X (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%). O gel, após a corrida, foi corado com solução corante (Azul brilhante de Coomassie G-250 0,25%; metanol 30%; ácido acético glacial 7%) por 3 h à temperatura ambiente e em seguida, descorado com solução descorante (Metanol 30%; ácido acético glacial 7%). Para estimativa da massa molecular das proteínas, foi utilizado o marcador de massa molecular BlueRay Prestained Marker (JenaBioscience, Jena, Alemanha, cat: PS-103).

5.23 WESTERN-BLOT: IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

Proteínas separadas em gel de poliacrilamida foram transferidas à membrana de nitrocelulose (Amersham, Reino Unido, cat: GE10600015) em tampão de transferência 1X (Tris base 0,58%, Glicina-HCl 0,29%, SDS 0,037%, Metanol 20%, pH 8,3). A transferência ocorreu no sistema semiúmido Multiphor II (Amersham, Reino Unido, cat: GE18101806) em amperagem constante de 150 mA e voltagem máxima de 10 V por 45 min. Depois, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% em PBST (NaCl 150 mM, NaH_2PO_4 10 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4), à temperatura ambiente e em agitação, durante uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com anticorpo primário, anti-HA produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA, cat: sc-7392), na diluição de 1:1000 em PBST à temperatura ambiente e em agitação, por uma hora. A membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo produzido em

bovino conjugado com a enzima fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA, cat: sc-2373), na diluição de 1:2000 em PBST à temperatura ambiente e em agitação, por uma h. A membrana foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com tampão da enzima fosfatase alcalina (APB, do inglês *Alkaline phosphatase buffer*) à temperatura ambiente por 10 min. As bandas específicas foram reveladas com solução de substrato da fosfatase alcalina, NBT-BCIP (Roche, Basileia, Suíça, cat: 11 681 451 001) e foram comparadas ao padrão: marcador BlueRay Prestained Marker (JenaBioscience, Jena, Alemanha, cat: PS-103).

5.24 LIMPEZA E QUANTIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

As frações de anticorpos purificados foram dessalinizadas com filtros de centrifugação Amicon Ultra-2 30 kDa (MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, EUA, cat: UFC203024) por diluição delas em PBS (NaCl 150 mM, NaHPO₄ 10 mM, pH 7,4) e posterior centrifugação a 7500 \times g e 4 °C por 10 min. Os anticorpos purificados e limpos foram quantificados pelo método de dosagem de proteínas de Bradford, descrito em De-Souza, 2016, usando uma curva padrão de IgG humana.

5.25 AVALIAÇÃO DA PUREZA

O grau de pureza dos anticorpos produzidos e purificados foi estimado por análise de densitometria do gel de poliacrilamida corado com Azul de Coomassie (SDS-PAGE), no programa de avaliação de eletroforese em gel, GelAnalyser versão 19.1. Para isso, todas as bandas contidas em cada linha do gel foram detectadas e analisadas quanto ao seu volume relativo ocupado e o grau de pureza foi estimado pela razão entre o volume da banda, corresponde ao anticorpo em seu tamanho correto, e o volume total de todas as bandas identificadas.

5.26 ENSAIOS DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA

5.26.1 Ensaio de ligação ao antígeno do loop de fusão

100 μ L de anticorpos recombinante 240 η M, em PBS (NaCl 150 mM, NaHPO₄ 10 mM, pH 7,4), foram adsorvidos em placa de ELISA NUNC MaxiSorp de fundo plano 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 44-2404-21) a 4 °C, durante à noite. Os poços foram lavados 3 vezes com 200 μ L de PBST (PBS com Tween 20 0,1%) e bloqueados com 150 μ L de albumina sérica bovina 1% (*Bovine Serum Albumin* – BSA) (SigmaAldrich, St. Louis, EUA, cat: A2153) em PBST, filtrada previamente com filtro de seringa, poro 0,22 μ m

(MerckMillipore, Burlington, Massachusetts, EUA, cat: SLFG025LS), a 37 °C por uma hora. Os poços foram lavados, como anteriormente, e diluições seriadas de 3,90 µM; 1,30 µM; 0,43 µM; 0,14 µM, em 100 µL de PBS, de peptídeo viral (*loop* de fusão) com biotina foram adicionadas e incubadas a 37 °C, por uma hora. A placa foi lavada com PBST, e 100 µL de estreptavidina conjugada à enzima fosfatase alcalina (SeraCare, Milford, EUA, cat: 475-3000), diluída 1:1000 em PBST, foi adicionado e a placa foi incubada a 37 °C por uma hora. Depois de lavar a placa com PBST, os peptídeos virais capturados foram detectados com 100 µL de pNPP 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 34045) diluído em Diethanolamine substrate buffer 1X (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca, cat: 34064). A placa foi incubada com a solução de pNPP à temperatura ambiente por 30 min e a leitura foi realizada com filtro de 405 nanômetros no espectrofotômetro SpectraMax M2^e (Molecular Devices, San Jose, Califórnia, EUA).

5.26.2 Ensaio de ligação ao vírus

100 µL de vírus Zika inativado, 20 µg/mL em PBS, foram usados para sensibilizar uma placa de ELISA NUNC MaxiSorp a 4 °C, durante à noite. Os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBST e bloqueados com 150 µL de BSA 1% em PBST, filtrado com filtro de seringa, poro 0,22 µm, a 37 °C por uma hora. Após lavar a placa, como anteriormente, diluições seriadas (1,98 µM a 2,72 ηM em 100 µl de PBST) de anticorpo recombinante foram incubadas na placa a 37 °C, por 1,5 h. A placa foi lavada com PBST, e 100 µL de anticorpo anti-HIS tag conjugado à enzima fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, cat: A5588), diluído 1:2000 em PBST, foram adicionados e incubados a 37 °C, por 1 h. Posteriormente, a lavagem da placa, os anticorpos ligantes ao vírus foram detectados com 100 µL de pNPP 1 mg/mL, diluído em Diethanolamine substrate buffer 1X. A placa foi incubada com a solução de pNPP à temperatura ambiente, por 30 min, e a leitura foi realizada com filtro de 405 nanômetros no espectrofotômetro SpectraMax M2^e. A média das absorbâncias foram determinadas a partir de replicatas de pelo menos dois experimentos independentes, com anticorpos de produções heterólogas diferentes, e a ligação dos anticorpos ao vírus Zika foi analisada por regressão não linear pelo programa GraphPad Prism.

5.27 ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO

A atividade de neutralização dos anticorpos recombinantes foi avaliada por teste de neutralização por redução de placa (PRNT) em células *Vero*. 1,5 x 10⁵ células por poço foram cultivadas em *Modified Eagle Medium* (MEM) (Thermo Fisher Scientific, Roskilde,

Dinamarca) contendo 10% SFB (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca), em volume de 500 μL , a 37 °C e CO_2 5%, por 48 horas, em uma placa de cultura de 24 poços. Após 24 horas, a proliferação das células era acompanhada de forma indireta em microscópio óptico invertido. Diluições dos anticorpos recombinantes (9,1 μM a 0,14 μM , em volume de 75 μL de meio MEM) foram incubadas com 75 μL de $8,26 \times 10^2$ unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL) de vírus Zika, em meio MEM a 37 °C, por uma hora. A mistura de anticorpos e vírus foi adicionada às células e incubadas a 37 °C e CO_2 5%, por uma hora. 440 μL de meio MEM foram removidos dos poços da placa, e os poços foram cobertos, gentilmente com 500 μL meio semissólido Carboximetil celulose *overlay* (do inglês carboxymethyl cellulose – CMC) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para restringir o movimento do vírus e a placa de cultura foi incubada a 37 °C e CO_2 5%, por 6 dias. A cada dois dias, o efeito citopático foi avaliado indiretamente em microscópio óptico invertido. Após os 6 dias, o meio semissólido foi removido e as células foram fixadas com 1 mL de Formol 28%, a 37 °C, durante a noite, e em seguida, os poços foram lavados com água destilada em abundância e corados com 500 μL de solução corante (Cristal violeta), à temperatura ambiente, por 15 min, para a contagem do número de placas. A porcentagem de neutralização foi determinada pela redução no número de placas de efeito citopático formadas nos poços contendo diluições dos anticorpos recombinantes, em comparação com o número de placas formadas nos poços, em que haviam apenas células e vírus Zika. Os valores de neutralização foram obtidos da média de replicatas de experimentos independentes. Foram preparados controle positivo com soro de camundongo imunizado com vírus e controles negativos com amostras sem vírus e amostras contendo apenas células. Cada uma das condições foi preparada em duplicatas ou triplicatas.

6. RESULTADOS

6.1 DESENHO DO ANTÍGENO

Para a seleção dos anticorpos específicos ao *loop* de fusão de Flavivirus, foi desenhado um antígeno correspondente a essa região do envelope viral para servir como antígeno na seleção de *Phage Display*. O antígeno foi desenhado contendo a região do *loop* de fusão (FL) ligada, por uma ponte dissulfeto, a outra região do domínio II, um peptídeo com sequência SRCPT (**Figura 9**), tal como ocorre no envelope viral (**Figura 10**). Essa proteína alvo também foi conjugada a uma molécula de biotina para ligação à placa de seleção pré-sensibilizada com estreptavidina. Também foi desenhado um peptídeo contendo apenas a sequência de aminoácidos do FL (**Figura 9**), para servir como peptídeo capturador na eluição dos anticorpos específicos, em uma abordagem de eluição por competição, além da clássica eluição ácida.

A

Loop de fusão

| | | | | | |
|---------------------------|----|---|-----------------|-----------|-----|
| ZIKV_H/PF/2013 | 60 | YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD | DRGWGNGCGLFGKGS | SLVTCAKFA | 120 |
| ZIKV_MR766 | 60 | YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVD | DRGWGNGCGLFGKGS | SLVTCAKFT | 120 |
| DENV_1_SG/07K3640DK1/2008 | 60 | IEAKISNITTTDSRCPTQGEATLVEEQDANFVCRRTFV | DRGWGNGCGLFGKGS | SLITCAKFK | 120 |
| DENV_2_16681 | 60 | IEAKLTNITTTDSRCPTQGEPSLNEEQDKRFVCKHSMV | DRGWGNGCGLFGKGS | GIVTCAMFR | 120 |
| DENV_3_SG/05K863DK1/2005 | 60 | IEGKITNITTTDSRCPTQGEAVLPEEQDQNYVCKHTYV | DRGWGNGCGLFGKGS | SLVTCAKFK | 120 |
| DENV_4_SG/06K2270DK1/2005 | 60 | IEASISNITTTATRCPTQGEPEYLKKEEQDQYICRRDVV | DRGWGNGCGLFGKGS | GVVTCAKFL | 120 |
| WNV_NY99 | 60 | YLATVSDLSTKAACPTMGEAHNDKRAPAFVCRQGVV | DRGWGNGCGLFGKGS | IDTCAKFA | 120 |
| JEV_SA14 | 60 | YHASVTDISTVARCPTTGEAHNEKRADSSYVCKQGFT | DRGWGNGCGLFGKGS | IDTCAKFS | 120 |
| YFV_Asibi | 60 | YNAVLTHVKINDKCPSTGEAHLAEENEGDNACKRTYS | DRGWGNGCGLFGKGS | SIVACAKFT | 120 |

. : : . * : * : . : * : : * : : * : : * : : * : : *

B

| Peptídeo | SEQUÊNCIA |
|------------------------|-------------------------------|
| Antígeno na seleção | Biotina-DRGWGNGCGLFGKGS-SRCPT |
| Eluição por competição | DRGWGNGAGLFGKGS |

Figura 9. Peptídeos correspondentes ao loop de fusão. (A) Sequência e alinhamento do *loop* de fusão (destacado pelo retângulo verde) de diferentes linhagens de Flavivirus, situada no domínio II da proteína E (envelope) que exerce um papel no processo de infecção. É destacada a conservação do *loop* de fusão, indicada por *. (B) Sequência do peptídeo correspondente ao *loop* de fusão usado como antígeno na seleção do *Phage Display* e do peptídeo, sem biotina (frio), usado na eluição dos anticorpos específicos por competição.

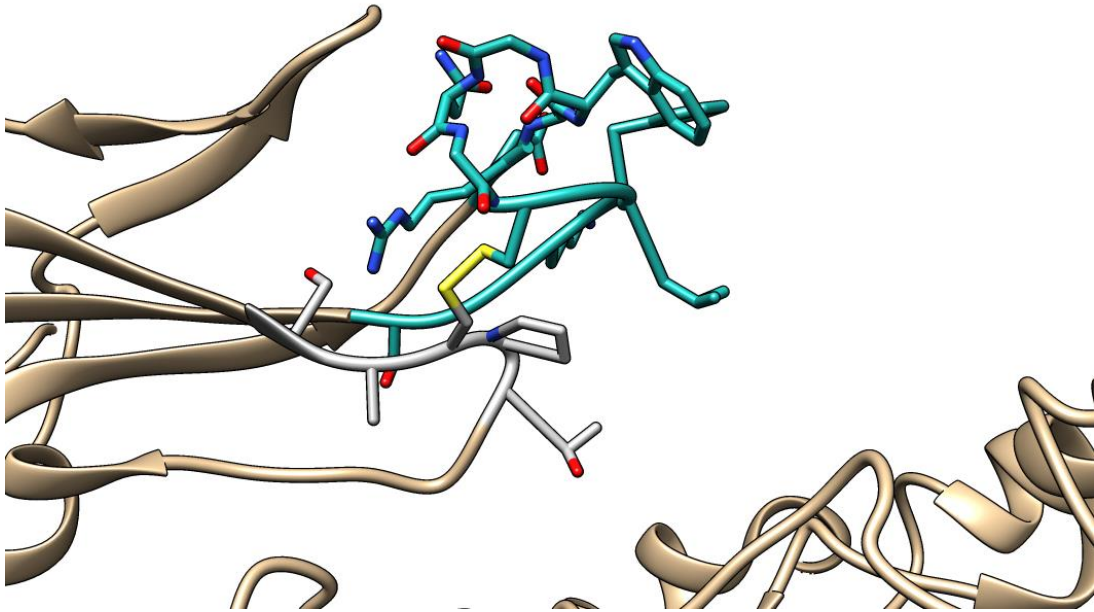


Figura 10. Representação do *loop* de fusão no envelope viral. É apresentada a conformação do *loop* de fusão, em ciano, no domínio II da proteína E do vírus Zika. No envelope viral, o FL apresenta uma ligação do tipo ponte dissulfeto (destacada em amarelo) com um peptídeo, SRCPT, em cinza, do domínio II. Imagem obtida pelo programa Chimera versão 1.14.

6.2 Seleção dos anticorpos por *Phage Display*

A biblioteca combinatória de fagomídeos pComb3XSSFab (Dantas-Barbosa *et al.*, 2005), contendo genes de fragmentos de anticorpos humanos no formato Fab fusionados ao gene da proteína III do capsídeo de fagos (**Figura 7**), foi utilizada nesse trabalho. A biblioteca, foi transformada em *Escherichia coli* linhagem *XL1-BLUE MRF'*. A partir dessa biblioteca de anticorpos, foram selecionados anticorpos ligantes ao *loop* de fusão.

O antígeno sintético, contendo biotina, foi imobilizado em uma placa de ELISA pré-sensibilizada com estreptavidina. Foram realizados 4 ciclos de seleção/amplificação, aumentando a adstringência da seleção a cada ciclo, por meio do aumento do número de lavagens para a retirada de anticorpos não ligantes. Foram procedidas duas formas de eluição dos anticorpos ligantes ao antígeno viral com o objetivo de evitar a obtenção de anticorpos para antígenos inespecíficos contidos no sistema de seleção: uma, usando uma solução ácida para desfavorecer a ligação de anticorpo-antígeno (seleção ácida), seguida da neutralização da solução de fagos eluídos; e outra, usando uma solução, concentrada, do antígeno viral não imobilizado, por não conter molécula de biotina (livre), eluindo por competição de afinidade

(seleção-peptídeo) (**Figura 11**). Para entendimento do comportamento da ligação e eluição dos anticorpos no sistema de seleção, a seleção ácida e a seleção-peptídeo foram conduzidas de forma independente durante todo o experimento e análise do progresso de seleção.

A cada ciclo de seleção, os fagos com anticorpos eluídos passavam por uma amplificação pela infecção de cultura de células *XLI-BLUE*, para aumentar os títulos de fagos e proceder uma expansão dos clones ligantes, e iniciava-se um novo ciclo de seleção, com aumento da pressão seletiva (**Figura 11**).

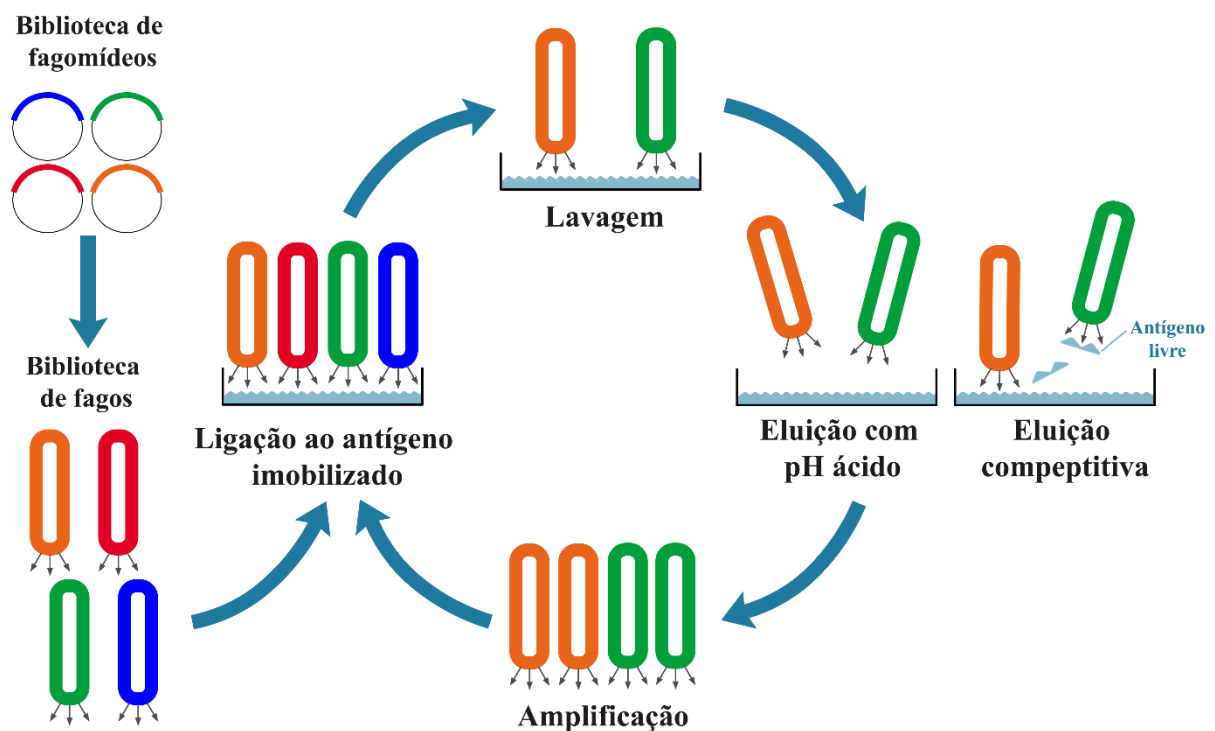


Figura 11. Esquema da seleção de *Phage Display*. Representação esquemática do método, utilizado, de seleção dos anticorpos específicos ao antígeno viral, FL de Flavivirus, imobilizado. O aumento da adstringência da seleção foi alcançado pelo aumento do número de lavagens a cada ciclo de seleção. A eluição dos anticorpos ligantes, expressos na superfície de fagos, foi realizada por duas maneiras: com uma solução ácida (solução ácida) e com uma solução do antígeno não imobilizado, livre, em excesso (seleção-peptídeo). Os fagos eluídos foram reamplificados e incubados novamente com o antígeno imobilizado a cada ciclo de seleção.

A análise do progresso de seleção do *Phage Display* iniciou-se com a titulação, a cada ciclo de seleção, dos fagos amplificados, que entravam na seleção (*input*) e dos fagos eluídos, que saíam da seleção (*output*) e eram amplificados, em seguida, para um novo ciclo. Os ciclos

1, 2, 3 e 4 da seleção ácida apresentaram títulos de fagos *input* de $1,7 \times 10^{12}$, $6,6 \times 10^{10}$, $1,5 \times 10^{11}$ e $1,6 \times 10^{11}$ e de fagos *output* de $1,3 \times 10^6$, $9,9 \times 10^4$, $3,6 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$, respectivamente (**Tabela 2**).

Os ciclos 1, 2, 3 e 4 da seleção-peptídeo apresentaram títulos de fagos *input* de $1,7 \times 10^{12}$, $5,9 \times 10^{10}$, $2,1 \times 10^{11}$ e $2,9 \times 10^{10}$ e de fagos *output* de $1,8 \times 10^5$, $1,7 \times 10^6$, $5,3 \times 10^3$, $1,1 \times 10^3$, respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2. Titulação dos fagos. Títulos dos fagos, contendo os fragmentos de anticorpos expressos na superfície do capsídeo viral, que entram na seleção, *input*, e dos fagos que eram eluidos após as lavagens, *output*, durante os 4 ciclos da seleção ácida e da seleção-peptídeo, conduzidas de forma independente.

| Ciclo | Número de lavagem | Seleção ácida | | Seleção-peptídeo | |
|-------|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | <i>Input</i> | <i>Output</i> | <i>Input</i> | <i>Output</i> |
| 1 | 5 | $1,67 \times 10^{12}$ | $1,30 \times 10^6$ | $1,67 \times 10^{12}$ | $1,82 \times 10^5$ |
| 2 | 10 | $6,62 \times 10^{10}$ | $9,95 \times 10^4$ | $5,87 \times 10^{10}$ | $1,69 \times 10^6$ |
| 3 | 15 | $1,46 \times 10^{11}$ | $3,58 \times 10^4$ | $2,10 \times 10^{11}$ | $5,28 \times 10^3$ |
| 4 | 15 | $1,60 \times 10^{11}$ | $1,00 \times 10^4$ | $2,90 \times 10^{10}$ | $1,07 \times 10^3$ |

6.3 ANÁLISE MONOCLONAL DA SELEÇÃO

Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve (VH e VL) das populações de anticorpos da biblioteca *naive* (antes da seleção) e dos anticorpos selecionados (ciclo de seleção 4) foram amplificados, por reação de PCR, usando os fagomídeos pComb3XSSFab como DNA molde e oligonucleotídeos iniciadores específicos para os segmentos gênicos VH e VL (Vkappa). A reação de amplificação resultou em produtos com tamanhos próximos a 400 pares de base (**Figura 12**), o que, considerando o tamanho dos iniciadores, condiz com os dados anotados para sequências de domínios variáveis depositadas no banco de sequências de nucleotídeos GENBANK (*accession number*: AB178030.1; D16834.1 para VL e AB095278.1; AJ001169.1 para VH).

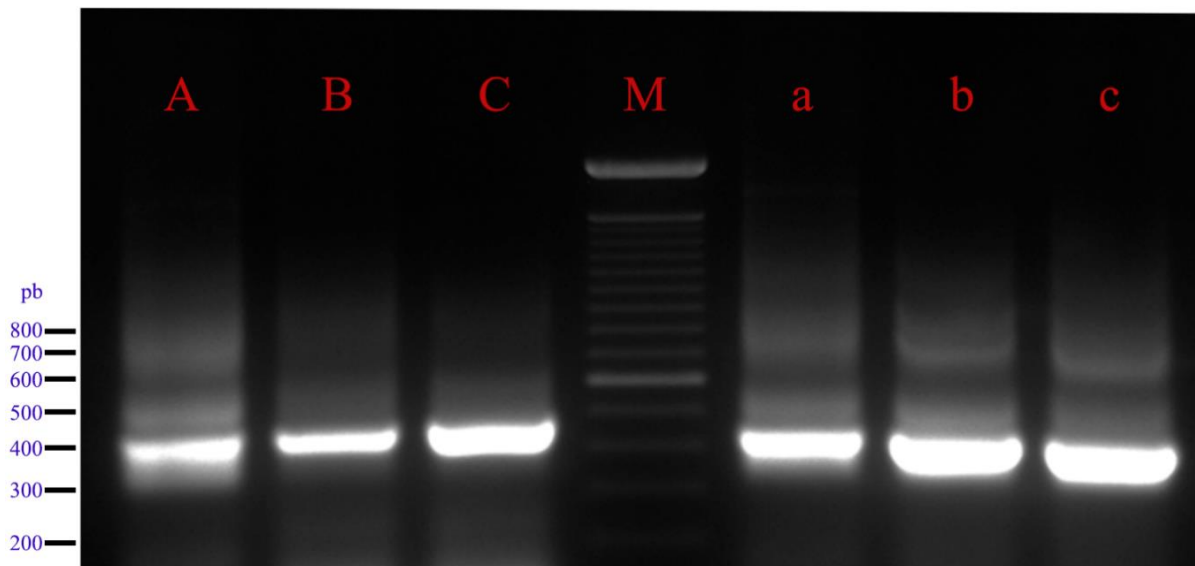


Figura 12. Amplificação de VH e VL. Análise por eletroforese em gel de agarose (2,0%) da amplificação dos genes dos domínios variáveis VH (letras vermelhas maiúsculas) e VL (letras vermelhas minúsculas) dos anticorpos da biblioteca antes da seleção (ciclo 0: A e a) e dos anticorpos selecionados na seleção-peptídeo (B e b) e na seleção ácida (C e c). M: Marcador de peso molecular 100 bp plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, cat: 15628-019).

As bandas correspondentes aos segmentos gênicos VH e VL geradas pela amplificação, com tamanho de 400 pb, foram extraídas do gel de agarose, evitando bandas inespecíficas, e purificadas. Com esse material gênico, foi realizada uma análise monoclonal do progresso da seleção, examinando a diversidade de clones de anticorpos ao longo da seleção, por amostragem das populações de clones da biblioteca antes da seleção e da subpopulação de clones gerada após o último ciclo de seleção (ciclo 4). Para isso, os fragmentos de DNA purificados foram clonados ao vetor pGEM-T. (**Figura 8**).

Os sistemas de ligação foram usados para transformar células *XLI-BLUE* competentes e as células transformadas foram selecionadas por seleção azul/branco. O DNA plasmidial de algumas colônias brancas isoladas, escolhidas ao acaso, e cada uma representando um clone de domínio variável de anticorpo, foi extraído e digerido com a enzima de restrição PvuII, para confirmação da clonagem. A enzima cliva nas posições 326 e 2890 gerando um fragmento de 436 pb, no vetor original, mais o inserto ligado (400 pb para os domínios variáveis de anticorpos). A digestão da preparação plasmidial de cada um dos clones liberou um fragmento próximo de 850 pb, tamanho esperado para o inserto dos VH e VL ligado ao pGEM-T (**Figura 13**).

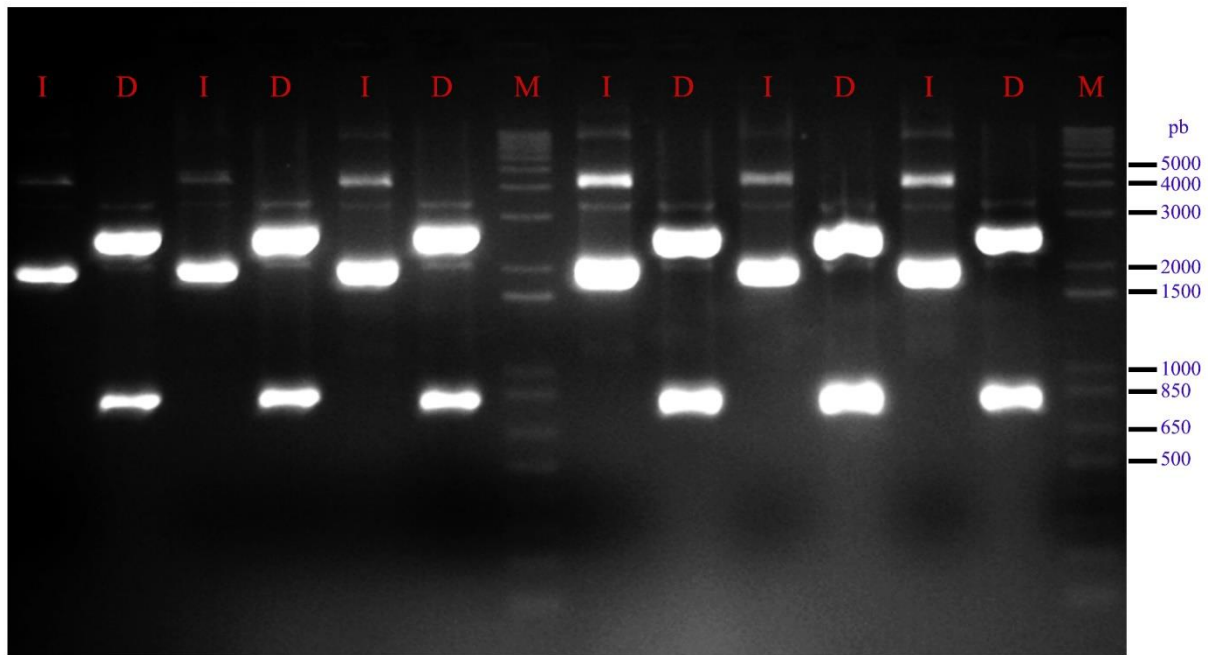


Figura 13. Análise de restrição dos clones recombinantes. Análise com enzima de restrição, *PvuII*, da clonagem dos segmentos de VH e VL ao vetor pGEM-T com alguns clones escolhidos aleatoriamente por eletroforese em gel de agarose (1,0%). D: amostra de DNA plasmidial digerida de clones aleatórios. I: amostra intacta. Bandas de tamanho próximo de 850 pb, correspondem à região do vetor, flanquada pelos sítios da enzima, contendo o inserto. M: marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, cat: 10787018).

Clones positivos foram escolhidos de forma aleatória e sequenciados, por sequenciamento Sanger, para verificar a diversidade da população de anticorpos antes e após a seleção. Durante o processo de seleção, houve uma redução da diversidade dos anticorpos representada pela redução da diversidade de clones individuais ao passar do ciclo 0 para o ciclo 4 (**Tabela 3**), tanto para a seleção ácida, quanto para seleção-peptídeo.

Tabela 3. Análise de diversidade das populações de anticorpos. Análise monoclonal da seleção pela avaliação da diversidade de alguns clones de VH e VL da população de anticorpos antes (Ciclo 0) e após a seleção (Ciclo 4); para a seleção-peptídeo (pep) e para a seleção ácida (ac). As sequências apresentadas correspondem às sequências da CDR3 de clones aleatórios sequenciados. Frequência: representatividade de cada sequência no conjunto total de clones sequenciados em cada amostra. Família: família gênica à qual a sequência pertence. * sequências diferem na CDR1.

| Amostra | Sequência da CDR3 | Frequência | Família |
|--------------------|----------------------|------------|---------|
| Ciclo 0 VH | GKHLGHSYGPGTFDY | 1/5 | VH3-07 |
| | GRALGDVITAIQGGHWYLDV | 1/5 | VH4-34 |
| | GSMGDIAFDY | 1/5 | VH1-46 |
| | DVYYDFWSGYYSG | 1/5 | VH3-09 |
| | ACIWSGVCYRETDY | 1/5 | VH4-61 |
| Ciclo 4 pep. VH | GRWGSY | 3/6 | VH3-74 |
| | VGGGRALDY | 1/6 | VH3-7 |
| | ETWGPEY | 1/6 | VH3-7 |
| | DGVAVAGLDY | 1/6 | VH1-2 |
| Ciclo 4 ac. VH | WGGGTEVVAAKGWFDP | 4/4 | VH1-8 |
| Ciclo 0 VL | QQSYRFPYT* | 1/6 | L19 |
| | QQSYRFPYT* | 1/6 | O12 |
| | WQGSHPWPWT | 1/6 | A17 |
| | QQYGGSPW | 1/6 | A27 |
| | QQRDNWPLT | 1/6 | A27 |
| | LQHDFNPLT | 1/6 | B2 |
| Ciclo 4 pep. VL | QQHDNLPIT | 5/6 | O18 |
| | QQIISLFT | 1/6 | O18 |
| Ciclo 4 ac. VL | QQYGGSPW | 2/5 | A27 |
| | QQGGSPW | 1/5 | A27 |
| | QQYSTYSWA | 1/5 | L12a |
| | LQHNTYPRT | 1/5 | A30 |

6.4 ANÁLISE POLICLONAL DA SELEÇÃO

Os produtos de PCR purificados correspondentes aos segmentos gênicos de VH e VL também foram sequenciados por sequenciamento de alta performance (*Illumina*), para analisar toda a população de clones de anticorpos antes e depois da seleção, e para identificar os

anticorpos que mais enriqueceram ao longo da seleção, ou seja, que tiveram sua frequência na população aumentada. As estatísticas gerais do sequenciamento mostraram uma redução da diversidade de clones nas seleções, evidenciada pelo dado de que, embora o número de sequências totais em cada ciclo de seleção foi relativamente semelhante, houve uma redução do número de sequências únicas dos domínios variáveis entre o ciclo 0 e os ciclos 4 (**Tabela 4**). Esse dado corrobora com o resultado da análise da seleção por sequenciamento Sanger.

Tabela 4. Estatística geral do sequenciamento *Illumina*. Relatório dos resultados do sequenciamento após análise *in silico* das sequências lidas. Os números de sequências apresentadas correspondem a sequências peptídicas dos domínios variáveis encontradas em cada ciclo da seleção-peptídeo (ciclo peptídeo) e da seleção ácida (ciclo ácido). A razão corresponde ao percentual de sequências que são únicas no conjunto total de sequências em cada população.

| População de clones | Número total de sequências | Número de sequências únicas | Razão sequências únicas / número total |
|---------------------|----------------------------|-----------------------------|--|
| Ciclo 0 VH | 64043 | 55059 | 85% |
| Ciclo 4 peptídeo VH | 72624 | 18080 | 25% |
| Ciclo 4 ácido VH | 15776 | 5568 | 35% |
| Ciclo 0 VL | 89185 | 41919 | 47% |
| Ciclo 4 peptídeo VL | 81411 | 7050 | 8,7% |
| Ciclo 4 ácido VL | 92952 | 10560 | 11,3% |

Por meio da análise de mudança da frequência (FC) de cada sequência de VH e VL entre os ciclos 4 e o ciclo 0 das seleções, foram detectados aquelas que mais enriqueceram ao longo da seleção e que poderiam apresentar maior afinidade ao antígeno viral. A maioria dos domínios variáveis da cadeia pesada foram os mais enriquecidos tanto na seleção ácida quanto na seleção-peptídeo (**Tabela 5**), ao passo que nenhum dos domínios variáveis da cadeia leve mais enriquecidos foi compartilhado pelas duas seleções (**Tabela 6**).

Tabela 5. Enriquecimento dos anticorpos pela análise da cadeia pesada. Valor de *Fold-Change*, FC, (quantas vezes a frequência da sequência aumentou do ciclo de seleção 0 para o ciclo 4) das sequências dos seis VH mais enriquecidos em cada uma das seleções. Sequências com prefixo “Hm”, correspondem a sequências que foram enriquecidas em ambas seleções, enquanto que sequências nomeadas com prefixo “p” são as mais sequências enriquecidas apenas na seleção-peptídeo, e sequências nomeadas com prefixo “ac” são as mais enriquecidas apenas na seleção ácida.

| Seleção-Peptídeo | | Seleção Ácida | |
|------------------|------|---------------|------|
| Sequência | FC | Sequência | FC |
| Hp1 | 1318 | Hac1 | 3827 |
| Hm1 | 1074 | Hm1 | 1307 |
| Hm2 | 746 | Hm3 | 838 |
| Hm3 | 735 | Hm2 | 667 |
| Hm4 | 610 | Hm6 | 645 |
| Hm5 | 483 | Hm5 | 586 |

Tabela 6. Enriquecimento dos anticorpos pela análise da cadeia leve. Valor de FC entre os ciclos de seleção 0 e 4 das sequências dos seis VL mais enriquecidos em cada uma das seleções.

| Seleção-Peptídeo | | Seleção Ácida | |
|------------------|------|---------------|------|
| Sequência | FC | Sequência | FC |
| Lp1 | 2308 | Lac1 | 1021 |
| Lp2 | 313 | Lac2 | 318 |
| Lp3 | 183 | Lac3 | 310 |
| Lp4 | 158 | Lac4 | 221 |
| Lp5 | 151 | Lac5 | 210 |
| Lp6 | 146 | Lac6 | 201 |

Na seleção ácida, houve uma diversidade maior de famílias gênicas dos VH e VL mais enriquecidos, em comparação com a diversidade de famílias observada na seleção-peptídeo

(Figura 14 e 15). A família gênica O18, à qual a maioria dos VLs mais enriquecidos na seleção-peptídeo pertence, não aparece na seleção ácida. Ao passo que algumas famílias gênicas de VL, como A30, B3 e L1 só aparecem na seleção ácida (Figura 14).

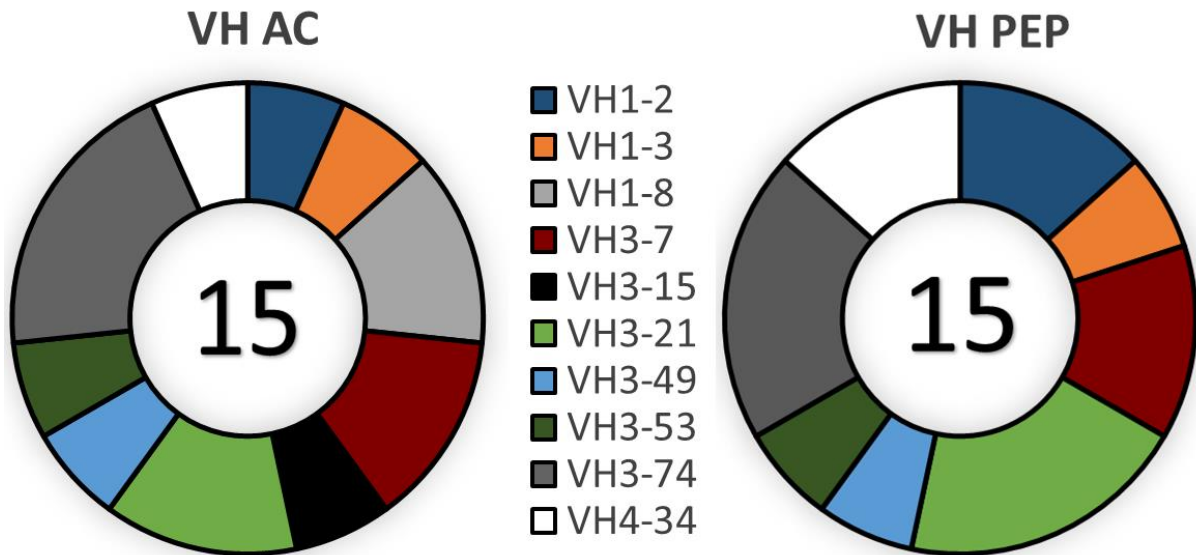


Figura 14. Famílias gênicas dos VH mais enriquecidos. Representatividade de cada família gênica de VH, no grupo de anticorpos mais enriquecidos na seleção-peptídeo, PEP, e na seleção ácida, AC. Foram analisadas as 15 sequências de VH mais enriquecidas de cada seleção. A largura de cada fatia do gráfico é proporcional ao número de sequências pertencente à específica família gênica.

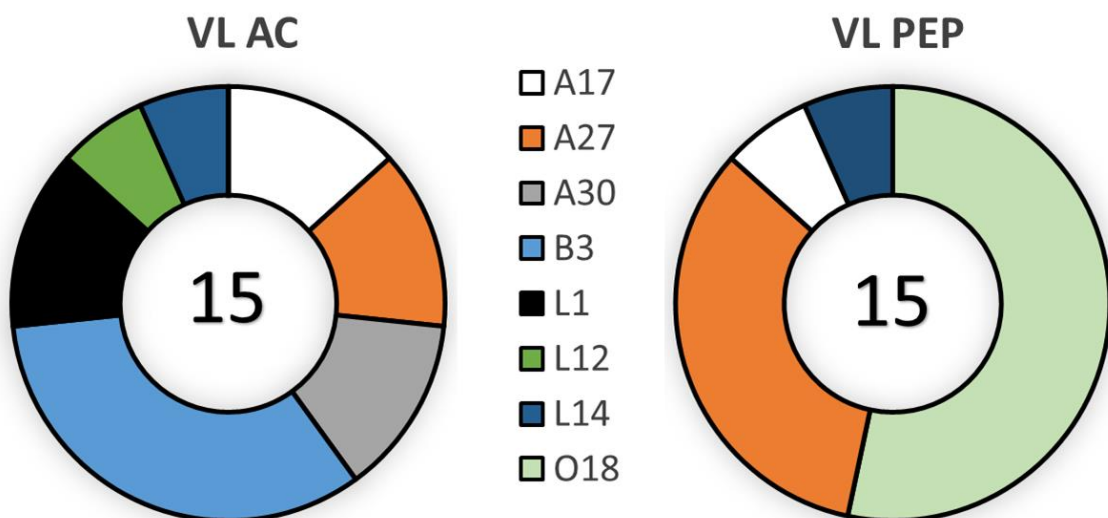


Figura 15. Famílias gênicas dos VL mais enriquecidos. Representatividade de cada família gênica de VL, no grupo de anticorpos mais enriquecidos na seleção-peptídeo, PEP, e na seleção ácida, AC. Foram analisadas as 15 sequências de VL mais enriquecidas de cada seleção. A largura de cada fatia do gráfico é proporcional ao número de sequências pertencente à específica família gênica.

Interessantemente, algumas sequências dos VH e VL mais enriquecidos apresentaram baixo nível de dissimilaridade às sequências germinais de imunoglobulina humana mais similares a elas. As sequências germinais correspondem às sequências de anticorpos que não sofreram rearranjo gênico nem hipermutação somática, presentes nas células B no início do processo de ontogenia dessas células. Por exemplo, Lp1, VL mais enriquecido na seleção-peptídeo, apresentou 5,3% de dissimilaridade; e Hp1 e Hac1, os VH mais enriquecido na seleção-peptídeo e seleção ácida respectivamente, apresentaram nenhuma dissimilaridade, tendo 100% de identidade à sequência germinal (**Figura 16**). De forma contrária, outras sequências apresentaram um grau maior de mutações, como o VH Hm1, que teve mais de 25 % de sua sequência diferente de sua sequência germinal mais próxima (**Figura 16**).

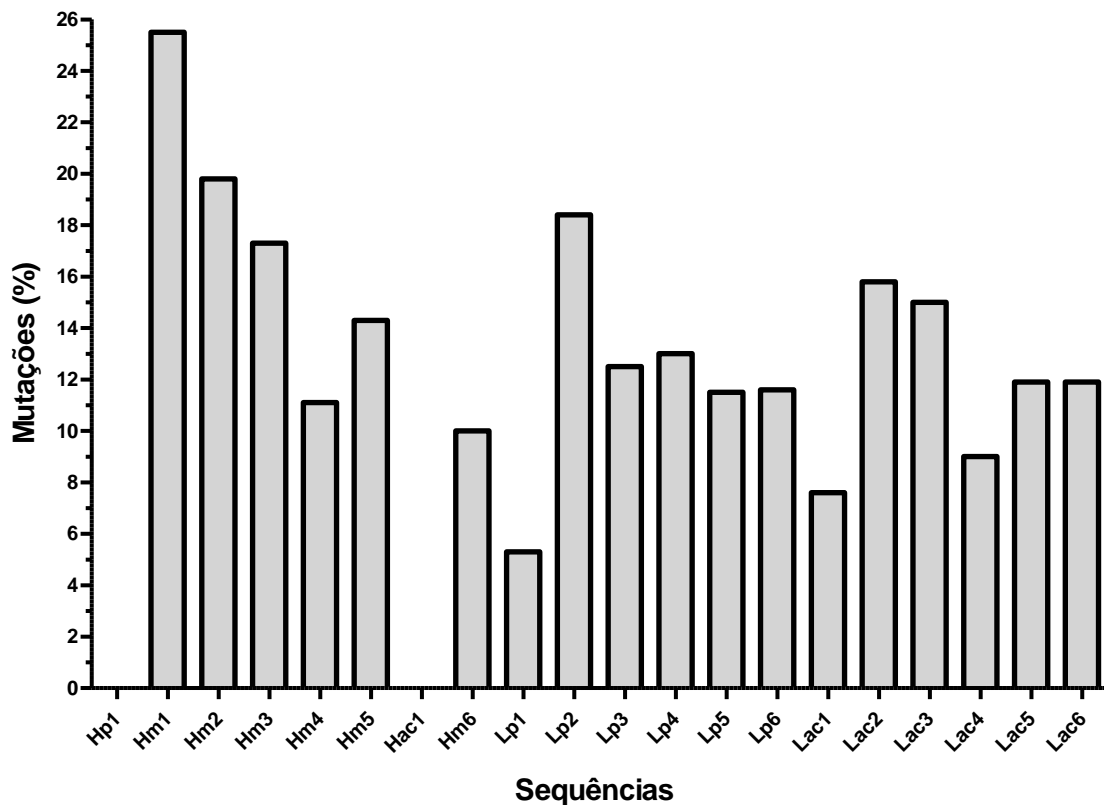


Figura 16. Análise de mutações dos anticorpos mais enriquecidos. Porcentagem de dissimilaridade das sequências de VH e VL mais enriquecidas em relação às suas respectivas sequências germinais.

6.5 DESENHO DE GENES

Os clones dos domínios VH e VL mais enriquecidos foram combinados estrategicamente, considerando a presença ou não em ambas seleções e considerando o seu

enriquecimento (FC), e foram usados para desenhar anticorpos recombinantes, no formato de scFv, (**Tabela 7**). Os segmentos gênicos codificadores dos scFv codificavam ainda cauda de histidina na porção aminoterminal (seis histidinas) e o epítipo HA (proteína hemaglutinina) na porção carboxiterminal, para purificação e detecção específica dos anticorpos (**Figura 17**).

Tabela 7. Combinação de VH e VL para construção dos scFv. Definição da combinação dos domínios VH e VL de cada anticorpo scFv. Seq: sequência. Família: Família gênica.

| Anticorpo | VH | | | VL | | |
|-----------|------|------|---------|------|------|---------|
| | Seq | FC | Família | Seq | FC | Família |
| AZ1p | Hp1 | 1318 | VH1-2 | Lp1 | 2308 | O18 |
| AZ2a | Hac1 | 3827 | VH4-34 | Lac1 | 1021 | L14 |
| AZ3m | Hm1 | 1074 | VH1-3 | Lp1 | 2308 | O18 |
| AZ4m | Hm1 | 1074 | VH1-3 | Lac1 | 1021 | L14 |
| AZ5m | Hm3 | 735 | VH3-7 | Lac1 | 1021 | L14 |
| AZ6m | Hm2 | 746 | VH3-53 | Lp1 | 2308 | O18 |
| AZ7p | Hp1 | 1318 | VH1-2 | Lp2 | 313 | A27 |

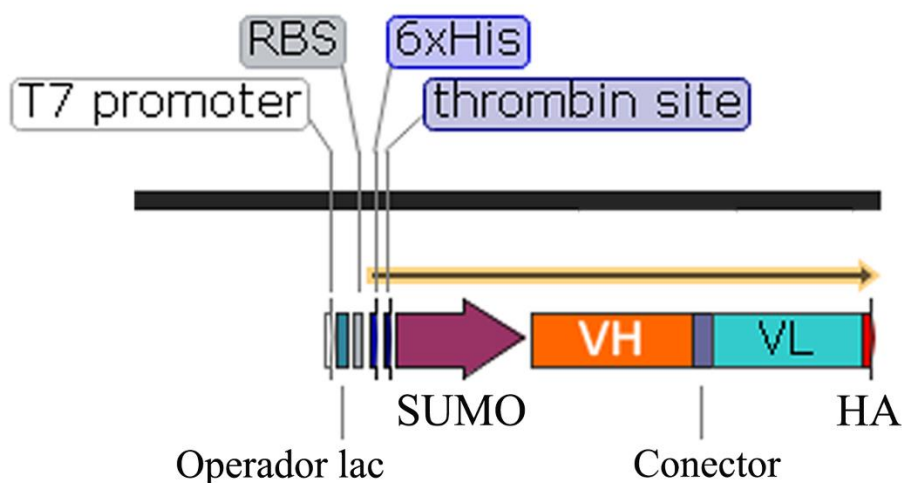


Figura 17. Sequência codificadora dos anticorpos recombinantes. Cassete de expressão dos scFv no vetor pET-SUMO em destaque, mostrando a sequência gênica codificadora de uma única proteína contendo os domínios variáveis da cadeia pesada e leve (VH e VL) ligados por uma sequência de peptídeo conector (conector): (GGGGS)₃. *T7 promoter*: promotor do fago T7. Operador lac: sítio de ligação do repressor do *operon Lac*. 6xHIS: sequência de seis resíduos de Histidina. HA: cauda de proteína hemaglutinina do vírus Influenza A (*accession number*: ATY52658.1). SUMO: proteína SMT3 da família SUMO de *Saccharomyces cerevisiae*. RBS: Sítio de ligação ao ribossomo (*Ribosomal binding site*). *Thrombin site*: sítio de clivagem da enzima Trombina.

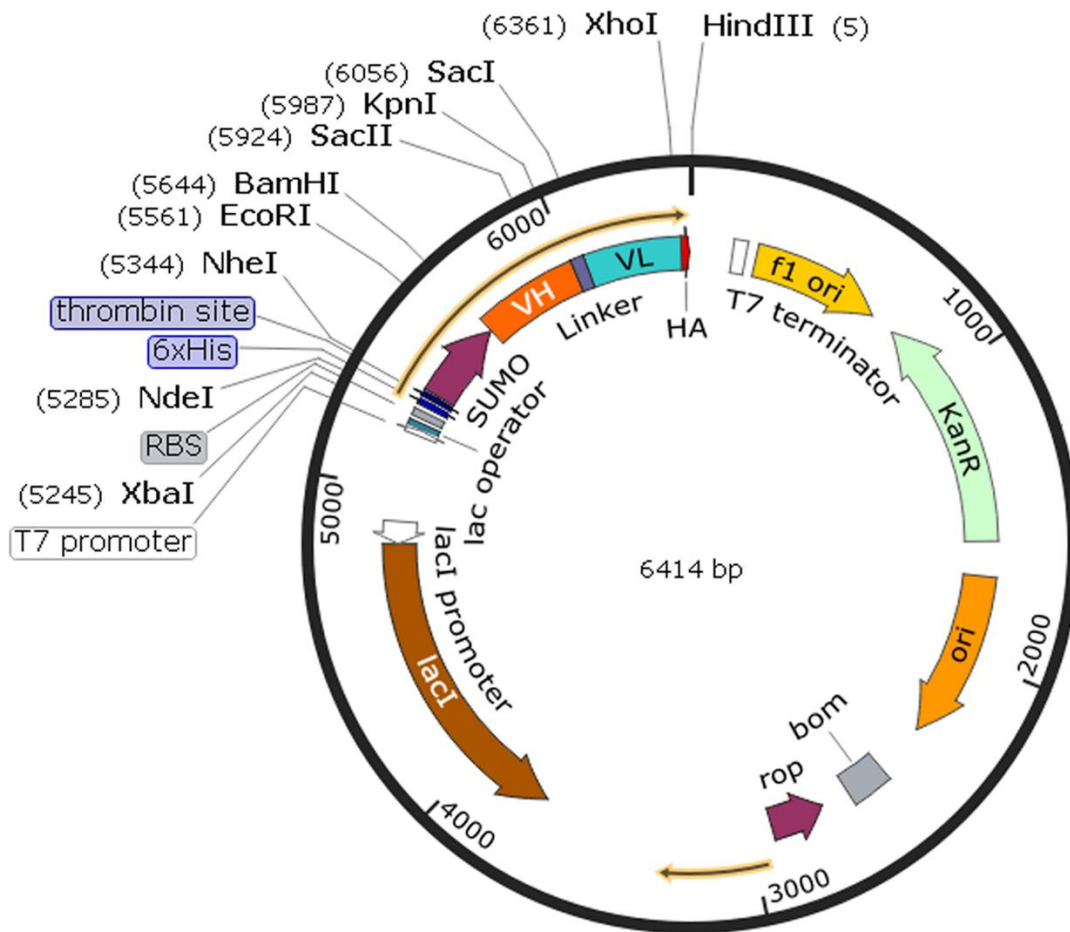


Figura 18. Vetor de expressão dos anticorpos recombinantes. Representação gráfica do vetor pET-SUMO de expressão heteróloga dos scFv em sistema de células bacterianas. *KanR*: resistência a Kanamicina. *T7 terminator*: terminador do fago T7. *Ori*: origem de replicação bacteriana.

Os genes dos scFv foram sintetizados e clonados no vetor de expressão pET-SUMO para a expressão heteróloga (**Figura 18**). Esse vetor é compatível com linhagens DE3 e contém a proteína SUMO. A clonagem dos genes nesse vetor foi pensada para aumentar os níveis de produção dos anticorpos recombinantes na forma solúvel em um sistema de expressão em células bacterianas. A clonagem foi confirmada pela digestão do vetor pET-SUMO com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (New England Biolabs, Ipswich, EUA), que liberou um fragmento entre 650 e 850 pares de base, tamanho esperado para o inserto (**Figura 19**).

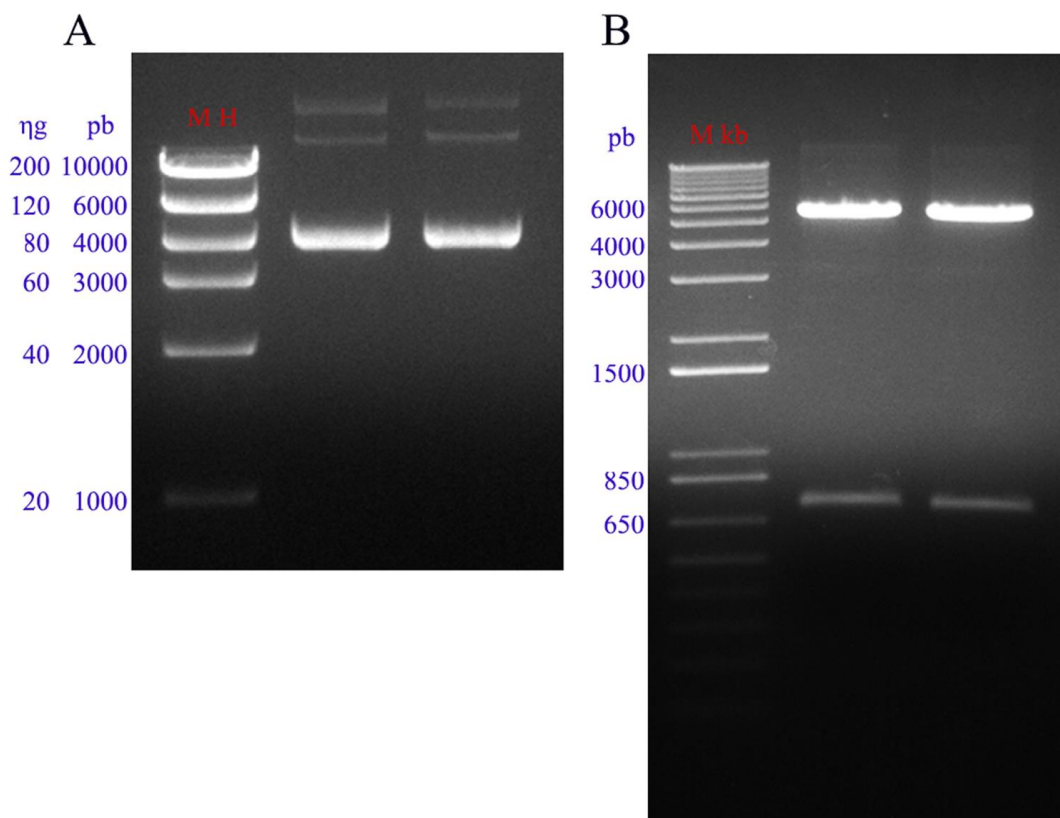


Figura 19. Análise da clonagem no vetor de expressão. Verificação da clonagem dos genes de scFv no vetor de expressão heteróloga pET-SUMO. **(A)** Análise do vetor intacto em gel de agarose (1,0%); 200 ng do vetor foram aplicados no gel. M H: Marcador de peso molecular High Mass (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, cat: 10496016). **(B)** Análise do vetor digerido por digestão dupla com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (New England Biolabs, Ipswich, EUA), liberando o inserto, de tamanho entre 650 e 850 pb, contendo os genes de scFv (VH, linker e VL). M kb: marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, cat: 10787018). Figura representa um experimento exemplo com genes de dois scFv, AZ1p e AZ3m, clonados no vetor pET-SUMO.

6.6 ANÁLISE DA PRESENÇA DAS COMBINAÇÕES VH E VL

Foi verificado se as combinações dos VH e VL mais enriquecidos já existiam na biblioteca de anticorpos expressos na superfície de fagos, usada na seleção, para assegurar que as construções dos scFv propostas poderiam permitir a expressão de proteínas viáveis, tendo em vista que como o sequenciamento dos domínios variáveis foi realizado de forma separada para cadeia pesada e cadeia leve, essas combinações poderiam levar a anticorpos recombinantes cujas estruturas eram instáveis para serem produzidas. Para isso, foi realizada uma reação de PCR, usando iniciadores específicos para as CDR3 dos VH e VL, tendo a biblioteca como DNA molde. Foi possível amplificar todas as combinações de VH e VL empregadas na construção dos scFv (**Figura 20**).

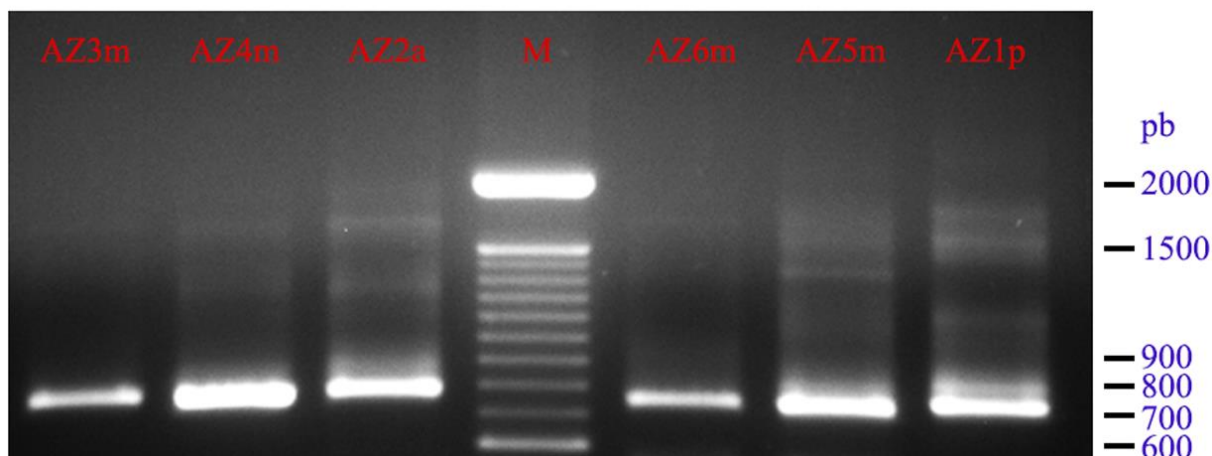


Figura 20. Análise das combinações de VH e VL. Verificação da presença, na biblioteca de anticorpos de *Phage Display*, das combinações dos domínios variáveis usados na construção dos scFv, por meio de reação de PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose (1,2%). M: Marcador de peso molecular 100 bp plus DNA ladder. Em vermelho cada um dos anticorpos recobinantes. Os VH dos scFv AZ1p e AZ7p possuem a mesma CDR3.

6.7 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS RECOMBINANTES

Os scFv foram produzidos em células *E. coli* linhagem *Shuffle pLys Y* e linhagem *BL21 pLys S* para a verificar, em qual célula, a produção seria mais adequada. Ambas células são compatíveis com vetores de expressão com promotor T7 (DE3), como o pET-SUMO, mas possuem características diferentes que podem influenciar na produção das proteínas heterólogas. Culturas de células foram crescidas, até atingirem alta densidade óptica (D. O. de 2,0) e a produção foi induzida na presença de IPTG (1 mM) por 2, 4 e 16 horas e à temperatura de 25°C, para avaliar a produção em diferentes tempos de indução. A produção foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes e redutoras, e Imunoensaio (*Western-blot*). Na avaliação da produção, as proteínas obtiveram melhores resultados com os tempos de 4 e 16 horas de indução (**Figura 21 e Figura 22**), sem muita diferença entre esses tempos. E as células *Shuffle pLys Y* apresentaram uma maior quantidade de anticorpo produzido (**Figura 21B**) que a gerada pelas células *BL21 pLys S* (**Figura 22B**).

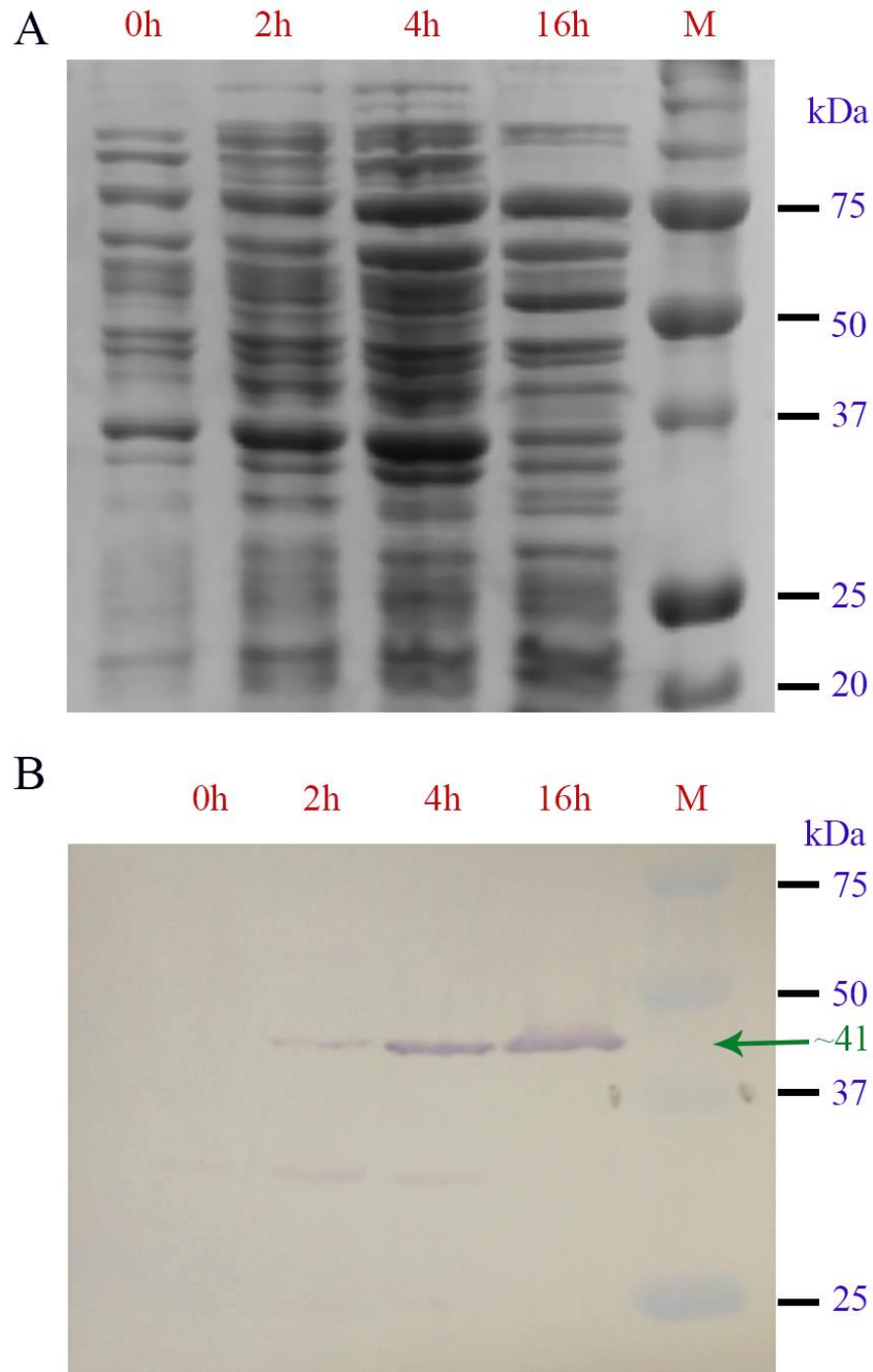


Figura 21. Análise da produção em *Shuffle pLys Y*. Análise, em SDS-PAGE (12%) (A) e Western-blot (B), da produção dos anticorpos recombinantes na célula *Shuffle pLys Y*. Em vermelho, é apresentado o tempo de indução com 1 mM de IPTG. M: Marcador de peso molecular All Blue (Biorad, California, EUA, cat :#1610373). A seta verde indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante de tamanho aproximado de 41 kDa. Figura representa um experimento exemplo de um dos scFv.

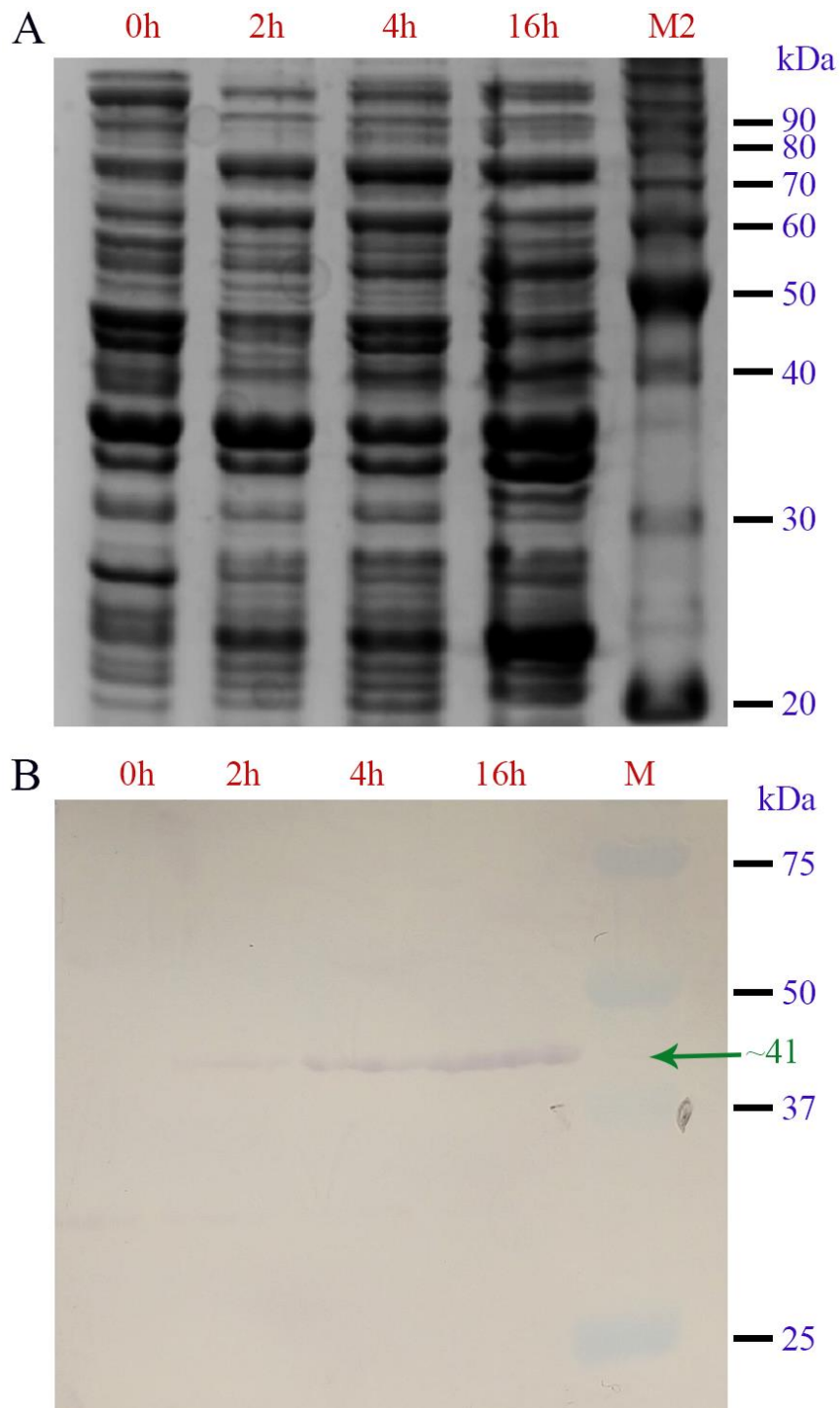


Figura 22. Análise da produção em *BL21 pLys S*. Análise, em SDS-PAGE (12%) (A) e Western-blot (B), da produção dos anticorpos recombinantes na célula *BL21 pLys S*. Em vermelho, é apresentado o tempo de indução com 1mM de IPTG. M2: Marcador de peso molecular BenchMarker (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, cat: 10747012). M: Marcador de peso molecular All blue (Biorad, California, EUA, cat: #1610373). A seta verde indica a banda correspondente ao anticorpo recombinante de tamanho aproximado de 41 kDa. Figura representa um experientio exemplo de um dos scFv.

As células *Shuffle pLys Y* foram escolhidas para a produção dos demais anticorpos, com tempo de 4 h de indução, no qual foi observado uma banda mais íntegra da proteína, para evitar possíveis problemas com um tempo longo de produção, como degradação e formação de corpos de inclusão.

Os anticorpos recombinantes AZ6m e AZ3m foram produzidos e purificados por cromatografia de afinidade a metal imobilizado pela cauda de histidina presente nas proteínas. O método de purificação consistiu no uso de colunas contendo resina saturada com níquel para a ligação dos anticorpos com HIS-tag e remoção de proteínas não específicas por centrifugação. Os anticorpos foram purificados em níveis de pureza diferentes (**Figuras 23 e 24**), e as frações eluídas foram dessalinizadas e quantificadas.

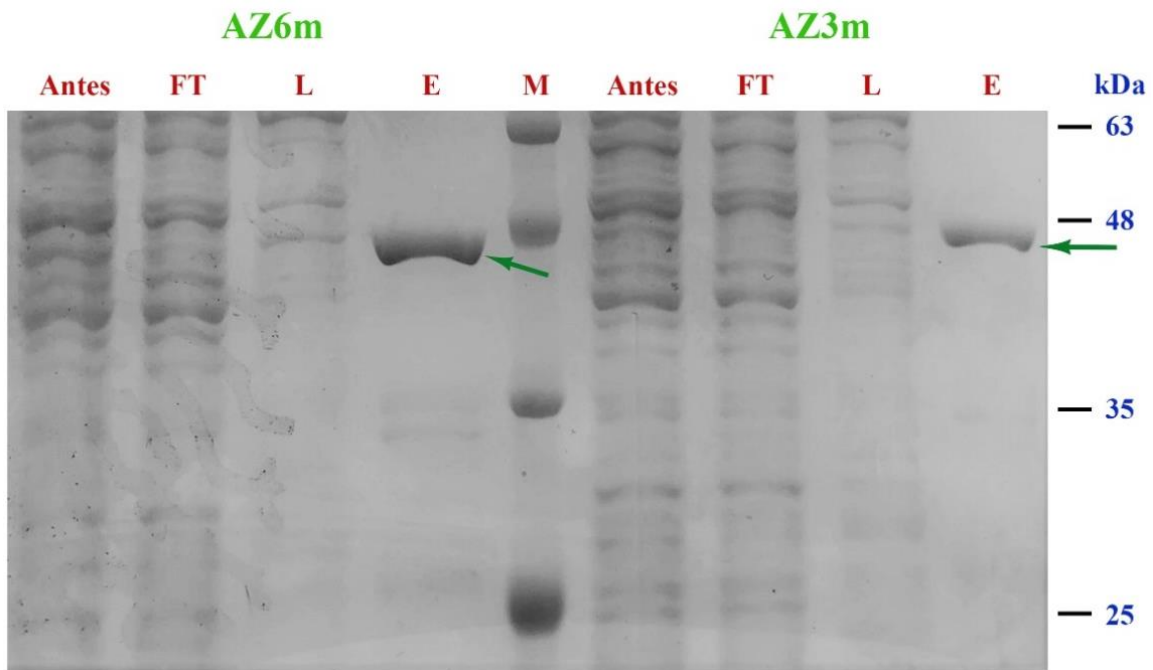


Figura 23. SDS-PAGE da Purificação dos scFv AZ6m e AZ3m. Análise por Eletroforese em gel de Poliacrilamida (desnaturante e redutor, 12%) da purificação dos anticorpos recombinantes AZ6m e AZ3m em sistema de purificação por centrifugação, com colunas de níquel imobilizado. Em vermelho, Antes: fração das proteínas antes de purificar; FT: fração que passou pela coluna ao aplicar a amostra (*Flow-Through*); L: Lavagem com 50 mM de Imidazol; E: fração eluída com 500 mM de Imidazol; 1 % do volume total da fração eluída foi aplicado no gel. M: Marcador de peso molecular BlueRay Prestained Marker (JenaBioscience, Jena, Alemanha, cat: PS-103). A seta verde indica a banda do scFv purificado com tamanho aproximado de 41 kDa.

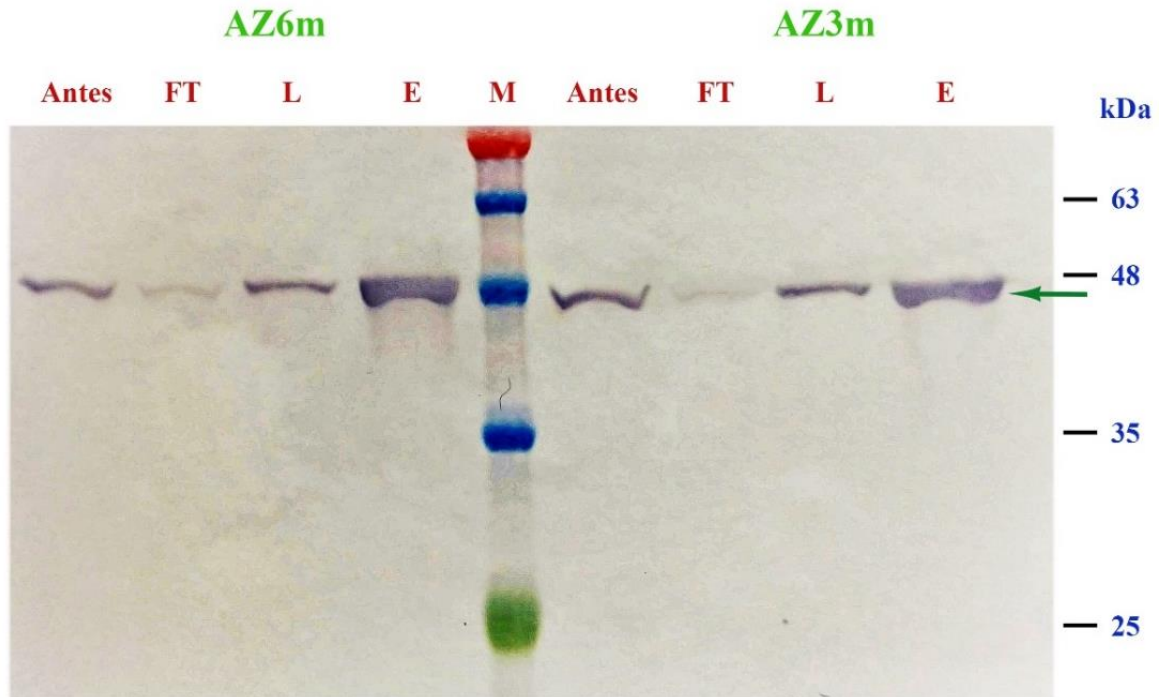


Figura 24. Western-blot da Purificação dos scFv AZ6m e AZ3m. Análise por Western-blot (gel 12%) da purificação dos anticorpos AZ6m e AZ3m. Em vermelho, Antes: fração das proteínas antes de purificar; FT: fração que passou pela coluna ao aplicar a amostra (*Flow-Through*); L: Lavagem com 50 mM de Imidazol; E: fração eluída com 500 mM de Imidazol; 1 % do volume total da fração eluída foi aplicado no gel. M: Marcador de peso molecular BlueRay Prestained Marker (JenaBioscience, Jena, Alemanha, cat: PS-103). A seta verde indica a banda do scFv purificado com tamanho aproximado de 41 kDa.

O anticorpo recombinante AZ1p foi produzido e purificado nas mesmas condições, e sua purificação foi avaliada também por eletroforese em gel de poliacrilamida e Western-blot. (Figura 25 e 26).

No imunoenensaio, foram observadas uma banda forte, correspondente ao tamanho do anticorpo desnaturado e reduzido de aproximadamente 41 kDa, e algumas bandas fracas de tamanhos menores, tanto na imunodeteção com anticorpo anti-HA-tag (situado na porção carboxi-terminal da proteína recombinante), quanto na imunodeteção usando um anticorpo anti-HIS-tag (situado na porção amino-terminal) (Figura 26).

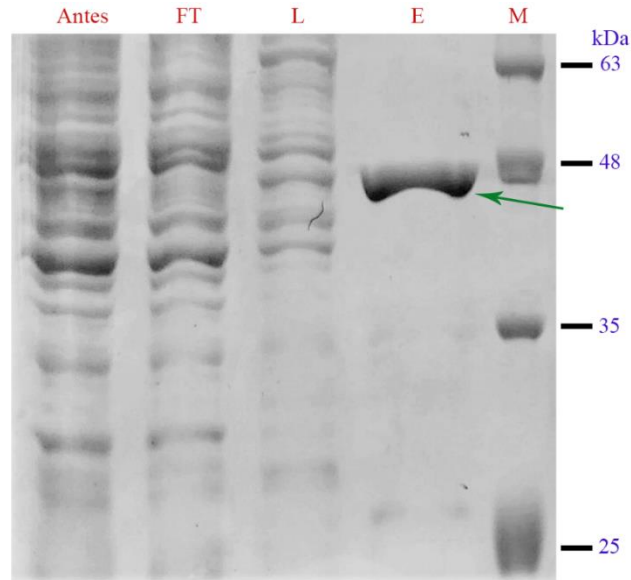


Figura 25. SDS-PAGE da Purificação do scFv AZ1p. Análise por SDS-PAGE (desnaturante e redutor, 12%) da purificação do anticorpo AZ1p com colunas de níquel imobilizado. Em vermelho, Antes: fração das proteínas antes de purificar; FT: fração que passou pela coluna ao aplicar a amostra (*Flow-Through*); L: Lavagem com 50 mM de Imidazol; E: fração eluída com 500 mM de Imidazol; 1 % do volume total da fração eluída foi aplicado no gel. M: Marcador de peso molecular BlueRay Prestained Marker. A seta verde indica a banda do scFv purificado com tamanho aproximado de 41 kDa.

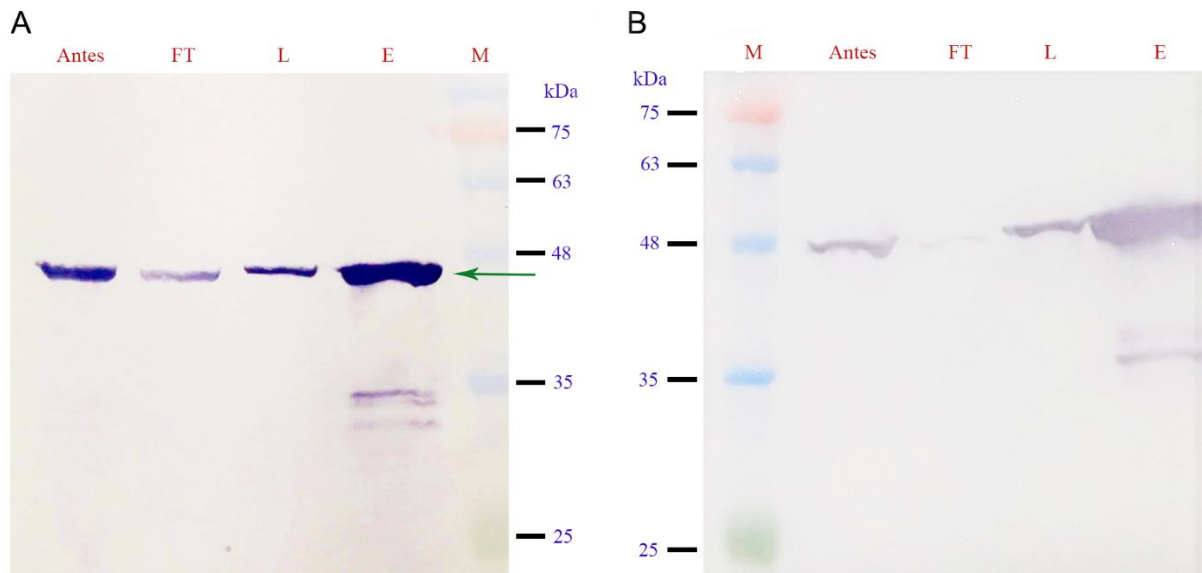


Figura 26. Western-blot da Purificação do scFv AZ1p. Análise por Western-blot (gel 12%) da purificação do anticorpo AZ1p. (A) A detecção do scFv foi realizada pelo uso de anticorpo anti-HA, seguido, do uso de um anticorpo secundário conjugado. (B) A detecção do scFv foi realizada pelo uso de anticorpo monoclonal anti-HIS-tag conjugado à fosfatase alcalina. Antes: fração antes de purificar; FT: *Flow-Through* ao aplicar a amostra; L: Lavagem com 50 mM de Imidazol; E: fração eluída com 500 mM de Imidazol; 2 % do volume total da fração eluída foi aplicado no gel. M: Marcador de peso molecular BlueRay Prestained Marker. A seta verde indica a banda do scFv purificado com tamanho aproximado de 41 kDa.

O rendimento da produção dos anticorpos foi avaliado após a quantificação. Os três anticorpos apresentaram diferentes rendimentos na produção e grau de pureza. AZ1p, AZ3m e AZ6m foram produzidos com rendimento final de 2,3 mg; 1,1 mg e 2,6 mg de proteína por litro de cultura, respectivamente (**Tabela 8**).

Tabela 8. Avaliação do rendimento da produção e purificação dos anticorpos. O rendimento é expresso em miligrama (mg) de proteína por litro (L) de cultura.

| Anticorpo | Rendimento na produção | Rendimento pós purificação | Grau de pureza |
|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| AZ1p | 3 mg/L | 2,3 mg/L | 76,1% |
| AZ3m | 1,4 mg/L | 1,1 mg/L | 75% |
| AZ6m | 3,1 mg/L | 2,6 mg/L | 83,1% |

6.8 LIGAÇÃO DOS ANTICORPOS AO ANTÍGENO VIRAL

Os anticorpos recombinantes humanos puros foram avaliados quanto à capacidade de ligação ao antígeno do *loop* de fusão dos Flavivirus, usado na seleção, por ELISA. Todos os scFv foram capazes de ligar ao antígeno viral, entretanto as ligações das proteínas apresentaram comportamentos diferentes. O anticorpo AZ6m teve maior atividade de ligação ao antígeno viral, com uma ligação bem acima da observada com os outros scFv (**Figura 27**).

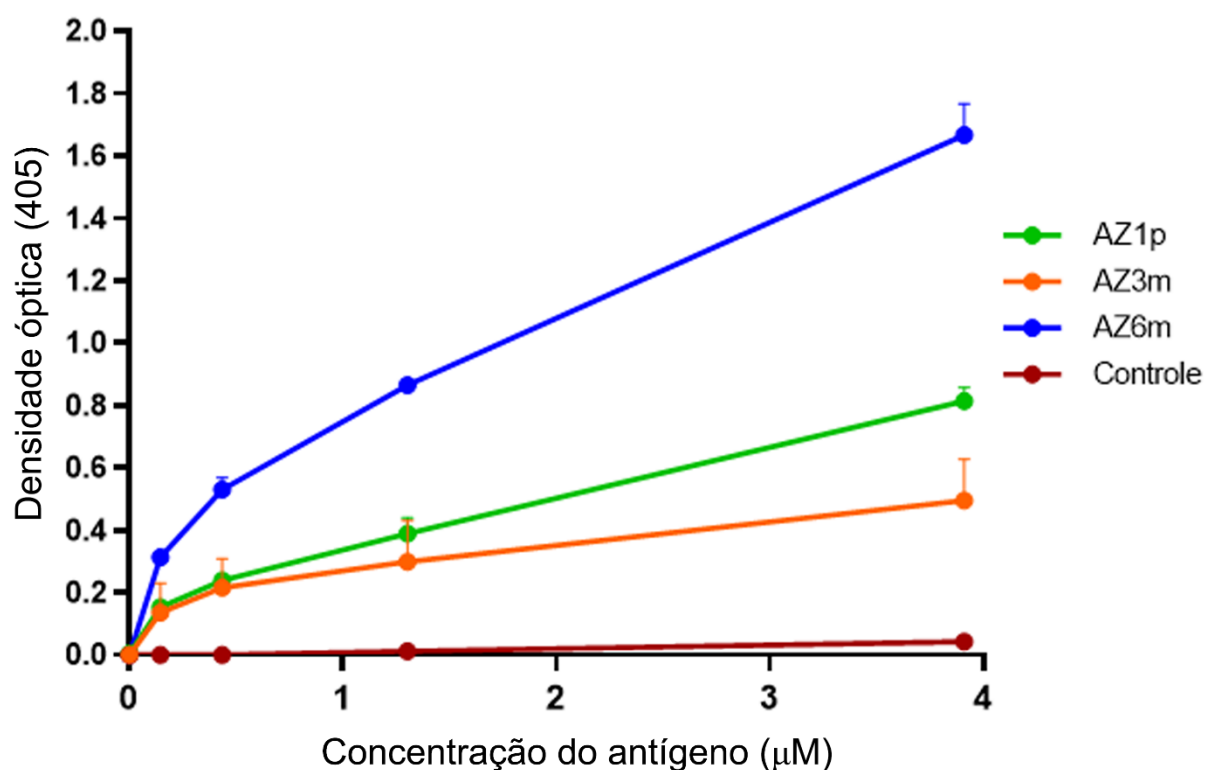


Figura 27. Ligação dos anticorpos ao *loop* de fusão viral. Avaliação por Elisa da ligação dos scFv ao ao FL de Flavivirus. O imunoenensaio foi realizado pela sensibilização da placa de Elisa com os anticorpos recombinantes os quais foram testados quanto à captura do antígeno viral, em diferentes concentrações (0,14; 0,43; 1,30 e 3,90 µM). Controle: controle de isotipo com um scFv específico a um antígeno não relacionado, produzido no mesmo sistema de expressão heterólogo dos scFv anti-ZIKV.

Os fragmentos de anticorpos foram testados também quanto à ligação ao vírus usando a partícula viral inteira, para investigar se eles eram capazes de ligar ao antígeno em sua conformação nativa do vírus, tendo em vista que o dobramento proteico da partícula viral inteira poderia esconder alguns aminoácidos que compõe o epítipo reconhecido pelos anticorpos e, assim, o comportamento de ligação dos scFv ao vírus inteiro poderia ser diferente da observada com o peptídeo viral.

O imunoenensaio foi realizado com vírus Zika inativado em condições próximas das fisiológicas; pH 7,4 e temperatura de 37 °C. Todos os anticorpos recombinantes testados se ligaram ao vírus, na conformação nativa, de maneira diferente da observada no imunoenensaio de ligação ao peptídeo viral. Entretanto a ligação dos três scFv foi semelhante, com o anticorpo AZ3m apresentando a melhor ligação entre eles (**Figura 28**).

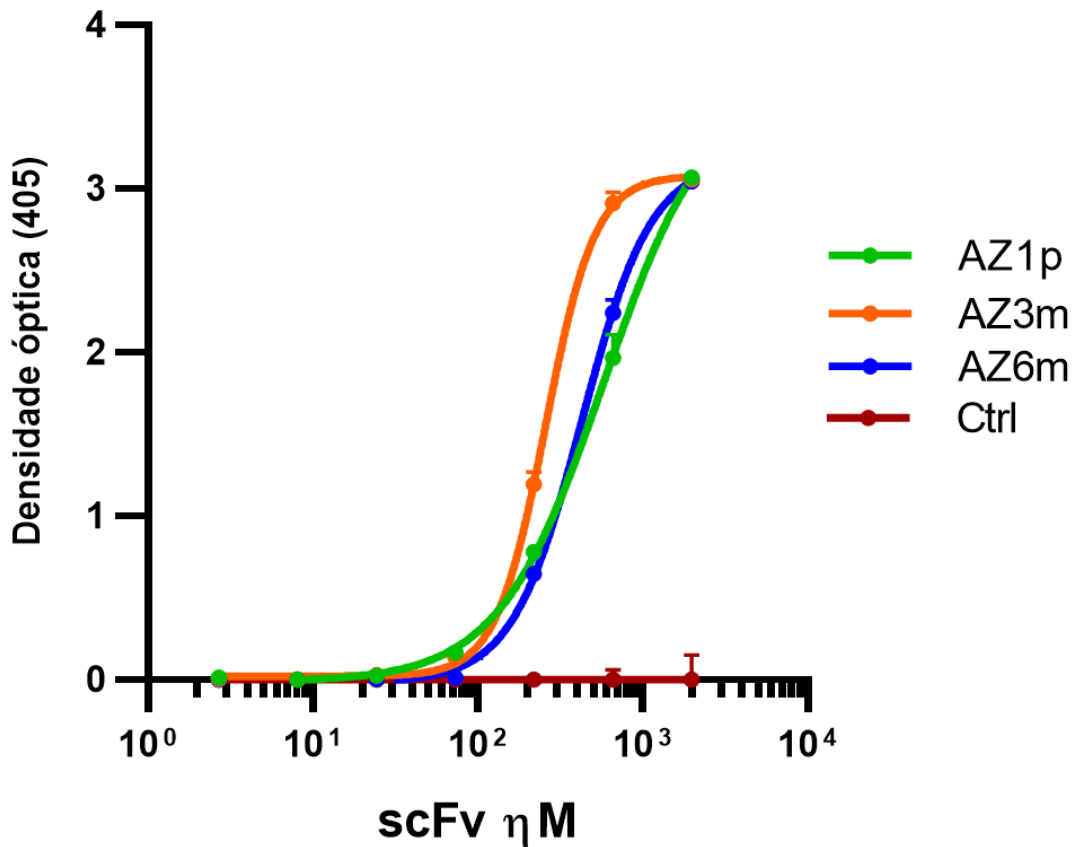


Figura 28. Ligação dos anticorpos ao vírus Zika. Avaliação, por ELISA, da ligação dos scFv ao vírus Zika imobilizado em uma placa de Elisa. Os dados mostram as médias de absorvância de diferentes diluições dos scFv (2,72 ηM a 1980 ηM), obtidas em pelo menos dois experimentos independentes, com scFv de produções heterólogas diferentes. Controle: controle de isotipo com um scFv específico a um antígeno não relacionado, produzido com vetor de expressão pET-SUMO em células de *Shuffle pLys Y* e purificado sob as mesmas condições de purificação dos scFv anti-ZIKV.

Os valores de EC₅₀ (concentração em que se observa metade da ligação máxima ao antígeno a qual corresponde à ligação efetiva) dos anticorpos anti-ZIKV, AZ1p, AZ3m e AZ6m, foram 580,4; 258,1 e 427,6 η M, respectivamente (**Tabela 9**).

Tabela 9. Análise da ligação ao vírus Zika. Valor da ligação efetiva dos anticorpos recombinantes ao vírus Zika, EC₅₀ (concentração em que se observa metade da ligação máxima dos anticorpos). Os valores foram obtidos pela análise dos resultados de ELISA com a partícula viral inteira do vírus Zika, por regressão não linear. Controle: scFv específico a um antígeno não relacionado, produzido nas mesmas condições dos scFv anti-ZIKV.

| Anticorpo | EC ₅₀ (η M) |
|-----------|------------------------------|
| AZ1p | 580,4 |
| AZ3m | 258,1 |
| AZ6m | 427,6 |
| Controle | Não ligante |

6.9 ATIVIDADE NEUTRALIZANTE DOS ANTICORPOS

A capacidade dos anticorpos anti-*loop* de fusão de neutralizar a infecção, por vírus Zika, foi avaliada por meio do ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT), medindo a formação de placas, que são regiões de efeito citopático, em cultura de células *Vero* (célula suscetível à infecção pelo vírus). O ensaio envolveu a incubação prévia de diluições dos fragmentos de anticorpos com o vírus e, em seguida, a incubação da mistura anticorpo-vírus com as células. A redução da infecção foi definida pela redução do número de placas formadas nos poços da placa de cultura contendo diluições dos anticorpos em relação ao número de placas nos poços em que não havia anticorpos. Todos os anticorpos conseguiram neutralizar o vírus com valores de neutralização semelhantes entre eles. (**Figura 29**). Esses valores foram próximos também da neutralização gerada pelo controle positivo, em que foi testado diluições de soro de camundongo imunizado com vírus Zika, previamente caracterizado.

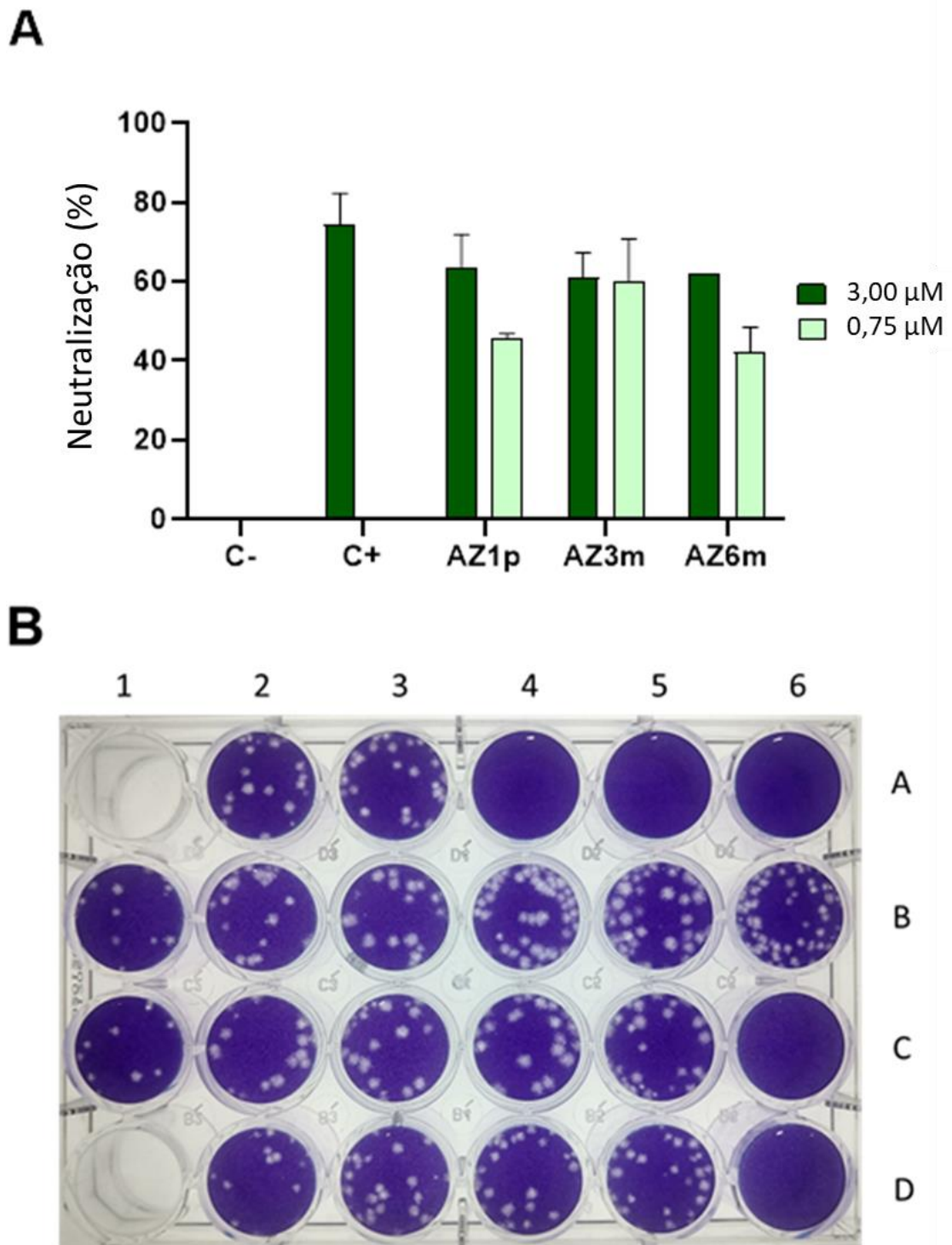


Figura 29. Ensaio de neutralização da infecção por vírus Zika. (A) Avaliação da capacidade dos anticorpos de neutralizar a infecção de células *Vero* por Vírus zika, por meio do teste de redução de placa. A neutralização corresponde ao percentual de redução do número de placas nos poços contendo os anticorpos (scFv). C+ corresponde a neutralização usando soro de camundongo imunizado com o vírus. C- corresponde aos poços sem anticorpo. (B) Imagem representativa das placas de cultura utilizadas no ensaio. Anticorpo recombinante a 500 µg/mL (2D e 3D); 250 µg/mL (2C e 3C); 125 µg/mL (2B e 3B); 62,5 µg/mL (2A e 3A); 31,25 µg/mL (4D e 5D); 15,6 µg/mL (4C e 5C); C+ (1B e 1C); só células (4A, 5A e 6A); células e vírus (4B, 5B e 6B); células e anticorpo recombinante a 500 µg/mL, sem vírus, (6C e 6D).

7. DISCUSSÃO

Abordagens terapêuticas para infecções virais baseados na imunização passiva com anticorpos oferecem um mecanismo de neutralização da infecção mais eficaz e seguro, em razão da alta afinidade e especificidade única obtidas pelos domínios altamente variáveis dessas proteínas. Anticorpos neutralizam infecções virais bloqueando proteínas ou glicoproteínas dos vírus envolvidas na ligação da partícula viral a receptores membranares ou na penetração dela ao citosol (Murin *et al.*, 2019; Krammer, 2019). O *loop* de fusão é uma região do Domínio II da Proteína E, altamente conservada entre os Flavivirus, e exerce função de mediar a liberação dos vírus no citoplasma, na fase tardia do processo de infecção (Zonetti *et al.*, 2018). Visando obter anticorpos monoclonais humanos e específicos para esse epítipo neutralizante do envelope viral, foi empregada uma seleção pela tecnologia de *Phage Display*, usando o FL como antígeno.

O *Phage Display* é uma metodologia de padrão-ouro para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos, porque permite a obtenção de anticorpos totalmente humanos e de alta afinidade, o que aumenta a segurança e a eficácia do tratamento. Além disso, é um sistema mais simples e rápido com abordagens diversas de seleção contra diferentes tipos de antígenos (antígeno imunogênico ou não, células ou tecidos inteiros, organismos vivos, antígenos tóxicos, etc.). Todas essas características resultam na obtenção de anticorpos mais estáveis e de maior afinidade, ou de afinidade moldada, ao antígeno de interesse, o que faz com que essa alternativa se sobressaia a outros métodos de isolamento de anticorpos humanos (Ledsgaard *et al.*, 2018; Chiu *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2019)

A tecnologia do *Phage Display* envolve a seleção de anticorpos ligantes a um antígeno viral a partir de uma biblioteca de anticorpos de alta variabilidade, e diferentes formas de seleções podem ser executadas dependendo da finalidade da pesquisa científica. Entretanto, problemas envolvendo ligação inespecífica e inacessibilidade do epítipo de interesse para ligação podem ocorrer (Christiansen, 2015; Noh *et al.*, 2019). Com o objetivo de diminuir esses problemas e entender o processo de seleção proposto, foi utilizado como alvo de seleção, o *loop* de fusão conjugado à uma molécula de biotina (**Figura 9**) de tal forma a permitir uma plataforma de seleção com o antígeno imobilizado em uma placa de ELISA sensibilizada com estreptavidina, para restringir o seu grau de liberdade ao se ligar na placa, evitando que o

antígeno pudesse assumir uma posição e conformação que impediriam a ligação do anticorpo, e para aumentar o nível de sensibilização da placa.

Além disso, o antígeno para seleção foi desenhado contendo o FL ligado a um peptídeo do domínio II, com sequência SRCPT, por uma ponte dissulfeto, tal como ocorre na partícula viral (**Figura 10**), visando que o antígeno apresentasse uma conformação próxima da encontrada na realidade do envelope viral, restringindo o seu grau de liberdade. Foram realizadas duas formas de eluição, uma eluição não seletiva (seleção ácida) e outra específica a anticorpos que de fato se ligam ao antígeno viral (**Figura 11**) por competição (seleção-peptídeo), utilizando uma solução saturante de um peptídeo capturador contendo apenas a sequência do FL (**Figura 9**). A ideia nessa eluição por competição, é isolar apenas os anticorpos que de fato se ligaram ao FL, evitando anticorpos que se ligaram ao peptídeo SRCPT ou a qualquer outro antígeno presente na plataforma de seleção.

Os títulos de fagos não revelaram um comportamento típico de titulação reportado em experimentos de *Phage Display* (Sharifzadeh *et al.*, 2013; Jo *et al.*, 2018), nos quais, à medida que se aproxima dos últimos ciclos de seleção, os títulos de fagos *output* se aproximam dos títulos de fagos *input*, mostrando que a seleção caminha para o limite da capacidade de seleção, em que quase todos os fagos que entram na seleção são eluídos. O comportamento anômalo da titulação pode ser devido ao fato da permanência do efeito de seleção, a qual não estava próxima do esgotamento e que exigiria mais ciclos de seleção para alcançar o nível máximo. Por outro lado, os títulos de fagos *output* reduziram conforme a pressão seletiva aumentava (**Tabela 2**), corroborando com a ideia de um processo seletivo que ainda ocorreria.

Diante do resultado da titulação de fagos, foi realizada uma análise de diversidade da biblioteca de anticorpos antes e depois da seleção para confirmar o sucesso do processo seletivo. A análise de diversidade de bibliotecas de *Phage Display* pode ser feita por sequenciamento de clones de anticorpos apanhados de forma aleatória, e representativos da população de anticorpos antes e após a seleção, tal como realizado em algumas seleções de *Phage Display* (Bagheri *et al.*, 2017; Fahimi *et al.*, 2018; Norbury *et al.*, 2019). O sequenciamento revelou que houve uma redução da diversidade de anticorpos ao longo dos 4 ciclos de ambas seleções (**Tabela 3**), como esperado em um processo de seleção de anticorpos (Christiansen, 2015), confirmando o sucesso no processo de seleção de anticorpos da biblioteca com afinidade ao antígeno viral e assegurando a continuação da análise do progresso da seleção por sequenciamento de alta performance das populações de anticorpos, para verificar o

comportamento de todos os anticorpos no sistema de seleção, bem como avaliar as diferenças entre as duas seleções.

O sequenciamento de alto rendimento é um método de análise rápida do progresso da seleção que permite avaliar todos os clones da população de anticorpos de cada ciclo de seleção ao mesmo tempo. Por isso essa forma de análise de seleção de *Phage Display* tem se destacado perante outros métodos (Christiansen, 2015; Barreto *et al.*, 2019; Noh *et al.*, 2019). A avaliação computacional do sequenciamento evidenciou uma redução da diversidade da biblioteca ao longo da seleção (**Tabela 4**), corroborando com os dados do sequenciamento anterior (análise monoclonal da seleção por Sanger), e identificou os VH e VL mais enriquecidos, que tiveram a sua frequência aumentada na população de anticorpos pela pressão seletiva (**Tabela 5 e 6**). Durante a seleção, os anticorpos competiram pela ligação ao antígeno, e aqueles com maior afinidade mantiveram a ligação frente à adstringência da seleção (lavagem) e conseguiram permanecer na próxima fase da seleção, aumentando a sua representatividade na população. Os domínios variáveis mais enriquecidos tiveram uma razão de aumento entre 1000 e 3900, isso significa que esses domínios apresentaram uma frequência, no ciclo 4 de seleção, 1000 a 3900 vezes maior do que a sua frequência no ciclo 0, antes da seleção (**Tabela 5 e 6**).

Interessantemente, as duas seleções compartilharam todos os VH mais enriquecidos, com exceção do primeiro VH mais enriquecido de cada uma delas, Hp1 e Hac1 (**Tabela 5**). Isso demonstra que a maneira pela qual foi realizada a eluição dos anticorpos ligantes favoreceu um VH frente aos demais. É possível que na seleção-peptídeo, a eluição conseguiu selecionar um VH (Hp1) que tem alta especificidade, mas baixa afinidade ao peptídeo, e que Hac1 seja algum contaminante (anticorpo não específico) no sistema de seleção ou um anticorpo de grande afinidade que dificultou a quebra da sua ligação na eluição por competição ou ainda que seja um VH cuja ligação depende de uma conformação do loop de fusão que não era encontrada no peptídeo competidor, que continha apenas a sequência do loop de fusão. Isso porque a eluição ácida é uma eluição que desfavorece quaisquer ligações anticorpo-antígeno de forma inespecífica e mais intensiva, característica essa demonstrada pela maior diversidade de famílias gênicas encontrada no grupo de domínios variáveis mais enriquecidos na seleção ácida em comparação com o grupo na seleção-peptídeo (**Figura 14 e 15**). Essa diferença de diversidade gênica entre as seleções não se limita a apenas as sequências mais enriquecidas, tal como observada na análise das famílias gênicas de todas as sequências da biblioteca ao longo da seleção (**Anexo, Figura 4**).

Ao contrário dos domínios da cadeia pesada, nenhum dos VL mais enriquecidos estiveram presente em ambas seleções (**Tabela 6**), isso mostra que a seleção dos domínios VH e VL se comporta de maneira distinta sugerindo que a participação dos domínios à ligação ao epítopo de fato é diferente. Uma explicação possível para esse fato é que o VH exerce um papel preponderante na ligação do anticorpo ao antígeno, permitindo uma flexibilidade maior na “escolha” do VL para a montagem do paratopo. Ou seja, um VH de alta afinidade pode interagir com VLs de alta afinidade ou com VLs de menor afinidade sem comprometer muito a ligação do anticorpo ao antígeno, mas o contrário não é possível.

Outro resultado interessante da análise das sequências dos domínios selecionados é o alto nível de mutações que diferem essas sequências das suas respectivas sequências germinais; alguns domínios apresentaram valores de dissimilaridade maiores do que 15% (**Figura 16**). Isso chama atenção devido ao fato de que, geralmente, mutações decorrentes dos processos de recombinação e hipermutação somática, durante o desenvolvimento e expansão clonal de células B na resposta imune humoral, resultam em variabilidade de até 15% na sequência do paratopo, mas não excluindo a possibilidade de níveis maiores de variação. Estudos da resposta imune mediada por anticorpos, mostraram que, em certos contextos imunológicos, é possível acumular mais de cem mutações nas regiões de CDRs e *frameworks*, como por exemplo na seleção imune de anticorpos de alta neutralização em infecções do vírus *Influenza* e de HIV. Além do mais, eventos de inserções e deleções, que ocorrem como subprodutos da hipermutação somática, também são comuns em anticorpos neutralizantes de HIV e podem contribuir para aumento da variabilidade dos anticorpos em relação ao parente germinal (Klein *et al.*, 2013; Methot *et al.*, 2017).

Além de um resultado natural da maturação das células B no sistema Imune, obtidas para a construção da biblioteca do *Phage Display* utilizada, esses valores de mutação encontrados nessa análise podem ser devido a erros introduzidos no processo de amplificação dos genes de VH e VL ou no sequenciamento deles. No entanto, a hipótese de que essas mutações são devidas a erros na PCR e no sequenciamento, é reduzida pelo fato das sequências analisadas serem correspondentes aos domínios mais enriquecidos na seleção, ou seja, que tiveram um aumento nas suas frequências na biblioteca. Desse modo, como são sequenciados diversos clones deles (a sequência pe lida várias vezes), o efeito desses erros na identificação correta das sequências é reduzido. Ainda assim, alguns domínios apresentaram baixo nível de mutação, como Hpl e Hac1 que tiveram 100% de identidade com sua sequência germinal, isto é, são sequências germinais (**Figura 16**). Assim tanto anticorpos germinais, como o scFv

AZ1p, quanto anticorpos que sofreram hipermutação somática, como o scFv AZ3m, podem apresentar potencial neutralizante para infecções virais (**Figura 29**).

Uma limitação da análise da seleção do *Phage Display* por sequenciamento das populações de anticorpos é que, como os domínios VH e VL são sequenciados separadamente, perde-se o par VH-VL dos anticorpos de maior afinidade (**Figura 12**). Sendo assim, após análise do progresso de seleção, há o desafio de combinar os VH com os VL para recuperar a montagem do paratopo de alta afinidade e especificidade ao epítipo de interesse. Além disso, há o desafio de escolher o formato do anticorpo recombinante que comportará o par VH-VL escolhido. Por meio da engenharia de anticorpos, é possível formar anticorpos com diferentes estruturas para alcançar uma finalidade específica, sem comprometer a montagem do paratopo (**Figura 20**). Nesse trabalho, foram combinados os VH e VL mais enriquecidos estrategicamente para gerar 7 anticorpos recombinantes (**Tabela 7**), considerando o valor de *fold change*, a exclusividade ou não deles a uma das seleções e a família gênica à qual pertencem. Os anticorpos recombinantes foram desenhados no formato de fragmento variável de cadeia única (scFv) (**Figura 17**), porque esse formato facilita a expressão heteróloga, inclusive em células bacterianas, já que não requer uma maquinária celular mais complexa. Além disso, anticorpos scFv apresentam menor tempo de meia vida no organismo, são mais resistentes a condições extremas, anulam a possibilidade de reação de ADE e possuem maior capacidade de penetração nos tecidos biológicos, inclusive tecidos neurais, e nas estruturas antigênicas possibilitando uma terapia mais eficaz e segura à infecção de Flavivirus (Bagheri *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019)

Entretanto, como o sequenciamento dos anticorpos mais enriquecidos foi realizado pelo sequenciamento dos VH e VL separadamente, não há garantia de que a combinação dos domínios variáveis permitiria a formação de um anticorpo viável e funcional. Para aumentar a segurança de que as construções de scFv propostas poderiam ser funcionais e expressas de forma heteróloga, foi realizada uma análise para avaliar se essas combinações existiam na biblioteca de anticorpos utilizada na seleção do *Phage Display*. Por reação de PCR, usando iniciadores específicos para a CDR3 dos domínios variáveis, foi mostrado que todas as combinações existiam na forma de anticorpos expressos na superfície de fagos na biblioteca (**Figura 20**).

Os genes dos scFv foram clonados no vetor de expressão pET-SUMO para a produção em células bacterianas sob a regulação do promotor forte T7 (**Figura 18**). O vetor contém um gene, fusionado aos genes de VH e VL, codificador da proteína SMT3, da família das proteínas

SUMO, a qual exerce função de iniciar o processo de enovelamento proteico e de aumentar a solubilidade de proteínas recombinantes expressas em sistemas heterólogos, diminuindo a formação de agregados (corpos de inclusão). De fato, a proteína SUMO gerou bons rendimentos de expressão solúvel (**Tabela 8**).

A produção foi testada em duas células: *BL21 pLys S* e *Shuffle pLys Y* que apresentam vantagens para a expressão de anticorpos em bactérias. Além das vantagens referentes às características das linhagens *BL21* e *Shuffle*, essas células expressam uma lisozima bifuncional que atua reduzindo a transcrição de genes regulados pelo promotor T7, controlando a expressão, o que é vantajoso quando a expressão heteróloga em altos níveis pode ser tóxica à, tal como é observado na expressão de anticorpos. Além disso, o efeito da função natural da lisozima de degradação da parede celular é reduzido ou anulado nessas duas linhagens. Desse modo, as células escolhidas poderiam fornecer um sistema eficiente para a expressão heteróloga dos anticorpos recombinantes (Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier, 2018)

As culturas de células foram crescidas, em meio de cultura rico, até atingirem valores de densidade óptica maiores (D.O. de 2,0) que dos protocolos tradicionais de expressão heteróloga (Liu *et al.*, 2019) e então a expressão heteróloga era induzida com IPTG. Os scFv foram produzidos em maior quantidade e melhor integridade nas células de *Shuffle* do que nas células de *BL21* (**Figura 21 e 22**). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as células *Shuffle* possuem modificações genéticas para apresentarem um citoplasma mais oxidante que favorece a expressão de proteínas cujo enovelamento depende de pontes dissulfetos, como os anticorpos (Pulido *et al.*, 2020). Os tempos de indução de 4 e 16 horas apresentaram os maiores níveis de produção (**Figura 21B e 22B**), porém foi priorizado o tempo de indução menor, a 25 °C, para reduzir a possibilidade de insolubilidade das proteínas recombinantes. Essas condições de produção vão ao encontro de padronizações de produção heteróloga relatadas na literatura (Samuel *et al.*, 2018; Ahmadzadeh *et al.*, 2019). Os anticorpos foram produzidos e purificados (**Figura 24 e 26**), por cromatografia de afinidade a metal imobilizado, com um rendimento suficiente para a realização da caracterização dos anticorpos (**Tabela 8**), assemelhando-se aos rendimentos finais obtidos para a expressão de scFv em sistema de células bacterianas reportados (Samuel *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018, Ahmadzadeh *et al.*, 2019). Wu, e colaboradores, desenvolveram alguns scFv anti-SARS CoV-2, por meio da técnica de *Phage Display*, com rendimentos de produção, em células bacterianas, e graus de pureza, estimados, próximos dos resultados obtidos para os scFv anti-Zika, desenvolvidos nesse trabalho (Wu *et al.*, 2020).

Foi realizado um ensaio de ELISA para analisar se as combinações de VH e VL resultavam em scFv que mantinham a capacidade de ligação ao antígeno viral usado na seleção do *Phage Display* e para comparar a ligação dos anticorpos. Todos os anticorpos ligaram de maneira distinta, e a combinação do VH Hm2 com o VL Lp1, AZ6m, apresentou maior atividade de ligação ao antígeno viral, em comparação com os scFv portadores de VH mais enriquecidos do que Hm2 (**Figura 27**).

Uma grande dúvida no desenvolvimento de anticorpos específicos ao *loop* de fusão de Flavivirus pela metodologia de seleção adotada é que, como foi utilizado um peptídeo sintético contendo a sequência de aminoácidos dessa região do envelope viral como alvo para seleção, os anticorpos selecionados poderiam não se ligar ao vírus inteiro, tendo em vista que o peptídeo pode assumir conformações que não existem no vírus, ou que os aminoácidos do peptídeo que constituem o epítopo dos anticorpos são ocultados (epítopo críptico) durante o enovelamento da estrutura proteica do vírus, já que o FL é uma região hidrofóbica e que naturalmente se encontra pouco acessível na estrutura viral, sendo sobreposto pela interface dos domínios I e III (Heinz & Stiasny, 2017). Para avaliar essas hipóteses, os anticorpos foram testados quanto à ligação ao vírus Zika, usando a partícula viral inteira, por ensaio de ELISA.

Todos os anticorpos foram capazes de ligarem ao vírus Zika, de maneira semelhante entre eles, com o scFv AZ3m apresentando a maior atividade de ligação (**Figura 28 e Tabela 9**). Essa análise de ligação ao vírus por ELISA é um método de caracterização que se destaca sobre outros métodos, pois é possível avaliar a ligação ao antígeno viral em sua conformação nativa na estrutura do vírus, permitindo se aproximar das condições reais de infecção e neutralização no organismo. Para isso, foi tomado o cuidado de inativar o vírus por exposição a radiação ultravioleta e de proceder o ELISA sob condições próximas das fisiológicas, pH 7,4 e temperatura de 37 °C. Um anticorpo scFv produzido e purificado nas mesmas condições dos scFv anti-Zika foi utilizado como controle negativo e o ensaio de ELISA foi realizado em, pelo menos, dois experimentos independentes, com anticorpos de produções diferentes. Na literatura sobre anticorpos neutralizantes para Flavivirus, a maioria dos estudos realizam análise de ligação utilizando como alvo, o antígeno apenas, o domínio proteico contendo o antígeno ou a proteína do envelope viral (Deng *et al.*, 2011; Sapparapu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Robbiani *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017; Kunamneni *et al.*, 2018). Esse tipo de análise, com a partícula viral inteira, é importante, pois é demonstrado que anticorpos neutralizantes podem ser eficazes em ensaios *in vitro*, entretanto podem não ter eficácia em ensaios *in vivo*, e o contrário ocorre também (Dai *et al.*, 2018).

Todos os anticorpos também foram capazes de neutralizar a infecção pelo vírus Zika, em células *Vero*, de maneira semelhante e com valores próximos da neutralização exercida pelo controle positivo, soro de camundongo imunizado (**Figura 29**). Os potenciais neutralizantes obtidos para os scFv testados foram melhores do que alguns valores já descritos, em ensaios de PRNT, com scFv anti-ZIKV (Wu *et al.*, 2017) e com anticorpos inteiros anti-*loop* de fusão (Dai *et al.*, 2016; Barba-spaeth *et al.*, 2016). Esses resultados estabelecem a importância desses anticorpos pelo potencial neutralizante deles, já que embora os anticorpos tenham especificidade a um antígeno envolvido no processo de infecção, é apontado que anticorpos para o FL geralmente não apresentam capacidades neutralizantes significativas pela dificuldade de acessibilidade desse antígeno viral (Stettler *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017).

Todavia, na literatura de anticorpos anti-FL, é demonstrada importante capacidade neutralizante de diferentes linhagens de flavivírus, em diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* (Dai *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018). Essa capacidade de neutralização pode ser explicada pelo fato de que, apesar da pouca acessibilidade do *loop* de fusão em pH neutro, o dinamismo do processo de “respiração viral” e as modificações conformacionais induzidas pela ligação de anticorpos monoclonais levam à exposição do FL, mesmo em um contexto sem acidificação do meio (Dai *et al.*, 2016; Haslwanter *et al.*, 2017; Heinz & Stiasny, 2017; Agrelli *et al.*, 2019). Além disso, existe a possibilidade de neutralização cruzada, pelo alto grau de conservação do FL, e a possibilidade de os anticorpos serem endocitados junto ao vírus ou sozinhos, inibindo a fusão membranar na vesícula endocítica durante o ciclo viral (Lu *et al.*, 2018). Dessa forma, anticorpos anti-FL consistem uma abordagem importante para a neutralização da infecção.

Os scFv desenvolvidos nesse trabalho podem se sobressair sobre outros anticorpos anti-*loop* de fusão em desenvolvimento, por serem anticorpos totalmente humanos e sem o fragmento Fc, o que evita a possibilidade de reações adversas, de neutralização de sua atividade (por respostas anti-anticorpos monoclonais) e de reação de ADE, envolvida na amplificação da doença e nos quadros clínicos mais severos de infecções secundárias por alguns Flavivírus. Além da segurança farmacológica e do alto potencial de reação cruzada entre Flavivírus, o formato scFv dos anticorpos desenvolvidos, nesse trabalho, pode aumentar as capacidades de neutralização *in vivo*, por impulsionar a penetração do anticorpo nos tecidos biológicos e pode permitir a ligação a epítomos críticos ou estericamente restritos, como o *loop* de fusão, diferentemente dos formatos Fab ou anticorpo inteiro que encontram dificuldades de acessar esses tipos de epítomos. E embora a estabilidade deles no meio externo seja menor, eles são mais estáveis em ambientes redutores, como alguns microambientes citossólicos, que são

importantes na terapia da infecção por vírus Zika (Kunamneni *et al.*, 2018; Goulet & Atkins, 2019; Kumar *et al.*, 2019; Diebolder *et al.*, 2020).

Três anticorpos recombinantes anti-FL, obtidos pela tecnologia de *Phage Display*, foram caracterizados quanto à capacidade de ligação e de neutralização da infecção por vírus Zika com êxito. O desenvolvimento de mais de um anticorpo neutralizante é importante para aumentar a taxa de sucesso durante a avaliação da habilidade neutralizante, e porque tem sido mostrado que a combinação de anticorpos neutralizantes é necessária para aumentar a eficiência do tratamento da infecção de Flavivirus, evitando a permanência de uma carga viral alta e a possibilidade de mutação do vírus Zika. Esses problemas foram encontrados em ensaios com primatas não humanos tratados com anticorpos anti-ZIKV os quais haviam apresentado um dos valores de ligação e neutralização mais potentes já descritos na literatura de anticorpos neutralizantes de ZIKV (Keeffe *et al.*, 2018; Van Ronpay *et al.*, 2020). A combinação de diferentes anticorpos neutralizantes, cada um específico a um epítipo distinto do vírus, aumenta o efeito protetor da intervenção com anticorpos, como demonstrado em abordagens terapêuticas para infecção com vírus Zika (Wang *et al.*, 2017), com vírus Ebola (Gilchuk *et al.*, 2019) e com HIV (Mendoza *et al.*, 2018). Desse modo se faz necessário o desenvolvimento de novos anticorpos neutralizantes, como os desenvolvidos nesse trabalho.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Infecções por flavivírus são um grande problema de saúde mundial, devido às mortes e consequências crônicas em pacientes infectados, como Síndrome Congênita do vírus Zika. Ainda não há nenhum tratamento específico ou vacina aprovada, o que aumenta a importância e a necessidade de desenvolver terapias eficazes e seguras. Anticorpos monoclonais humanos podem ser engenheirados para proteger contra essas infecções de forma eficiente, pela ligação específica e alta afinidade; e de forma segura, evitando complicações, como a reação de ADE, que tem dificultado a geração de vacinas seguras. Essa proteção é interessante também porque a imunização passiva pode evitar a transmissão vertical de vírus, em grávidas infectadas, bloquear o ciclo viral e aumentar as respostas imunes celulares antivirais (Robbiani *et al.*, 2017; Kunamneni *et al.*, 2018; Van Ronpay *et al.*, 2020).

Nesse trabalho, foram isolados anticorpos recombinantes humanos com especificidade ao *loop* de fusão, região da proteína E que está envolvida no processo de infecção e é altamente conservada entre os Flavivírus. Foi demonstrado que três desses anticorpos são capazes de ligar ao *loop* de fusão no vírus Zika e são capazes de neutralizar a infecção de células suscetíveis ao ZIKV, com um potencial neutralizante que compete com alguns anticorpos neutralizantes já descritos na literatura. A obtenção de novos anticorpos neutralizantes é importante, pois já está bem firmada, na comunidade científica especializada, a ideia de que anticorpos neutralizantes com especificidades diferentes, administrados em conjunto ou fisicamente combinados, é necessária para superar as infecções por vírus Zika e por outros Flavivírus (Wang *et al.*, 2017; Keeffe *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2018). Essa ideia vai no encontro dos conhecimentos da resposta imune humoral gerada na presença de infecção viral no organismo hospedeiro (Pierson *et al.*, 2008; Culshaw *et al.*, 2018). Os anticorpos aqui, desenvolvidos, podem apresentar valor terapêutico também em razão de seu formato recombinante, que permite explorar, de forma segura, seu potencial de reação cruzada, possibilitando a neutralização eficaz de infecções por diferentes Flavivírus.

Desse modo, foi possível o desenvolvimento, com sucesso, de importantes anticorpos neutralizantes de vírus Zika. A continuação dessa pesquisa envolve a avaliação da capacidade desses anticorpos de ligação e de neutralização de outros Flavivírus, como os sorotipos de Dengue e o vírus da Febre amarela, e de neutralizar a infecção por vírus Zika em ensaios *in*

vivo. Também se pretende produzir e caracterizar os outros anticorpos monoclonais que foram isolados pela técnica de *Phage Display*.

Em resumo, os próximos passos dessa pesquisa são:

- Avaliar por ELISA a ligação dos anticorpos recombinantes aos quatro sorotipos de Dengue e ao vírus da Febre amarela;
- Analisar a capacidade dos anticorpos de neutralização da infecção de vírus Zika e de outros flavivírus por outras metodologias *in vitro*, como a neutralização usando partículas virais repórter, RVP (do inglês *Reporter Viral Particle*);
- Testar a neutralização dos anticorpos da infecção por vírus Zika, da Dengue e da Febre amarela *in vivo*, em ensaios com camundongos nocauteados para os genes dos receptores de Interferon do tipo I (*IFN α* e *IFN β*) e/ou Interferon do tipo II (*IFN γ*);
- Medir e comparar as afinidades dos anticorpos ao antígeno viral, *loop* de fusão;
- Caracterizar estruturalmente a ligação dos anticorpos ao FL, identificando os resíduos de aminoácidos que constituem os epítomos deles;
- Produzir e caracterizar os outros anticorpos isolados por *Phage Display*: AZ2a, AZ4m, AZ5m e AZ7p.

9. REFERÊNCIAS

Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandão LAC. **ZIKA virus entry mechanisms in human cells.** *Infect Genet Evol.* 2019;69:22-29.

Ahmadzadeh M, *et al.* **Anti-HER2 scFv Expression in Escherichia coli SHuffle®T7 Express Cells: Effects on Solubility and Biological Activity.** *Mol Biotechnol.* 2020;62(1):18-30.

Alfaleh MA, Jones ML, *et al.* **Strategies for Selecting Membrane Protein-Specific Antibodies using Phage Display with Cell-Based Panning.** *Antibodies (Basel).* 2017;6(3):10.

Almagro JC, Daniels-Wells TR, *et al.* **Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy.** *Front Immunol.* 2018;8:1751.

Almagro JC, *et al.* **Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development.** *Antibodies (Basel).* 2019;8(3):44.

Alpaugh M, Cicchetti F. **A brief history of antibody-based therapy.** *Neurobiol Dis.* 2019;130:104504.

Angius F, Ilioaia O, Amrani A, *et al.* **A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase-based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins.** *Sci Rep.* 2018;8(1):8572.

Ayyar BV, Arora S, Ravi SS. **Optimizing antibody expression: The nuts and bolts.** *Methods.* 2017;116:51-62.

Bagheri S, Yousefi M, Safaie Qamsari E, *et al.* **Selection of single chain antibody fragments binding to the extracellular domain of 4-1BB receptor by phage display technology.** *Tumour Biol.* 2017;39(3).

Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, *et al.* **Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization.** *Nature.* 2016;536(7614):48-53.

Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, *et al.* **Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity.** *Science.* 2017;356(6334):175-180.

- Barreto K, Maruthachalam BV, Hill W, *et al.* **Next-generation sequencing-guided identification and reconstruction of antibody CDR combinations from phage selection outputs.** *Nucleic Acids Res.* 2019;47(9):e50.
- Bashir S, Paeshuyse J. **Construction of Antibody Phage Libraries and Their Application in Veterinary Immunovirology.** *Antibodies (Basel).* 2020;9(2):21.
- Basile K, Kok J, Dwyer DE. **Zika virus: what, where from and where to?** *Pathology.* 2017;49(7):698-706.
- Batista ICA, Quinan BR, *et al.* **Design and production of dengue virus chimeric proteins useful for developing tetravalent vaccines.** *Vaccine.* 2020;38(8):2005-2015.
- Baz M, Boivin G. **Antiviral Agents in Development for Zika Virus Infections.** *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(3):101.
- Borkotoky S, Murali A. **A computational assessment of pH-dependent differential interaction of T7 lysozyme with T7 RNA polymerase.** *BMC Struct Biol.* 2017;17(1):7.
- Cambier JC, Gauld SB, Merrell KT, Vilen BJ. **B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?** *Nat Rev Immunol.* 2007;7(8):633-643.
- Chan KR, Wang X, Saron WAA, *et al.* **Cross-reactive antibodies enhance live attenuated virus infection for increased immunogenicity.** *Nat Microbiol.* 2016;1(12):16164.
- Chen J, Zhao Y, Feng W. **Selection, preparation and characterization of scFv against human lipocalin 6 by phage display technology.** *Protein Expr Purif.* 2020;171:105627.
- Chiu ML, Gilliland GL. **Engineering antibody therapeutics.** *Curr Opin Struct Biol.* 2016;38:163-173.
- Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. **Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics.** *Antibodies (Basel).* 2019;8(4):55.
- Christiansen A, *et al.* **High-throughput sequencing enhanced phage display enables the identification of patient-specific epitope motifs in serum.** *Sci Rep.* 2015;5:12913.
- Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton GR. **The immunopathology of dengue and Zika virus infections.** *Curr Opin Immunol.* 2018;48:1-6.
- Cyster JG, Allen CDC. **B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions.** *Cell.* 2019;177(3):524-540.

- Dai L, Song J, Lu X, *et al.* **Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody.** *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):696-704.
- Dai L, Wang Q, Song H, Gao GF. **Zika Virus Envelope Protein and Antibody Complexes.** *Subcell Biochem.* 2018;88:147-168.
- Dantas-Barbosa C, Brígido MM, Maranhão AQ. **Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients.** *Genet Mol Res.* 2005;4(2):126-140.
- Dejnirattisai W, Supasa P, *et al.* **Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus.** *Nat Immunol.* 2016;17(9):1102-1108.
- Deng YQ, Dai JX, Ji GH, *et al.* **A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein.** *PLoS One.* 2011;6(1):e16059.
- Diebolder P, Mpoy C, Scott J, *et al.* **Preclinical Evaluation of an Engineered scFv-Fc Targeting Human CD44.** *J Nucl Med.* 2020;jnumed.120.249557.
- Elgner F, Sabino C, Basic M, *et al.* **Inhibition of Zika Virus Replication by Silvestrol.** *Viruses.* 2018;10(4):149.
- Esquivel RN, *et al.* **In Vivo Delivery of a DNA-Encoded Monoclonal Antibody Protects Non-human Primates against Zika Virus.** *Mol Ther.* 2019;27(5):974-985.
- Fahimi F, *et al.* **Phage display-derived antibody fragments against conserved regions of VacA toxin of Helicobacter pylori.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(16):6899-6913.
- Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N. **Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase.** *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016;8(1):16-22.
- Faustino AF, Martins AS, Karguth N, *et al.* **Structural and Functional Properties of the Capsid Protein of Dengue and Related Flavivirus.** *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3870.
- Fear DJ. **Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase.** *Curr Opin Immunol.* 2013;25(5):619-628.

- Fercher C, Keshvari S, McGuckin MA, Barnard RT. **Evolution of the magic bullet: Single chain antibody fragments for the targeted delivery of immunomodulatory proteins.** *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(2):166-183.
- Ferraris P, Yssel H, Missé D. **Zika virus infection: an update.** *Microbes Infect*. 2019;21(8-9):353-360.
- Frei JC, Lai JR. **Protein and Antibody Engineering by Phage Display.** *Methods Enzymol*. 2016;580:45-87.
- Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, *et al.* **Designing Human Antibodies by Phage Display.** *Transfus Med Hemother*. 2017;44(5):312-318.
- Gao Y, Huang X, Zhu Y, Lv Z. **A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays.** *J Immunoassay Immunochem*. 2018;39(4):351-364.
- Gilchuk P, *et al.* **Analysis of a Therapeutic Antibody Cocktail Reveals Determinants for Cooperative and Broad Ebolavirus Neutralization.** *Immunity*. 2020;52(2):388-403.e12.
- Goulet DR, Atkins WM. **Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics.** *J Pharm Sci*. 2019;109(1):74-103.
- Grilo AL, Mantalaris A. **The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market.** *Trends Biotechnol*. 2019;37(1):9-16.
- Gupta SK, Shukla P. **Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review.** *Crit Rev Microbiol*. 2016;43(1):31-42.
- Haakenson JK, Huang R, Smider VV. **Diversity in the Cow Ultralong CDR H3 Antibody Repertoire.** *Front Immunol*. 2018;9:1262.
- Hasan SS, Miller A, Sapparapu G, *et al.* **A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection.** *Nat Commun*. 2017;8:14722. Published 2017 Mar 16.
- Haslwanter D, Blaas D, Heinz FX, Stiasny K. **A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection.** *PLoS Pathog*. 2017;13(9):e1006643.
- Heinrich J, *et al.* **The YoaW signal peptide directs efficient secretion of different heterologous proteins fused to a StrepII-SUMO tag in Bacillus subtilis.** *Microb Cell Fact*. 2019;18(1):31.

Heinz FX, Stiasny K. **The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(1):e00055-16.

Hemadou A, *et al.* **Pacific Biosciences Sequencing and IMGT/HighV-QUEST Analysis of Full-Length Single Chain Fragment Variable from an *In Vivo* Selected Phage-Display Combinatorial Library.** *Front Immunol.* 2017;8:1796.

Huang JX, Bishop-Hurley SL, Cooper MA. **Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4569-4582.

Hughes BW, Addanki KC, *et al.* **Infectivity of Immature Neurons to Zika Virus: A Link to Congenital Zika Syndrome.** *EBioMedicine.* 2016;10:65-70.

Hunter M, Yuan P, Vavilala D, Fox M. **Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells.** *Curr Protoc Protein Sci.* 2019;95(1):e77.

Javed F, Manzoor KN, Ali M, *et al.* **Zika virus: what we need to know?** *J Basic Microbiol.* 2018;58(1):3-16.

Jo G, Jeong MS, Wi J, *et al.* **Generation and Characterization of a Neutralizing Human Monoclonal Antibody to Hepatitis B Virus PreS1 from a Phage-Displayed Human Synthetic Fab Library.** *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28(8):1376-1383.

Jovčevska I, Muyldermans S. **The Therapeutic Potential of Nanobodies.** *BioDrugs.* 2020;34(1):11-26.

Kanyavuz A, Marey-Jarossay A, *et al.* **Breaking the law: unconventional strategies for antibody diversification.** *Nat Rev Immunol.* 2019;19(6):355-368.

Karrar S, Cunninghame Graham DS. **Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus: What the Genetics Tell Us.** *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(4):496-507.

Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, *et al.* **Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans.** *Science.* 2017;358(6365):929-932.

Keeffe JR, *et al.* **A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates.** *Cell Rep.* 2018;25(6):1385-1394.e7.

Kenneth M, Paul T, Mark W, Charles J. **Janeway's immunobiology**. *Garland Science*. 8th ed. New York, 2012. ISBN: 9780815342434. NLM ID: 101568727.

Klein F, *et al.* **Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization**. *Cell*. 2013;153(1):126-138.

Krammer F. **The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination**. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(6):383-397.

Kuipers G, Karyolaimos A, Zhang Z, *et al.* **The tunable pReX expression vector enables optimizing the T7-based production of membrane and secretory proteins in E. coli**. *Microb Cell Fact*. 2017;16(1):226.

Kumar R, *et al.* **Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies**. *Int J Biol Macromol*. 2019;135:907-918.

Kunamneni A, Ye C, Bradfute SB, Durvasula R. **Ribosome display for the rapid generation of high-affinity Zika-neutralizing single-chain antibodies**. *PLoS One*. 2018;13(11):e0205743. Published 2018 Nov 16.

Labrijn AF, *et al.* **Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline**. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(8):585-608.

Ledsgaard L, *et al.* **Basics of Antibody Phage Display Technology**. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):236.

Li J, *et al.* **Expression of soluble native protein in *Escherichia coli* using a cold-shock SUMO tag-fused expression vector**. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2018;19:e00261.

Liu X, Wu J. **History, applications, and challenges of immune repertoire research**. *Cell Biol Toxicol*. 2018;34(6):441-457.

Liu Y, Huang H. **Expression of single-domain antibody in different systems**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(2):539-551.

Liu ZY, Shi WF, Qin CF. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):131-139.

Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, *et al.* **Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases**. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):1.

- Lu X, Xiao H, Li S, *et al.* **Double Lock of a Human Neutralizing and Protective Monoclonal Antibody Targeting the Yellow Fever Virus Envelope.** *Cell Rep.* 2019;26(2):438-446.e5.
- Malafa S, *et al.* **Impact of flavivirus vaccine-induced immunity on primary Zika virus antibody response in humans.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(2):e0008034.
- Maranhão AQ, Silva HM, da Silva WMC, *et al.* **Discovering Selected Antibodies From Deep-Sequenced Phage-Display Antibody Library Using ATTILA.** *Bioinform Biol Insights.* 2020;14:1177932220915240.
- Maranhão AQ, Simi KC, Burtet RT, Brígido MM. **Clonagem e expressão de genes de anticorpos: métodos e aplicações.** In: Rodrigo Ribeiro Resende (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações.* Blucher S/A. 2015;2: 435-480.
- Martín-Acebes MA, Saiz JC, Jiménez de Oya N. **Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace?** *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:44.
- McConnell MJ. **Where are we with monoclonal antibodies for multidrug-resistant infections?.** *Drug Discov Today.* 2019;24(5):1132-1138.
- McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. **Molecular programming of B cell memory.** *Nat Rev Immunol.* 2011;12(1):24-34.
- Meffre E, O'Connor KC. **Impaired B-cell tolerance checkpoints promote the development of autoimmune diseases and pathogenic autoantibodies.** *Immunol Rev.* 2019;292(1):90-101.
- Mendoza P, Gruell H, Nogueira L, *et al.* **Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression.** *Nature.* 2018;561(7724):479-484.
- Methot SP, Di Noia JM. **Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination.** *Adv Immunol.* 2017;133:37-87.
- Mimmi S, Maisano D, Quinto I, Iaccino E. **Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery.** *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(2):87-91.
- Ministro J, Manuel AM, Goncalves J. **Therapeutic Antibody Engineering and Selection Strategies.** *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2020;171:55-86.
- Miranda-Filho Dde B, Martelli CM, Ximenes RA, *et al.* **Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome.** *Am J Public Health.* 2016;106(4):598-600.

- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. **Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion.** *Nature*. 2004;427(6972):313-319.
- Murin CD, Wilson IA, Ward AB. **Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses.** *Nat Microbiol*. 2019;4(5):734-747.
- Nelson BR, *et al.* **Immune Evasion Strategies Used by Zika Virus to Infect the Fetal Eye and Brain.** *Viral Immunol*. 2020;33(1):22-37.
- Noh J, Kim O, Jung Y, *et al.* **High-throughput retrieval of physical DNA for NGS-identifiable clones in phage display library.** *MAbs*. 2019;11(3):532-545.
- Norbury LJ, Basałał K, Bąska P, *et al.* **Generation of a single-chain variable fragment phage display antibody library from naïve mice panned against *Fasciola hepatica* antigens.** *Exp Parasitol*. 2019;205:107737.
- Oleinika K, Mauri C, Salama AD. **Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease.** *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(1):11-26.
- Pelegriñ M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. **Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents?** *Trends Microbiol*. 2015;23(10):653-665.
- Petkau G, Turner M. **Signalling circuits that direct early B-cell development.** *Biochem J*. 2019;476(5):769-778.
- Pierson TC, Diamond MS. **The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes.** *Nature*. 2018;560(7720):573-581.
- Pierson TC, Fremont DH, *et al.* **Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development.** *Cell Host Microbe*. 2008;4(3):229-238.
- Poonsiri T, Wright GSA, *et al.* **Structural Study of the C-Terminal Domain of Nonstructural Protein 1 from Japanese Encephalitis Virus.** *J Virol*. 2018;92(7):e01868-17.
- Pulido IY, *et al.* **Functional Heterologous Expression of Mature Lipase LipA from *Pseudomonas aeruginosa* PSA01 in *Escherichia coli* SHuffle and BL21 (DE3): Effect of the Expression Host on Thermal Stability and Solvent Tolerance of the Enzyme Produced.** *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3925.

- Rathore APS, *et al.* **Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses.** *Sci Adv.* 2019;5(2):eaav3208.
- Rathore APS, St John AL. **Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses.** *Front Immunol.* 2020;11:334.
- Riley RL, Khomtchouk K, Blomberg BB. **Inflammatory immune cells may impair the preBCR checkpoint, reduce new B cell production, and alter the antibody repertoire in old age.** *Exp Gerontol.* 2018;105:87-93.
- Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, *et al.* **Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico.** *Cell.* 2017;169(4):597-609.e11.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. **Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges.** *Front Microbiol.* 2014;5:172.
- Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. **New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update.** *Protein Sci.* 2019;28(8):1412-1422.
- Roulland S, Suarez F, Hermine O, Nadel B. **Pathophysiological aspects of memory B-cell development.** *Trends Immunol.* 2008;29(1):25-33.
- Ryu HY, Ahn SH, Hochstrasser M. **SUMO and cellular adaptive mechanisms.** *Exp Mol Med.* 2020;52(6):931-939.
- Sager G, Gabaglio S, Sztul E, Belov GA. **Role of Host Cell Secretory Machinery in Zika Virus Life Cycle.** *Viruses.* 2018;10(10):559.
- Samuel RVM, *et al.* **Soluble Production of Human Recombinant VEGF-A121 by Using SUMO Fusion Technology in Escherichia coli.** *Mol Biotechnol.* 2018;60(8):585-594.
- Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, *et al.* **Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice.** *Nature.* 2016;540(7633):443-447.
- Satheeshkumar PK. **Expression of Single Chain Variable Fragment (scFv) Molecules in Plants: A Comprehensive Update.** *Mol Biotechnol.* 2020;62(3):151-167.
- Sharifzadeh Z, *et al.* **Development of oligoclonal nanobodies for targeting the tumor-associated glycoprotein 72 antigen.** *Mol Biotechnol.* 2013;54(2):590-601.
- Sharma V, *et al.* **Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide.** *Can J Microbiol.* 2020;66(2):87-98.

- Shim H. **Antibody Phage Display**. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1053:21-34.
- Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, *et al*. **Monoclonal Antibodies: A Review**. *Curr Clin Pharmacol*. 2018;13(2):85-99.
- Sioud M. **Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics**. *Mol Biotechnol*. 2019;61(4):286-303.
- Smith GP. **Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish (Nobel Lecture)**. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2019;58(41):14428-14437.
- Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, *et al*. **Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection**. *Science*. 2016;353(6301):823-826.
- Stiasny K, Heinz FX. **Flavivirus membrane fusion**. *J Gen Virol*. 2006;87:2755-2766.
- Studier FW. **T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in E. coli**. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;124(1):e63.
- Turner KB, *et al*. **Next-Generation Sequencing of a Single Domain Antibody Repertoire Reveals Quality of Phage Display Selected Candidates**. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149393.
- Van Rompay KKA, Coffey LL, Kapoor T, *et al*. **A combination of two human monoclonal antibodies limits fetal damage by Zika virus in macaques**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(14):7981-7989.
- Wang J, Bardelli M, Espinosa DA, *et al*. **A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential**. *Cell*. 2017;171(1):229-241.e15.
- Wang Q, Yang H, Liu X, *et al*. **Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus**. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra179.
- Weiss RA, Verrrips CT. **Nanobodies that Neutralize HIV**. *Vaccines (Basel)*. 2019;7(3):77.
- Woods J. **Selection of Functional Intracellular Nanobodies**. *SLAS Discov*. 2019;24(7):703-713.
- Wu Y, *et al*. **Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III**. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(10):e89.
- Wu Y, Li C, Xia S, *et al*. **Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2**. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):891-898.e5.

Xu H, Cao B, Li Y, Mao C. **Phage nanofibers in nanomedicine: Biopanning for early diagnosis, targeted therapy, and proteomics analysis.** *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2020;12(4):e1623.

Yang C, Gong R, de Val N. **Development of Neutralizing Antibodies against Zika Virus Based on Its Envelope Protein Structure.** *Virologica Sinica.* 2019;34(2):168-174.

Zhang J, Sun A, Dong Y, Wei D. **Recombinant Production and Characterization of SAC, the Core Domain of Par-4, by SUMO Fusion System.** *Appl Biochem Biotechnol.* 2018;184(4):1155-1167.


Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, *et al.* **Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection.** *Cell.* 2016;166(4):1016-1027.

Zonetti LFC, Coutinho MC, de Araujo AS. **Molecular Aspects of the Dengue Virus Infection Process: A Review.** *Protein Pept Lett.* 2018;25(8):712-719.

10. ANEXO

Artigo da análise do sequenciamento dos anticorpos selecionados por *Phage Display*

Discovering Selected Antibodies From Deep-Sequenced Phage-Display Antibody Library Using ATTILA

Andréa Queiroz Maranhão^{1,2}, Heidi Muniz Silva¹,
Waldeyr Mendes Cordeiro da Silva^{1,3} ,
Renato Kaylan Alves França¹, Thais Canassa De Leo⁴,
Marcelo Dias-Baruffi⁴, Rafael Trindade Burtet¹
and Marcelo Macedo Brigido^{1,2}

¹Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília, Brazil. ²Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (iii-INCT), São Paulo, Brazil. ³NEPBio, Federal Institute of Goiás, Formosa, Brazil. ⁴School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, Brazil.

Bioinformatics and Biology Insights
Volume 14: 1–8
© The Author(s) 2020
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/1177932220915240



ABSTRACT: Phage display is a powerful technique to select high-affinity antibodies for different purposes, including biopharmaceuticals. Next-generation sequencing (NGS) presented itself as a robust solution, making it possible to assess billions of sequences of the variable domains from selected sublibraries. Handling this process, a central difficulty is to find the selected clones. Here, we present the AutomaTed Tool For Immunoglobulin Analysis (ATTILA), a new tool to analyze and find the enriched variable domains throughout a biopanning experiment. The ATTILA is a workflow that combines publicly available tools and in-house programs and scripts to find the fold-change frequency of deeply sequenced amplicons generated from selected VH and VL domains. We analyzed the same human Fab library NGS data using ATTILA in 5 different experiments, as well as on 2 biopanning experiments regarding performance, accuracy, and output. These analyses proved to be suitable to assess library variability and to list the more enriched variable domains, as ATTILA provides a report with the amino acid sequence of each identified domain, along with its complementarity-determining regions (CDRs), germline classification, and fold change. Finally, the methods employed here demonstrated a suitable manner to combine amplicon generation and NGS data analysis to discover new monoclonal antibodies (mAbs).

KEYWORDS: Phage display, biopanning, combinatorial library, next-generation sequencing, antibody variable domains

RECEIVED: October 25, 2019. ACCEPTED: March 3, 2020.

TYPE: Original Research

FUNDING: The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was financially supported by FAP-DF (Grant Number 0193.001784/2017) and Capes and CNPq support scholarships.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS: The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

CORRESPONDING AUTHOR: Marcelo Macedo Brigido, Department of Cellular Biology, Institute of Biological Science, University of Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil. Email: brigido@unb.br

Introduction

The use of phage-display antibody combinatorial libraries has impeded the isolation of innovative antibodies. Approximately 30% of the approved antibodies for clinical treatments in the last 5 years were isolated from phage-displayed libraries using different selection strategies.¹ Originally, the validation of selected clones was based on either the enrichment of specific clones throughout the selection rounds² or biological activities of some (few) randomly selected clones.³ However, the low throughput of Sanger sequencing limited these strategies, as enriched clones were assessed from few sequences, or activity-screened clones (antigen binding, for example). Thirty years after the pioneering work describing the phase-display technique,⁴ new methodologies such as next-generation sequencing (NGS) have pushed the technology toward modern standards for selecting biologically active selected clones.

The development of NGS increased in several orders of magnitude the quantity of individual clone sequences obtained, allowing the determination of complete variable domain repertoires. As a consequence, NGS sequencing became the preferred strategy to determine antibody phage clones that were successfully selected in phage-display experiments.⁵ Most of

these approaches rely on repertoire studies and clonal skewing to find selected antibody winner sequences.^{6–8} Some methods focus on the VH complementarity-determining region-3 (CDR3) to address the diversity of phage libraries.^{9,10} The role of CDR3 in antigen (Ag) recognition and binding is noteworthy, but other regions (CDR1 or 2, and even some framework residues) have also been described as crucial in some antibody-antigen interactions. Thus, novel approaches addressing the whole sequence may be more indicated to find reliable high-affinity antibody domains.

In this work, we describe a new workflow—AutomaTed Tool For Immunoglobulin Analysis (ATTILA)—that makes it possible to identify variable domains enriched after selection. The methodology combines the generation of VH and VL amplicons from antibody-displaying phages, before and after selection, and the use of NGS to acquire their coding sequences. After a filtering process, ATTILA can establish the frequency of each variable domain sequence in a given selection round. It generates a report with the fold change of each enriched sequence, giving the amino acid sequence, complementarity-determining region (CDR) identification, and germline classification of the variable domains. We also report a human Fab

VH-VL combinatorial library displayed on phage,¹¹ which was examined to validate the ATTILA workflow. We present ATTILA analyses based on heavy variable domain (VH) sequences, submitted to NGS sequencing in either Illumina or 454 sequencers. The ATTILA workflow also assesses the variability of the library and the error rate of the whole process and analyzes the changes in selected VHs throughout the selection cycles from 5 different biopanning experiments. Finally, we show that ATTILA is a powerful tool to point out specifically selected variable domains using the combination of polymerase chain reaction (PCR) and NGS to identify antibodies from phage-display libraries enriched by panning. Based on the ATTILA results, antibodies harboring the most enriched VH and VL can be produced and further characterized.

Methods

Describing ATTILA

Automated Tool for Immunoglobulin Analysis (ATTILA) is a workflow that combines both third-party and in-house programs for analyzing phage-display selection of antibodies by NGS sequencing data derived from Illumina or 454 sequencers. It compares the content of VH and VL clones in both unselected library (R_0) and antigen-selected sublibraries (R_s) driven by 2 criteria. First, a candidate sequence must present typical regions of the antibody variable domain in a frame that typify a valid VDJ rearrangement. A candidate sequence must display known conserved Cysteine residues flanking both CDR1 and 3 and the conserved β -bulge residues at the end of CDR3.¹² Second, a candidate sequence must be enriched in the last cycle of selection (R_s) compared with the original library (R_0). As enrichment is assessed comparing the relative frequency of clone sequences, to meet the second criterion, sequences must have an increased relative frequency in R_s . Then, based on CDR definition¹³ and on observations from the germline sequence profile, ATTILA establishes the minimum and maximum distances between the first C residue before CDR1 and the conserved C residue before CDR3, and between residue C and conserved WGXXG (heavy chain) or FGXXG (light chain) motifs flanking CDR3. Consequently, the translation step implicitly uses the first selection criterion.

The ATTILA workflow takes, as input, each sequencing set of 4 libraries, 2 from the heavy chain (VH) and 2 from the light chain (VL). Both contain a sample of the original phage-display library (R_0), as well as a sublibrary derived from a panning experiment (R_s). As Illumina libraries allow paired-end reads, ATTILA included a joining step before filtering using the fastq-join utility from ea-utils package.¹⁴ The sequence quality control is then performed by filtering both quality and length with FASTQC¹⁵ and PRINSEQ.¹⁶

Next, a program translates antibody variable domain sequences, using a singular approach to choose the most probable open reading frame (ORF). The chosen ORF does not have stop codons, except TAG, that codes for glutamine

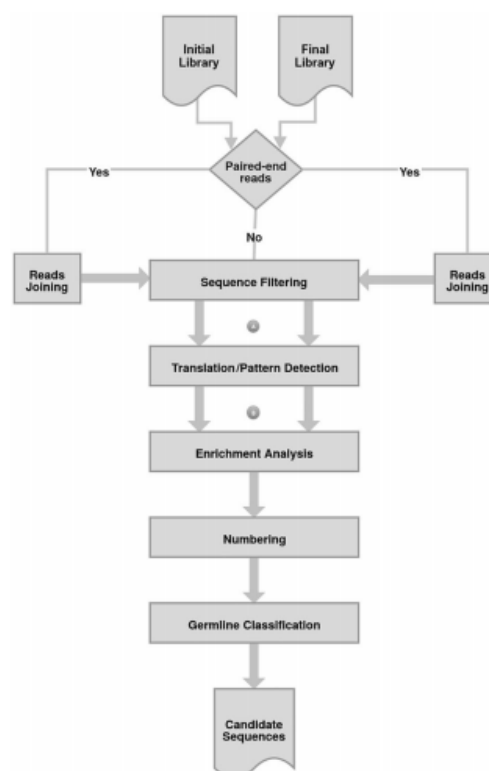


Figure 1. The ATTILA workflow. It retrieves selected VH and VL domain sequences from phage-display experiments. The ATTILA workflow reads antibody phage-display NGS sequencing, either single-end or paired-end sequence data in FASTQ format, and delivers a report of the most enriched VH and VL sequences after panning. Those marked A and B represent workflow steps focused on the following figures. ATTILA indicates Automated Tool For Immunoglobulin Analysis; NGS, next-generation sequencing.

(SupE44+ *Escherichia coli* strains) and presents conserved framework residues flanking CDR1 and CDR3. A Perl script calculates the relative frequency of each unique translated subsequence delimited by the first Cysteine (C) residue before CDR1 and W/FGXXG, after CDR3. Another Perl script compares the relative frequencies of each sequence in R_0 and R_s , calculates the frequency fold change, and generates a sorted list of sequences with increased relative frequencies. For those found only in the post-selection sublibrary, a single sequence appearance is considered for the initial library. A summary of the ATTILA workflow is shown in Figure 1.

Data checking and enrichment analysis

For checking the ATTILA results, we examined 2 output files. The first was a nucleotide FASTA file obtained after NGS quality check and filtering. The second was a list of VH clones predicted after translation and pattern detection, named the VDJ data set. A VDJ file can be in the nucleotide or amino acid

format. The VDJ sequence files were compared using bash commands and Blast¹⁷ to retrieve ATTILA data. The VH gene usage was computed using Blastn¹⁷ against a Kabat germline database (obtained from GenBank, National Center for Biotechnology Information [NCBI]), filtering the best hits at e value $\leq 10^{10}$ for family assignment. The UpSet plot (Figure 3) was generated with the VDJ amino acid dataset.

VH and VL amplicons for NGS sequencing. The VH and VL coding genes from each round of a given experiment were amplified from pooled phagemid preparations. For PCR, the following primers with Illumina adapters were used: 5'leadVH—TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGCCCAACCAGCCATGGCC; 3'VH_rev—GTCTC GTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGAT GGGCCCTTGGTGGAGGC; 5'Vkappa—TCGTCGGCA GCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC; and 3'Vkappa_rev—GTCTCGTGG GCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT.

The reactions were performed using Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and the cycling was as follows: 95°C for 2 minutes; 30 cycles of 95°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, followed by an extra 5-minute incubation at 72°C. The amplicons were analyzed in 0.8% agarose gel from where it was extracted and purified using UltrafreeDA columns (Millipore), according to the manufacturer's instructions prior to NGS sequencing.

Immunoglobulin Fab library and NGS sequencing. All experiments were performed with a previously described Fab phage-display library¹¹ based on the pComb3X vector.³ The library was deeply sequenced 5 times, in the Illumina MiSeq platform, and in a single experiment with 454 pyrosequencing (Roche). For each sequencing experiment, VH and VL amplicons were obtained as described above. The NGS raw data are shown in Supplementary Table S1.

Selection procedure. Two phage-display panning experiments were also assessed here. The first experiment was performed selecting Fabs against a synthetic glycopeptide. The selection procedure was performed, increasing the number of washes throughout the experiments. Typically, 5, 10, 15, and 15 washes in rounds 1 to 4, respectively. The elution was performed using an acid solution. The PCR amplicons for VH and VL were obtained as above, from the original library, as well as for the second, third, and fourth selection rounds. In the second experiment, the library was panned against a biotin-labeled peptide, and 2 different protocols performed the elution: either by disfavoring binding using traditional acid elution or by competition with an unlabeled peptide. Four rounds of selection were performed, increasing the number of washes as described above, and PCR also obtained the sets of VH and VL amplicons from the original library and round 4.

Results

Developing ATTILA workflow

The ATTILA workflow (Figure 1) can be used to analyze NGS sequences from PCR amplicons obtained from phage-displayed libraries. It compares the content of VH and VL clones in both the unselected library (R_0) and antigen-selected sublibraries. The ATTILA VH and VL domain retrieval complies with 2 significant criteria. For the first one, a sequence must be typified as a valid immunoglobulin VDJ rearrangement. For the second criterion, a candidate sequence must be enriched in the last cycle of selection (R_s) compared with the original library (R_0).

The ATTILA workflow finds candidate sequences displaying known conserved Cysteine residues flanking both CDR1 and 3 and the conserved β -bulge residues GXG at the end of CDR3.¹² Based on the CDR's definition¹³ and on observations of the germline sequence profile, ATTILA establishes a valid rearranged domain (VDJ) of heavy or (VJ) light chains by computing the minimum and maximum distances between the first C residue before CDR1 and the conserved C residue just before CDR3, and between residue C and conserved *WGXXG* (heavy chain) or *FGXXG* (for light chain) motifs flanking CDR3 (Supplementary Figure S1 and Table S2). The ATTILA assesses the enrichment by comparing the relative frequency of clone sequences and determining those that have increased their relative frequency in the R_s sample, to meet the second criterion.

The R_0 subset reflects the variability of the Fab library

The original library clone content was independently assessed in 5 distinct experiments performed over a 4-year time interval. The NGS data were processed, filtered, and used for VDJ pattern identification. In Figure 2, the input files and their respective R_0 subsets were classified in families of germline VH gene usage. A similar family distribution profile was observed in all experiments, suggesting a homogeneous distribution among families despite the large variation in the input size. Experiment number 5, the single 454 sequenced subset, displayed sequence diversity consistent with the larger Illumina sequence data sets.

The R_0 subset was generated with in-frame VDJ coding sequences based on pattern recognition. The VH domain coding sequences contained both conserved Cysteine, one located at FW1 and the other at the verge of CDR3, and ending with a conserved *WGXXG* motif at the beginning of FR4. Imposing this criterion, a significant loss in sequence number was observed comparing the input sequences, and the VDJ parsed R_0 (Figure 2). The VDJ subsets showed a reduction ranging from 25 to more than 50% of the total input sequences in the same experiments. Despite this, germline gene usage did not change significantly. The R_0 subset represented the universe of clones in the original library comprising bone fide VDJ rearranged gene fragments.

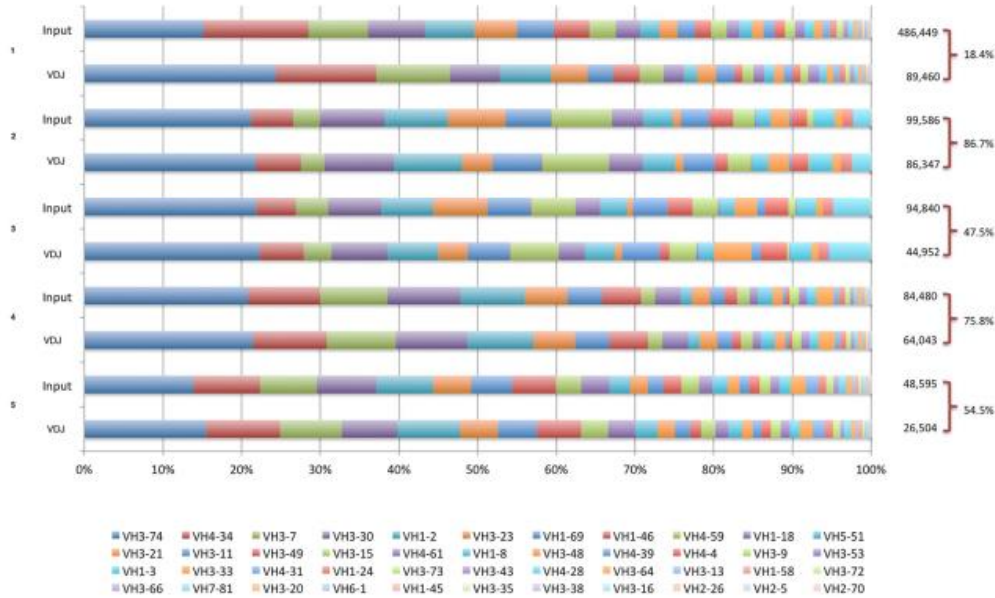


Figure 2. The VH gene usage of raw input sequences and rearranged VDJ after translation and pattern detection. Raw VH domain sequences were analyzed after the sequence filtering step (marked as A in Figure 1) and labeled as Input, and after rearranged VDJ pattern detection (marked as B in Figure 1). The VH gene usage was assigned by Blast against a Kabat VH germline database and is shown in proportional stacked bars for 5 independent libraries' (R_0) sequencing events. Number on the right represents the total number of sequences from A and B workflow steps in Figure 1.

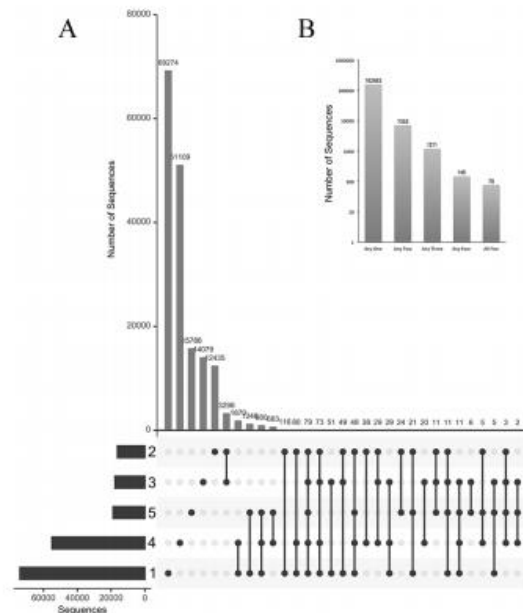


Figure 3. Accessing the diversity of the antibody phage library. The antibody phage-display library was independently sampled 5 times. (A) The UpSet plot of intersection between R_0 sequence sets. The horizontal bar chart indicates the total number of sequences in each R_0 . The upper bar chart indicates the intersection size between sets of sequences in one or more R_0 . Dots represent which R_0 contribute to each intersection. (B) Bar chart resuming groups of intersections. Each bar indicates the sum of similar intersections' size, as captioned in the UpSet plot.

The original phage libraries were sampled 5 times and the size of the intersection among these R_0 subsets reflects the real size of the library. The intersections were explored using the UpSet plot showing that most sequences appear exclusively in specific R_0 subsets (Figure 3A). The topmost exclusive subsets accounted for up to 69 274 sequences in a single experimental R_0 , adding to a total of 162 638 exclusive sequences that are found in single R_0 samples (Figure 3B). Sequences appearing in 2, 3, 4, or in all R_0 samples represented smaller subsets with no more than 3298 sequences, in a subset restricted to experiments 2 and 3. Interestingly, only 79 sequences were found in all 5 R_0 subsets. Nevertheless, among the 171 471 distinct sequences observed in all 5 experiments, 162 683 (95%) appear in any single R_0 , and less than 0.05% of them was found in all R_0 . These data show that library sampling always revealed a large fraction of novel sequences. This number is compatible with the previously predicted library size of 1.45×10^8 of different and functional Fabs.¹¹

Error rate

Sequencing error may yield artifactual sequences not previously found in the phage-display library. Due to the difficulty of estimating the experimental error rate in hitherto very variable immunoglobulin sets, we estimated the artifactual appearance of extra Cysteine residues in the V gene coding sequence. As observed in Table 1, as many as 3% of sequences of correct in-frame VDJ subsets contained at least an additional Cysteine residue, a potential error due to PCR or sequencing procedures. Despite the elevated error rate, there was no clear deviation of the R_0 subsets' germline

Table 1. Cysteine error rate.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Total VDJ | 85 107 | 82 459 | 41 054 | 61 837 | 24 893 |
| 1C | 3.630 | 1.569 | 3.006 | 3.574 | 3.113 |
| >1C | 0.322 | 0.345 | 1.230 | 0.290 | 0.291 |

Total VDJ indicates the total number of valid rearranged sequences; 1C, 1 additional non-conventional Cysteine; >1C, more than 1 additional non-conventional Cysteine.

identity profile, as observed for experimental sequence identity to the closest human germline compared with a GenBank human VH sequence subset (Supplementary Figure S2).

Evolution of the selected library subsets

The changes in VH family content and the emergence of selected phage clones were observed in 2 independent panning experiments. In the first, 4 rounds of phage selection were sequenced: unselected library (R_0) and rounds 2 through 4 (R_2 , R_3 , and R_4). These selection rounds were accomplished increasing stringency (augmenting the number of washes). Thus, although the output/input ratios increase, markedly in rounds 3 and 4, the rise is usually smaller than the fold change observed for the most enriched individual clones. Figure 4A reveals the changes in the frequency of the most frequent clones along the selection process. The emergence of enriched clones is clear after the third round of selection and remains evident notable in the fourth round. The most enriched VH clones appear with frequencies above 10% of the total clone count in round 4.

Phage clones that did not interact with the selection target were diluted along with the panning procedure, and the selection round sequence data sets accompany this. The 4 most frequent R_0 clones, depicted in red in Figure 4A, were counter-selected and showed a sharp decline in the initial cycles of selection. Thus, spurious clones were removed throughout the panning process.

In the second panning experiment, phages were selected for binding to a biotinylated peptide and eluted either with an acid elution or with a competing peptide. Only R_0 and R_4 of each selection are shown (Figure 4B and D). The observed profile showed that various leading clones were found after either elution procedure, except for a single clone enriched after acid elution but barely enriched after specific peptide elution protocols (green line). The most selected clone in both elutions comprises 13% to 17% of total VDJ sequences (blue line). Similar to the former experiment, highly represented R_0 sequences were counter-selected along with the selection procedure (red lines). The enrichment of clones throughout the selection procedure biases the V gene usage. The VH family usage was accompanied in

both experiments and revealed a sharp change, as observed in Figure 4C and D. The increase in some VH gene family usage reflects clonal enrichment depicted in Figure 4A and B, respectively. The VH families 1-46, 4-34, and 3-53 were more abundantly found in the experiment shown in Figure 4C, whereas VH families 1-2, 3-74, 3-7, 3-21, and 3-35 were more prevalent in Figure 4D.

Enrichment analysis reveals the winning clones

The enrichment analysis performed by ATTILA compares the frequency of rearranged sequences in the last selected round (R_i) and the initial library (R_0), and display them as a list of clones based on their fold change. Figure 5 presents the fold-change enrichment of VH clones in the experiments depicted in Figure 4. The most enriched clones are those with the highest fold change and vary among experiments. Although the experiment with glycopeptide results in clones with a fold change close to 10^4 , the experiments with peptide selection results in fold changes ranging from 10^3 to 3×10^3 .

The enrichment of VL clones was also calculated and reported by ATTILA using rules similar to those for VH. Supplementary Figure S3 shows the enrichment of VL for the experiments reported above. Enrichment is less pronounced than observed for VH, and the most selected VL varied from 700 to 1400 times. In 2 of these experiments, the presence of Fabs bearing high selected VH and VL domains was also confirmed by PCR, using CDR3 (H and L) targeting primers (data not shown). In a biopanning experiment where only VLs were selected from a human VL library, the 2 most enriched VLs reported by ATTILA were tested for their ability to bind to the same antigen used in the selection procedure. Both new selected VL harboring clones showed a better antigen binding when compared with the original clone (Supplementary Figure S4).

Discussion

The use of high-throughput sequencing technology to analyze phage-display results had been proposed as an alternative to Sanger sequencing or biological activity selection protocols.¹⁰ The prevalence of clones is inferred from sequence abundance changes along the selection process. Here we propose a workflow for sequence enrichment analysis after phage-display library panning, based on simple frequency changes. The ATTILA workflow is freely available at GitHub.

The use of NGS for the identification of selected phage clones led to the proposal of some, but few automatic workflows. REceptor LIgand Contacts (RELIC)¹⁸ was one of the first software for phage-display analysis, and it enables users to align sequences and find motifs from phage-display experimental results. At present, it is limited by biases associated with the original phage-display technique. MIMOP¹⁹ integrates 2-dimensional and 3-dimensional analyses to predict potential epitopic regions, respectively, performed by MimAlign and

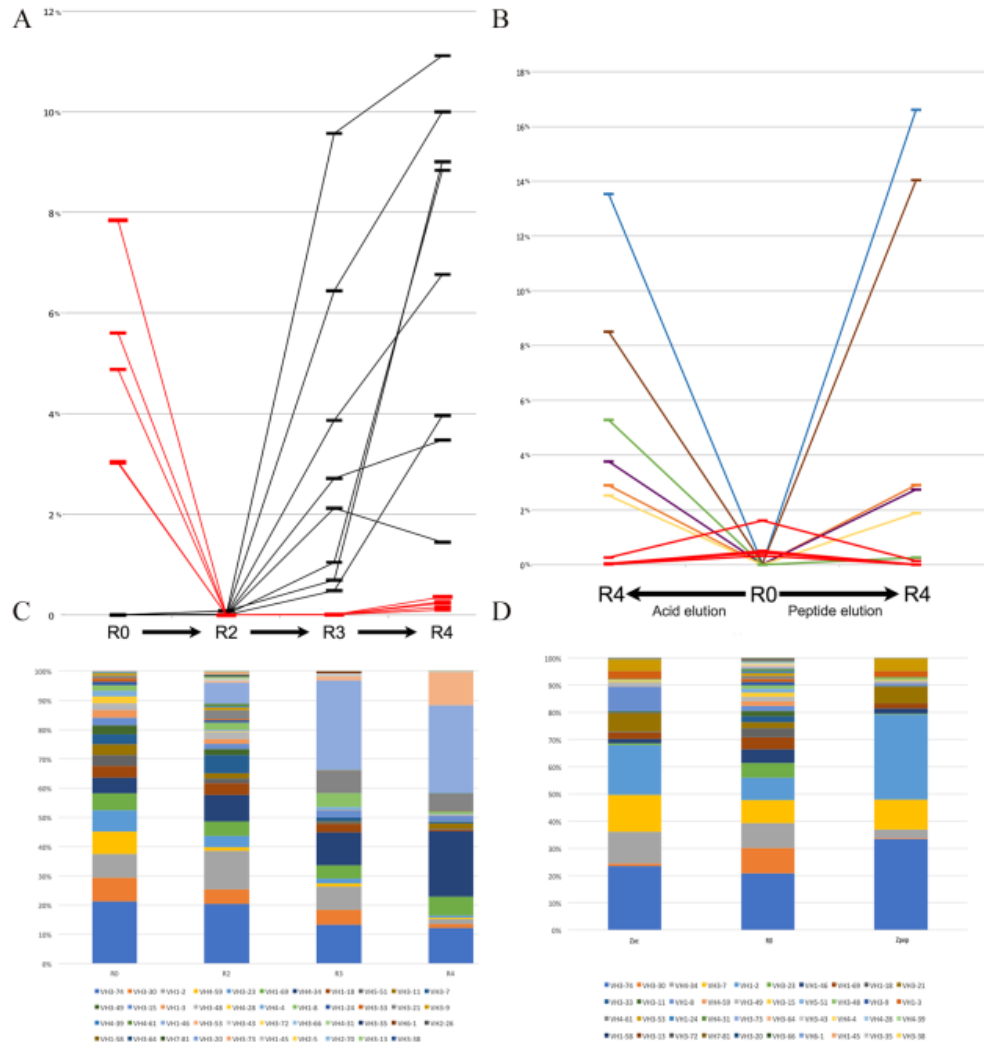


Figure 4. The VH sequences are selected during panning experiments. The evolution of representative sequence contents is shown during selection steps (R_0 , R_2 , R_3 , and R_4) for panning experiment number 1 (A, C), and along R_0 and R_4 steps for 2 independent elution protocols for panning experiment 2 (B, D). In (A), the fractions of the most frequent sequences found in R_0 (red) and R_4 (black) are tracked along the selection process. The quantity of each sequence is plotted as the percentage of total sequences in the VDJ subset. In (B), the quantity of the most representative sequences in experiment 2 is shown for R_0 (central slot), R_4 of acid-eluted phages (left slot), and R_4 for peptide-eluted phages (right slot). R_0 overrepresented sequences are shown in red, and enriched sequences found in both elution protocols are labeled in colors. (C, D) The VH gene usage of the corresponding VDJ subsets, suggesting that the selection leads to VH gene usage bias.

MimCons programs. SLiMfinder²⁰ is a probabilistic method to identify short linear motifs (SLiMs) with a very high level of specificity and a low false discovery rate. It can be applied to solve many problems in this domain, including phage-display library peptides.

VDJFasta⁶ uses Hidden Markov Models to analyze antibody variable domain repertoires. N2GSAb²¹ is a tool focused on HCDR3 to find entire clones using a smarty PCR strategy that uses an elegant approach to derive phage clones. However, high-affinity antibodies contain uniquely mutated variable

domains that account not only for affinity but also for selectivity and bona fide structural features, both equally important if the aim is to obtain clinical Abs. These subtle amino acid residues' substitution may be lost as a consequence of clonal skewing or CDR3 centered analysis. ImmuneDB⁸ both stores and analyzes NGS immune receptor sequencing data by aggregating tools to process raw reads for gene usage, infer clones, aggregate data, and run downstream analyses. DEAL (Diversity Estimator of Antibody Library)⁷ is an algorithm to estimate the library complexity.

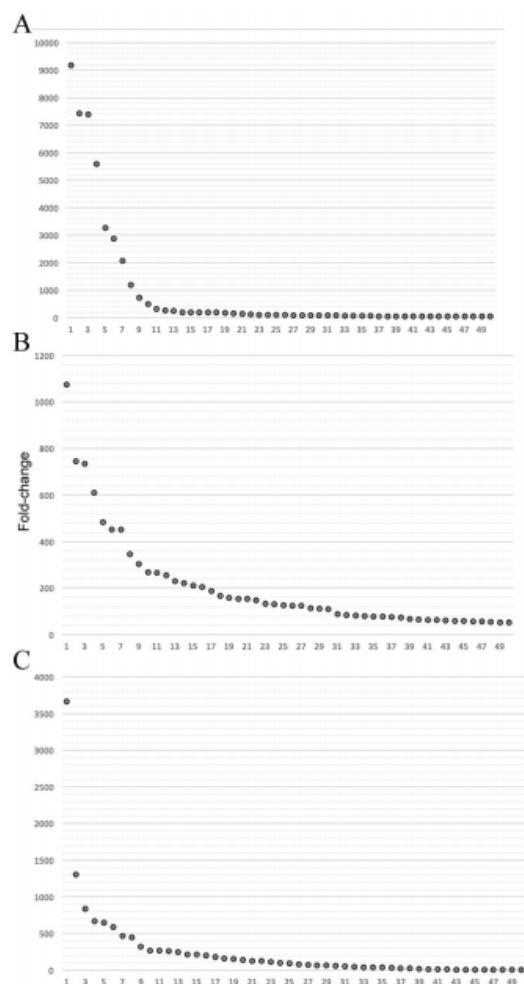


Figure 5. Enrichment of VH domain sequences observed in the panning experiments. The fold change of the 50 most enriched clones as predicted with ATTILA are plotted in descending order: (A) panning experiment 1; (B) panning experiment 2 with peptide elution; and (C) panning experiment number 2 with acid elution.

Finally, PHAST_{pep}²² makes it possible to discover peptides from phage display and NGS that target a selected cell type, which enhances clinical translatability by circumventing complications with systemic use.

PHAST_{pep} is the software that is most similar to ATTILA, presenting several standard features such as translation of sequences, translation validation, enrichment frequency calculation, and normalization.

On the other hand, ATTILA program *translateab9* is able to detect the entire VH and VL domain sequences, using an elegant and efficient translation method, where the choice of the ORF is based not only on the absence of stop codons, but also on the presence of canonical immunoglobulin motifs. Also,

ATTILA identifies the antibody germline genes that gave rise to these domains. The ATTILA workflow already proved to be suitable to discovery antibodies to a given target: using a combination of the most enriched VH and VL sequences, a single-chain fragment variable (scFv) anti- α -dystroglycan mucin glycopeptide was constructed and showed selectively binding to the tumor cell surface.²³ It can also be used to select individual domains with improved ability to bind to its antigen (Supplementary Figure S4).

The successful acquisition of a high-affinity antibody phage clone depends on the size and diversity of the phage-display library. Hence, we estimate the size of the library comparing 5 different sequencing experiments on a unique library. As observed in Figure 3, every library sampling revealed a large number of unique sequences, mostly specific to a given experiment. Sequences appearing in all library samplings were scarce, suggesting that the sequenced library was large enough to maintain novelty findings along with multiple sequencing events. This library was derived from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and its estimated size was 10^8 .¹¹ Considering that the sequence retrieval in each experiment varies from 10^4 to 10^5 unique sequences, it is expected that each single sequence should appear in 2 library sample ranges from 1 to 10^4 to 1 to 10^3 individual clones, an estimate that is supported by the intersection analysis shown in Figure 3.

The diversity of individual VDJ reflects the actual size of the library rearranged immunoglobulin gene fragment, but the size estimated by sequencing is distorted by experimental error. Experimental sequence error arises from either PCR steps or the sequencing procedure, artifactually enlarging the library sequence universe.²⁴ Experimental sequence error overestimates the actual variability of the VDJ gene fragment set. Here, the experimental error rate was measured indirectly, at the protein level, assuming that no Cysteine residues were naturally found in between the conserved Cysteine residues in both FW1 and FW3. However, any additional Cysteine residue must reflect artifacts introduced during either PCR or sequencing. We observed a significant number of sequences containing additional Cysteines, suggesting that, at the protein level, at least 1% to 3% of observed sequences are artifactual.

Sequence abundance along selection cycles revealed the increase in selected phage clones. Counting VDJ sequence data sets prior (R_0) and after selection (R_s) revealed the extinction of fortuitous library sequences and the increase in selection dependent sequences. The variation of sequence frequency reflected a bona fide selection process, where unique sequences raised in abundance along with selection cycles, reaching up to one-tenth of the total VDJ data set. Moreover, selected sequences were also sensitive to the elution procedure, as expected for different panning protocols. Therefore, despite sequencing error and limited data set, the ATTILA method seems efficient in the identification of individual phage clone variation during the selection procedure.

Conclusions

A workflow for deriving a rearranged antibody variable domain sequence was created and incorporated into a software package named ATTILA. The ATTILA workflow can retrieve VH and VL sequences by comparing a phage-display library, R_0 , and a selected sublibrary, R_S . The calculated enriched sequences reflect the phage-display panning selection, and the front-runner selected variable domain sequences can be combined for producing novel antigen-specific recombinant antibody molecules. The simplicity and effectiveness of the ATTILA method allow for its general use assisting phage-display experimental analyses in NGS sequencing.

Acknowledgements

The authors are thankful to Prof Concepta McManus for English language revision of the manuscript.


Author Contributions

A. Q. Maranhão, M. M. Brigido, and H. M. Silva: concept and design of the workflow. R. K. A. França, T. C. De-Leo, and R. T. Burtet performed the wet bench experiments. H. M. Silva and W. M. C. Silva: programming. A. Q. Maranhão, M. Dias-Baruffi, and M. M. Brigido directed all experiments. All authors contributed to writing and reviewing the manuscript.

Availability of Data and Materials

The workflow is freely available as a package named ATTILA at <https://github.com/waldeyr/attila>.

ORCID iD

Waldeyr Mendes Cordeiro da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-8660-6331>

REFERENCES

- Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trend Biotechnol.* 2019;37:9-16.
- Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J.* 1994;13:3245-3260.
- Steinberg P, Rader CBI. Analysis of selected antibodies. In: Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ, eds. *Phage Display: A Laboratory Manual*. New York: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004:736.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228:1315-1317.
- Rouet R, Jackson KJ, Langley DB, Christ D. Next-generation sequencing of antibody display repertoires. *Front Immunol.* 2018;9:118.
- Glanville J, Zhai W, Berka J, et al. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:20216-20221.
- Fantini M, Pandolfini L, Lisi S, et al. Assessment of antibody library diversity through next generation sequencing and technical error compensation. *PLoS ONE.* 2017;12:e0177574.
- Rosenfeld AM, Meng W, Luning Prak ET, Hershberg U. ImmuneDB, a novel tool for the analysis, storage, and dissemination of immune repertoire sequencing data. *Front Immunol.* 2018;9:2107.
- Maranhão AQ, Costa MBW, Guedes L, Moraes-Vieira PM, Raiol T, Brigido MM. A mouse variable gene fragment binds to DNA independently of the BCR context: a possible role for immature B-cell repertoire establishment. *PLoS ONE.* 2013;8:e72625.
- Ravn U, Gueneau F, Baerlocher L, et al. By-passing *in vitro* screening—next generation sequencing technologies applied to antibody display and *in silico* candidate selection. *Nuc Acid Res.* 2010;38:e193.
- Dantas-Barbosa C, Brigido MM, Maranhão AQ. Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. *Genet Mol Res.* 2005;4:126-140.
- Chothia C, Novotn ě J, Brucoleri R, Karplus M. Domain association in immunoglobulin molecules: the packing of variable domains. *J Mol Biol.* 1985;186:651-663.
- Kabat EA, Te Wu T, Perry HM, Foeller C, Gottesman KS. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Darby, PA: DIANE Publishing; 1992.
- Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinform J.* 2013;7:1-8.
- Andrews S. FastQC Project. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Updated 2012. Accessed January 2019.
- Aronesty E. ea-utils: command-line tools for processing biological sequencing data. <https://expressionanalysis.github.io/ea-utils>. Updated 2011. Accessed January 2019.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-410.
- Mandava S, Makowski L, Devarapalli S, Uzubell J, Rodi DJ. Relic—a bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. *Proteomics.* 2004;4:1439-1460.
- Moreau V, Granier C, Villard S, Laune D, Molina F. Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. *Bioinformatics.* 2006;22:1088-1095.
- Edwards RJ, Davey NE, Shields DC. SLiMfinder: a probabilistic method for identifying over-represented, convergently evolved, short linear motifs in proteins. *PLoS ONE.* 2007;2:e967.
- Ravn U, Didelot G, Venet S, et al. Deep sequencing of phage display libraries to support antibody discovery. *Methods.* 2013;60:99-110.
- Brinton LT, Bauknight DK, Dasa SSK, Kelly KA. PHASTp: analysis software for discovery of cell-selective peptides via phage display and next-generation sequencing. *PLoS ONE.* 2016;11:e0155244.
- Canassa-DeLeo T, Campo VL, Rodrigues LC, et al. Multifaceted antibodies development against synthetic α -dystroglycan mucin glycopeptide as promising tools for dystroglycanopathies diagnostic. *Glycoconj J.* 2020;37:77-93.
- Bashford-Rogers RJ, Palsler AL, Idris SF, et al. Capturing needles in haystacks: a comparison of B-cell receptor sequencing methods. *BMC Immunol.* 2014;15:29.