

HERNAN HERMES MONTEIRO DA COSTA

Desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos e humanizados anti-flavivírus com potencial neutralizante: prospecção, caracterização e uso em diagnóstico e terapia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2022

HERNAN HERMES MONTEIRO DA COSTA

Desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos e humanizados anti-flavivírus com potencial neutralizante: prospecção, caracterização e uso em diagnóstico e terapia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Prudencio

Versão corrigida – A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2022

RESUMO

Costa, H. H. M. **Desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos e humanizados anti-Flavivírus com potencial neutralizante: prospecção, caracterização e uso em diagnóstico e terapia.** [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente da família *Flaviviridae*, e um problema atual em todo o mundo, principalmente devido às síndromes congênitas e neurológicas associadas a ele. Como os sintomas clínicos iniciais das doenças causadas pelos flavivírus são muito semelhantes, o diagnóstico clínico é difícil. Ainda, há grande complexidade em obter testes diagnósticos específicos e sensíveis, devido à alta similaridade antigênica entre estes arbovírus, e o tratamento por meio de imunoterapias representa um grande desafio, e ainda não foram alcançados. Sendo assim, esforços para a obtenção e avaliação de insumos como possíveis candidatos ao desenvolvimento de testes rápidos ou para uma imunoterapia se fazem necessários. Nesse trabalho, foi realizado a expressão, purificação e caracterização da proteína de envelope recombinante de ZIKV (rEZIKV) e quatro anticorpos recombinantes humanos do tipo scFv (*single chain variable fragment*) com especificidade ao ZIKV. Previamente, foi realizado três estratégias de biosseleções por *Phage Display* pelo nosso grupo, a partir do uso de bibliotecas de anticorpos recombinantes Fab expressos em fagos filamentosos, possibilitando a obtenção de milhares de sequências distintas por meio do sequenciamento de próxima geração (NGS) das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas de anticorpos. Na primeira estratégia, foi realizado a seleção diretamente contra ZIKV, sem pré-adsorção contra outro flavivírus. Na segunda e terceira estratégia, as sequências foram selecionadas por meio de uma abordagem subtrativa de seleção negativa e positiva contra vírus Dengue sorotipo 2 (DENV2) e ZIKV, respectivamente. Inicialmente foi realizado a expressão da proteína rEZIKV em *E. coli* a fim de produzir antígenos para a validação dos anticorpos monoclonais. Foi utilizado um biorreator Airlift com volume de 5 L e purificação em coluna de níquel em um sistema automatizado de cromatografia. A proteína rEZIKV teve rendimento de 20mg/L e manteve sua antigenicidade e imunogenicidade. Posteriormente, com base em análises do programa ATTILA, usando como parâmetro de escolha o enriquecimento das sequências após cinco ciclos de biosseleção, foram escolhidas quatro sequências de scFvs anti-ZIKV. As sequências gênicas foram sintetizadas e clonadas em vetor pET-SUMO e expressadas em sistema heterólogo de células bacterianas, purificados por afinidade em um sistema de cromatografia automatizado. Foi demonstrado que os quatro scFvs se ligam à proteína rEZIKV e às partículas maduras de ZIKV tanto por ELISA quanto por *western blot*. Ainda, outros quatro scFvs anti-ZIKV da segunda e terceira estratégia foram selecionados pelo programa ATTILA, sintetizados e clonados em vetor pCOd600, que contém a sequência Fc de IgG1 humana, gerando um anticorpo no formato FvFc. Desta forma, avançamos na criação e caracterização de um banco de anticorpos monoclonais recombinantes a fim de estabelecer estratégias para o desenvolvimento de diagnóstico diferencial ou mesmo imunoterapias para o tratamento de infecções geradas pelo ZIKV. Os novos insumos gerados neste trabalho parecem ser promissores e novos ensaios serão realizados a fim de avaliar a viabilidade para sua utilização no manejo de infecções por ZIKV.

Palavras-chave: Flavivírus. Vírus Zika. Phage display. Anticorpos monoclonais. scFv.

ABSTRACT

Costa, H. H. M. **Development of human and humanized monoclonal antibodies anti-Flavivirus with neutralizing potential: prospection, characterization and use in diagnostic and therapy.** [Dissertation (Masters Thesis in Biotechnology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2022.

The Zika virus (ZIKV) is an emerging arbovirus of the *Flaviviridae* family, and a current problem worldwide, mainly due to the congenital and neurological syndromes associated with it. As the initial clinical symptoms of diseases caused by flaviviruses are very similar, clinical diagnosis is difficult. Still, there is great complexity in obtaining specific and sensitive diagnostic tests, due to the high antigenic similarity between these arboviruses, and treatment through immunotherapies represents a great challenge, and they have not yet been achieved. Therefore, efforts to obtain and evaluate inputs as possible candidates for the development of rapid tests or for immunotherapy are necessary. In this work, the expression, purification and characterization of the recombinant envelope protein of ZIKV (rEZIKV) and four human recombinant antibodies of the scFv type (single chain variable fragment) with specificity to the ZIKV were carried out. Previously, three Phage Display bioselection strategies were carried out by our group, using libraries of recombinant Fab antibodies expressed in filamentous phages, making it possible to obtain thousands of distinct sequences through next-generation sequencing (NGS) of the regions variables of the light and heavy chains of antibodies. In the first strategy, selection was performed directly against ZIKV, without pre-adsorption against another flavivirus. In the second and third strategies, the sequences were selected through a subtractive approach of negative and positive selection against Dengue virus serotype 2 (DENV2) and ZIKV, respectively. Initially, the expression of the rEZIKV protein in *E. coli* was carried out in order to produce antigens for the validation of monoclonal antibodies. An Airlift bioreactor with a volume of 5 L and nickel column purification in an automated chromatography system was used. The rEZIKV protein had yield of 20mg/L and maintained its antigenicity and immunogenicity. Subsequently, based on analysis of the ATTILA program, using sequence enrichment after five cycles of bioselection as a choice parameter, four anti-ZIKV scFv sequences were chosen. The gene sequences were synthesized and cloned in pET-SUMO vector and expressed in a heterologous system of bacterial cells, purified by affinity in an automated chromatography system. The four scFvs were shown to bind to the rEZIKV protein and to mature ZIKV particles by both ELISA and western blot. In addition, four other anti-ZIKV scFvs of the second and third strategies were selected by the ATTILA program, synthesized and cloned in pCOd600 vector, which contains the human IgG1 Fc sequence, generating an antibody in the FvFc format. Thus, we have advanced in the creation and characterization of a recombinant monoclonal antibody bank in order to establish strategies for the development of differential diagnosis or even immunotherapies for the treatment of infections generated by ZIKV. The new inputs generated in this work seem to be promising and new tests will be carried out in order to evaluate the feasibility for their use in the management of ZIKV infections.

Keywords: Flavivirus. Zika virus. Phage display. Monoclonal antibodies. scFv.