

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTICORPO  
MONOCLONAL ANTI PD-1 BIOSSIMILAR AO NIVOLUMABE**

**MICHAEL BERNARDES RAMOS**

**Rio de Janeiro**  
**2019**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**MICHAEL BERNARDES RAMOS**

**Expressão e caracterização de um anticorpo monoclonal anti-PD-1  
biossimilar ao nivolumabe**

Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

Ramos, Michael Bernardes.

Expressão e caracterização de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 biossimilar ao Nivolumabe / Michael Bernardes Ramos. - Rio de Janeiro, 2019. xvii, 85 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2019.

Orientador: Haroldo Cid da Silva Júnior.

Co-orientadora: Patrícia Cristina da Costa Neves.

Bibliografia: f. 68-78

1. Anticorpo monoclonal. 2. Anti-PD-1. 3. Biossimilar. 4. Nivolumabe. I. Título.

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, nos Laboratórios de Tecnologias do DNA recombinante (LATER) e Tecnologias de Anticorpos Monoclonais (LATAM), sob a orientação do Prof. Dr. Haroldo Cid da Silva Júnior e da Prof.<sup>(a)</sup> Dr.<sup>(a)</sup> Patrícia Cristina da Costa Neves.



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**  
**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**MICHAEL BERNARDES RAMOS**

**EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTICORPO  
MONOCLONAL ANTI PD-1 BLOSSIMILAR AO NIVOLUMABE**

Orientadores: Prof. Dr. Haroldo Cid da Silva Júnior e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Cristina da  
Costa Neves

Dissertação aprovada em 28 de março de 2018

Examinadores:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline de Almeida Oliveira  
Bio-Manguinhos/Fiocruz - Presidente

Prof. Dr. Martin Hernan Bonamino  
INCA/Fiocruz

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danuza de Almeida Esquenazi  
IOC/Fiocruz

Rio de Janeiro  
2019

Dedico este trabalho a Deus e a minha família, em especial a minha mãe Linete e a amiga Alice, exemplos de superação e caráter.

## AGRADECIMENTOS

A Instituição FIOCRUZ em especial ao Instituto de Imunobiológicos, Biomanguinhos, que tornou possível a realização deste projeto.

Aos meus orientadores Dr. Haroldo Cid da Silva Júnior e Dra. Patrícia Cristina da Costa Neves, por aceitarem esse desafio, conduzindo-me e desenvolvendo o meu nível de instrução técnica, uma vez que eu não possuía conhecimento para a condução desse trabalho sozinho. Além de todo o comprometimento por parte deles durante a sua execução.

Aos Laboratórios de Tecnologias do DNA Recombinante (LATER), Tecnologias de Anticorpos Monoclonais (LATAM) e Tecnologias de imunobiológicos (LATIM) pelo suporte físico e de materiais fornecidos.

A toda equipe dos laboratórios que de alguma forma contribuíram para a melhor condução dos experimentos, em especial a Cristiane Pestana que realizou o sequenciamento das construções recombinantes e a Anna Érika Vieira que ajudou com as purificações da proteína expressa.

As colaboradoras Ana Paula Dinis e Renata Chagas, do laboratório de macromoléculas, LAMAM, por terem realizado os ensaios de caracterização físico-química.

Aos membros da banca de defesa do mestrado, titulares e suplentes, pela disponibilidade e gentileza em aceitar prontamente o convite realizado.

Ao coordenador do curso de Mestrado José Procópio Senna por sempre estar disposto a resolver qualquer pendência relacionada ao curso.

As secretárias da coordenação pela presteza, em especial a Zaíra pela paciência e amizade adquiridas ao longo do curso.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	v
ÍNDICE.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE QUADROS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O câncer .....	1
1.2 Epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo.....	4
1.3 O papel do sistema imune e dos <i>checkpoints</i> imunológicos no câncer.....	6
1.4 Via de morte celular programada 1 (PD-1).....	10
1.5 Anticorpos terapêuticos Anti PD-1 .....	15
1.6 Terapia com o uso do Nivolumabe .....	15
1.7 Estrutura e função do Nivolumabe .....	17
1.8 Medicamentos bioequivalentes .....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	25
3. OBJETIVOS .....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos .....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Clonagem dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1 .....	28
4.1.1 Genes sintéticos.....	28
4.1.2 Amplificação dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada .....	28
4.1.3 Construção dos vetores pCI-neo + cadeia leve e pCI-neo + cadeia pesada.....	29
4.1.4 Preparo de células eletrocompetentes.....	31
4.1.5 Transformação de células eletrocompetentes e seleção dos clones recombinantes .....	31
4.1.6 Sequenciamento.....	32
4.1.7 Obtenção de massa das construções selecionadas para os ensaios de transfecção .....	32
4.2 Expressão transiente do anticorpo anti PD-1 em células de mamífero.....	32
4.2.1 Transfecção de células Expi293F .....	32
4.2.2 Avaliação da expressão do anti PD-1 por ensaio imunoenzimático (ELISA in house) .....	34
4.2.3 Avaliação da expressão do anti-PD-1 por SDS-PAGE .....	35

4.2.4	<b>Western Blotting</b> .....	36
4.2.5	<b>Transfecção das células Expi293F em um volume maior</b> .....	36
4.3	<b>Purificação do anticorpo por cromatografia de afinidade</b> .....	37
4.4	<b>Elisa <i>in house</i> para quantificação do anticorpo anti PD-1 purificado</b> ....	37
4.5	<b>Determinação do grau de homogeneidade</b> .....	37
4.6	<b>Caracterização físico-química</b> .....	38
4.6.1	<b>Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....	38
4.6.2	<b>Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)</b> .....	38
4.6.3	<b>Focalização isoeétrica</b> .....	38
4.6.4	<b>Espectroscopia de fluorescência (fluorimetria)</b> .....	39
4.6.5	<b>Dicroísmo circular no UV-distante (DC)</b> .....	39
4.7	<b>Avaliação da ligação do anticorpo anti PD-1 ao receptor alvo imobilizado em superfícies sólidas</b> .....	40
4.7.1	<b>Ensaio imunoenzimático (ELISA)</b> .....	40
4.7.2	<b>Análise estatística</b> .....	41
4.7.3	<b>Western blotting</b> .....	41
4.8	<b>Análise da ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1 recombinante expresso na superfície de células Expi293F</b> .....	42
4.8.1	<b>Clonagem do gene PD1-GFP em vetor de expressão</b> .....	42
4.8.2	<b>Transfecção de células Expi293F com a construção pCi-neo+PD-1- GFP</b> .....	42
4.8.3	<b>Análise da ligação Anti PD-1/PD-1 por citometria de fluxo</b> .....	42
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	44
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
7.1	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	67
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68
9.	<b>ANEXOS</b> .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ABRADILAN</b>	Associação Brasileira de Distribuição e Logística de Produtos Farmacêuticos
<b>AMP</b>	ampicilina
<b>Anti-CD3</b>	anticorpo monoclonal que se liga ao complexo proteico CD3
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APC</b>	células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen presenting cells</i> )
<b>BRAF</b>	gene humano que codificada a proteína B-Raf
<b>CD</b>	dicroísmo circular (do inglês <i>circular dichroism</i> )
<b>CEX</b>	cromatografia de troca catiônica (do inglês <i>cation exchange chromatography</i> )
<b>CD28</b>	receptor co-estimulatório de células T (do inglês <i>cluster of differentiation 28</i> )
<b>CD3</b>	cluster de diferenciação 3 (do inglês <i>cluster of differentiation 3</i> )
<b>CD80</b>	cluster de diferenciação 80 (do inglês <i>cluster of differentiation 80</i> )
<b>CD86</b>	cluster de diferenciação 86 (do inglês <i>cluster of differentiation 86</i> )
<b>CDRs</b>	regiões determinantes de complementariedade (do inglês <i>complementarity-determining regions</i> )
<b>Cf</b>	concentração final
<b>CHO</b>	célula de ovário de <i>hamster</i> chinês (do inglês <i>Chinese hamster ovary</i> )
<b>Ci</b>	concentração inicial
<b>CMV</b>	citomegalovírus humano (do inglês <i>human cytomegalovirus</i> )
<b>CTCs</b>	células tumorais circulantes (do inglês <i>circulating tumor cells</i> )
<b>CTLA-4</b>	antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (do inglês <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i> )
<b>CTLs</b>	linfócitos T citotóxicos (do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>DNTPs</b>	desoxiribonucleotídeos trifosfatados
<b>DNTs</b>	doenças não transmissíveis (do inglês <i>noncommunicable diseases</i> )
<b>DO</b>	densidade ótica

<b>DSC</b>	calorimetria de varredura diferencial (do inglês <i>differential scanning calorimetry</i> )
<b>EGFR</b>	receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i> )
<b>ELISA</b>	ensaio imunoenzimático (do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
<b>ECM</b>	matriz extracelular (do inglês <i>extracellular matrix</i> )
<b>EMA</b>	Agência de Medicamentos Europeia (do inglês <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EMT</b>	transição epitélio-mesenquimal (do inglês <i>epithelial to mesenchymal transition</i> )
<b>RCT</b>	ensaio controlado randomizado (do inglês <i>randomized controlled trial</i> )
<b>Fab</b>	Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês <i>fragment antigen-binding</i> )
<b>FACS</b>	separação de células ativada por fluorescência (do inglês <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
<b>FDA</b>	Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (do inglês <i>US food and drug administration</i> )
<b>Fv</b>	Fragmento variável (do inglês <i>variable fragment</i> )
<b>Fw</b>	primer sense (do inglês <i>Forward</i> )
<b>HEK</b>	rim embrionário humano (do inglês <i>human embryonic kidney</i> )
<b>HIC</b>	cromatografia de interação hidrofóbica (do inglês <i>hydrophobic interaction chromatography</i> )
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HR</b>	razão de risco (do inglês <i>hazard ratio</i> )
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IC95%</b>	intervalo de confiança de 95%
<b>IDT</b>	Tecnologias de DNA Integrado (do inglês <i>integrated DNA technologies</i> )
<b>IEF-PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Focalização Isoelétrica (do inglês <i>Isoelectric-focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>IFN-γ</b>	interferon gama
<b>IFNG</b>	gene de interferon gama

<b>IgG</b>	imunoglobulina G
<b>IgG4</b>	imunoglobulina G do isotipo 4
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
<b>ITIM</b>	imunoreceptor motivo inibitório baseado em tirosina (do inglês <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> )
<b>ITSM</b>	imunoreceptor motivo interruptor baseado em tirosina (do inglês <i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i> )
<b>KD</b>	constante de equilíbrio (do inglês <i>equilibrium constant</i> )
<b>Koff</b>	constante de dissociação (do inglês <i>dissociation constant</i> )
<b>Kon</b>	constante de associação (do inglês <i>association constant</i> )
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>mAb</b>	anticorpo monoclonal
<b>mAU</b>	unidade arbitrária (do inglês <i>arbitrary unit</i> )
<b>MDSC</b>	células supressoras derivadas de mielóides (do inglês <i>myeloid-derived suppressor cells</i> )
<b>min</b>	minutos
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de Massas em Tandem (do inglês <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>NA</b>	não disponível
<b>NR</b>	não relatado
<b>NK</b>	célula matadora natural (do inglês <i>natural killer cell</i> )
<b>NKT</b>	linfócito matador natural T (do inglês <i>natural killer T cells</i> )
<b>nm</b>	nanômetro
<b>NOB</b>	biológico não original (do inglês <i>non-original biological</i> )
<b>NSCLC</b>	câncer de pulmão de células não pequenas (do inglês <i>non-small cell lung cancer</i> )
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>ORR</b>	taxa de resposta objetiva (do inglês <i>objective response rate</i> )
<b>p</b>	probabilidade de significância estatística
<b>p53</b>	gene supressor de tumor
<b>PBMC</b>	células mononucleares do sangue periférico (do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PD</b>	farmacodinâmica (do inglês <i>pharmacodynamic</i> )

<b>PD-1</b>	proteína de morte celular programada 1 (do inglês <i>programmed cell death protein 1</i> )
<b>PD-L1</b>	ligante 1 de PD-1
<b>PD-L2</b>	ligante 2 de PD-1
<b>PEI</b>	polietilenimina
<b>PFS</b>	sobrevida livre de progressão (do inglês <i>progression-free survival</i> )
<b>pl</b>	ponto isoelétrico (do inglês <i>Isoelectric point</i> )
<b>PIGF</b>	fator de crescimento placentário (do inglês <i>placental growth fator</i> )
<b>PK</b>	farmacocinética (do inglês <i>pharmacokinetic</i> )
<b>PM</b>	peso molecular
<b>PTEN</b>	proteína fosfatase e homólogo de tensina (do inglês <i>phosphatase and tensin homolog protein</i> )
<b>PTK</b>	proteína tirosino-kinase (do inglês <i>protein-tyrosine kinase</i> )
<b>PVDF</b>	fluoreto de polivinilidina
<b>PW</b>	água purificada (do inglês <i>purified water</i> )
<b>R</b>	primer anti-sense (do inglês <i>reverse</i> )
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>SAP</b>	fosfatase alcalina de camarão (do inglês <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
<b>SCC</b>	carcinoma de células escamosas (do inglês <i>squamous cell carcinoma</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SEC</b>	cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês <i>size-exclusion chromatography</i> )
<b>SFB</b>	soro fetal bovino
<b>SHP-1</b>	fosfatase proteína-tirosina citoplasmática 1 (do inglês <i>cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase 1</i> )
<b>SHP-2</b>	fosfatase proteína-tirosina citoplasmática 2 (do inglês <i>cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase 2</i> )
<b>SPR</b>	ressonância plasmônica de superfície (do inglês <i>surface plasmon resonance</i> )
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TCA</b>	ácido tricloroacético

<b>TCR</b>	receptor de células T (do inglês <i>T cell antigen receptor</i> )
<b>TGF<math>\beta</math></b>	fator de transformação do crescimento beta (do inglês <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TIL</b>	linfócito infiltrante de tumor (do inglês <i>tumor-infiltrating lymphocytes</i> )
<b>Treg</b>	linfócito T regulatório
<b>UV</b>	radiação ultravioleta (do inglês <i>ultraviolet radiation</i> )
<b>V</b>	volts
<b>Ve</b>	volume de eluição
<b>VEGF</b>	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VEGFR</b>	receptor do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor receptor</i> )
<b>VIS</b>	radiação visível (do inglês <i>visible radiation or visible light</i> )
<b>Vo</b>	volume de eluição (do inglês <i>void volume or Elution volume</i> )
<b>ZAP</b>	proteína associada a zeta (do inglês <i>zeta associated protein</i> )
<b><math>\zeta</math></b>	letra grega Zeta
<b><math>\infty</math></b>	símbolo infinito

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Anticorpos monoclonais terapêuticos que interferem na via de sinalização do receptor PD-1, aprovados pelo FDA para o tratamento de câncer.....	83
Quadro 1.2: Métodos mais empregados na avaliação de atributos críticos de qualidade para o exercício de comparabilidade entre um biossimilar e seu produto de referência.....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Ensaios clínicos de Nivolumab para o tratamento de câncer de pulmão de células escamosas (SCC). .....	84
Tabela 1.2: Estudos de combinação de Nivolumab em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). .....	85
Tabela 4.1: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1. ....	29

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Características adquiridas pelas células do câncer durante a progressão tumoral .....	2
Figura 1.2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10).....	6
Figura 1.3: Representação esquemática das três fases envolvidas no processo de imunoeedição do câncer .....	6
Figura 1.4: Estrutura molecular de PD-1 e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 .....	11
Figura 1.5: Múltiplas populações de células mielóides e linfóides que expressam PD-1 e são inibidas por células tumorais PD-L1 <sup>+</sup> ou APC.....	12
Figura 1.6: Representação simplificada da imunologia tumoral e o papel da via PD-L1/PD-1 .....	13
Figura 1.7: Representação esquemática da expressão da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), que é um homólogo de CD28 expresso na superfície dos linfócitos T .....	14
Figura 1.8: Representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina G (IgG) e do sítio de ligação ao antígeno.....	18
Figura 1.9: Desenvolvimento de novas drogas biológicas versus biossimilares .....	21
Figura 1.10: Via para aprovação de biossimilares pelo FDA.....	24
Figura 4.1: Mapa circular do vetor pCi-neo usado nas construções recombinantes .	30
Figura 5.1: PCR do gene de cadeia leve.....	44
Figura 5.2: PCR do gene de cadeia pesada .....	44
Figura 5.3: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos da clivagem enzimática das construções pCi-neo vazio e pCi-neo + cadeia leve com as endonucleases de restrição XhoI e XbaI .....	45
Figura 5.4: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos da clivagem enzimática das construções pCi-neo + cadeia pesada com as endonucleases de restrição XhoI e XbaI.....	46
Figura 5.5: Viabilidade da cultura de células HEK293F x níveis de expressão do anticorpo anti PD-1 ao longo do experimento de transfecção .....	47
Figura 5.6: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de	

poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, dos sobrenadantes de células Expi293F .....	48
Figura 5.7: (A) Western Blotting após ensaio de eletroforeses desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, dos sobrenadantes de células Expi293F .....	49
Figura 5.8: Cromatograma da purificação do anticorpo Anti-PD-1 através da ligação a proteína A.....	49
Figura 5.9: Cromatograma do ensaio de desalting para a troca de tampão.....	50
Figura 5.10: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora, das amostras coletadas durante a purificação do anticorpo anti-PD-1 por cromatografia de afinidade à proteína A.....	50
Figura 5.11: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, com o perfil de homogeneidade do anticorpo anti-PD-1 purificado por cromatografia de afinidade à proteína A.....	51
Figura 5.12: (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, do anticorpo anti-PD-1 purificado e do Nivolumab.....	52
Figura 5.13: Sobreposição dos perfis cromatográficos dos anticorpos anti-PD-1 (linha cheia) e Nivolumabe (linha tracejada), monitorados em 220nm.....	53
Figura 5.14: IEF-PAGE pH 3-9 para estimativa do pI do anti-PD1 e Nivolumabe .....	54
Figura 5.15: Espectros de fluorescência dos anticorpos anti-PD1 e Nivolumabe .....	54
Figura 5.16: Espectros de dicroísmo circular do anticorpo anti-PD1 e Nivolumabe ..	55
Figura 5.17: Ensaio imunoenzimático (ELISA) in house para avaliar a ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1 comparando-a com a ligação do Nivolumabe ao receptor PD1 .....	56
Figura 5.18: Western blotting para avaliar a ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor comercial PD-1 (Abcam) .....	57
Figura 5.19: Citometria de fluxo para avaliar a ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1 .....	58

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer representa a segunda causa de mortalidade na população mundial. No Brasil, a doença está entre as três principais causas de morte e estimativas apontam a ocorrência de 600.000 novos casos por ano, para o biênio 2018-2019. O sistema imunológico desempenha um papel importante no controle e na erradicação da doença. Entretanto, diversos mecanismos de supressão imunológica podem reduzir a imunidade antitumoral do hospedeiro. Neste contexto, anticorpos dirigidos contra *checkpoints* imunológicos, como a via de morte celular programada 1 (PD-1), tem demonstrado sucesso na reversão do quadro de imunossupressão contra o tumor. Porém, embora eficaz está terapia tem um alto custo, o que gera a necessidade de biossimilares. A substituição de biológicos de referência por biossimilares pode aumentar o acesso dos pacientes bem como reduzir os gastos públicos com saúde. Os biossimilares são medicamentos biológicos que apresentam o mesmo perfil de segurança e eficácia dos medicamentos de referência. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo expressar e caracterizar um anticorpo monoclonal anti-PD-1 biossimilar ao Nivolumabe. Inicialmente, as sequências nucleotídicas dos genes de cadeia leve e pesada deste anticorpo foram clonadas no vetor de expressão pCI-neo. As construções obtidas foram utilizadas para transfectar células de mamífero Expi293F e a expressão do anti-PD-1 foi detectada por ELISA, SDS-PAGE e Western blotting. Após a purificação do anticorpo por cromatografia de afinidade à proteína A, prosseguiu-se com a caracterização físico-química, utilizando-se os ensaios de cromatografia de exclusão por tamanho, focalização isoeletrica, fluorimetria e dicroísmo circular. Por fim, foram realizados ensaios para avaliar a ligação do anti PD-1 ao receptor alvo imobilizado em superfícies sólidas, bem como ancorado na superfície de células de mamífero. Para permitir o exercício de comparabilidade, o anticorpo de referência foi submetido aos mesmos ensaios realizados para o biossimilar proposto. Os resultados demonstraram que apesar de diferenças sutis entre as moléculas, foi possível obter o anticorpo anti PD-1 a partir de células de mamífero apresentando características físico-químicas e de ligação ao alvo bastante similares ao anticorpo de referência. Para garantir a similaridade funcional do anticorpo Anti PD-1 em relação ao Nivolumabe, existe a perspectiva de realizar ensaios celulares e de atividade biológica *in vivo*.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, Anti PD-1, Biossimilar, Nivolumabe.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death in the world's population. In Brazil, the disease is among the three main causes of death and estimates indicate the occurrence of 600,000 new cases per year for the 2018-2019 biennium. The immune system plays an important role in controlling and eradicating the disease. However, mechanisms of immune suppression may reduce host's antitumor immunity. In this context, antibodies directed against immunological checkpoints, such as the programmed cell death pathway 1 (PD-1), have demonstrated success in reversion of immunosuppression framework against the tumor. However, although effective this therapy has a high cost, which generates the need of biosimilars. The replacement of reference biologicals by biosimilars can increase patient's access as well as reduce high cost of public health. Biosimilars are biological medicines that have the same safety and efficacy profile as reference medicines. Therefore, the present project aimed to express and characterize a biosimilar anti-PD-1 monoclonal antibody to Nivolumab. Initially, the nucleotide sequences of the heavy and light chain genes of this antibody were cloned into the pCI-neo expression vector. The recombinant vector obtained were used to transfect Expi293F mammalian cells and anti-PD-1 expression was detected by ELISA, SDS-PAGE and Western blotting. After purification of the antibody by protein A affinity chromatography, the physico-chemical characterization was continued using size-exclusion chromatography, isoelectric focusing, fluorimetry and circular dichroism assays. Finally, assays were performed to evaluate the binding of anti-PD-1 to the target receptor immobilized on solid surfaces as well as anchored on the surface of mammalian cells. To allow the comparability exercise, the reference antibody was subjected to the same assays performed for the proposed biosimilar. The results demonstrated that despite subtle differences between the molecules, it was possible to obtain the anti-PD-1 antibody from mammalian cells having physicochemical and target binding characteristics very similar to the reference antibody. To assure the functional similarity of the Anti-PD-1 antibody to Nivolumab, there is prospect of performing cellular and biological activity assays *in vivo*.

Key words: Monoclonal antibody, Anti PD-1, Biosimilar, Nivolumab.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O câncer

Câncer é um termo genérico usado para designar um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento de células anormais, além de seus limites habituais, que podem invadir tecidos adjacentes do corpo e/ou espalhar-se para outros órgãos. A doença pode afetar quase qualquer parte do corpo, tendo muitos subtipos anatômicos e moleculares, sendo que cada um requer estratégias específicas de tratamento (WHO, 2018).

Além disso, o desenvolvimento de um tumor é considerado um processo “análogo à evolução darwiniana”, em que a sucessão de alterações genéticas na célula, inicia o caminho, onde suas descendentes adquirem características e vantagens competitivas, garantindo sua multiplicação e dominância na população de células saudáveis (TEIXEIRA, 2007).

Os pesquisadores Hanahan e Weinberg (2000), sugeriram a existência de 6 principais características biológicas, adquiridas pelas células tumorais através de mutações, ao longo dos múltiplos estágios de desenvolvimento do tumor, em seres humanos. Com o avanço do conhecimento na área, foram feitas novas observações, para esclarecer e modificar as anteriores, sendo incluídas quatro novas características (Figura 1.1), que são necessárias para a progressão e o crescimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As características descritas por Hanahan e Weinberg (2011), que constituem a base para o desenvolvimento e a manutenção tumoral, estão descritas de forma resumida a seguir

*Sustentação da sinalização proliferativa* – Para que as células normais saiam do estado chamado “quiescente” e comecem a se proliferar, é necessário que recebam sinais vindos de fora, de outras células de seu entorno. Células cancerosas, demonstram grande independência desses sinais, para começar a se multiplicar (TEIXEIRA, 2007)



**Figura 1.1: Características adquiridas pelas células do câncer durante a progressão tumoral. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011, p. 668).**

∴

*Evasão dos supressores de crescimento* – Em um tecido onde há milhões ou bilhões de células, o controle sobre sua multiplicação é absolutamente necessário. Uma das formas de controle do crescimento celular foi delineada acima. Da mesma forma, há sinais bioquímicos que agem para inibir a divisão celular. Assim, para trilhar o caminho que leva uma célula a se tornar cancerosa, ela precisa desenvolver a capacidade de evitar esses sinais, para não ver inibida a sua própria proliferação (TEIXEIRA, 2007).

*Escape da destruição imune* – Como um dos mecanismos, as células cancerosas altamente imunogênicas podem evadir-se a destruição imune, através da produção de componentes incapacitantes do sistema imunológico. Por exemplo, as células cancerosas podem paralisar a infiltração dos linfócitos T citotóxicos (CTLs) e células *natural killer* (NK), secretando fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ , do inglês *Transforming Growth Factor*) ou outros fatores imunossupressores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Outros mecanismos mais sutis operam através do recrutamento de células ativamente imunossupressoras, incluindo células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas da linhagem de mielóides (MDSCs) (ROUSSEY et al., 2017), ou através da expressão pelas células tumorais de ligantes das moléculas de *checkpoint* imunológico, como os ligantes do receptor de morte programada 1 PD-1 (PD-L1 e PD-L2) (BRAHMER; HAMMERS; LIPSON, 2015a). Este último mecanismo está relacionado ao tema dessa dissertação.

*Capacidade de imortalidade replicativa* – Mesmo tendo adquirido as três habilidades mencionadas anteriormente, ainda assim a célula, em um certo momento vai parar de se duplicar. É a senescência, característica das células normais, correlacionada ao funcionamento normal de dois genes supressores de tumor, o do retinoblastoma e o p53. Esse “programa” parece operar independentemente de qualquer sinalização célula a célula, é interno à célula (TEIXEIRA, 2007). Além disso, após diversas replicações ocorre o processo natural de encurtamento dos telômeros, que são regiões de DNA repetitivo, que limitam e protegem as extremidades do cromossomo à degradação ou fusão com outro cromossomo (ALBERTS et al., 2014). Sem telômeros, cada vez que uma célula se divide, os genomas perderiam progressivamente a informação genética, porque os cromossomos ficam cada vez mais curtos. As células cancerígenas podem manter seus telômeros a partir da produção de telomerase, induzida por oncoproteínas ou ainda ativam uma via alternativa de alongamento dos telômeros (SAMARASINGHE, 2015). Então, para se tornar cancerosa, uma célula deve contornar esses mecanismos, o que é conseguido quando ocorrem mutações nos genes que controlam essas vias (TEIXEIRA, 2007).

*Promoção de inflamação pelo tumor* – Alguns tumores são densamente infiltrados por células de ambos os braços do sistema imunológico, inato e adaptativo, assim, espelham condições inflamatórias semelhantes à de tecidos não neoplásicos. Sendo a proliferação celular a principal característica associada a inflamação, ao fornecer moléculas bioativas ao microambiente tumoral. Além disso, células inflamatórias podem liberar produtos químicos, que são ativamente mutagênicos para células cancerígenas próximas, acelerando sua evolução genética em direção a estados de malignidade aumentada (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

*Ativação de invasão e metástase* – A metástase é entendida como um processo complexo de eventos moleculares e bioquímicos realizados por múltiplos atores. Segundo PACHMAYR; TREESE; STEIN, (2017), a abordagem mais reconhecida é o conceito da cascata de invasão e metástase onde se distinguem 6 etapas: invasão local, intravasamento, sobrevivência na circulação, aprisionamento em sítio de órgão distante e extravasamento, formação de micrometástase e colonização metastática. Em cada uma dessas etapas, atores podem modular o comportamento das células ou do microambiente.

*Indução da angiogênese* – As células dependem de oxigênio e nutrientes, que são fornecidos através da vascularização dos tecidos. Quando um tumor cresce, suas células vão se distanciando dos vasos que alimentam o tecido. Por isso, as células

cancerosas, ou pré-cancerosas, devem providenciar o surgimento de vasos capilares que as nutram. Entretanto, no tecido sadio, o nascimento de vasos é um processo cuidadosamente regulado, o que não ocorre no câncer (TEIXEIRA, 2007).

*Instabilidade do genoma e mutação* - A progressão do tumor em vários estágios pode ser retratada, como uma sucessão de expansões clonais, cada uma das quais é desencadeada pela aquisição de mudança de um genótipo mutante habilitador. Por causa de fenótipos hereditários, por exemplo, inativação de genes supressores de tumor, que também podem ser adquiridos através de mecanismos epigenéticos, assim como a metilação de DNA e modificações nas histonas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

*Resistência a morte celular* - A maquinaria do programa de morte celular ou apoptose, compõe-se de sensores, que fiscalizam o ambiente interno da célula e externo a ela, em busca de sinais de que ela deve viver ou morrer - e de executores, comandados por esses sensores, que se encarregam de causar a morte celular. Para um tumor crescer, as células cancerosas ou pré-cancerosas devem adquirir a habilidade de desativar esses sensores ou executores, dado o fato de seus genomas estarem cheios de defeitos (TEIXEIRA, 2007).

*Desregulação energética celular* - Mesmo na presença de oxigênio, as células cancerígenas podem reprogramar seu metabolismo da glicose e, portanto, sua produção de energia, limitando seu metabolismo energético em grande parte à glicólise e levando a um estado denominado "glicólise aeróbica". A glicólise aumentada permite o desvio de intermediários glicolíticos, em várias vias biossintéticas, incluindo aqueles que geram nucleotídeos e aminoácidos; isso facilita, por sua vez, a biossíntese das macromoléculas e organelas necessárias para montar novas células (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

## **1.2 Epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo**

As Doenças Não Transmissíveis (DNT), principalmente as doenças cardiovasculares, o câncer, a diabetes e as doenças respiratórias crônicas, representam um dos principais desafios da saúde na atualidade. Em 2015, elas foram responsáveis por 40 milhões de óbitos, representando 70% de todas as mortes no mundo (WHO, 2019).

Uma grande proporção destas foi prematura, pois mais de 15 milhões de pessoas vieram a óbito entre 30 e 70 anos de idade (NIH, 2018). Além disso, cerca

de 85% desses óbitos, ocorreram em países em desenvolvimento, onde a probabilidade de morrer precocemente por uma DNT é quatro vezes superior à dos países desenvolvidos. Sendo que a maioria desses casos, poderiam ter sido prevenidos ou atrasados (WHO, 2017).

Dados mais recentes, indicam que o câncer se tornou a segunda principal causa de morte em todo o mundo e estima-se que representou 9,6 milhões de óbitos em 2018. Ainda de acordo com esses dados, nos homens, os cânceres de pulmão, próstata, cólon e reto, estômago e fígado são os tipos mais comuns, enquanto que os cânceres de mama, cólon e reto, pulmão, colo do útero e tireóide são os mais frequentes entre as mulheres (WHO, 2019).

O custo econômico anual total estimado em 2010 para o manejo da doença foi de U\$1,16 trilhões de dólares. De acordo com a evidência atual, entre 30 e 50% das mortes por câncer podem ser impedidas ao se modificar ou evitar fatores de risco importantes, incluindo evitar produtos do tabaco, reduzir o consumo de álcool, manter um peso corporal saudável, exercitar-se regularmente e combater os fatores de risco relacionados às infecções (WHO, 2019).

Estudos preditivos foram realizados com tendências globais estimadas, que se concretizadas, preveem um aumento substancial na incidência em todos os casos de câncer, levando a um aumento de 12,7 milhões em 2008 para aproximadamente 22,2 milhões até 2030 (BRAY et al., 2012).

No Brasil, um dos grandes desafios para a prevenção e o controle da doença deve-se ao fato do país possuir uma dimensão continental, além de fortes diferenças regionais em termos de comportamentos, crenças e atitudes de sua população. Recentemente, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), disponibilizou um relatório, elaborado com as estimativas de incidência da doença no país, para o biênio 2018-2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017).

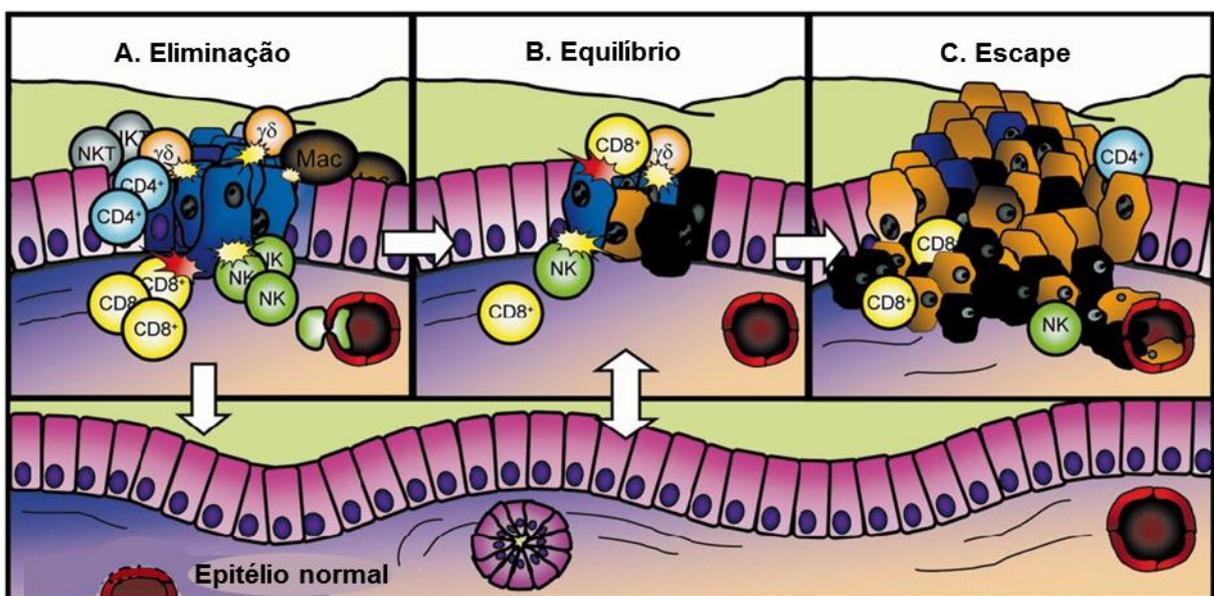
De acordo com o relatório, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano, sendo que o cálculo global corrigido para o sub-registro, aponta a ocorrência de 640 mil casos novos (INCA, 2018). Dentre estes, (Figura 1.2), a expectativa é de que o câncer de próstata seja o mais incidente entre os homens e o câncer de mama entre as mulheres.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

**Figura 1.2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (Números arredondados para múltiplos de 10). Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (2017, p. 58).**

### 1.3 O papel do sistema imune e dos *checkpoints* imunológicos no câncer

De acordo com trabalho publicado por DUNN; OLD; SCHREIBER, (2004), o sistema imunológico desempenha um duplo papel, não só na prevenção, ao proteger o hospedeiro do desenvolvimento tumoral, mas também ao esculpir ou editar a imunogenicidade de tumores que podem eventualmente se formar. Assim, esses pesquisadores chegaram ao entendimento da existência de um processo mais amplo conhecido como imunoeedição do câncer. Resumidamente, este processo é dividido em três fases (Figura 1.3): (A) Eliminação, (B) Equilíbrio e (C) Escape. Além disso, essas fases são bastante dinâmicas e podem ocorrer concomitantemente, ou se repetir a cada vez que surgem células neoplásicas antigênicas (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).



**Figura 1.3: Representação esquemática das três fases envolvidas no processo de imunoeedição do câncer. Fonte: Adaptado de DUNN; OLD; SCHREIBER, (2004, p. 33).**

(A) Eliminação, ocorre quando as células do sistema imunológico inato são alertadas para a presença de um tumor crescente, devido à disrupção tecidual local, que ocorre como resultado da remodelação estromal. O remodelamento produz moléculas pró-inflamatórias que, juntamente com quimiocinas, convocam células do sistema imune inato para esta nova fonte de “perigo” local (MATZINGER, 1994), (WRENSHALL et al., 1999), (FREDERICK; CLAYMAN, 2001).

Os linfócitos matadores naturais T (NKT), células T, células matadoras naturais (NK) e macrófagos, recrutadas para a massa tumoral em desenvolvimento, podem reconhecer moléculas, tais como ligantes G2D de NK, que foram induzidos sobre células tumorais, pela inflamação incipiente ou seu próprio processo de transformação celular. Além disso, células T e células NKT, podem reconhecer tumores em desenvolvimento via interação de TCR com seus ligantes, ou com complexos expressos sobre células tumorais (BENLAGHA; BENDELAC, 2000). Esses eventos levam a um resultado comum, que é crítico para a progressão da resposta antitumoral - a produção de IFN- $\gamma$ . A quantidade inicial de IFN- $\gamma$  liberada no local do tumor, induz a produção local de quimiocinas, que recrutam mais células do sistema imune inato para o tumor (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

Produtos gerados durante a remodelação da matriz extracelular, podem induzir macrófagos infiltrantes de tumor a produzir baixas quantidades de IL-12, que estimulam células NK infiltrantes de tumor para produzir baixas quantidades de IFN- $\gamma$ , que por sua vez ativa macrófagos no tumor a produzir mais IL-12, levando ao aumento da produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (BANCROFT; SCHREIBER; UNANUE, 1991), (HODGE-DUFOUR et al., 1997).

Além desse sistema de feedback positivo, a ligação dos receptores de ativação de células NK a seus ligantes, sobre células tumorais, estimulam ainda mais a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (DIEFENBACH et al., 2000). Com isso, estas células podem ativar um número de processos dependentes de IFN- $\gamma$ , incluindo efeitos anti-proliferativos, pró-apoptóticos e angiostáticos, que resultam na morte de uma parte do tumor (LUSTER; LEDER, 1993) (BROMBERG et al., 1996), (KUMAR et al., 1997), (COUGHLIN et al., 1998), (QIN; BLANKENSTEIN, 2000).

Em outro mecanismo, os macrófagos ativados expressam produtos tumorocidas, como oxigênio reativo (PACE et al., 1983). As células NK ativadas, podem matar as células tumorais, por exemplo, via mecanismos dependentes de perforina (HAYAKAWA et al., 2002). Como resultado, uma fonte de antígenos de células tumorais mortas torna-se disponível e o sistema imunológico adaptativo é

recrutado no processo. As células dendríticas imaturas (DC), recrutadas para o local do tumor, se tornam ativadas ou pela exposição ao meio de citocina criado, durante o ataque ao tumor pela imunidade inata, ou pela interação com células NK tumor infiltrantes (GEROSA et al., 2002). As DC ativadas podem adquirir antígenos tumorais e após se tornarem maduras e portadoras desses antígenos, migram para o linfonodo, onde elas induzem a ativação de células T virgens (Th1) específicas para tumores (SALLUSTO; MACKAY; LANZAVECCHIA, 2000).

As células Th1 facilitam o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos, específicos de tumores, induzidos via apresentação cruzada de peptídeos tumorais antigênicos em moléculas de MHC de classe I de células dendríticas. Assim, o desenvolvimento da imunidade adaptativa específica ao tumor, fornece ao hospedeiro a capacidade de eliminar o desenvolvimento do tumor (YU et al., 2003), (HUANG et al., 2014).

(B) Equilíbrio, nesta fase, o sistema imune do hospedeiro e qualquer variante de célula tumoral que sobreviveu à fase de eliminação, entram em um equilíbrio dinâmico, em que linfócitos e IFN- $\gamma$  exercem pressão de seleção potente e implacável sobre as células tumorais, o que é suficiente para conter, mas não extinguir completamente, um leito tumoral contendo muitas células tumorais geneticamente instáveis e mutantes. Embora, muitas variantes de escape de células tumorais serem destruídas, novas variantes surgem, transportando diferentes mutações que podem lhes proporcionar maior resistência ao ataque imune. No fim, um possível resultado do processo de equilíbrio é uma nova população de clones tumorais, com imunogenicidade reduzida, selecionada de uma população parental heterogênea pela técnica de moldar forças pelo sistema imunológico (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

(C) Escape, nesse momento, variantes de células tumorais selecionadas na fase do equilíbrio, agora podem crescer em um ambiente que se torna impeditivo de atuação do sistema imune. Esta violação das defesas imunes do hospedeiro, ocorrem mais provavelmente quando mudanças genéticas e epigenéticas na célula tumoral, conferem resistência à detecção ou eliminação imune, permitindo aos tumores se expandir e se tornar clinicamente detectáveis. Como ambos os compartimentos inato e adaptativo do sistema imunológico, funcionam na rede de imunovigilância do câncer, os tumores muito provavelmente teriam que contornar um ou ambos os braços da imunidade, a fim de alcançar um crescimento progressivo (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

As células tumorais Individuais podem empregar múltiplas estratégias imunoevasivas, para evitar o poder integrado das respostas imunes inatas e adaptativas (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Resumidamente, a resistência imune adaptativa, ocorre quando o câncer muda seu fenótipo, em contrapartida às respostas imunes pró-inflamatória ou citotóxica, evadindo-se a essa resposta. Este processo é desencadeado, quando há o reconhecimento específico das células do câncer por células T, que leva a produção de citocinas de ativação imune. Com isso, o câncer desenvolve mecanismos, para limitar as respostas imunes e inflamatórias, e se proteger do ataque das células T (RIBAS, 2015). No microambiente tumoral, as células cancerígenas, sequestram mecanismos inibitórios, para evitar as repostas da imunidade antitumoral (PARK; KUEN; CHUNG, 2018).

Atualmente, reconhece-se que os tumores podem impedir diretamente ou indiretamente o desenvolvimento de respostas imunes antitumorais, através da liberação de citocinas imunossupressoras (TGF-  $\beta$  e IL-10) ou via mecanismos envolvendo células T com atividades imunossupressoras (células T reguladoras) (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O escape do tumor também pode resultar de mudanças, que ocorrem diretamente no nível do tumor. Estas mudanças, podem incluir alterações, que afetam o reconhecimento do tumor por células efetoras imunes, tais como perda de expressão de antígenos, ou desenvolver mecanismos para escapar da destruição imune, tais como a expressão de ligantes que interferem nas vias de sinalização dos *checkpoints* imunológicos, como a via do receptor de morte celular programada 1, PD-1, em linfócitos T (MARINCOLA et al., 1999), (PEDOEEM et al., 2014). Esta via se relaciona ao tema abordado nessa dissertação.

Os *checkpoints* imunológicos, referem-se a uma infinidade de vias inibitórias, que são cruciais, para a manutenção da auto-tolerância, modulação da duração e amplitude das respostas imunes fisiológicas, nos tecidos periféricos, a fim de minimizar os danos colaterais nos tecidos. Neste contexto, os tumores cooptam, certas vias de *checkpoint* imune, como um mecanismo principal de resistência, particularmente contra células T, que são específicas para antígenos tumorais (PARDOLL, 2012).

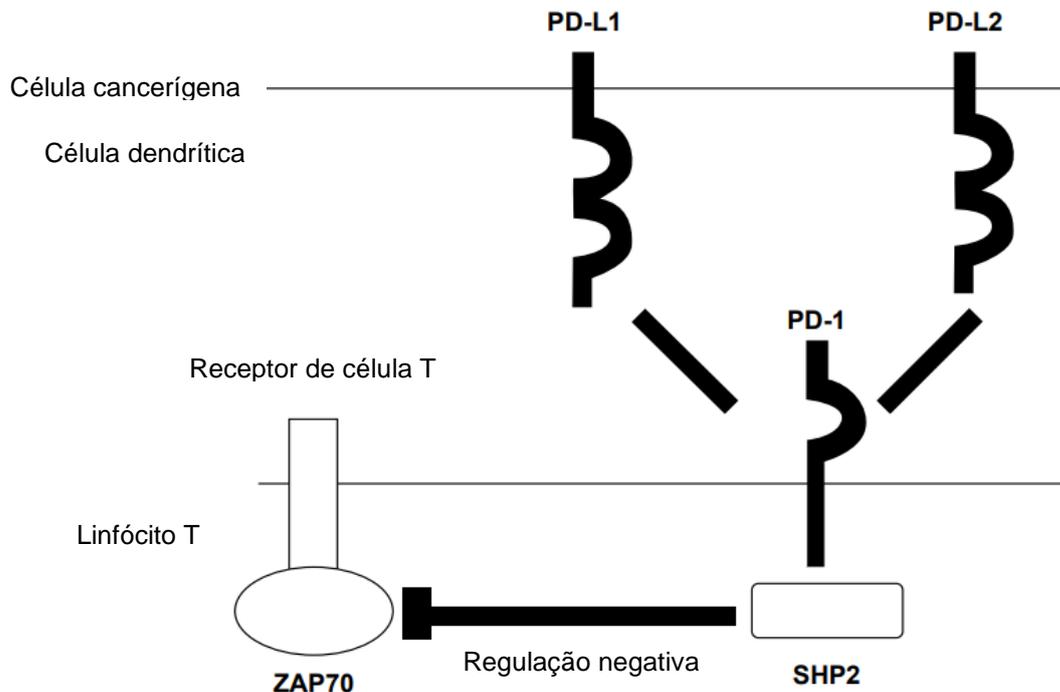
Os dois receptores mais conhecidos, por sua função inibitória para a resposta imune, são o antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e morte programada 1 (PD-1). Enquanto, o receptor CTLA-4 é responsável por modular respostas imunes centrais (linfonodos), o receptor PD-1 modula a atividade de resposta imune nos tecidos periféricos (TYKODI, 2014).

#### 1.4 Via de morte celular programada 1 (PD-1)

A proteína de morte celular programada 1 (PD-1), é um receptor imune inibitório, que desempenha papéis importantes na co-inibição e exaustão de células T, e é um alvo proeminente para a imunoterapia contra o câncer (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2017). Ela é uma proteína transmembrana do tipo I, pertencente à superfamília de imunoglobulinas CD28, sendo composta por 288 aminoácidos, que são divididos em, um domínio extracelular globular, um domínio transmembrana e um domínio intracelular, que contém um imunorreceptor motivo inibitório baseado em tirosina (ITIM) e também um imunorreceptor motivo de mudança baseado em tirosina (ITSM) (TSAI; ZARZOSO; DAUD, 2014).

Acredita-se, que o domínio intracelular de PD-1 transduza sinais negativos dentro das células, através de ITIM e ITSM (OKAZAKI et al., 2001). Enquanto, o ITIM recruta fosfatases contendo o domínio de homologia-2 de Src (SH2) (NEEL; GU; PAO, 2003). O ITSM recruta fosfatases contendo domínio 2 de região de homologia de Src, SHP-2 (OKAZAKI et al., 2001). Estudos, que utilizaram formas de PD-1 com mutação na tirosina (Y223) em ITIM, demonstraram que os efeitos inibitórios de ativação e produção de IL-2 eram preservados com o receptor ativado. Porém, ao se realizar mutações na tirosina (Y248), no domínio ITSM, essa capacidade era perdida, uma vez que a mutação anulou a interação de PD-1 com SHP2 (VASSILIKI; CHATTERJEE; LI, 2014). Além desse estudo, um trabalho que explorou espectrometria de massas para avaliar a estrutura desses domínios fosforilados, demonstrou que o peptídeo fosforilado correspondente ao ITSM da cauda intracelular de PD-1 poderia servir como local de ancoragem para SHP-2 *in vitro* (SHEPPARD et al., 2004).

A fosforilação da tirosina (Y248) no ITSM é necessária para a cascata de sinalização inibitória, induzindo a ligação de SHP-2 a PD-1, que por sua vez desfosforila e modula negativamente a função da ZAP70 nos linfócitos T, (Figura 1.4) (OKAZAKI et al., 2001). A ZAP70 é uma proteína tirosino-kinase (PTK) de 70kDa, essencial na transdução da sinalização, nos linfócitos T e células natural killer (NK). Essa proteína intracelular, encontra-se associada à cadeia  $\zeta$  (Zeta), do complexo do receptor de células T (TCR). As proteínas tirosino-kinases desempenham um papel crucial na ativação de células T. A estimulação do TCR resulta em fosforilação de um número de substratos celulares. Assim, a cadeia  $\zeta$  do TCR, pode mediar a transdução de estímulos extracelulares em funções efetoras celulares (CHAN et al., 1992).

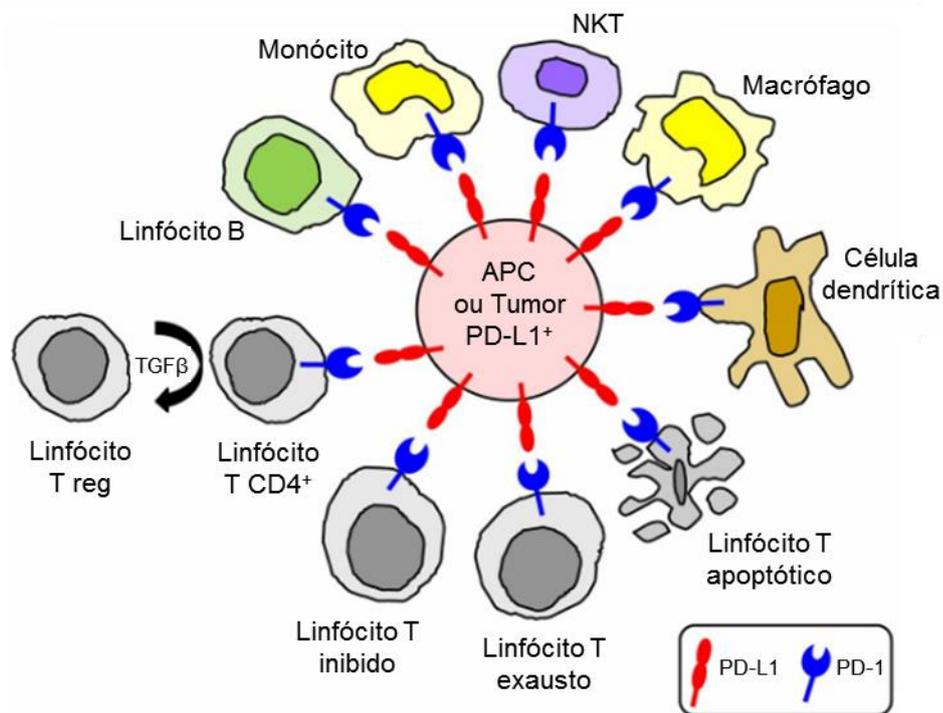


**Figura 1.4: Estrutura molecular de PD-1 e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2. Fonte: Adaptado de NAKAMURA et al. (2015, p. 2046). Abreviações: PD-1, receptor de morte programada 1; PD-L1 e PD-L2, ligante 1 e ligante 2 do receptor de morte celular programada 1; SHP2, fosfatase contendo domínio de região 2 de homologia de Src.**

O receptor PD-1 é expresso em células T CD4 + e CD8 + ativadas, bem como em células B, células mielóides (monócitos), células NK e NKT, sugerindo múltiplos papéis na regulação do sistema imunológico (KEIR et al., 2008). Ele pode ser expresso em macrófagos e células dendríticas (GORDON et al., 2017). Além disso, também é encontrado em células T com estímulos crônicos, mas não é encontrado em linfócitos T virgens (NAKAMURA et al., 2015). As populações de células que expressam o receptor PD-1 são mostradas abaixo (figura 1.5). Alguns dos papéis que esse receptor desempenha no sistema imunológico estão descritos de forma simplificada em seguida (figura 1.6).

O receptor CTLA-4 é expresso exclusivamente em células T e regula a amplitude da ativação das células T nos estágios iniciais (células T de memória e naive) (figura 1.7). Ele neutraliza a atividade do receptor co-estimulatório de células T (CD28), uma vez que ocorre o reconhecimento do antígeno. O CD28 e o CTLA-4 compartilham ligantes idênticos: CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2). A expressão de CTLA-4 na superfície das células T amortece a ativação das mesmas, por competição com CD28 na ligação a CD80 e CD86, causando sinais inibitórios através da ativação de fosfatases. Ele também medeia a inibição de células T independente de sinalização

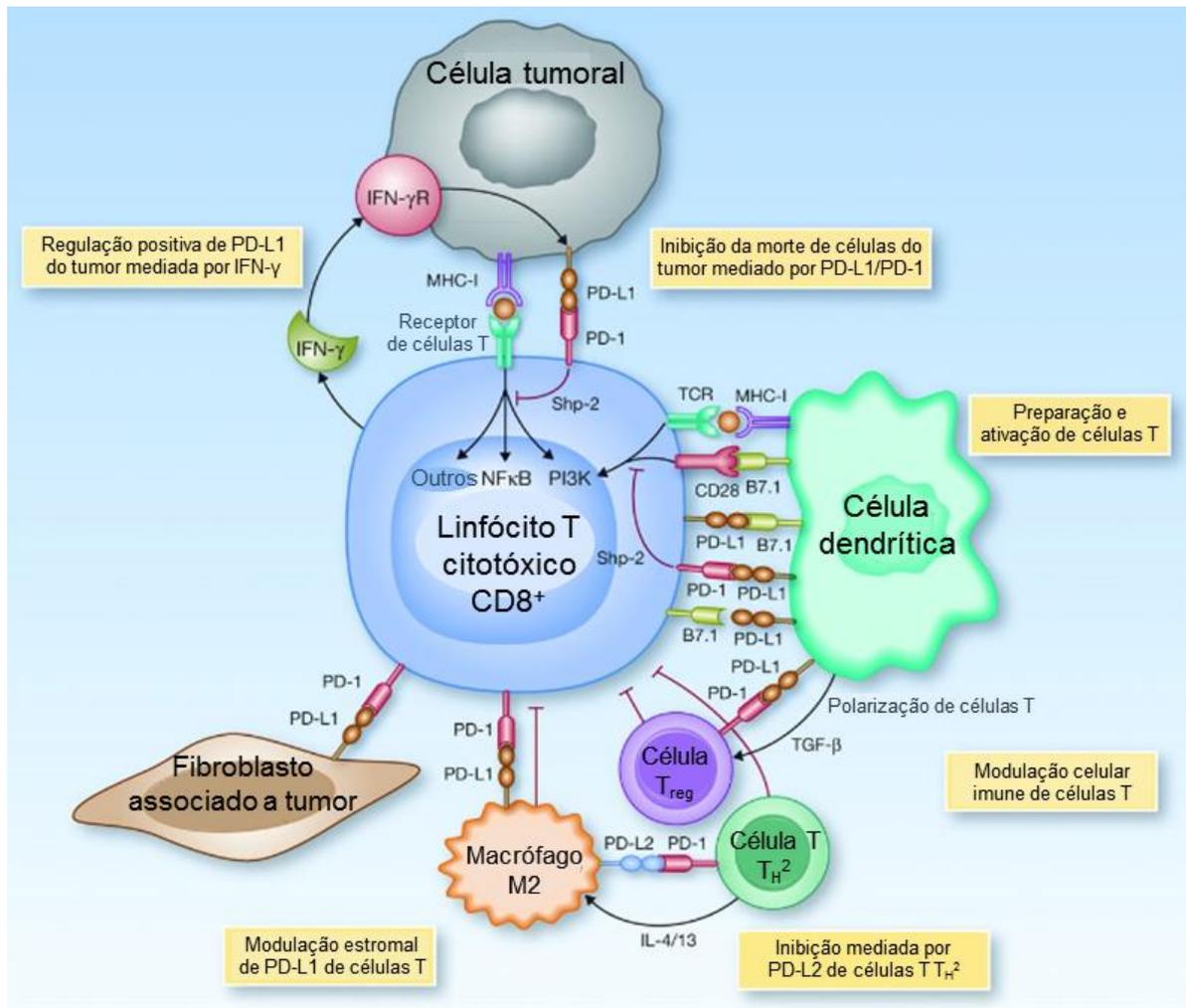
através do sequestro de CD80 e CD86 da ligação a CD28 e por trans-endocitose de CD80 e CD86 das APC (RAMSAY, 2013).



**Figura 1.5:** Múltiplas populações de células mielóides e linfóides que expressam PD-1 e são inibidas por células tumorais PD-L1<sup>+</sup> ou APC. A ligação de células PD-L1<sup>+</sup> a células T ativadas PD-1<sup>+</sup> pode resultar em disfunção de células T causando anergia, exaustão e apoptose de células T, bem como induzindo a diferenciação de células Treg. PD-1 também é expresso por células B ativadas, monócitos, células NKT, macrófagos e DC, suprimindo essas células. Fonte: Adaptado de OSTRAND-ROSENBERG; HORN; HAILE, (2014, p. 3837).

Em contraste ao CTLA-4, o receptor PD-1 tem como principal papel, limitar a atividade de células T efetoras em órgãos e tecidos periféricos, durante as respostas inflamatórias e prevenir a autoimunidade (RAMSAY, 2013). Além de estar envolvido, com os mecanismos de escape imunológico, durante infecções virais crônicas e câncer (GHIOTTO et al., 2010). Sua expressão é induzida em células T ativadas, quando ocupados por um dos seus ligantes, PD-L1 ou PD-L2 (RAMSAY, 2013).

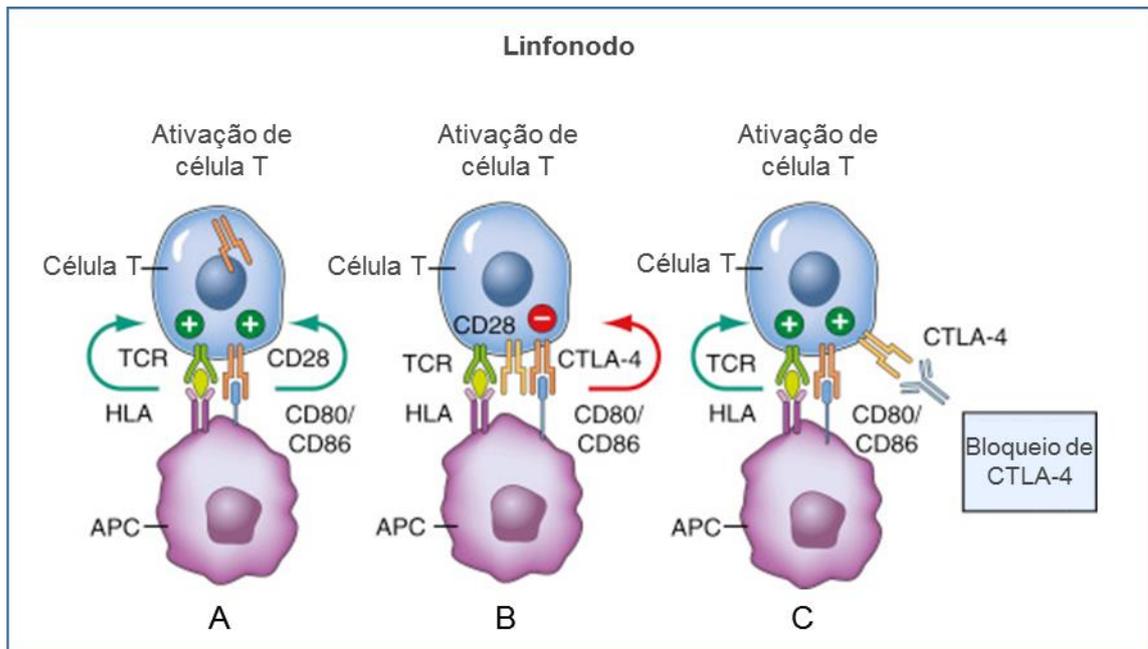
Estes ligantes são glicoproteínas transmembrana do tipo I, pertencem à família B7, possuem domínios extracelulares com estruturas semelhantes a imunoglobulinas, e apresentam 40% de homologia, dos aminoácidos entre si. De forma oposta à expressão limitada de PD-1, os seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, são amplamente expressos (NAKAMURA et al., 2015).



**Figura 1.6: Representação simplificada da imunologia tumoral e o papel da via PD-L1/PD-1.**  
 Fonte: Adaptado de CHEN, D. S.; IRVING; HODI, (2012, p. 6581).

PD-L1 é expresso em células não-hematopoiéticas e pode ser induzido em células parenquimatosas com auxílio de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) (CHEN, L., 2004). O ligante 1 de PD-1, também pode ser expresso, em uma ampla variedade de células imunológicas, incluindo linfócitos T ativados, linfócitos B, células dendríticas e macrófagos. Além de células ou tecidos não linfóides, tais como células endoteliais, células de câncer de pulmão e células de câncer de mama (NAKAMURA et al., 2015). Neste caso, está associado ao aumento da quantidade de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e com pior prognóstico (HINO et al., 2010), (ZOU; CHEN, 2008).

PD-L2 é principalmente expresso, em células dendríticas e monócitos, mas pode ser induzido, em uma ampla variedade de células imunes e células não imunes, dependendo do microambiente local (ROZALI et al., 2012). Sua expressão, também é observada em alguns tecidos e linhagens de células cancerígenas (NAKAMURA et al., 2015).



**Figura 1.7: Representação esquemática da expressão da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), que é um homólogo de CD28 expresso na superfície dos linfócitos T. (A) O CTLA-4 é expresso transitoriamente na superfície das células T CD8 ativadas. (B) A inibição de células T CD8 por CTLA-4 ocorre por envolvimento de moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 ligadas a CTLA-4 em células T CD8, o que resulta na desfosforilação de proteínas de sinalização do receptor de células T (TCR). (C) O bloqueio com Ipilimumabe reestabelece a capacidade de ativação. APC, célula apresentadora de antígeno; HLA, antígeno leucocitário humano. Fonte: Imagem adaptada de BELL; FERNANDES; ANDERSEN, (2018).**

De acordo com YOUNGNAK et al., (2003), PD-1 tem uma maior afinidade de ligação para PDL2, que para PD-L1. Porém, em um trabalho publicado por GHIOTTO et al., (2010), foram realizados ensaios de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e citometria de fluxo, para avaliar os mecanismos moleculares da interação de PD-1 com seus ligantes, o resultado demonstrou, que os dois ligantes apresentam afinidades comparáveis por PD-1, porém PD-L1, teve uma interação atrasada em relação ao PD-L2, devido a um fenômeno de transição conformacional, que atrasou a dissociação do PD-L1 ao PD-1.

O bloqueio clínico de PD-1, em células NK ativadas e células B (função inibitória), pode melhorar a atividade lítica anti-tumoral e a produção de anticorpos em pacientes com câncer. Além disso, a expressão de receptores de checkpoint inibitórios em Tregs (PD-1, CTLA-4) e MDSCs (PD-1, CTLA4), regula positivamente a sua função imunossupressora. O bloqueio terapêutico destes receptores, parece diminuir a atividade das células Tregs e MDSCs, no microambiente tumoral, e promover a imunovigilância do câncer pelas células T (FRANCISCO et al., 2009), (LIU, Y. et al., 2009), (RAMSAY, 2013).

Atualmente, está se tornando aparente, que a superexpressão dos ligantes inibitórios do *checkpoint imune* (PD-L1, PD-L2), é um dos principais mecanismos de resistência imune do câncer, particularmente na resposta a células T anti-tumorais e citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) (RAMSAY, 2013). Estes mecanismos em geral, são iniciados por interações ligante-receptor e podem ser facilmente bloqueados por anticorpos ou modulados por formas recombinantes de ligantes ou receptores (PARDOLL, 2012).

### 1.5 Anticorpos terapêuticos Anti PD-1

Um número crescente de biofármacos, vem sendo utilizado para o tratamento de neoplasias, com destaque para os anticorpos monoclonais. Neste contexto, a imunoglobulina G (IgG) é a forma preferida para muitas indicações, devido à elevada meia-vida plasmática, à estabilidade ao longo do tempo, à adequação para uma purificação de afinidade eficiente e, se previsto, funções efetoras imunológicas (AL-RUBEAI, 2011).

Atualmente, a terapia com anticorpos monoclonais anti-PD-1 tem alcançado grande sucesso clínico no tratamento de câncer. Diante disso, alguns anticorpos terapêuticos, visando o bloqueio de *checkpoint imune*, já foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (Quadro 1.1, Anexo 4), e estão disponíveis no mercado, para o tratamento de câncer. Apesar de serem anticorpos, com sequências distintas, a função deles é interferir na via de sinalização do receptor PD-1, bloqueando-o e eliminando a “barreira de proteção” ao câncer. Assim, eles permitem um aumento das respostas imunes e ajudam o organismo do paciente a lutar contra as células tumorais.

### 1.6 Terapia com o uso do Nivolumabe

O Nivolumabe (OPDIVO®), é um anticorpo monoclonal humano completo, pertencente a classe das imunoglobulinas IgG4, que se liga ao receptor PD-1, provocando a inibição do *checkpoint imune*, por bloquear a interação entre este receptor e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 (EMA, 2015). Ele foi desenvolvido, para atuar contra o receptor de morte celular programada 1, impedindo a ativação do inibidor de *checkpoint* imunológico, que regula negativamente a proliferação e ativação de linfócitos T (NAKAMURA et al., 2015). O bloqueio do receptor PD-1, pode restaurar

as respostas imunes contra o câncer, por reverter a inibição dos linfócitos T, mediada pela via de PD-1 (BRAHMER; HAMMERS; LIPSON, 2015b).

Portanto, ao agir como um imunomodulador, bloqueando a ativação do receptor PD-1, em linfócitos T, o Nivolumabe foi indicado, para o uso em pacientes com melanoma metastático ou irresssecável, que não pode ser removido cirurgicamente. Além dos pacientes, que foram previamente tratados com ipilimumabe, assim como, após tratamento combinado com ipilimumabe e um inibidor de BRAF. Por fim, em pacientes, cujos tumores expressam mutações do gene BRAF V600, ou que não respondam mais a outras drogas (TOPALIAN et al., 2014).

Entre o período de 2008 e 2015, um estudo de meta-análise, avaliou quatro ensaios clínicos, com 1910 pacientes. Esses ensaios, demonstraram que a terapia baseada no uso de Nivolumabe, prolongou a sobrevida livre de progressão (PFS), no tratamento de melanoma avançado, com menos efeitos adversos (ZHANG et al., 2016). Historicamente, poucos tratamentos foram efetivos para o melanoma avançado, razão pela qual, este produto foi aprovado, no âmbito de um programa acelerado pelo FDA, de modo a permitir acesso mais cedo ao paciente (TSAI; ZARZOSO; DAUD, 2014). Além disso, o Nivolumabe é o primeiro inibidor de PD-1, aprovado para o tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e câncer de pulmão de células escamosas (SCC), em estágio avançado de tratamento ou após quimioterapia a base de platina (ANG; LIM; SOO, 2016).

Em outubro de 2015, o FDA ampliou a indicação do medicamento, para o tratamento de NSCLC metastáticas, baseado em ensaio clínico randomizado, aberto, multicêntrico e internacional, onde 582 pacientes participaram. Este estudo, demonstrou a melhoria da sobrevida global dos pacientes tratados com Nivolumabe em comparação com aqueles que receberam docetaxel (KAZANDJIAN et al., 2016).

Além desse estudo de 2015, um estudo de revisão (Tabelas 1.1 e 1.2, Anexo 5 e Anexo 6 respectivamente), avaliando ensaios clínicos recentes, que estão em andamento em diferentes fases, com diferentes linhas de tratamento, para o SCC e NSCLC, com o Nivolumabe sozinho, ou em combinação com outros tratamentos, vem demonstrando resultados parciais positivos, embora, esses ensaios ainda precisem ser finalizados e seus resultados avaliados.

Uma outra aplicação possível, para este tipo de anticorpo monoclonal, seria o seu emprego para o tratamento de doenças infecciosas crônicas, onde a via de PD-1, em geral, tem papel relevante. Essa abordagem, vem sendo discutida na literatura, como no estudo conduzido por ROUSSEY et al., (2017), utilizando modelos animais

de infecção pulmonar criptocócica persistente, que investigou a contribuição da via de PD-1 na doença, e se o tratamento com o anticorpo anti-PD-1, pode melhorar a eliminação fúngica. O resultado deste estudo, demonstrou que a sinalização de PD-1, promove a infecção pulmonar criptocócica persistente, e que o tratamento com o anti-PD-1, melhora a eliminação fúngica.

Em outra publicação, RAO et al., (2017), realizaram uma revisão na literatura, que avaliou o potencial da utilização de terapia dirigida pelo hospedeiro, através do bloqueio da via de PD-1. Os pesquisadores chegaram à conclusão, que o bloqueio da via de PD-1, é uma terapia adjunta promissora para doenças infecciosas crônicas, como tuberculose e HIV, assim essa terapia deve ser testada em ensaios clínicos randomizados.

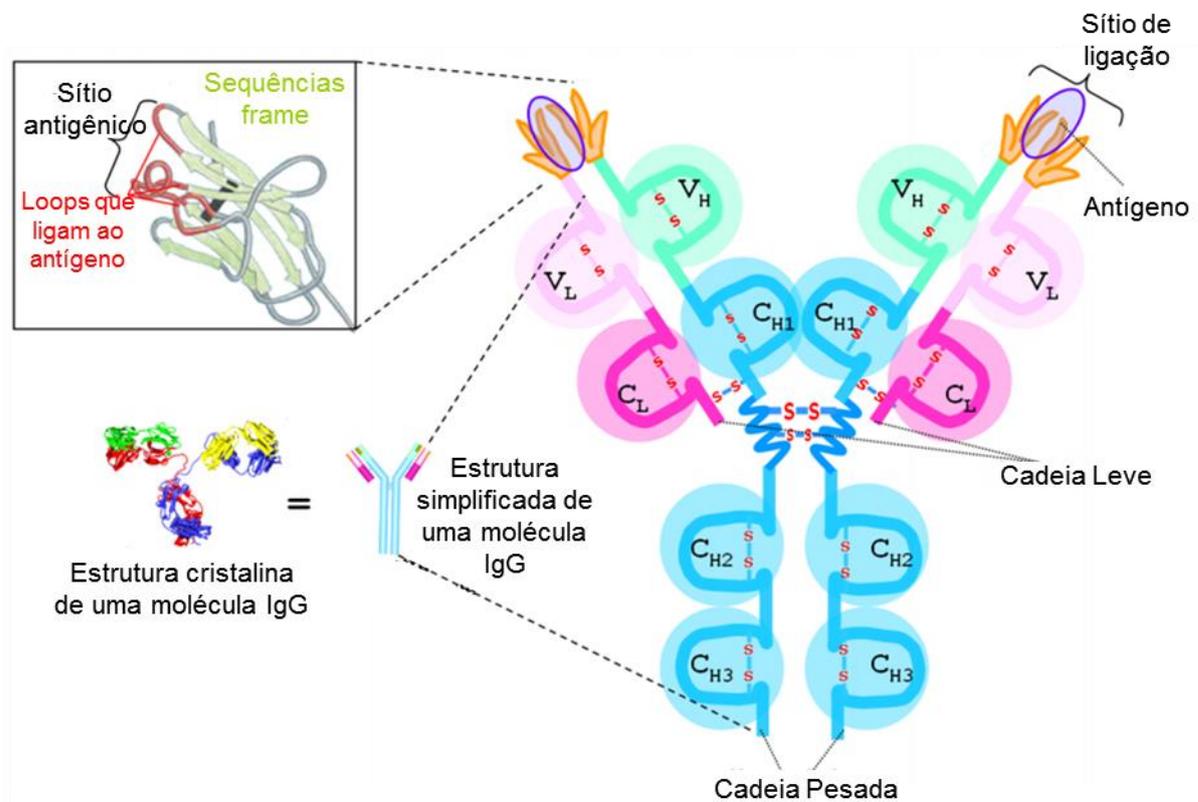
Um terceiro trabalho, com revisão de literatura, DYCK; MILLS, (2017), chegaram à conclusão, que o bloqueio de *checkpoints imune*, tem um importante papel para aumentar a eficácia de vacinas terapêuticas, contra muitas infecções crônicas, como malária, tuberculose e HIV.

## 1.7 Estrutura e função do Nivolumabe

De maneira geral, as imunoglobulinas (Igs) são frações de proteínas presentes no soro do sangue circulante, que possuem a habilidade de distinguir componentes do sistema imune, contribuindo assim, para uma resposta imune de neutralização contra toxinas e vírus (SCHROEDER; CAVACINI, 2010). Elas são proteínas heterodiméricas, compostas por duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). Podem ser separadas funcionalmente, em domínios “variáveis” (V) próximo ao terminal NH<sub>2</sub>, que se ligam a antígenos, e domínios “constantes” (C) próximo ao terminal COOH, que especificam funções efetoras, cada um dos quais, consiste de 2 folhas β pregueadas, 'presas' por uma ponte de sulfeto, entre dois resíduos de cisteína conservados (Figura 1.8) (COZMA, 2014).

A IgG é o isotipo predominante, encontrado no plasma, e tem a maior meia vida plasmática. Com base nas diferenças estruturais, funcionais e antigênicas, na região constante de cadeia pesada, em particular CH1 e CH3, foram identificadas 4 subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Essas diferenças nos domínios CH, afetam a flexibilidade e afinidade funcional do anticorpo, o que facilita interações com antígenos multivalente. A mobilidade ou flexibilidade, das porções Fab e Fv, são principalmente

controlados, pelo domínio CH1 e a região de dobradiça. Todas as subclasses de IgG, exibem diferentes atividades funcionais (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).



**Figura 1.8: Representação esquemática da estrutura de uma imunoglobulina G (IgG) e do sítio de ligação ao antígeno. O anticorpo consiste em duas cadeias pesadas e duas cadeias leves unidas por pontes dissulfeto na região de dobradiça. Cada cadeia pesada consiste em três regiões constantes (CH) e uma região variável (VH) e cada cadeia leve consiste de uma região constante (CL) e uma região variável (VL). As regiões variáveis contribuem para a formação do domínio de ligação ao antígeno. Fonte: Adaptado de COZMA (2014, p. 9)**

Os seis loops hiper-variáveis, dentro dos domínios variáveis, chamados de regiões determinantes de complementariedade (CDRs), são conhecidos por serem responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, enquanto que os domínios constantes são responsáveis por mediar a ativação efetora (SELA-CULANG; KUNIK; OFRAN, 2013).

O Nivolumabe é um anticorpo monoclonal totalmente humano, da subclasse IgG4, obtido a partir de camundongos transgênicos, que expressam IgG humana. Após a seleção de um clone de hibridoma produtor do anti-PD-1, os genes codificantes das regiões variáveis da imunoglobulina, foram sequenciados e posteriormente clonados, em um vetor de expressão, contendo a região constante IgG4, que foi usado, para estabelecer uma linhagem de células CHO, expressando o anticorpo (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2015).

Esse anticorpo é composto por 2 cadeias pesadas idênticas, com 440 aminoácidos, e duas cadeias leve Kappa idênticas, com 214 aminoácidos, que são ligados através de pontes de sulfeto inter-cadeias (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2016). Ele possui uma mutação na região Fc de cadeia pesada, S228P, para aumentar a estabilidade e reduzir a variabilidade (NAKAMURA et al., 2015).

O Nivolumabe possui um peso molecular calculado de 146,2kDa (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2016). Dados do DRUGBANK, (2019), baseado em propriedades esperadas para a IgG, sugerem um ponto isoelétrico entre 6,1 e 8,5; com solubilidade em água de 50mg/mL, um ponto de fusão entre 80° e 90°C, e o ponto de ebulição sem estabilidade térmica, uma vez que os fragmentos Fab e Fc, desnaturam-se a 60° e 70°C, respectivamente, sendo que o fragmento Fc é mais sensível a diminuição do pH.

De acordo com os trabalhos publicados por AALBERSE, R. O. B. C.; SCHUURMAN, (2002) e AALBERSE, R. C. et al., (2009), os anticorpos da subclasse IgG4, possuem propriedades biológicas únicas. Pois, estudos de mutagenesis realizados por KOLFSCHOTEN et al., (2007), concluíram, que os anticorpos da subclasse IgG4, trocam de cadeias leves *in vivo*, gerando produtos biespecíficos, com atividades anti-inflamatórias. Além disso, apresentam limitada capacidade de formar complexos imunes e ativar o complemento (ZEE; SWIETEN; AALBERSE, 1986).

Das quatro subclasses humanas de IgG, a IgG4 é a menos abundante no soro, com aproximadamente 5% do total, e possui o papel biológico, na resposta do hospedeiro a estimulação crônica e anti-inflamatória (SALFELD, 2007). Em outro estudo, pesquisadores demonstraram, que a IgG4 desempenha um papel protetor, na doença alérgica, por inibir a degranulação de mastócitos (SANTOS et al., 2015).

## 1.8 Medicamentos biossimilares

Biossimilares são medicamentos biológicos, de elevada qualidade e que demonstram ter os mesmos atributos de eficácia, segurança e qualidade, que um medicamento biológico de referência, sendo que não podem ser considerados, medicamentos genéricos, produto original, *biobetter*, *stand-alone* ou análogo ao biológico original (NOB). Pois estes, são diferentes em termos de síntese, requisitos de qualidade requeridos, nível de inovação, caminho regulatório percorrido ou órgão responsável pela aprovação, respectivamente (MORA, 2015).

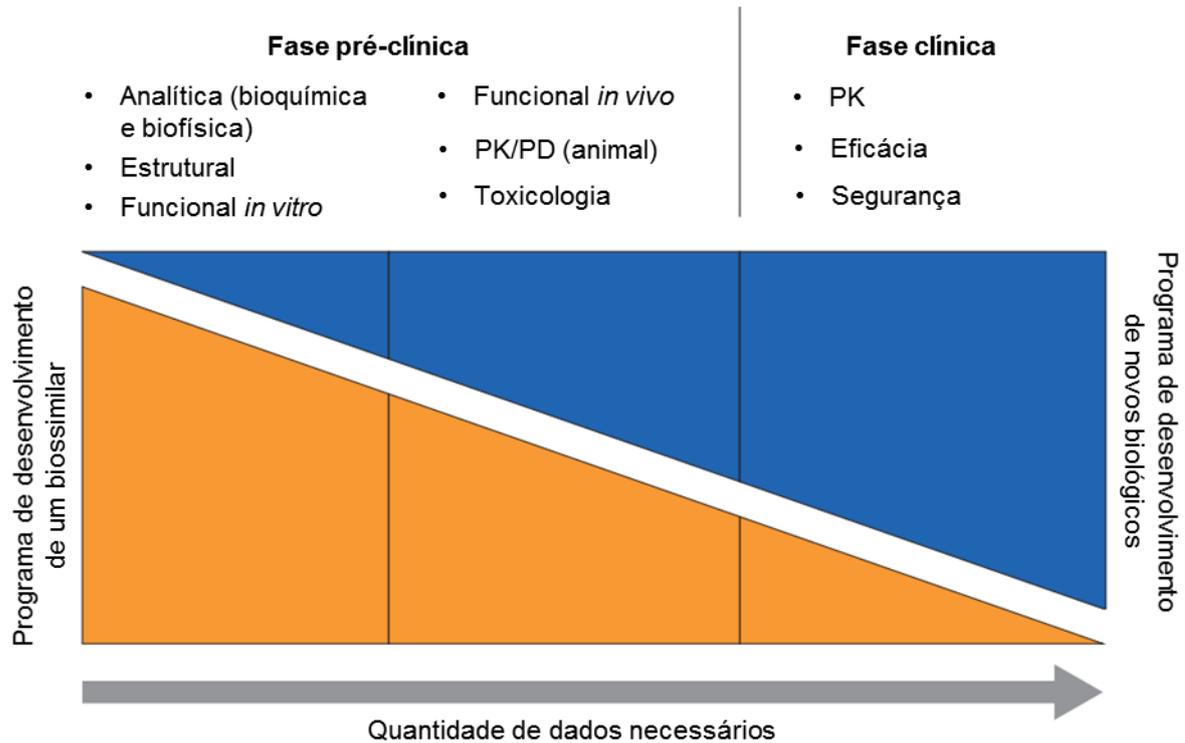
Os medicamentos biossimilares devem sempre ter a mesma sequência primária de aminoácidos e o enovelamento, como o produto original (WINDISCH, 2015). Além disso, eles são produzidos e comercializados a partir do fim da vigência da patente dos biológicos originais, com o objetivo de reduzir os custos com o tratamento (BLACKSTONE; FUHR, 2013), (SCHEINBERG et al., 2018).

Esses biofármacos podem ser produzidos por fabricante diferente do produto original, sendo obtidos por um processo diferente, uma vez que, detalhes sobre o processo de fabricação são segredos comerciais, inacessíveis a concorrentes. Além disso, a linhagem celular produtora do anticorpo de referência, permanece em propriedade do fabricante do produto original, e quase todas as informações sobre essa linhagem continuam sendo um segredo comercial (GOTHAM, 2018).

A aprovação dos biossimilares, depende do cumprimento das diretrizes internacionais (LÓPEZ-MORALES et al., 2015). Uma das vantagens, é que os ensaios clínicos necessários para a sua aprovação, podem diferir daqueles solicitados para um produto inovador, devido ao menor número de pacientes de fase III recrutados (WEISE et al., 2019). Além da possibilidade de extrapolação das indicações terapêuticas, baseado em dados de eficácia e segurança de outras indicações. Assim, os biossimilares tem sido aprovados, sem que haja a necessidade da realização de ensaios clínicos específicos para essas indicações (WEISE et al., 2019).

O caminho para aprovação de um biossimilar, começa com uma extensiva caracterização físico-química da molécula, seguido por ensaios não clínicos comparativos *in vitro*, sendo que estudos não clínicos em animais, podem não ser necessários, a menos que haja diferenças claras, entre o biossimilar e o produto de referência, em termos de impurezas, relacionadas ao processo, ou diferenças importantes na formulação, que possam causar preocupações potenciais de eficácia ou toxicidade. Por fim, um ensaio clínico controlado e randomizado (RCT) deve ser realizado, visando reduzir a incerteza residual, após a extensa análise físico-química e *in vitro* (Figura 1.9).

Desta forma, os biossimilares necessitam de um único estudo de farmacocinética para demonstrar a equivalência com o produto de referência, e um RCT suficientemente grande, para demonstrar equivalência, junto a imunogenicidade e segurança comparáveis. As margens de equivalência, para este ensaio controlado randomizado, são derivadas de uma meta-análise de RCT de fase III de placebo, do produto de referência (ISAACS et al., 2017).



**Figura 1.9: Desenvolvimento de novas drogas biológicas versus biossimilares. Fonte: Adaptado de BUI et al. (2015, p. 4). PK- farmacocinética; PD- farmacodinâmica.**

De acordo com publicações do FDA e EMA, assim como vários trabalhos com moléculas candidatas a biossimilares, diversos ensaios são empregados na caracterização de um biofármaco (Quadro 1.2), sendo que nenhuma técnica é considerada exclusiva, para se determinar uma característica em especial. O que pode-se observar é que elas são empregadas de maneira complementar, na interpretação de um atributo avaliado.

Ainda segundo publicação da Agência reguladora de Medicamentos e Alimentos (FDA), um produto biossimilar, para ser licenciado, deve ter a mesma potência, via de administração, forma de dosagem, além de utilizar o mesmo mecanismo de ação para as condições de uso propostas, na medida em que, o mecanismo de ação do produto de referência seja conhecido. Ressalta-se, que as condições propostas de uso, devem ter sido previamente aprovadas para o produto de referência (DOUGHERTY; ZINEH; CHRISTL, 2018).

No Brasil, somente em 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº55/2010 sobre o tema, estabelecendo os critérios para aprovação de biossimilares no país (SCHEINBERG et al., 2018). Essa resolução fornece duas rotas para a aprovação: uma conhecida como “comparabilidade” e outra chamada “desenvolvimento individual” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

**Quadro 1.1: Métodos mais empregados na avaliação de atributos críticos de qualidade para o exercício de comparabilidade entre um biossimilar e seu produto de referência. Fonte: Elaborado pelo autor com informações extraídas de (GARIDEL et al., 2008); (BERKOWITZ, S. et al., 2013); (MENDOZA-MACEDO et al., 2016); (EMA, 2016), (FDA, 2016); (HONG et al., 2017); (MIAO et al., 2017); (SULLIVAN; DIGRAZIA, 2017). \*1 trabalho sugere que a criticidade é baixa.**

Nível	Atributo de qualidade crítica	Método	Criticidade	Atributo da Farmacopeia	Relevância clínica
Propriedades físico-químicas	Sequência de aminoácidos (estrutura 1ª)	Dispersão de luz multi-ângulo, SDS-PAGE, espectrometria de massas, mapeamento de peptídeo MS/MS ou UV, degradação de Edman, espectrometria de massas em tandem	Muito alta	Identidade	Eficácia, segurança e imunogenicidade
	Estrutura de ordem superior (Estruturas 2ª, 3ª e 4ª)	Espectroscopia lifetime TCSPC, análise de tióis livres, calorimetria de varredura diferencial, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, cristalografia de raio X, dicroísmo circular, espectroscopia por Infravermelho com transformada de Fourier, troca pulsada deutério/hidrogênio, espectroscopia de fluorescência	Alta	Identidade	Eficácia e imunogenicidade
	Heterogeneidade de carga, variantes oxidadas, partículas subdivisíveis e variantes truncadas*	Cromatografia de interação hidrofóbica, focalização isoeletrica capilar, eletroforese de zona capilar, focalização isoeletrica, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de troca aniônica, obscurecimento de luz, espectrometria de massas	Alta	Identidade e impurezas	Eficácia e imunogenicidade
Atividade Biológica	Afinidade em relação à molécula alvo	ELISA (baseado em células), citometria de fluxo (baseada em células), ressonância plasmônica de superfície, interferometria de camada dupla, calorimetria de titulação isotérmica	Muito alta	Identidade	Eficácia e segurança
Propriedades Imunoquímicas	Potência biológica	Ensaio de proliferação celular	Muito alta	Potência	Eficácia e segurança
Pureza, Impurezas e contaminantes	Agregados e isoformas de degradação	Eletroforese em gel capilar, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de fase reversa, SDS-PAGE, ultracentrifugação analítica	Alta	Identidade e impurezas	Imunogenicidade
	Concentração de proteínas	Determinação de conteúdo por espectroscopia UV/VIS	Muito alta	Identidade e impurezas	Eficácia

A nomenclatura utilizada nesta resolução chama biossimilares de “Produtos biológicos” e produtos de referência de “novos biológicos”. A rota comparativa é quase idêntica à descrita no documento da OMS, portanto, mais rigorosa e requer estudos comparativos de fase I e fase III com o produto de referência, além de permitir a extrapolação para outras indicações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010), (SCHEINBERG et al., 2018).

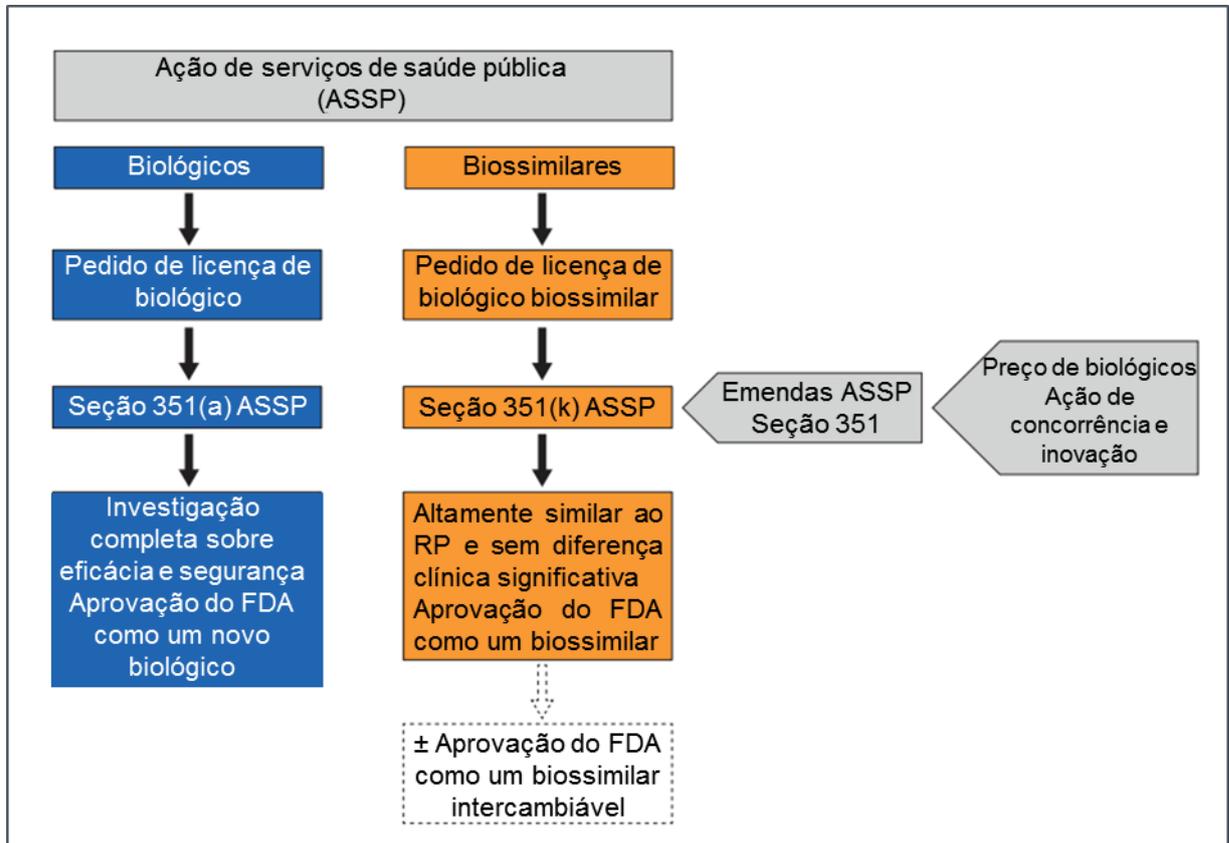
Por sua vez, a rota do “desenvolvimento individual” impede o exercício de comparabilidade com um pequeno dossiê, que cria alguma preocupação em relação ao seu uso, particularmente na regulação de anticorpos monoclonais biossimilares. No entanto, a extrapolação de indicações, que é um ponto importante e controverso sobre produtos biossimilares, não é permitido nesta rota (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010), (SCHEINBERG et al., 2018).

Em relação ao mercado farmacêutico global, analistas especulam, que o segmento dos biológicos e biossimilares, deverá chegar a US\$ 26,5 bilhões até 2020 (MARKET RESEARCH, 2014). Embora, os mercados desenvolvidos representem 80% das vendas, de produtos biológicos de referência, o segmento no resto do mundo, inclui muitos mercados, em que as taxas de tratamento, com produtos biológicos de marca são atualmente baixas, devido aos altos custos. Portanto, existem oportunidades, para que os biossimilares, ampliem o mercado e proporcionem um melhor acesso à terapia biológica. Devido a esta janela de oportunidades, muitas empresas, iniciaram o desenvolvimento de biossimilares em seus mercados domésticos e no exterior (DECISION RESOURCES GROUP, 2014).

Estima-se que, o lançamento de novos biossimilares, na próxima década, possa economizar até US \$250 bilhões, e aumentar o acesso a tratamentos biológicos, para mais 1,2 milhão de pacientes em 2025. Isso amplia, as opções de tratamento para pacientes crônicos, e permite maior uso de medicamentos biológicos, fornecendo maior acesso a indivíduos que, no passado, abandonaram o tratamento ou se voltaram para medicamentos menos efetivos (ASSOCIATION FOR ACCESSIBLE MEDICINES, 2018).

Apesar de nenhum produto biofarmacêutico, original ou biossimilar, ser livre de riscos, os critérios adotados para a sua aprovação são bastante rígidos. Uma vez que é concedida, a sua autorização de comercialização, por uma agência regulatória, como por exemplo o FDA, (Figura 1.10), a aprovação é fundamentada, em um sólido processo de desenvolvimento baseado em ciência, que preza pelo equilíbrio risco-benefício. Assim, não há motivos, para acreditar que o uso de um biossimilar, traz

mais riscos para o paciente, que o produto original de referência correspondente, uma vez que, após o primeiro biossimilar ser autorizado, em 2006, nenhum alerta clínico, levantou bandeiras vermelhas, sobre o caminho estabelecido pelos biossimilares (MORA , 2015).



**Figura 1.10: Via para aprovação de biossimilares pelo FDA.** Fonte: Adaptado de EPSTEIN (2018, p. 4). FDA, Agência de medicamentos e alimentos dos EUA; RP, produto de referência [i.e. 351 (a) biológico aprovado].

## 2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos observou-se uma modificação na estrutura demográfica brasileira, devido ao envelhecimento da população, com 60 anos ou mais, que superou a marca dos 30,2 milhões em 2017 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2018). Além disso, uma transiente alteração epidemiológica no país, vem causando o aumento do consumo de biofármacos, principalmente os empregados no tratamento de câncer e doenças inflamatórias (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2016).

O Sistema Único de Saúde (SUS), é um dos responsáveis pela promoção da saúde. Por ser um direito fundamental garantido pela constituição federal, o governo gasta aproximadamente R\$ 7 bilhões por ano, com ações na Justiça, na área da Saúde (INTERFARMA, 2018). Com o crescimento das demandas judiciais, o orçamento voltado para as ações e programas de atendimento coletivo, tem sido consumido cada vez mais, para o atendimento das ações judiciais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Mais de um terço do montante gasto em 2014, com pedidos judiciais, foi usado para a compra de medicamentos importados (ABRADILAN, 2015). Desse valor, os biofármacos equivalem a cerca de 4%, porém representam 51% dos gastos, refletindo o alto custo desses produtos (BRASIL, 2014).

Com a expiração das patentes de biofármacos, os caminhos para o desenvolvimento de biossimilares foram abertos (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2016). Isso permite uma janela de oportunidades para diminuir os gastos públicos com medicamentos biológicos. Bio-Manguinhos, como instituição da Fiocruz, tem como principal missão fornecer insumos para a saúde pública, incluindo biofármacos, portanto pode ter um papel importante para o SUS ao desenvolver novos biossimilares.

O advento da terapia de bloqueio da via de PD-1 revolucionou a imunoterapia do câncer, ao reestabelecer o equilíbrio na via, e permitir que o sistema imunológico combata a doença. Fato que levou os seus descobridores a ganharem o Prêmio Nobel de medicina (THE NOBEL ASSEMBLY AT KAROLINSKA INSTITUTET, 2018).

Embora, o Anti-PD-1 não seja a primeira terapia de bloqueio de *checkpoint* imunológico aprovada, ele foi o primeiro a tratar de forma eficiente o melanoma, e outros 14 tipos de câncer (JOHNS HOPKINS, 2017). Estudos também sugerem, o seu potencial uso no tratamento de doenças infecciosas crônicas (DYCK; MILLS, 2017).

Diante desse contexto, em que a indústria farmacêutica, constitui a base do processo de evolução da medicina, e a terapia de bloqueio de PD-1 é apontada, pela comunidade científica, como o principal método para tratar o câncer e com potencial para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, justifica-se que Bio-manguinhos, como principal laboratório público brasileiro, desenvolva uma plataforma, para a produção de anticorpos monoclonais anti PD-1 biossimilares no país, de forma a fornecer ao SUS e ampliar o acesso mais rapidamente aos pacientes. Este trabalho pode contribuir por estabelecer metodologias e plataformas úteis ao longo do processo de desenvolvimento deste ou de outros biofármacos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente projeto tem como objetivo geral a obtenção de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 bioequivalente ao Nivolumabe.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Clonar os genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1 em vetor de expressão;
- Expressar o anticorpo anti PD-1 em células de mamíferos;
- Purificar o anticorpo por meio de métodos cromatográficos;
- Realizar a caracterização físico-química do anticorpo;
- Avaliar a capacidade de ligação do anticorpo ao receptor alvo PD-1.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Clonagem dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1

#### 4.1.1 Genes sintéticos

As sequências dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1, bioessimular ao Nivolumabe, foram obtidas a partir do banco de dados *DRUG BANK* (número de acesso: DB09035). Posteriormente, estes genes foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) e enviados em vetor plasmideal pUCIDT AMP (Anexo 1).

#### 4.1.2 Amplificação dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada

Com o objetivo de incluir os sítios de restrição necessários para a etapa de clonagem, os genes de cadeia leve e de cadeia pesada foram amplificados pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), a partir das construções pUCIDT + cadeia leve e pUCIDT + cadeia pesada. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação da cadeia leve continham os sítios para XhoI e XbaI (*Forward* - CCG**CTCGAGG**CCACCATGGACTTCCAGGTGCAG e *Reverse* - GTCTTTTAACAGGGGCGAGTGTTAAT**CTAGAGCA**). Para a amplificação da cadeia pesada, também foram utilizados oligonucleotídeos com os sítios XhoI e XbaI (*Forward* -CCG**CTCGAGG**CCACCATGGGCTGGAGCCTGATC e *Reverse* - CCTGTCTCTGTCCCTGGGCAAGTAAT**CTAGAGCA**). A PCR foi então realizada utilizando-se a mistura de reagentes descrita na tabela 4.1.

As condições de ciclagem para cadeia leve foram as seguintes: (i) denaturação inicial de 94°C por 5 minutos; (ii) 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (denaturação), 60°C por 30 segundos (hibridização) e 68°C por 1 minuto (extensão); (iii) extensão final de 68°C por 5 minutos, (iv) 4°C ∞.

**Tabela 4.1: Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anticorpo anti PD-1. Fonte: Elaborado pelo autor.**

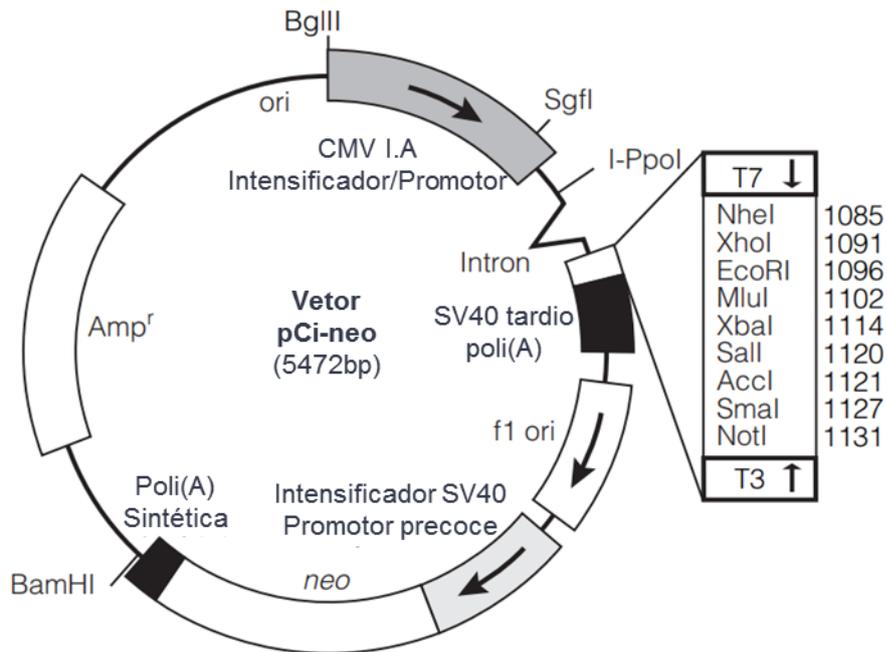
Reagente	Concentração	Volume/reação
Água livre de DNase/RNase (Thermo Fisher Scientific)	-	38,1µl
Tampão da PCR sem MgSO <sub>4</sub> (Thermo Fisher Scientific)	10X	5µl
dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Thermo Fisher Scientific)	10mM	1,5µl
MgSO <sub>4</sub> (Thermo Fisher Scientific)	50mM	1µl
<i>Platinum™ Pfx DNA Polymerase</i> (Thermo Fisher Scientific)	2,5U/µL	0,4µl
Oligonucleotídeo sense (Fw)	10µM	1,5µl
Oligonucleotídeo anti-sense (Rv)	10µM	1,5µl
DNA <i>Template</i>	50ng/µl	1µl
Volume final	----	50µL

Para a cadeia pesada, as condições foram: (i) denaturação inicial de 94°C por 5 minutos; (ii) 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (denaturação), 63°C por 30 segundos (hibridização) e 68°C por 1 minuto e meio (extensão); (iii) extensão final de 68°C por 5 minutos, (iv) 4°C ∞.

Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v). Os géis foram corados com Gel Red™ *Nucleic Acid* 10.000x *in water* (Biotium), sendo diluído 3:10000 em TAE de acordo com as instruções do fabricante e visualizados sob luz ultravioleta (UV). Em seguida, os materiais foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. Após a purificação, os *amplicons* foram quantificados com a plataforma NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

#### 4.1.3 Construção dos vetores pCI-neo + cadeia leve e pCI-neo + cadeia pesada

Após a realização da PCR, os *amplicons* foram digeridos e clonados no vetor de expressão pCI-neo (Promega) esquematizado na Figura 4.1.



**Figura 4.1: Mapa circular do vetor pCi-neo usado nas construções recombinantes. Fonte: Adaptado de PROMEGA CORPORATION, (2009, p. 6). ori - origem, CMV I.A - imediatamente anterior de Citomegalovírus; SV40 tardio poli(A) - sinal de poliadenilação tardia de SV40; f1 - região de fago; neo – neomicina fosfotransferase; Poli(A) sintética – sinal de poliadenilação sintética; Amp<sup>r</sup> - região codificante de β-lactamase.**

Resumidamente, realizou-se a digestão com as enzimas de restrição XhoI (Thermo Fisher Scientific) e XbaI (Thermo Fisher Scientific), tanto dos genes de cadeia leve e de cadeia pesada do anti PD-1 quanto o vetor de expressão pCI-neo. Em seguida, alíquotas da reação de clivagem foram submetidas a ensaio de eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v). Os volumes totais das reações contendo os fragmentos de 717pb da cadeia leve e de 1386pb da cadeia pesada foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega), conforme instruções do fabricante.

Para evitar a recircularização do vetor durante a etapa de ligação, o mesmo foi submetido a reação enzimática de desfosforilação com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, PROMEGA), seguindo as recomendações do fabricante. O vetor desfosforilado também foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System. Em seguida, quantificou-se os genes de cadeia leve e de cadeia pesada e o vetor de expressão pCI-neo com NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Por fim, realizou-se a reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. A proporção utilizada entre o vetor e o inserto foi de 1:10 (m/m), respectivamente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### 4.1.4 Preparo de células eletrocompetentes

As células competentes de *Escherichia coli* (Thermo Scientific), cepa TOP10, foram preparadas para eletroporação, conforme descrito por Sambrook e Russell, 2001.

#### 4.1.5 Transformação de células eletrocompetentes e seleção dos clones recombinantes

Para realizar a transformação e seleção dos clones recombinantes, foi adicionado 1µL do volume da ligação pCI-neo+cadeia leve a uma alíquota de 100µL, de células competentes de *E. coli*, cepa TOP 10. Esse material foi então transferido para uma cubeta de 0,2mm e submetido à eletroporação, utilizando-se o equipamento MicroPulser™ (Bio-Rad). Em seguida, adicionou-se 900 µL de meio de cultura Luria Bertani (triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), cloreto de sódio 0,5% (m/v), água destilada qsp 100mL) à cubeta e o volume total foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, sem antibiótico, o qual foi mantido a 37°C, sob agitação de 200 rotações por minuto (rpm), por 1 hora. Posteriormente, as células foram semeadas com 10%, 40% e 50% do volume total do inóculo, respectivamente, em três placas de Petri contendo meio de cultura LB Ágar (triptona 1% (m/v), extrato de levedura 0,5% (m/v), cloreto de sódio 0,5% (m/v), ágar bacteriológico 1,5% (m/v), água destilada qsp 100mL) e em presença do antibiótico ampicilina na concentração final (Cf) de 100 µg/mL. As placas foram incubadas na estufa a 37°C por 16 horas. As colônias obtidas foram transferidas, separadamente, para tubos falcon de 15mL contendo 5 mL de meio LB e o antibiótico ampicilina na Cf de 100 µg/mL. Os tubos foram incubados por 16 horas, com agitação de 200 rpm a 37°C. Posteriormente, foi feita a extração do DNA plasmideal dos possíveis clones recombinantes, utilizando-se o kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche Life Science).

Para confirmar a presença do gene de cadeia leve do anti PD-1, os plasmídeos foram submetidos a reações de clivagens enzimáticas com as endonucleases XhoI e XbaI. Os produtos das clivagens enzimáticas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), como descrito no subitem 4.1.2.

Estoques de bactérias contendo os plasmídeos recombinantes foram preparados e mantidos a -80°C, de acordo com protocolos descritos por Sambrook e

Russell (2001). Seguiu-se também os mesmos passos para transformação com a construção pCI-neo + cadeia pesada anti PD-1.

#### **4.1.6 Sequenciamento**

Os genes de cadeia leve e de cadeia pesada de cinco dos clones obtidos em cada transformação contendo as construções pCI-neo + cadeia leve e pCI-neo + cadeia pesada foram sequenciados pelo método de Sanger et al. (1977), utilizando-se o sequenciador automático 3500xL *Genetic Analyser* (Applied Biosystems/HITACHI). As sequências obtidas foram então ordenadas e uma sequência consenso foi gerada utilizando-se o programa SeqMan (DNASTar™). A sequência obtida foi alinhada com a sequência de gene sintético, fornecida pela *Integrated DNA Technologies*. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se o programa BLAST (Anexo 3 e 4), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

#### **4.1.7 Obtenção de massa das construções selecionadas para os ensaios de transfecção**

Antes dos ensaios de transfecção, foi necessário recorrer a purificação do vetor de expressão + gene cadeia leve e do vetor de expressão + gene de cadeia pesada em maior escala. Para esta etapa, foi utilizado o kit QIAGEN® *Plasmid Maxi* e as instruções do fabricante foram seguidas.

### **4.2 Expressão transiente do anticorpo anti PD-1 em células de mamífero**

#### **4.2.1 Transfecção de células Expi293F**

O sistema Expi293F (Thermo Scientific), estabelecido a partir de uma linhagem de células embrionárias de rim humano, foi escolhido para realizar a expressão transiente do anticorpo anti-PD-1.

A condição inicial de cultivo escolhida foi o crescimento das células em suspensão, utilizando frascos do tipo Erlenmeyer (Corning) de 125mL com fundo chanfrado, em um volume total de 30 mL de cultura por frasco.

No dia anterior ao início do experimento, culturas de células Expi293F em meio *Expi293™ expression medium* (Thermo Fisher Scientific) com densidade de  $2,5 \times 10^6$  células/mL e viabilidade de no mínimo 95% - determinada através de leitura em contador automático Countess II (ThermoFisher Scientific) - foram preparadas e mantidas sob agitação orbital em estufa a 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> e 120 RPM. No dia da transfecção, uma nova contagem celular e determinação de viabilidade foi realizada para precisar o volume de suspensão celular necessário para iniciar o cultivo com  $7,5 \times 10^7$  células viáveis por frasco. O volume de suspensão celular determinado foi então transferido, sob condições assépticas, para frasco Erlenmeyer (*Flask Baffled Bottom W/Vented Closure*, Thermo) de 125 mL, estéril e avolumado para 25,5 mL com meio *Expi293™ expression medium*, sendo mantido nas mesmas condições previamente especificadas, enquanto a preparação de DNA plasmidial para transfecção era formulada.

O preparo do meio reacional de transfecção foi realizado sob condições assépticas e de acordo com as especificações disponíveis no manual de cultivo do fornecedor do sistema de cultivo Expi293F (Thermo Fisher). Para o volume de cultivo inicial designado (30 mL), utilizou-se 30 µg de DNA plasmidial recombinante para o preparo do meio lipossomal para transfecção em cada frasco de cultura. Uma vez que as construções de cadeia leve e cadeia pesada foram preparadas em vetores separados, foram utilizados 15 µg de DNA plasmidial de cada uma das construções para preparo do meio reacional. O volume necessário para obtenção de 15 µg de construção cadeia leve + pCI-neo e 15 µg de cadeia pesada + pCI-neo foi transferido para tubo com capacidade apropriada e diluído com 1,476 mL de Opti-MEM pré-aquecido. Em um segundo tubo, um volume de 81 µL de reagente para formação de vesículas lipossomais Expifectamine 293 (Thermo Fisher) foi diluído e homogeneizado em 1,419 mL de meio Opti-MEM pré-aquecido, com incubação do material por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado o tempo de incubação, a solução de reagente lipossomal foi transferida para o tubo contendo o material genético recombinante alvo de transfecção, sendo o meio homogeneizado e mantido sob incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação para formação das vesículas lipossomais, o material alvo de transfecção contendo as construções genéticas recombinantes foi transferido, sob condições assépticas, para cada frasco erlenmeyer contendo a cultura de células Expi293F. Em paralelo, uma cultura adicional de células Expi293F foi transfectada com meio Expifectamine e vetor pCI-

neo vazio sem insertos heterólogos, para servir como controle negativo nos ensaios posteriores de avaliação da expressão da proteína recombinante de interesse.

A suspensão celular recém-transfectada com o material genético recombinante de cadeia leve e cadeia pesada foi então incubada sob agitação orbital em estufa a 37°C, 8% de CO<sub>2</sub> e 120 RPM por 18 horas. Após este período, uma alíquota de 1,0 mL em cada frasco foi retirada do meio para posterior avaliação da expressão do Anti PD-1 recombinante e também para o cálculo do número de células totais e do percentual de viabilidade. Em seguida, aplicaram-se 150 µL do indutor de expressão *Expifectamine 293 transfection enhancer I* e 1,5 mL do indutor de expressão *Expifectamine 293 transfection enhancer II*, ambos fornecidos no sistema comercial de expressão utilizado (Thermo Fisher). A suspensão celular transfectada foi então mantida sob as mesmas condições de incubação previamente especificadas durante todo o cultivo, sendo feita a coleta de 1,0 mL da cultura em cada dia de cultivo, a fim de se realizar a contagem de células totais, a determinação do percentual de células viáveis e a posterior análise da expressão da proteína de interesse através de ensaios de ELISA, SDS-PAGE e *Western Blotting*. Ao final do período de cultivo (conduzido por um período total de 7 dias), a cultura foi submetida a centrifugação por 10 minutos a 500g. O sobrenadante foi separado e armazenado a – 20°C até a data de realização do experimento de purificação por cromatografia líquida.

#### **4.2.2 Avaliação da expressão do anti PD-1 por ensaio imunoenzimático (ELISA in house)**

Para a detecção da expressão celular do anticorpo anti PD-1 (IgG4 humana), executou-se um ensaio ELISA *in house*. Primeiramente, uma placa de 96 poços de fundo chato (NUNC/Maxisorp) foi sensibilizada com o anticorpo *Anti-human IgG Fc* (Sigma, cat. I2136), diluído 1/500 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. Aplicou-se 100µL da solução anticorpo/tampão em cada poço (aproximadamente 500ng) e incubou-se overnight a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes utilizando-se 200µL de PBS-T por poço, e, em seguida, foram adicionados 300µL de solução de bloqueio (PBS-T + 5% de leite mólico + 0,5% de BSA + 3% SFB) por 2 horas a 37°C. Após a etapa de bloqueio, a placa foi lavada com PBS-T, conforme previamente mencionado. Adicionou-se 100µL das amostras puras e/ou diluídas em PBS pH 7,4 e incubou-se a placa por 2 horas a 37°C. Novamente a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 100µL do anticorpo secundário Anti-human IgA, G, M

peroxidase (Thermo, cat. 31418), na diluição de 1:8000 (em PBS pH 7,4), permanecendo por 1 hora a 37°C. Transcorrido o tempo de incubação, adicionou-se 100µL do revelador (TMB, Thermo), e incubou-se a placa por 10 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. A revelação foi interrompida com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, e prosseguiu-se com a leitura da densidade óptica (DO) em 450nm, utilizando o leitor SUNRISE RCHISTO (TECAN).

Para a quantificação do Anti PD-1 expresso, foi construída uma curva padrão, utilizando-se um anticorpo IgG de origem humana (Sigma, cat. 56834). Para isso, adicionou-se 100µL deste anticorpo padrão, em duplicata, nas seguintes concentrações: 100ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,3ng/mL, 3,1ng/mL, 1,6ng/mL e 0,8ng/mL. Com os valores de DO obtidos para esse anticorpo, fez-se a média das DO e subtraiu-se o valor do branco (PBS puro, pH 7,4). Os valores foram empregados para a construção de um gráfico, onde foram plotadas no eixo X as diferentes concentrações do anticorpo padrão e no eixo Y os valores da DO obtida em cada concentração subtraindo-se o branco. Assim, obteve-se uma equação da reta a partir da curva padrão ( $R^2 =$  aproximadamente 1), que forneceu os valores de concentração para o anticorpo Anti-PD-1.

#### **4.2.3 Avaliação da expressão do anti-PD-1 por SDS-PAGE**

Com o objetivo de avaliar a expressão do anti-PD-1 ao longo dos 7 dias de cultivo, realizou-se um ensaio de SDS-PAGE (4/12%), sob condição redutora, e um ensaio de SDS-PAGE (4/10%), sob condição não redutora. Para isso, utilizou-se 15µL dos sobrenadantes de cultivo celular em tampão de amostra redutor (tris-HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 100 mM), ou não redutor (tris-HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v)), para um volume final de 20µL. Em seguida, as amostras em tampão redutor foram fervidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras em tampão redutor e não redutor foram carregadas em gel de poliacrilamida e a corrida foi realizada a 110V por 1 hora e 20 minutos. Após esse período, o gel de poliacrilamida foi retirado com cuidado e lavado com água, para retirar o excesso do tampão de carregamento. Então, adicionou-se aproximadamente 50mL de solução para fixação das bandas (50% metanol, 10% ácido acético, água quantidade suficiente para 50mL), permanecendo sob agitação de 25 rpm por 30 minutos e a temperatura ambiente. Em

seguida, a solução foi descartada e o gel foi lavado por 3 vezes com água morna. Por fim, o gel foi corado com a adição de aproximadamente 25mL de *Gel Code™ Blue Stain Reagent* (Thermo), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.2.4 Western Blotting

Além do ensaio de SDS-PAGE, realizou-se também um ensaio de Western Blotting para avaliar a expressão. Para isso, executou-se uma nova corrida em gel de poliacrilamida, nas condições definidas no item anterior. Logo em seguida, preparou-se o sistema *Mini-Trans-Blot® Eletrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad), de acordo com o manual do fabricante, e o procedimento ocorreu a 90V por 60 minutos. Assim que a transferência foi concluída, as membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) foram coradas com o corante *Ponceau S* (Ponceau S 0,1% (m/v), ácido acético glacial 5% (v/v)) e descoradas com água purificada (PW) até que as bandas das proteínas se tornassem visíveis, confirmando a transferência. Após as bandas serem coradas, as membranas foram lavadas com 20mL de PBS-T (T-0,05%) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS-T + 5% leite mólico), overnight a 4°C. No dia seguinte, descartou-se a solução de bloqueio e lavou-se as membranas com PBS-T por 5 minutos, sob agitação de 20rpm. Após está etapa, adicionou-se 10 mL do anticorpo secundário *AP- Goat Anti-human IgG* (H+L) 1:1000 (Invitrogen, cat. 627122) em cada membrana e prosseguiu-se com incubação de 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação de 20rpm. Após esse período, a solução foi descartada e as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 5 minutos sob agitação de 20rpm em temperatura ambiente. Para a revelação do ensaio, adicionou-se 10 mL do reagente de revelação do kit *AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad, cat.170-6432) a cada uma das membranas, e prosseguiu-se com a incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante. O Nivolumabe foi utilizado como controle positivo e o sobrenadante de expressão no 7º dia de células transfectadas com o vetor pCi-neo vazio foi utilizado como controle negativo.

#### 4.2.5 Transfecção das células Expi293F em um volume maior

Um novo ensaio de transfecção, com as construções pCi-neo+cadeia leve e pCi-neo+cadeia pesada, foi realizado para aumento do volume de células transfectadas, seguindo-se a metodologia descrita no item 4.2.1. As células

transfectadas foram mantidas por 5 dias em cultura, em um volume final de 145mL. Após este período, o sobrenadante das células foi recolhido e purificado.

#### **4.3 Purificação do anticorpo por cromatografia de afinidade**

O anticorpo anti-PD-1 foi purificado por cromatografia de afinidade à proteína A, utilizando-se o sistema *Hitrap™ MabSelect Sure™ de 5ml* (GE Healthcare). A coluna pré-empacotada, com volume de 5,0 mL, foi inicialmente equilibrada sob fluxo constante de 1,0 mL/min com 35 mL de tampão fosfato 20 mM + NaCl 0,15M pH 7,0, utilizando-se o equipamento AKTA Pure (GE Healthcare). A lavagem do sistema foi feita com 10 volumes de coluna e a eluição da amostra foi realizada com o tampão citrato de sódio 0,1M pH 3,6. Após a purificação, realizou-se um ensaio de *desalting* para troca do tampão citrato de sódio 0,1M pH 3,6 por tampão PBS 1X. Para isso, utilizou-se um sistema *Hitrap Desalting de 5mL* (GE Healthcare). Duas colunas foram conectadas entre si para gerar um volume útil de 3mL, aumentando a capacidade de dessalinização da coluna. Em seguida, as colunas foram equilibradas com o tampão PBS, e injetou-se no sistema volumes de 2mL do anticorpo purificado. Por fim, as frações recolhidas correspondentes a cada pico foram reunidas no mesmo tubo Falcon e passaram por um ensaio de ultracentrifugação com *Amicon® Ultra 15 mL centrifugal filter 30K* (Merck) para que a amostra fosse concentrada.

#### **4.4 Elisa *in house* para quantificação do anticorpo anti PD-1 purificado**

Da mesma forma que havia sido feito com o sobrenadante das transfecções. Após o ensaio de ultracentrifugação, amostras recolhidas da etapa de purificação e concentração, passaram por um ensaio de Elisa *in house*, como descrito no item 4.2.2, para estimar a massa final de anticorpo recuperada, e o percentual de perdas ao longo do processo. A curva padrão desse ensaio, foi construída nas seguintes concentrações: 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,3ng/mL, 3,1ng/mL, 1,6ng/mL, 0,8ng/mL e 0,4ng/mL.

#### **4.5 Determinação do grau de homogeneidade**

Utilizou-se densitometria óptica para estimar-se o grau de homogeneidade do anticorpo anti-PD-1 purificado por cromatografia de afinidade à proteína A. O material

purificado passou primeiramente por um novo ensaio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, como descrito no item 4.2.3. Neste ensaio, as amostras de anti-PD-1 foram aplicadas no gel de poliacrilamida em concentrações crescentes a partir de 10µg até 35µg. Posteriormente, para realizar-se a avaliação da representatividade de impurezas em cada banda, o gel foi fotografado na plataforma de densitometria *GS-800 Calibrated Densitomer* (Bio-Rad) e analisado utilizando-se o software *Quantite One® 1-D analysis software* (Bio-Rad), de acordo com o manual do fabricante.

#### **4.6 Caracterização físico-química**

A caracterização físico-química dos anticorpos anti-PD-1 foi realizada em parceria com o laboratório de Macromoléculas (LAMAM) de Biomanguinhos.

##### **4.6.1 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para análise comparativa do perfil de migração eletroforética entre os anticorpos anti-PD1 e Nivolumabe, realizou-se um ensaio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, seguindo-se os mesmos passos descritos no item 4.2.3. Neste ensaio, preparou-se amostras com aproximadamente 10µg de cada anticorpo.

##### **4.6.2 Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)**

Cerca de 100µL das amostras de Nivolumabe 0,5mg/mL e Anti PD-1 0,5mg/mL foram injetadas em coluna Superdex 200 GL 10 x 300mm – 24mL (GE Healthcare), as quais foram operadas a 25°C e estavam conectadas em um sistema Akta Pure. A coluna foi previamente equilibrada com PBS 1X pH7,0. A eluição cromatográfica foi realizada com fluxo de 0,5 mL/min, por cerca de 1,2 volumes de coluna (~58 min) e com monitoramento da absorvância a 280nm e 220nm.

##### **4.6.3 Focalização isoeétrica**

As amostras dos anticorpos anti-PD1 e Nivolumabe, concentração de 0,5 mg/mL, foram diluídas 2 x em água para diminuir a concentração salina. O ponto

isoelétrico (pI) foi estimado por focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE), conforme recomendação de Phamacia Biotech (1990). O IEF-PAGE foi realizado em gel PhastGel® (GE Healthcare) com gradiente de pH 3 a 9. Para as estimativas de pI, foi utilizado padrão de pI High (GE Healthcare) na faixa de pH 5,0 a 10,5, cujas proteínas são  $\beta$ -lactoglobulina A (5,20), anidrase carbônica B bovina (5,85), anidrase carbônica B humana (6,55), mioglobina ácida de cavalo (6,85), mioglobina básica de cavalo (7,35), lectina ácida de lentilha (8,15), lectina intermediária de lentilha (8,45), lectina básica de lentilha (8,65), tripsinogênio (9,30) e citocromo C (10,25). A amostra foi aplicada no gel, com o pente de aplicação de 4  $\mu$ L para 6 amostras. A corrida eletroforética foi realizada no PhastSystem® com corrente constante de 2.5mA, voltagem de 2.000 V e duração de 30 minutos. Após a corrida, o gel foi incubado em uma solução de TCA 0,1% durante 1 hora. Em seguida, o gel foi corado com uma solução de metanol 30% e ácido acético 10% acrescida de 5 gotas da solução aquosa do corante de Coomassie Brilliant Blue R350 0,1% (PhastGel Blue R, GE Healthcare) durante 18 horas. Após a coloração, o gel foi digitalizado no aparelho Gel DOC XR+™ (Bio-Rad). Os anticorpos foram analisados em duplicata e comparados com as 7 bandas dos padrões proteicos de ponto isoelétrico (pI) conhecidos.

#### **4.6.4 Espectroscopia de fluorescência (fluorimetria)**

Para monitorar as mudanças nos espectros de emissão de fluorescência de triptofano, os experimentos foram realizados utilizando-se um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Jasco Corp., Tóquio, Japão). Para a obtenção dos espectros de fluorescência utilizou-se o comprimento de onda de 280 nm para a excitação e a emissão foi varrida de 295nm a 415nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, a temperatura ambiente, com um volume de 200  $\mu$ L dos anticorpos anti-PD-1 e Nivolumabe, os quais encontravam-se na concentração de 0,5mg/mL.

#### **4.6.5 Dicroísmo circular no UV-distante (DC)**

As medidas de DC para os anticorpos anti-PD-1 e Nivolumabe foram realizadas em um espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Corp., Tóquio, Japão), coletando espectros de 190nm a 260nm, com o uso de uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Foram feitas três medidas consecutivas e o espectro final foi o

resultado da acumulação destas três medidas, obtidas na velocidade de 50nm/min, com subtração adequada dos espectros dos respectivos brancos acumulados da mesma forma. O experimento foi realizado em temperatura ambiente, com um volume de 400  $\mu\text{L}$  e na concentração final de 0,5 mg/mL. As medidas foram realizadas em triplicata.

#### **4.7 Avaliação da ligação do anticorpo anti PD-1 ao receptor alvo imobilizado em superfícies sólidas**

##### **4.7.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Para avaliar se o anticorpo anti PD-1 obtido se liga ao receptor PD-1 (Abcam, cat. ab174035), foi realizado um ELISA *in house*. Primeiramente, uma placa de 96 poços de fundo chato (NUNC/Maxisorp) foi sensibilizada com receptor PD-1 diluído 1/900 (2,5 $\mu\text{L}$  da solução do receptor que estava na concentração 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) em 2.247,5 $\mu\text{L}$  de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6. Aplicou-se 100 $\mu\text{L}$  da solução contendo o receptor PD-1/tampão em cada poço (aproximadamente 100ng) e incubou-se a placa overnight a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes utilizando 200 $\mu\text{L}$  de PBS-T (T-0,05%) por poço, e, em seguida, foram adicionados 300 $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (PBS-T + 5% de leite mólico + 0,5% de BSA + 3% SFB) e incubado por 2 horas a 37°C. Após a etapa de bloqueio, a placa foi lavada com PBS-T, conforme previamente mencionado. Adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  das alíquotas do anticorpo anti PD-1, Nivolumabe e IgG4 inespecífica, (0,5ng/100 $\mu\text{L}$ = 0,005ng/ $\mu\text{L}$ ), diluídos em PBS pH 7,4 e incubou-se a placa por 2 horas a 37°C. Novamente, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário *Anti-human IgA, G, M peroxidase* (Thermo, cat. 31418), na diluição de 1:5000 (em PBS pH 7,4), sendo incubado por 1 hora a 37°C. Transcorrido o tempo de incubação, lavou-se novamente como já mencionado e adicionou-se 100 $\mu\text{L}$  do revelador (TMB, Thermo), e incubou-se a placa por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo a reação interrompida adicionando-se 50 $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura ocorreu de acordo com o descrito no item 4.2.2. O anticorpo de referência Nivolumabe (Bristol-Myers Squibb) foi utilizado como controle positivo, enquanto que o anticorpo IgG4 de plasma humano (Sigma, cat.56834) foi utilizado como controle negativo.

#### 4.7.2 Análise estatística

As análises foram conduzidas com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5. Os dados foram reportados como média  $\pm$  erro-padrão da média. Os níveis de significância entre os valores de DO do anti PD-1 e do Nivolumabe foram avaliados a partir do teste t de Student bi-caudal. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

#### 4.7.3 Western blotting

Para avaliar se o anticorpo anti PD-1 apresentava capacidade de reconhecer o receptor PD-1 linearizado, realizou-se um ensaio de *Western Blotting*, como descrito no item 4.2.4. Entretanto, neste ensaio, preparou-se 3 amostras com aproximadamente 2 $\mu$ g do receptor PD-1 comercial (Abcam) em tampão de amostra redutor, que foram fervidas e carregadas para corrida em gel SDS-PAGE (4/12%). Assim que a transferência foi concluída e as bandas presentes na membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foram coradas, cortou-se as raias em tiras e colocou-se em placas de 8 canaletas. Em seguida, lavou-se com 2mL de PBS-T e bloqueou-se com tampão de bloqueio, overnight a 4°C.

No dia seguinte, descartou-se a solução de bloqueio e lavou-se as tiras com PBS-T por 5 minutos, sob agitação de 20rpm. Em seguida, descartou-se a solução de lavagem e adicionou-se 1 mL do anticorpo anti PD-1 (20 $\mu$ g/mL), 1 mL do anticorpo Nivolumabe (20 $\mu$ g/mL) e 1 mL do anticorpo IgG4 (20 $\mu$ g/mL), em tiras diferentes, sendo incubados por 3 horas sob agitação de 20 rpm a temperatura ambiente. Após esse período, as tiras foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 5 minutos sob agitação de 20rpm, em seguida essa solução foi descartada. Após esta etapa, aplicou-se 1 mL do anticorpo secundário *Anti human IgG ( $\gamma$ - chain specific) Alkaline phosphatase* 1:30000 (Sigma, A-3187) e prosseguiu-se com incubação de 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação de 20rpm. Posteriormente, a solução foi descartada e as tiras lavadas conforme mencionado para o anticorpo primário. Para a revelação do ensaio, adicionou-se 1 mL do reagente de revelação do kit *AP Conjugate Substrate* (Bio-Rad, cat.170-6432) a cada uma das tiras, e prosseguiu-se com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, de acordo com o protocolo do fabricante. O Nivolumabe foi utilizado como controle positivo e a IgG4 de plasma humano (Sigma, cat. 56834) foi utilizada como controle negativo.

## **4.8 Análise da ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1 recombinante expresso na superfície de células Expi293F**

Para avaliar a capacidade de ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor alvo ancorado na membrana celular, optou-se por realizar a expressão transiente do PD-1 em sistema Expi293F. Como a eficiência de transfecção não é 100%, foi necessário desenvolver uma abordagem para diferenciar as células transfectadas das não transfectadas e, com isso, identificar a expressão do PD-1. Desta forma, o receptor em questão foi expresso fusionado à proteína fluorescente verde (GFP).

### **4.8.1 Clonagem do gene PD1-GFP em vetor de expressão**

A sequência completa do gene *PD-1* humano (Q15116, UniProt) foi fusionada à sequência do gene *reporter* GFP (C5MKY7, UniProt). A sequência resultante *PD1-GFP* foi sintetizada pela empresa IDT e enviada no vetor pUC-IDT. O gene *PD1-GFP* foi então transferido do vetor pUC-IDT para o vetor de expressão pCi-neo, utilizando-se as endonucleases de restrição XhoI e EcoRI. As metodologias empregadas nesta etapa foram as mesmas já descritas para a clonagem dos genes de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo anti-PD-1 (item 4.1).

### **4.8.2 Transfecção de células Expi293F com a construção pCi-neo+PD-1-GFP**

Células Expi293F foram transfectadas com a construção pCi-neo+PD1-GFP, seguindo-se a metodologia descrita no item 4.2.1. As células transfectadas foram mantidas por 3 dias em cultura para permitir a expressão do receptor PD-1 na superfície celular. Após este período, as células foram colhidas e utilizadas no teste de ligação.

### **4.8.3 Análise da ligação Anti PD-1/PD-1 por citometria de fluxo**

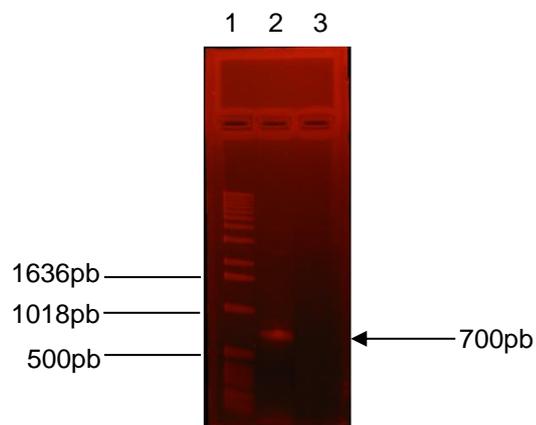
Primeiramente, realizaram-se ensaios de citometria com as células transfectadas e após 3 dias incubadas com o anti PD-1, a partir de uma curva de gradiente de concentração crescente de 0,1µg/mL até 10µg/mL (resultados não mostrados) e de 10µg/mL até 100µg/mL. Desta forma, a concentração de 10µg/mL foi

a escolhida para a realização do ensaio onde comparou-se o anticorpo anti PD-1, o Nivolumabe e a IgG4 não específica.

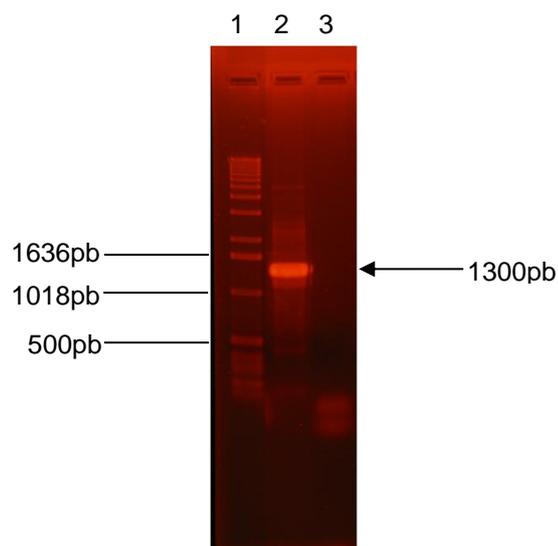
Para esses ensaios, as densidades das células transfectadas com pCi-neo+PD1-GFP foram ajustadas para conter  $1 \times 10^6$  células por tubo. Em seguida, as células foram incubadas com 50 $\mu$ L do anti PD1 (10 $\mu$ g/mL) ou 50 $\mu$ L do Nivolumabe (10 $\mu$ g/mL) ou ainda com 50 $\mu$ L de uma IgG4 humana não específica (10 $\mu$ g/mL), em temperatura ambiente por 30 minutos, sendo lavadas posteriormente com 1mL de PBS + 10% SFB e centrifugadas por 5min a 400g. Então, foi adicionado em cada tubo 50 $\mu$ L do anticorpo secundário *anti-human IgG ( $\gamma$ -chain specific) R-Phycoerythrin* (Sigma, P9170) diluído 1/50 em PBS + 10% SFB, sendo incubado por 30 minutos ao abrigo da luz e lavado em seguida. Por fim, foi adicionado 150 $\mu$ L de PBS + 1% de paraformaldeído, sendo homogeneizado suavemente com a pipeta e realizada a adição de mais 150 $\mu$ L de PBS para a aquisição e análise em citometro de fluxo BD LSRFortessa (Plataforma de citometria de fluxo do Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos).

## 5. RESULTADOS

Primeiramente, com o objetivo de incluir os sítios de restrição necessários para a clonagem em pCI-neo, os genes do anticorpo anti PD-1 foram amplificados por PCR (Figura 5.1 e Figura 5.2). Foram observadas bandas de aproximadamente 700pb e 1300pb, as quais correspondem aos tamanhos esperados para as cadeias leve e pesada do anti-PD-1, respectivamente.



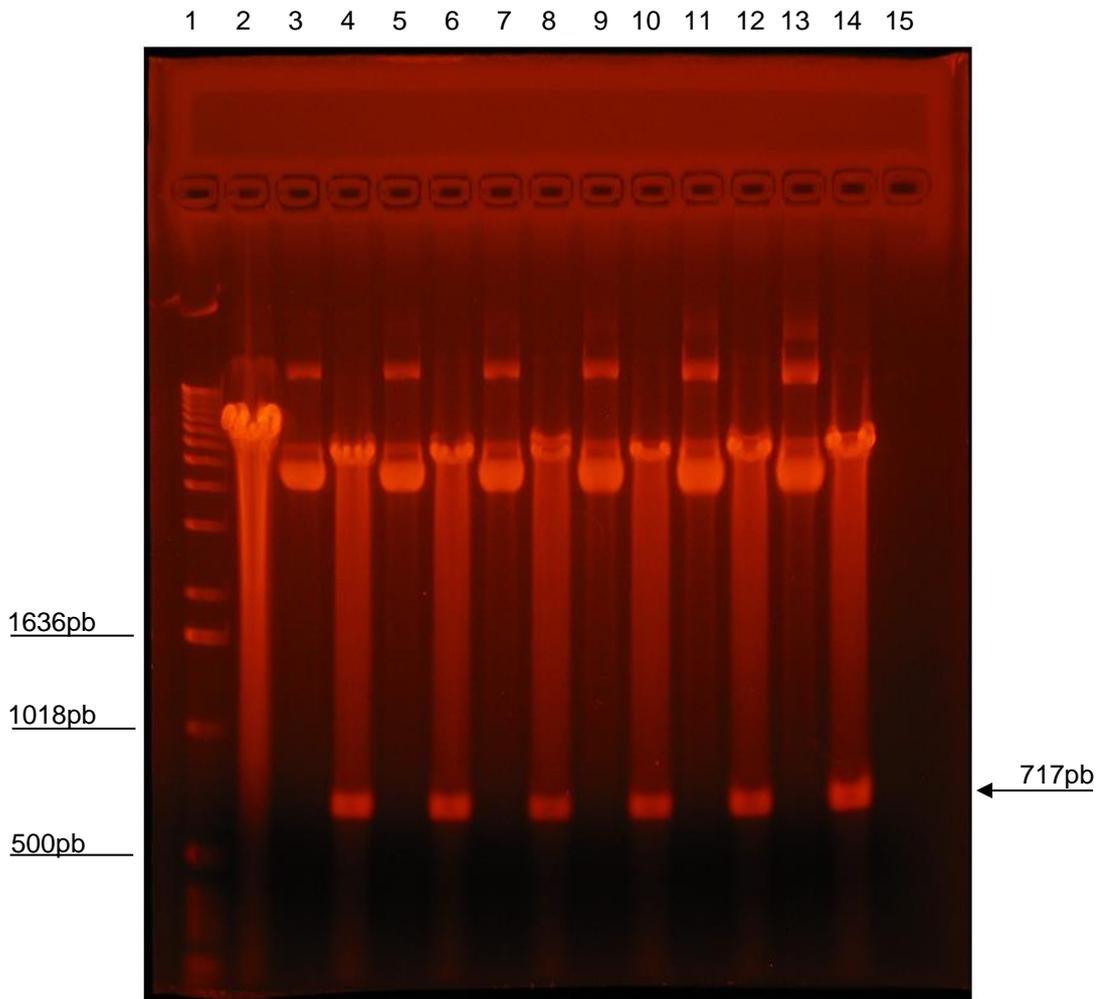
**Figura 5.1: PCR do gene de cadeia leve. Linha 1 – Padrão 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); Linha 2- produto de PCR do gene de cadeia leve do anti PD-1; Linha 3- controle negativo do mix. Fonte: Foto do projeto.**



**Figura 5.2: PCR do gene de cadeia pesada. Linha 1 – Padrão 1kb DNA Ladder™; Linha 2- produto de PCR do gene de cadeia pesada do anti PD-1; Linha 3- controle negativo do mix. Fonte: Foto do projeto.**

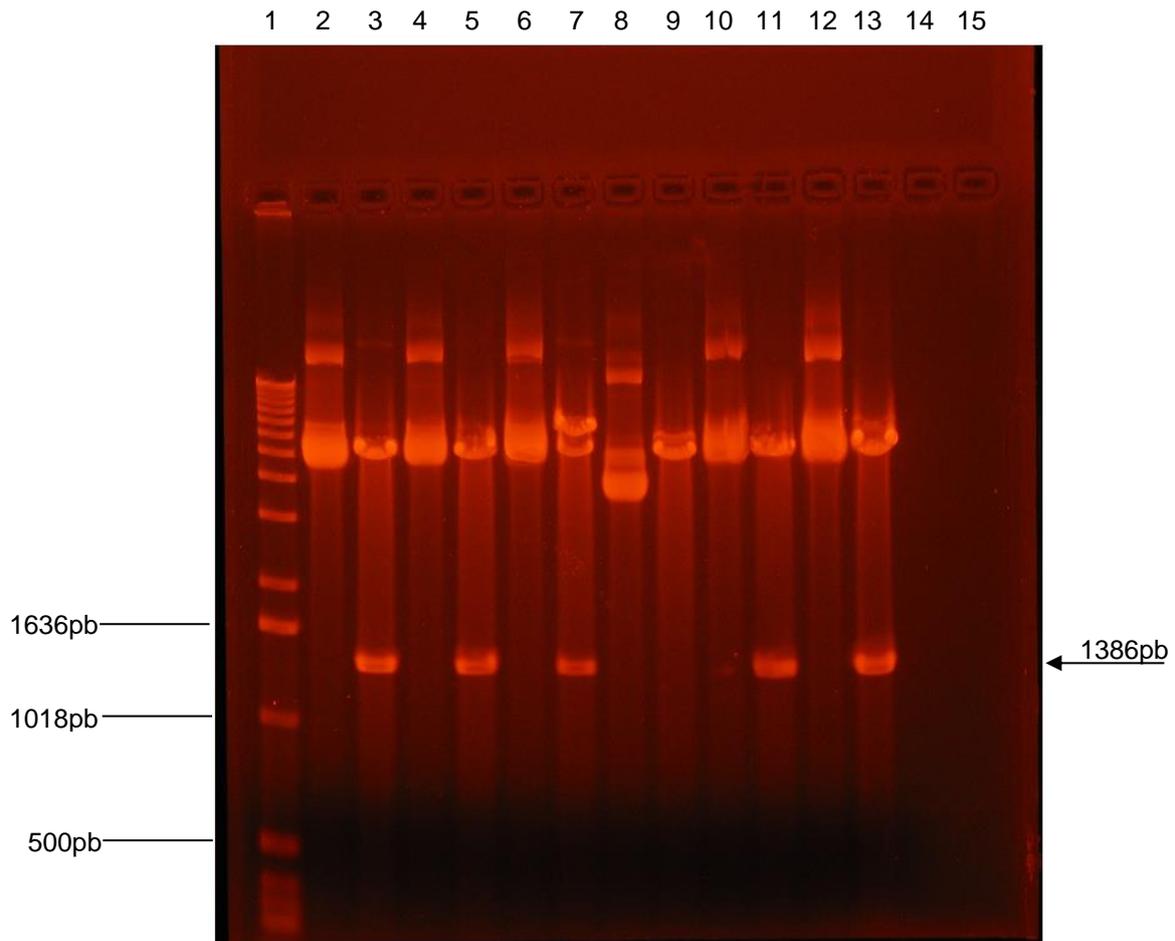
Para confirmar a clonagem dos genes de interesse no vetor pCI-neo, os plasmídios dos possíveis clones recombinantes foram extraídos e submetidos a clivagens enzimáticas com as endonucleases de restrição XhoI e XbaI.

Conforme esperado, foram observados fragmentos de aproximadamente 700pb para a cadeia leve em todos os 6 clones selecionados (Figura 5.3).



**Figura 5.3:** Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos da clivagem enzimática das construções pCI-neo vazio e pCI-neo + cadeia leve com as endonucleases de restrição XhoI e XbaI. Linha 1 – Padrão 1kb DNA Ladder™; Linha 2- Digestão do vetor pCI-neo (teste de corte da enzima XbaI); Linha 3- clone 1 não digerido; Linha 4- clone 1 digerido; Linha 5- clone 2 não digerido; Linha 6- clone 2 digerido; Linha 7- clone 3 não digerido; Linha 8- clone 3 digerido; Linha 9- clone 4 não digerido; Linha 10- clone 4 digerido; Linha 11- clone 5 não digerido; Linha 12- clone 5 digerido; Linha 13- clone 6 não digerido; Linha 14- clone 6 digerido; Linha 15- vazio. Fonte: Foto do projeto.

Para a cadeia pesada, foram observados fragmentos de aproximadamente 1300pb em 5 dos 6 clones selecionados (Figura 5.4). Estes resultados confirmam a clonagem destes genes no vetor de expressão pCI-neo.



**Figura 5.4:** Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos da clivagem enzimática das construções pCI-neo + cadeia pesada com as endonucleases de restrição XhoI e XbaI. Linha 1 – Padrão 1kb DNA Ladder™; Linha 2- clone 1 não digerido; Linha 3- clone 1 digerido; Linha 4- clone 2 não digerido; Linha 5- clone 2 digerido; Linha 6- clone 3 não digerido; Linha 7- clone 3 digerido; Linha 8- clone 4 não digerido (aparentemente recircularizado); Linha 9- clone 4 digerido sem gene de cadeia pesada; Linha 10- clone 5 não digerido; Linha 11- clone 5 digerido; Linha 12- clone 6 não digerido; Linha 13- clone 6 digerido; Linha 14 e 15- vazias. Fonte: Foto do projeto.

A partir do alinhamento no software BLAST®, visualizou-se que as sequências clonadas estavam de acordo com as sequências dos genes sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies*. Desta forma, os clones 4 (cadeia leve, Anexo 1) e 1 (cadeia pesada, Anexo 2) foram selecionados para o ensaio de transfecção.

Células Expi293F foram co-transfectadas com as construções pCI-neo+cadeia leve e pCI-neo+cadeia pesada, na razão 1:1. A viabilidade das células foi acompanhada durante todo o experimento, conforme mostrado (Figura 5.5, linha vermelha). A partir das alíquotas de sobrenadante coletadas ao longo dos 7 dias de cultivo, foi realizado um ensaio de ELISA *in house* (Figura 5.5, linha azul) para quantificar o anticorpo expresso. Os níveis de expressão do anticorpo anti PD-1 aumentaram durante o cultivo, chegando até a concentração média de aproximadamente 140µg/mL por volta do 5º dia pós-transfecção.

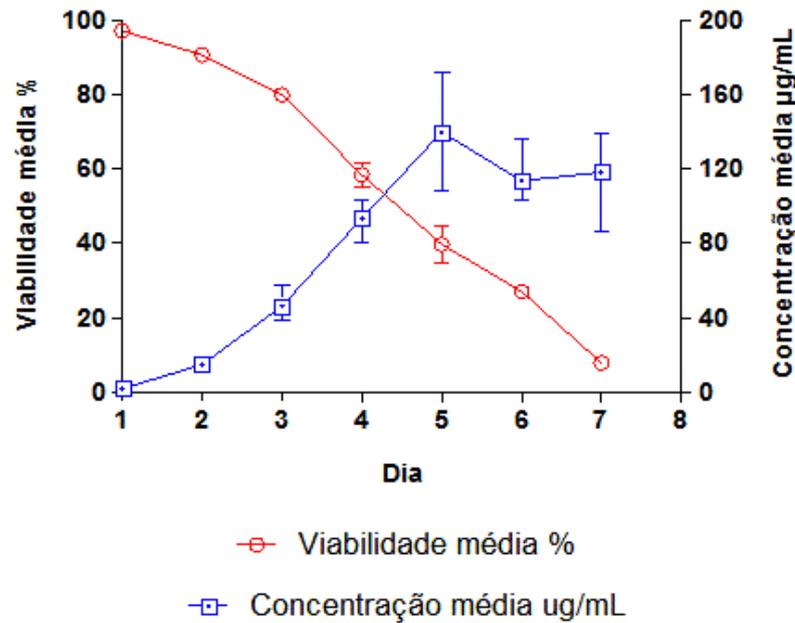


Figura 5.5: Viabilidade da cultura de células HEK293F x níveis de expressão do anticorpo anti PD-1 ao longo do experimento de transfecção. No eixo vertical a esquerda, encontram-se os valores percentuais encontrados em relação a contagem do número total de células (vivas x mortas), no eixo vertical a direita estão os níveis de expressão do anticorpo e no eixo horizontal, os dias em que as amostras foram coletadas. Linha vermelha, viabilidade das células HEK293F. Linha azul, níveis de expressão do anti PD-1, (n=4). Fonte: Dados do projeto.

Além do ensaio de ELISA *in house*, foram realizados ensaios de SDS-PAGE e *Western Blotting* sob condições redutoras (Figura 5.6 A e Figura 5.7 A) e não redutoras (Figura 5.6 B e Figura 5.7 B) para avaliar o perfil de expressão.

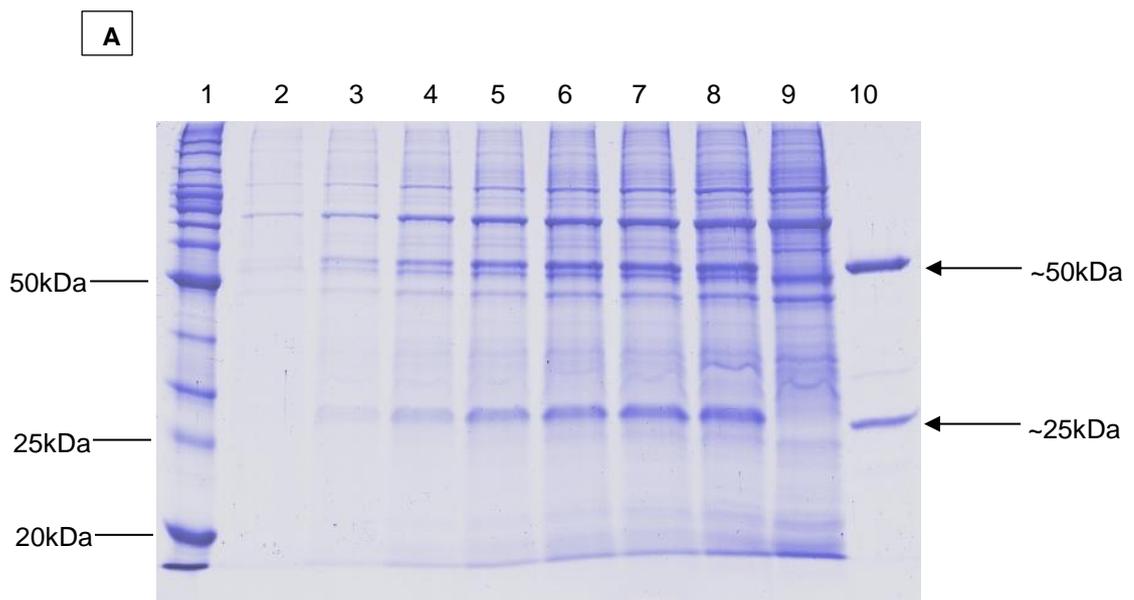
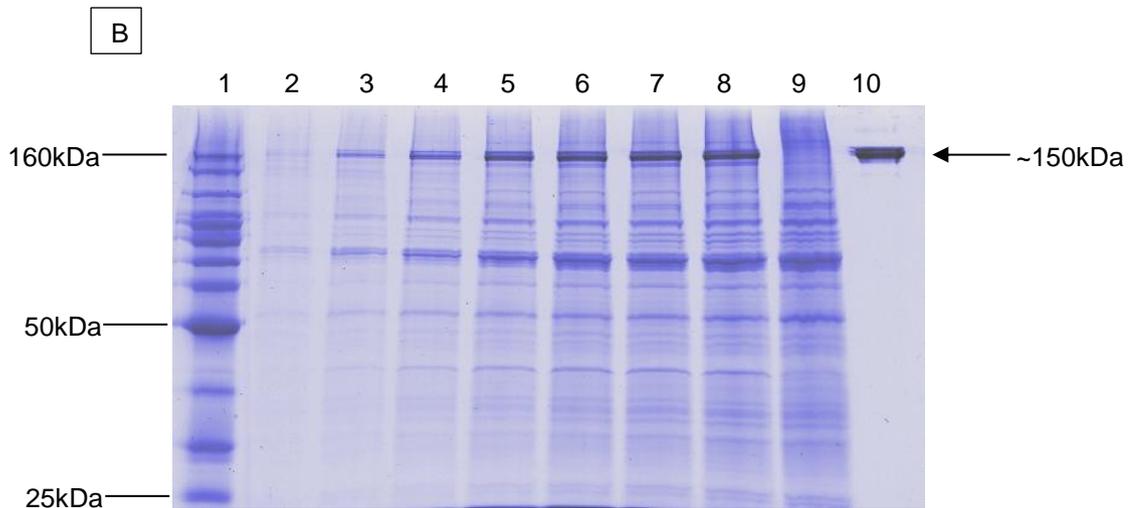


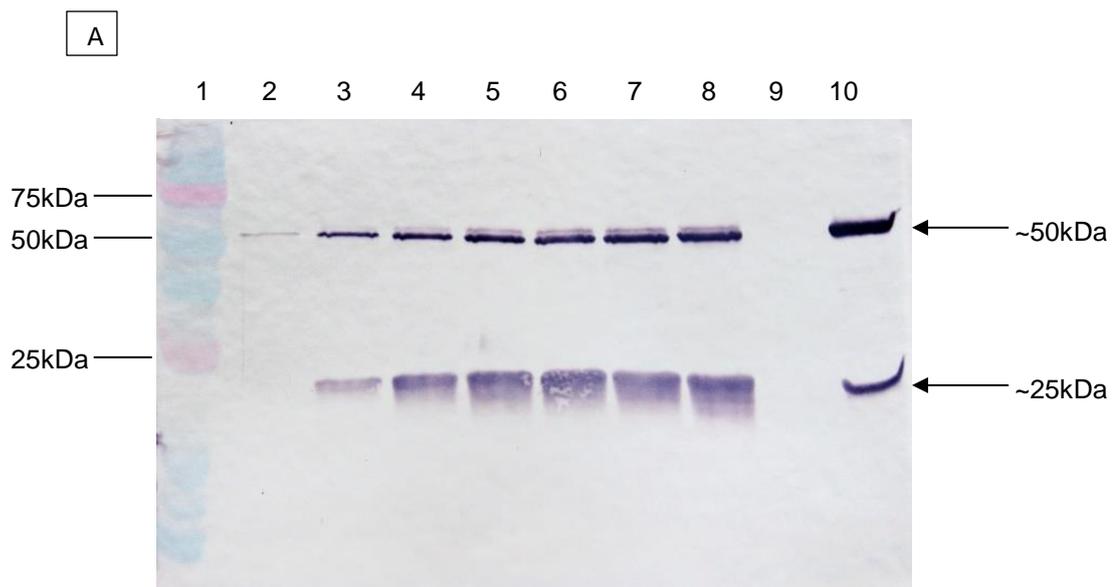
Figura 5.6 (A): Continua.



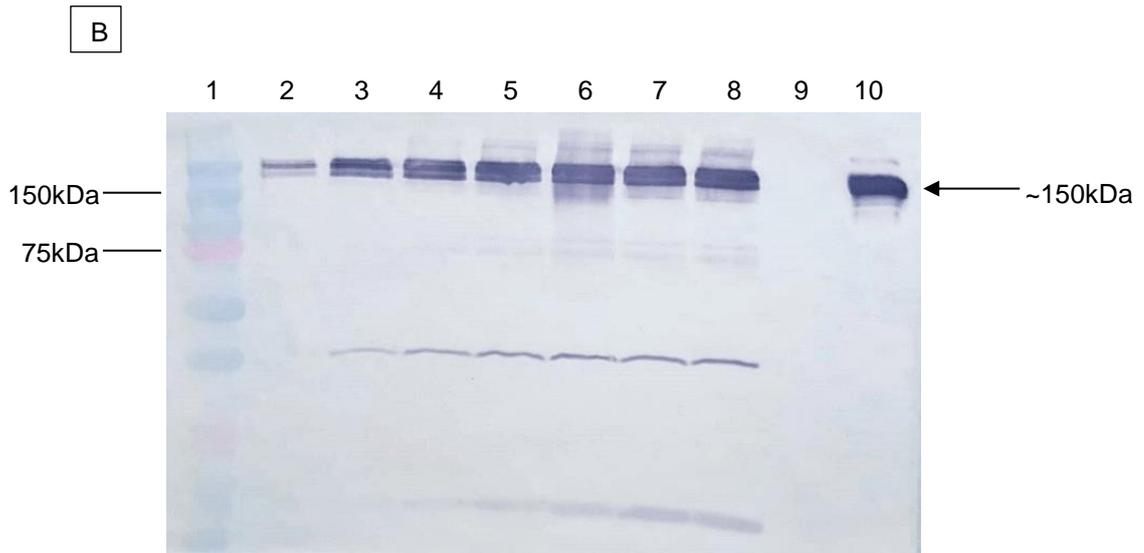
**Figura 5.6:** (A) Conclusão - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, dos sobrenadantes de células Expi293F. Linha 1- Marcador *Bench Mark™ Protein Ladder*; Linha 2- Anti PD-1 (dia 1) após transfecção; Linha 3- Anti PD-1 (dia 2); Linha 4- Anti PD-1 (dia 3); Linha 5- Anti PD-1 (dia 4); Linha 6- Anti PD-1 (dia 5); Linha 7- Anti PD-1 (dia 6); Linha 8- Anti PD-1 (dia 7); Linha 9- Vetor pCI-neo vazio (dia 7); Linha 10- Anticorpo Nivolumabe (1 $\mu$ g) controle positivo. Fonte: Fotos do projeto.

Quando condições redutoras foram empregadas, foi possível visualizar bandas de aproximadamente 25kDa e 50kDa, as quais correspondem às cadeias leve e pesada do anticorpo anti PD-1, respectivamente.

Sob condições não redutoras, verificou-se a presença de uma banda única, com massa molecular de aproximadamente 150kDa, correspondente a massa esperada para uma imunoglobulina IgG4.

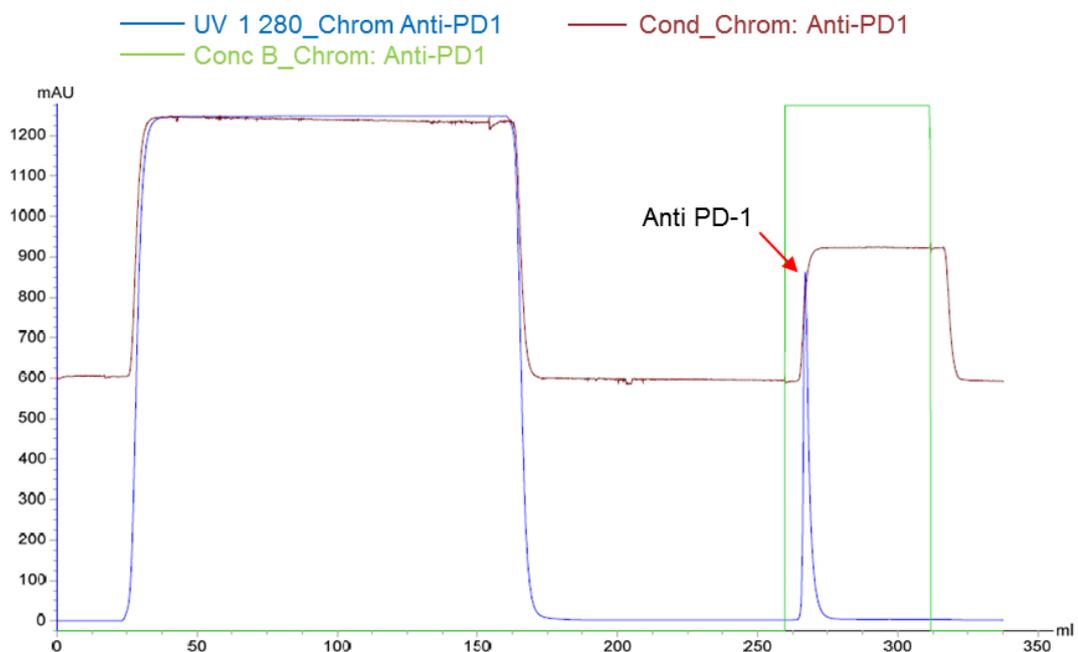


**Figura 5.7 (A):** Continuação.



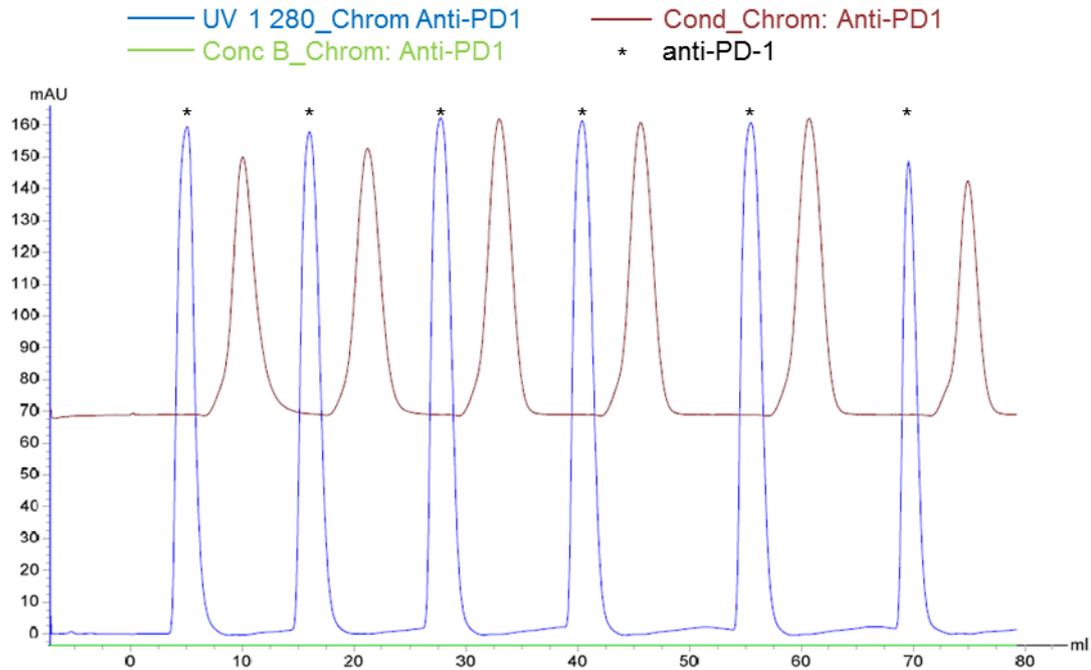
**Figura 5.7:** (A) Western Blotting após ensaio de eletroforeses desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, dos sobrenadantes de células Expi293F. Linha 1- Padrão *Precision Plus Protein™ Standards Dual color*; Linha 2- Anti PD-1 (dia 1) após transfecção; Linha 3- Anti PD-1 (dia 2); Linha 4- Anti PD-1 (dia 3); Linha 5- Anti PD-1 (dia 4); Linha 6- Anti PD-1 (dia 5); Linha 7- Anti PD-1 (dia 6); Linha 8- Anti PD-1 (dia 7); Linha 9- Vetor pCI-neo vazio (dia 7); Linha 10- Anticorpo Nivolumabe (1 $\mu$ g) controle positivo. Fonte: Fotos do projeto.

A partir de um novo ensaio de transfecção com um volume maior de cultura, 145mL, mantido até o 5<sup>o</sup> dia, o anticorpo anti PD-1 expresso foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade, utilizando-se proteína A (Figura 5.8).



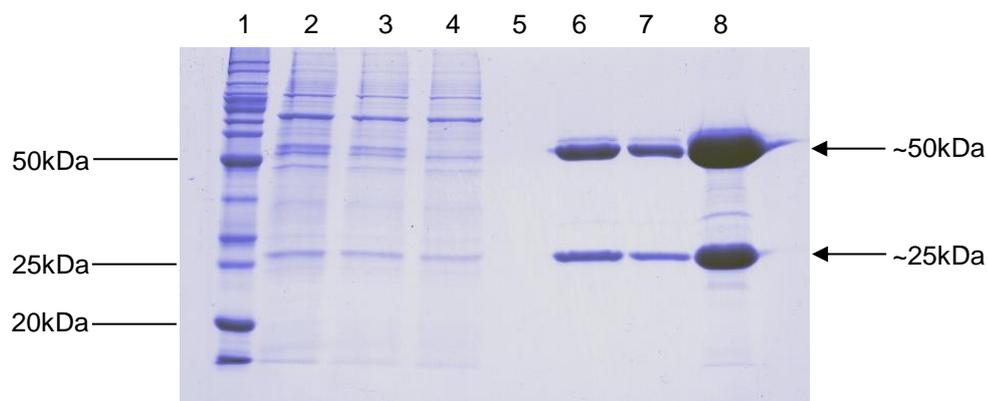
**Figura 5.8:** Cromatograma da purificação do anticorpo Anti-PD-1 através da ligação a proteína A. No eixo vertical, estão representados os valores de absorvância em mAU ( $\lambda = 280\text{nm}$ ). No eixo horizontal, estão representados os volumes em mililitros do tampão aplicado no sistema. O pico em azul indica a fração eluída com tampão Citrato de sódio 0,1M (pH 3,6). Fonte: Arquivo do projeto.

Em seguida, realizou-se a troca do tampão de eluição por PBS (Figura 5.9).



**Figura 5.9:** Cromatograma do ensaio de desalting para a troca de tampão. No eixo vertical, estão representados os valores de absorvância em mAU ( $\lambda = 280\text{nm}$ ). No eixo horizontal, estão representados os volumes em mililitros do tampão aplicado no sistema. Os picos em azul indicam as frações eluídas em tampão PBS (pH 7,4). Fonte: Arquivo do projeto.

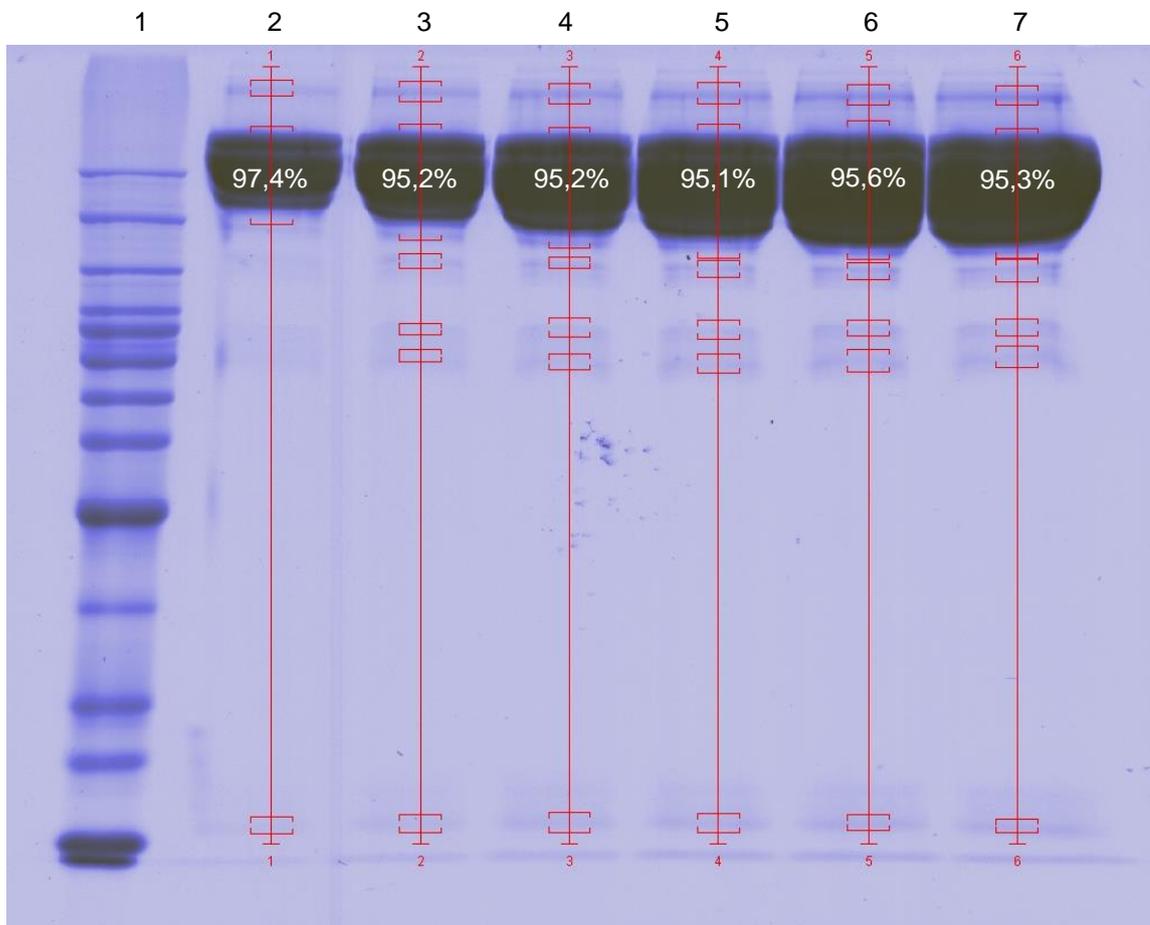
Durante os ensaios, observaram-se picos com bases bem definidas, sugerindo uma provável homogeneidade da amostra. Além disso, em cada etapa realizada durante a purificação, troca de tampão e concentração, foram coletadas amostras, as quais foram analisadas por SDS-PAGE, sob condição redutora (Figura 5.10).



**Figura 5.10:** Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora, das amostras coletadas durante a purificação do anticorpo anti-PD-1 por cromatografia de afinidade à proteína A. Linha 1- Marcador *Bench Mark™ Protein Ladder*; Linha 2- Sobrenadante de células Expi293F; Linha 3- Sobrenadante equilibrado com o tampão de lavagem; Linha 4- Fração não ligada que passou através da coluna; Linha 5- Amostra de lavagem da coluna; Linha 6- Fração de eluição do Anti PD-1; Linha 7- Fração eluída após desalting; Linha 8- Anticorpo Anti PD-1 após ultrafiltração. Fonte: Foto do projeto.

A análise do gel permitiu visualizar que a maior parte dos contaminantes haviam sido removidos. Ao quantificar a massa de anticorpo recuperada em cada etapa, a partir de um ensaio de ELISA *in house*, a recuperação final estimada para o anticorpo purificado foi de aproximadamente 50mg por litro de cultura transfectada. Com isso, estima-se que as perdas acumuladas ao longo dessas etapas foram de aproximadamente 30%, ao compararmos com a concentração inicial presente no sobrenadante das células transfectadas e cultivadas por 5 dias.

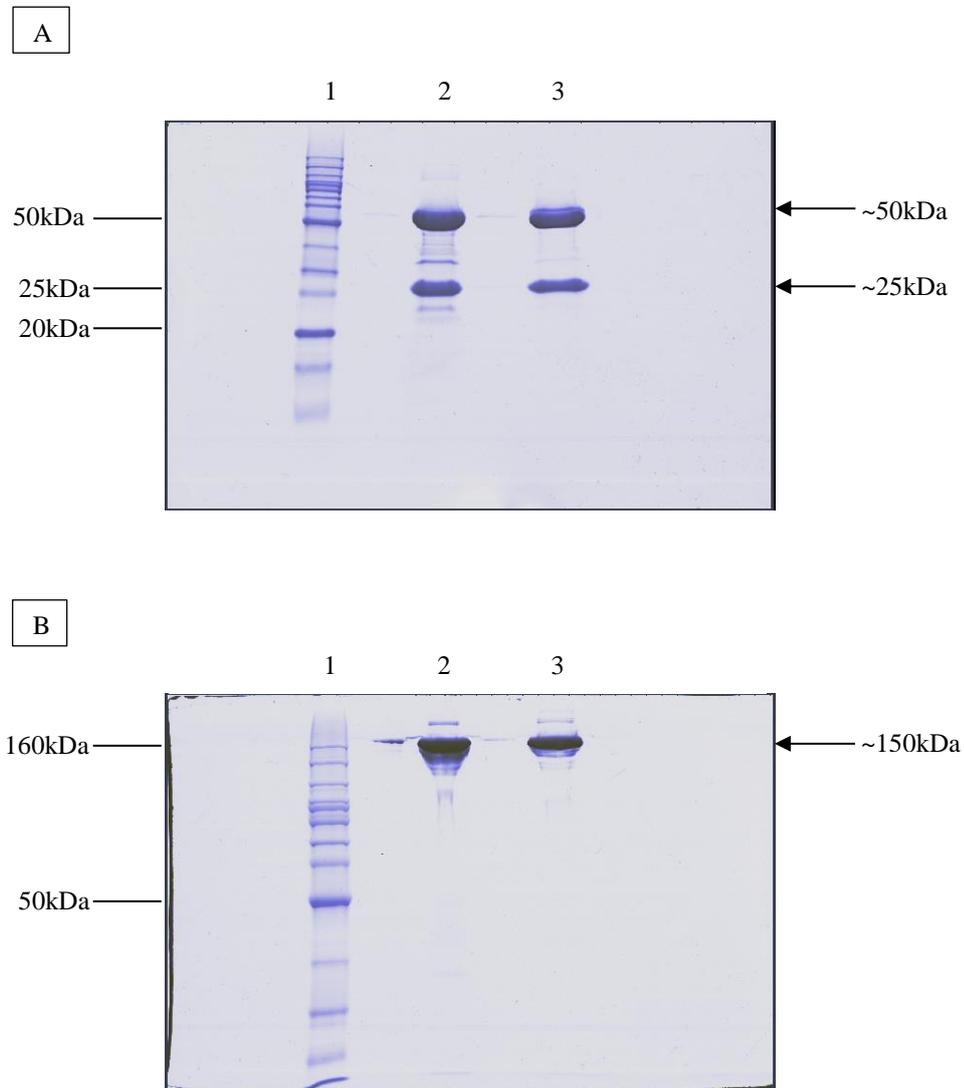
Para determinar o grau de homogeneidade do anticorpo purificado, realizou-se um novo ensaio de SDS-PAGE, sob condição não redutora (Figura 5.11), onde foram aplicadas quantidades crescentes de massa de anticorpo (10µg a 35µg).



**Figura 5.11: Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, com o perfil de homogeneidade do anticorpo anti-PD-1 purificado por cromatografia de afinidade à proteína A. Linha 1- Marcador *Bench Mark™ Protein Ladder*; Linha 2- Anti PD-1 10µg; Linha 3- Anti PD-1 15µg; Linha 4- Anti PD-1 20µg; Linha 5- Anti PD-1 25µg; Linha 6- Anti PD-1 30µg; Linha 7- Anti PD-1 35µg. Fonte: Foto do projeto.**

Observou-se que a partir de 15µg não houve queda no percentual de anticorpo em relação as outras bandas visualizadas, assim estimou-se uma homogeneidade do material purificado em torno de 95%.

O perfil eletroforético do anti-PD-1 foi comparado ao anticorpo de referência (Nivolumabe), na presença (Figura 5.12 A) e na ausência de agente redutor (Figura 5.12 B). Em ambas as condições analisadas, foi possível observar que o anticorpo candidato a biossimilar apresentou perfil de migração similar ao Nivolumabe.

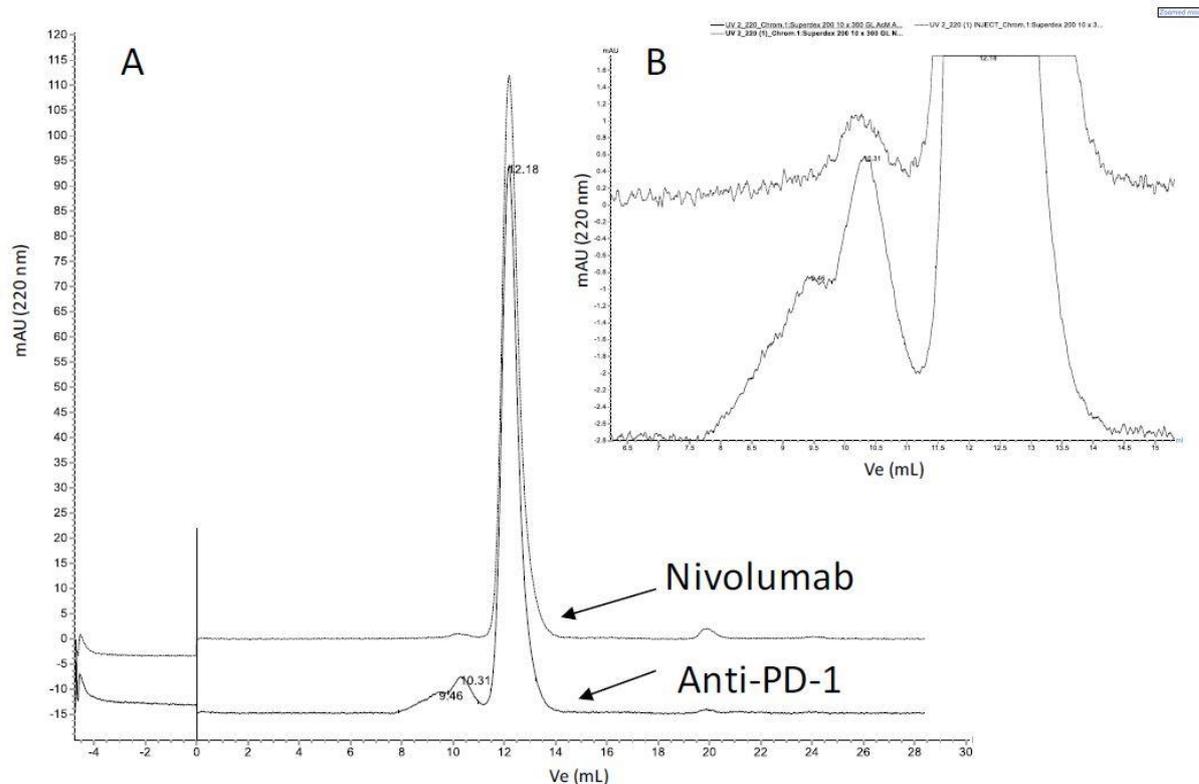


**Figura 5.12:** (A) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/12%), sob condição redutora e (B) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 4%/10%), sob condição não redutora, do anticorpo anti-PD-1 purificado e do Nivolumabe. Linha 1- Marcador *Bench Mark™ Protein Ladder*; Linha 2- Nivolumabe; Linha 3- anticorpo Anti PD-1 após a purificação. Fonte: Fotos do projeto.

Durante a etapa de caracterização físico-química do anticorpo utilizando-se o ensaio de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), foram observados três picos cromatográficos, tanto para o anticorpo anti-PD1 quanto para o Nivolumabe (Figura 5.13 A).

O pico principal apresentou volume de eluição ( $V_e$ ) de aproximadamente 12mL. Os demais picos com aproximadamente 9mL e 10mL sugerem a presença de

agregados (Figura 5.13 B). Tais picos apresentaram-se ligeiramente mais intensos no perfil do anticorpo anti-PD-1, quando comparado ao perfil do Nivolumabe.



**Figura 5.13: Sobreposição dos perfis cromatográficos dos anticorpos anti-PD-1 (linha cheia) e Nivolumabe (linha tracejada), monitorados em 220nm. Eixo Y absorvância (mAU) e eixo X volume de eluição (mL) referente a cada pico detectado para os anticorpos, a partir da integração automática dos cromatogramas (A). Aumento na região do cromatograma onde são observados os menores picos (B). Fonte: Arquivo do projeto.**

Com o ensaio de focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE), foi possível observar que a banda eletroforética principal detectada apresentou valor de  $pI$  de 8,61 tanto para o Nivolumabe quanto para o anti-PD1 (Figura 5.14). Os resultados de valores de  $pI$  foram semelhantes para os dois anticorpos estudados e dentro da faixa esperada para anticorpos de uma forma geral. Vale ressaltar, que ambas as amostras apresentaram número e mesma proporcionalidade de bandas indicando que estas possuem perfis de heterogeneidade semelhantes.

No ensaio de fluorescência, o espectro obtido do Nivolumabe apresenta intensidade de fluorescência menor quando comparado ao espectro do anti-PD1 (Figura 5.15). Entretanto, foi observado um pico máximo de fluorescência em aproximadamente 342nm para ambos. Assim, pode-se inferir que não existem diferenças conformacionais drásticas entre os anticorpos estudados e que eles estão numa conformação que pode ser considerada como nativa/enovelada.

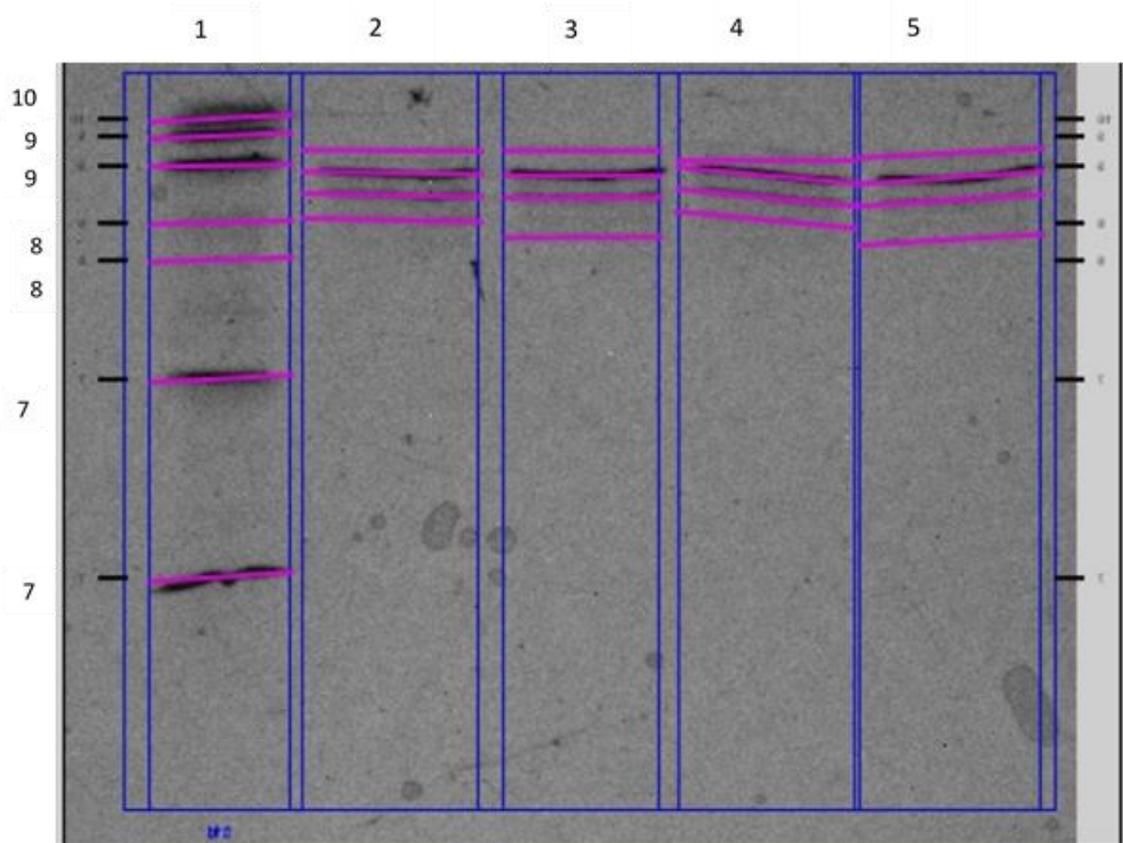


Figura 5.14: IEF-PAGE pH 3-9 para estimativa do pI do anti-PD1 e Nivolumabe. Raia 1: Padrões de pI 5-10 (High). Raias 2 e 4: Nivolumabe diluído 2 x, Raias 3 e 5: anti-PD1 diluído 2 x. Fonte: Foto do projeto.

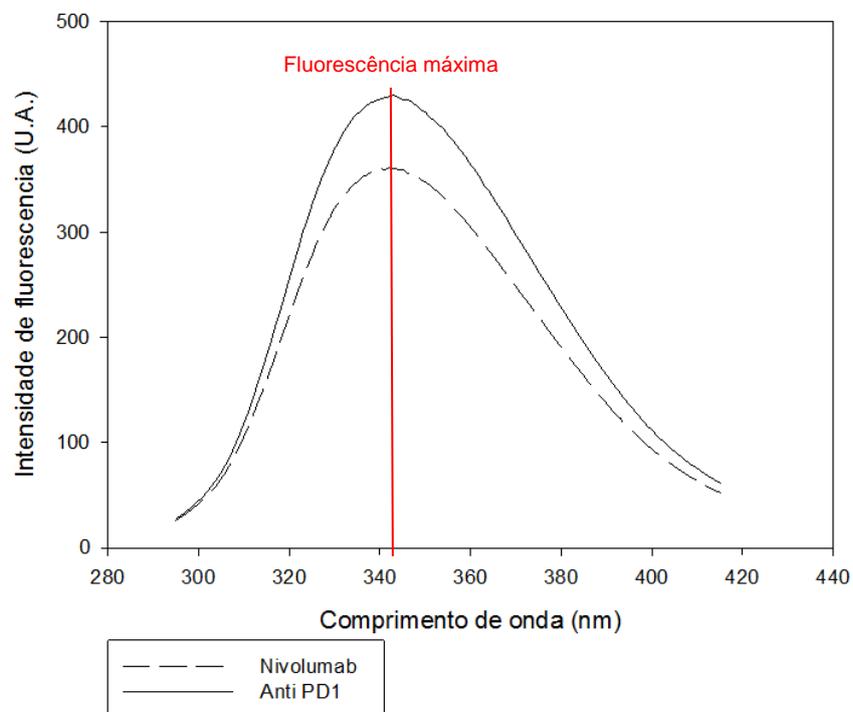
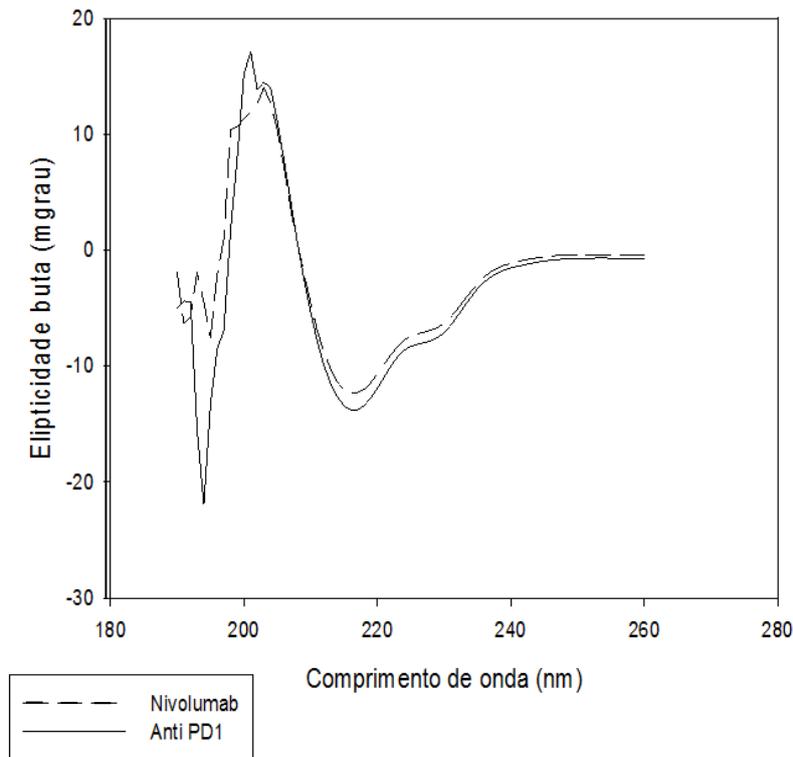


Figura 5.15: Espectros de fluorescência dos anticorpos anti-PD1 e Nivolumabe. A amostra foi excitada a 280 nm e a emissão foi coletada de 295 a 415 nm. Gráfico representativo de triplicatas de espectros para cada anticorpo. Nivolumabe (linha tracejada) e anti-PD1 (linha sólida). Fonte: Arquivo do projeto.

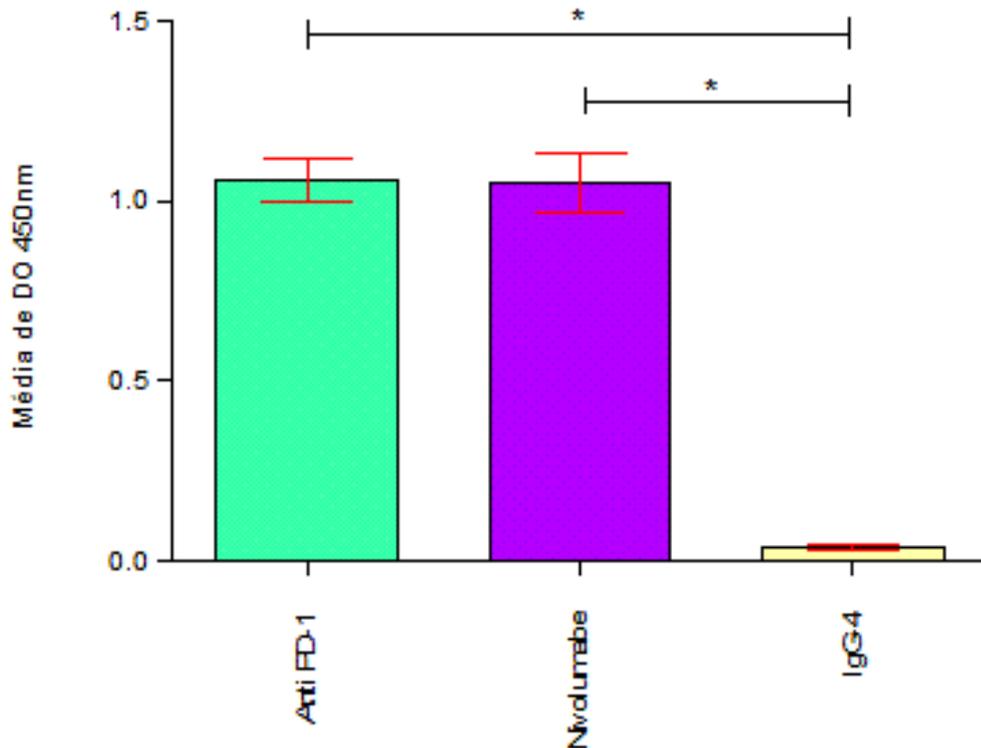
Por fim, os espectros de dicroísmo circular indicam que os dois anticorpos apresentam o mesmo tipo de estrutura secundária em folha beta, com um pico máximo em torno de 202nm e um pico mínimo de aproximadamente 216nm (Figura 5.16).



**Figura 5.16:** Espectros de dicroísmo circular do anticorpo anti-PD1 e Nivolumabe. Gráfico representativo de triplicatas de espectros para cada anticorpo. Nivolumabe (linha tracejada) e anti-PD1 (linha sólida). Fonte: Arquivo do projeto.

A capacidade de ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor PD-1 foi avaliada por ensaio de ELISA *in house*. Neste ensaio, o anti-PD-1 ligou-se de forma específica ao receptor alvo adsorvido na placa (Figura 5.17). Além disso, observou-se que os valores de DO para a ligação do Nivolumabe ao receptor alvo foram similares aos valores observados para o anti-PD-1, o que difere dos valores de DO observados para a IgG4 não específica.

Uma análise estatística realizada com os valores de absorvância obtidos, revelou que não há diferença estatisticamente significativa, entre o anti-PD-1 e o Nivolumabe, na capacidade de reconhecimento do PD-1 adsorvido em placa. Demonstrando a confiabilidade dos dados, o controle negativo, IgG4 inespecífica, apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao anti PD-1 e o Nivolumabe.

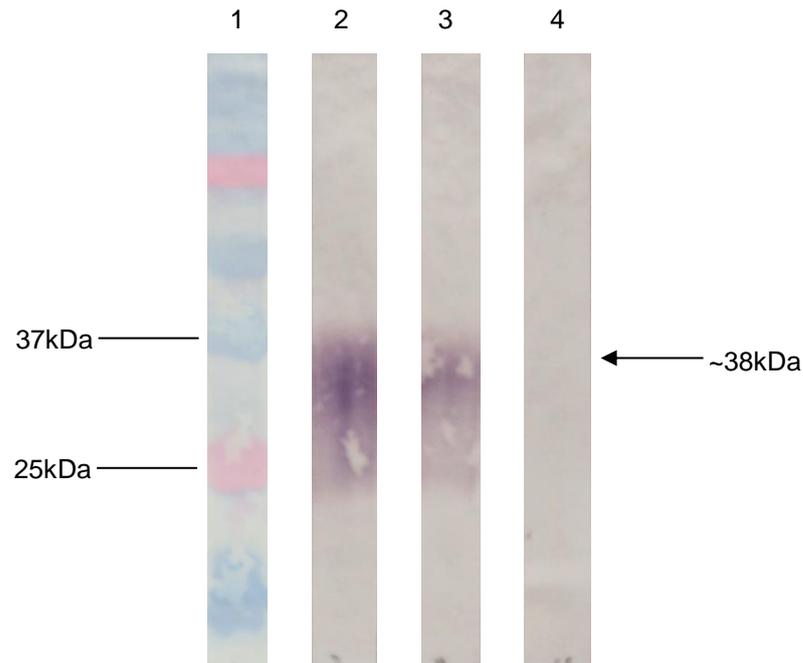


**Figura 5.17:** Ensaio imunoenzimático (ELISA) in house para avaliar a ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1 comparando-a com a ligação do Nivolumabe ao receptor PD1. No eixo vertical, encontram-se os valores de absorvância ( $\lambda = 450\text{nm}$ ) e no eixo horizontal, os anticorpos testados. A placa de ELISA foi sensibilizada com 100ng/poço do receptor PD-1 comercial (Abcam), sendo utilizado 0,5ng de massa dos anticorpos para detecção. Foram analisados 3 lotes de cada construção, com  $p < 0,05$  (teste t de Student bicaudal). \* As absorvâncias do Nivolumabe e do anti-PD-1 são estatisticamente diferentes da absorvância de uma IgG4 humana, com  $p < 0,05$  (teste t de Student bicaudal). As absorvâncias do anti PD-1 e do Nivolumabe não são estatisticamente diferentes entre si, com  $p > 0,05$ . Fonte: Arquivo do projeto.

Para avaliar se a capacidade de ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor alvo PD-1 mantinha-se em condições desnaturantes e redutoras, foi realizado um ensaio de *Western blotting* (Figura 5.18), a partir de um ensaio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condição redutora.

Desta forma, o receptor PD-1 comercial foi resolvido em gel de poliacrilamida, sob condição redutora, e transferido para uma membrana de nitrocelulose. O anticorpo anti-PD-1 foi, então, utilizado como anticorpo de detecção. Da mesma forma empregou-se o Nivolumabe como controle positivo e uma IgG4 inespecífica como controle negativo.

A análise da membrana permitiu observar uma banda de aproximadamente 37kDa, a qual pode corresponder ao receptor PD-1 (~38kDa). Este resultado sugere que o reconhecimento do receptor PD-1 pelo anticorpo pode não depender de conformação.



**Figura 5.18: Western blotting para avaliar a ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor comercial PD-1 (Abcam). Linha 1- Marcador *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad); Linha 2- Receptor PD-1 (2 $\mu$ g) + Anti PD-1; Linha 3 – Receptor PD-1 (2 $\mu$ g) + Nivolumabe; Linha 4 – Receptor PD-1 (2 $\mu$ g) + IgG4 humana não específica. Anticorpo primário: anticorpo anti-PD-1 (20 $\mu$ g/mL). Anticorpo secundário: anticorpo *anti human IgG ( $\gamma$ -chain specific) – Alkaline phosphatase 1:30000* (Sigma, A-3187). Fonte: Foto do projeto.**

Além dos ensaios de ELISA e *Western blotting*, posteriormente, foram realizados dois ensaios de citometria de fluxo com concentrações crescentes do anticorpo anti-PD-1, sendo um deles a partir de um gradiente de concentração de 0,1  $\mu$ g/mL a 10  $\mu$ g/mL e em seguida outro ensaio com gradiente de concentração de 10  $\mu$ g/mL a 100  $\mu$ g/mL (resultados não mostrados), para avaliar a concentração que apresentava a menor quantidade de ligações inespecíficas, durante a ligação do anticorpo ao receptor alvo na membrana celular e assim definiu-se a melhor concentração a ser utilizada nesse ensaio.

Em seguida, um novo ensaio de citometria de fluxo foi realizado para avaliar a ligação do anticorpo anti-PD-1 ao receptor alvo na membrana celular (Figura 5.19). Para esses ensaios, o receptor recombinante foi construído fusionado a uma proteína GFP e expresso por células Expi293F. O anti-PD-1 foi utilizado como anticorpo primário, para reconhecimento do receptor PD-1. Durante a aquisição em citômetro de fluxo, observou-se que o anticorpo anti PD-1 se liga ao receptor alvo. Este resultado sugere que o anticorpo expresso reconhece, de forma similar ao Nivolumabe, o receptor recombinante presente na superfície celular.

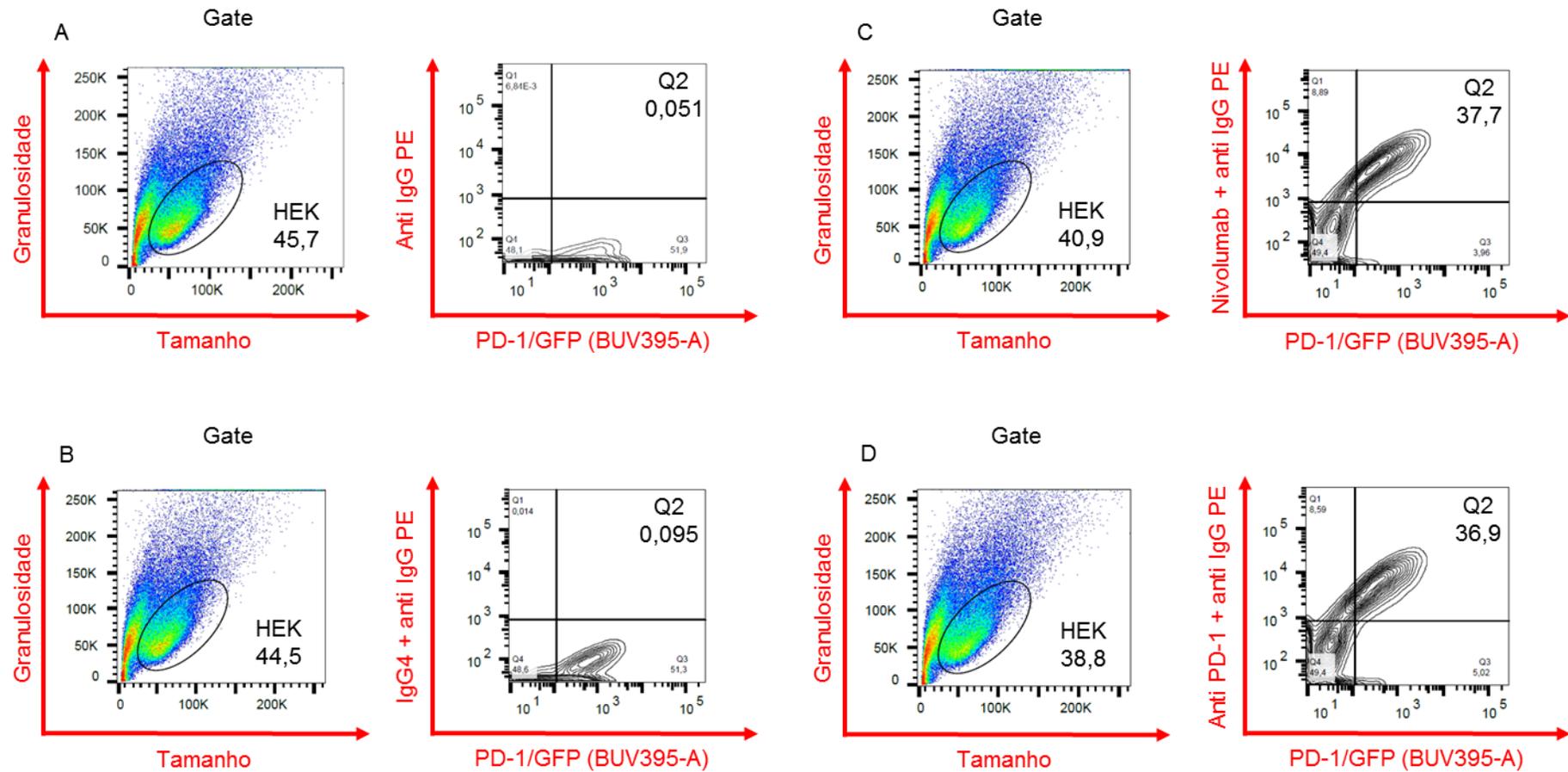


Figura 5.19: Citometria de fluxo para avaliar a ligação do anti PD-1 ao receptor PD-1. Na 1ª imagem em cada condição foi realizado o *gate* nas células transfectadas com o vetor pCi-neo contendo o gene PD-1/GFP. No gráfico ao lado de cada *gate*, no eixo y observamos a ligação ao PD-1. No eixo x, vemos a expressão de PD-1 fusionado a proteína GFP (A, B, C, D). (A) Células incubadas apenas com o anticorpo 2°; (B) Células com a IgG4 inespecífica 10µg/mL + anticorpo 2°; (C) Células incubadas com o Nivolumabe 10µg/mL + anticorpo 2°; (D) Células incubadas com o anti PD-1 10µg/mL + anticorpo 2°. Anticorpo 2° *anti-human IgG PE* 1:50. Fonte: Arquivo do projeto.

## 6. DISCUSSÃO

O medicamento OPDIVO® (Nivolumabe), foi o primeiro biofármaco inibidor de *checkpoint* imunológico, anti PD-1, aprovado para a utilização em pacientes com alguns tipos de câncer. Por este motivo, foi escolhido para o desenvolvimento deste estudo em Bio-manguinhos, como um protótipo interno para produção de biossimilares.

A patente deste medicamento, no Brasil, tem a expectativa de vigência até 2026 (20 anos após a data de depósito). Entretanto, em decorrência do atraso da concessão dos pedidos por parte do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), poderá ocasionar a aplicação do art.40 da LPI 9279/96 prorrogando o direito do titular por 10 anos após a concessão.

Segundo dados do *EvaluatePharma® World Preview* (2017), a indústria farmacêutica deve crescer a uma taxa de 6,5% ao ano, para atingir US \$1,06 trilhões até 2022. Esse crescimento pode ser amplamente atribuído à expansão de terapias existentes, principalmente relacionadas com os inibidores de PD-1/PD-L1 (Opdivo®, Keytruda® e Darzalex®) (EVALUATEPHARMA®, 2017). Sendo assim, mesmo levando-se em consideração o longo período até a expiração da patente, este foi considerado um bom momento para que as indústrias farmacêuticas e biotecnológicas do país, dentre elas Bio-manguinhos, começassem a adquirir competências e experiências que as colocassem na fronteira tecnológica do setor, trabalhando e desenvolvendo novas tecnologias por meio da produção de biossimilares (INSTITUTO DE ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2016).

Diante deste contexto, a sequência do anticorpo anti PD-1 comercial (Nivolumabe) foi obtida de um banco de patentes, buscando assim, desenvolver um biossimilar, que leve a resultados mais rápidos do que o desenvolvimento de um novo produto biológico. Atualmente, o processo de P&D de biofármacos dura em média de 10 a 12 anos e tem um custo estimado de mais de US \$100 milhões (WROBLEWSKI et al., 2009).

Além disso, no caso de um biossimilar, o tempo de desenvolvimento do produto em relação ao medicamento inovador é menor, pois inicia-se a partir do desenvolvimento de uma linhagem celular produtora da proteína de referência (AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2016). Além disso, não é necessário passar por todas as fases de ensaios clínicos, com algumas exceções, de acordo com as exigências de cada agência reguladora para sua aprovação (FDA, 2017).

Atualmente existe uma grande quantidade de sistemas de expressão que produzem proteínas recombinantes como bactérias, leveduras, células de inseto, células de mamífero, plantas, entre outros. No entanto, a maioria destes sistemas é incapaz de realizar todas as modificações pós-traducionais presentes em proteínas de origem humana. Estima-se que mais de 50% das proteínas humanas são N-glicosiladas e que os glicanos são componentes essenciais de muitas proteínas, incluindo anticorpos monoclonais terapêuticos, eritropoietina e fatores de coagulação do sangue como o fator IX (SUBEDI et al., 2015). O sistema de expressão em células de mamíferos permite a realização destas modificações, além do correto enovelamento e montagem adequada, que são importantes para a atividade biológica (KHAN, 2013).

A escolha pelo sistema de expressão Expi293, que usa uma linhagem derivada de células de rim embrionário humano, as células Expi293F, adaptadas para crescer em suspensão, atingindo altas densidades e utilizando meio sem soro (Expi293 Expression Medium), deve-se ao fato de ser um método muito simples, rápido e altamente eficiente, para expressar proteínas recombinantes. Este é um sistema adequado para experimentos, uma vez que pode produzir a partir de uma pequena escala (30 ml até 300 ml), sendo útil para estudar proteínas que requerem maquinarias de enovelamento complexas, chaperonas, cofatores ou modificações pós-traducionais. A ausência de algum destes fatores pode causar perda de função, mal enovelamento ou pode interromper as interações proteína-proteína, de certos complexos eucarióticos de múltiplas subunidades, receptores de superfície e proteínas segregadas. No caso específico de anticorpos, que são moléculas complexas, com pontes de dissulfeto e sítios de glicosilação, o uso dos sistemas de expressão de células de mamífero pode contornar as desvantagens encontradas em outros sistemas, pois fornecem um ambiente de expressão eucariótica. (PORTOLANO et al., 2014).

Além de todas essas vantagens citadas anteriormente, a escolha por esse sistema de expressão transiente deve-se a permitir a análise de um grande número de variáveis de uma determinada proteína rapidamente. Assim, experiências de expressão transitória são mais vantajosas para obtenção de quantidades de proteína suficientes para caracterização inicial e realização de prova de conceito. Em oposição, a expressão estável do transgene (cassete de expressão), é desejável para produção em larga escala e para o controle sobre a qualidade e homogeneidade de proteínas (Dalton e Barton, 2014).

Com relação ao experimento de expressão a partir da transfecção transiente das células Expi293F, inicialmente, foi realizado um ensaio de cinética de expressão por 7 dias para determinar o melhor ponto de colheita do material. O dia 5 foi escolhido, pois foi o ponto no qual observou-se o pico de expressão e a viabilidade celular encontrava-se em aproximadamente 50%. Estes resultados se assemelham ao do trabalho publicado por SUBEDI et al., (2015), onde foram realizados ensaios de transfecção transiente utilizando protocolos otimizados para o sistema Expi293, cujo objetivo era aumentar os níveis de expressão e o rendimento final das proteínas recuperadas. Neste trabalho, no 5º dia, as células estavam com a viabilidade menor que 50% e o sobrenadante da cultura foi recolhido para limitar a proteólise, uma vez que uma viabilidade menor, poderia levar a perdas do material expresso e comprometer a recuperação das proteínas, devido a elevada liberação de enzimas proteolíticas no meio de cultura pela morte das células.

Embora, no ensaio de cinética observou-se um pico de expressão com média de 140mg/L no 5º dia, o fabricante do kit promete entregar até 1g de proteína por litro de cultura transfectada (THERMO, F., 2019). Porém, ao ser realizado um segundo experimento de transfecção, o nível de anticorpo ant-PD-1 obtido após as etapas de purificação, troca de tampão e concentração foi de aproximadamente 50mg de anticorpo por litro de cultura transfectada, sendo as perdas estimadas em 30%, que impactaram na recuperação final. Entretanto, em um estudo descrito na literatura, que buscou o desenvolvimento de métodos otimizados, com a inclusão do vetor plasmidial (pGEN2), a transfecção transitória assistida por polietilenimina (PEI), em linhagens de células de mamíferos (HEK293F), e com recuperação de elevados rendimentos de proteína apropriadamente glicosilada, SUBEDI et al., (2015), conseguiram rendimentos para 3 diferentes proteínas entre 95mg e 120mg por litro de cultura. Quando comparado ao trabalho de SUBEDI et al., (2015), uma recuperação final de 50mg/L pode ser considerada baixa. Entretanto, é importante salientar que nesse caso

os parâmetros de transfecção não foram otimizados. Além disso, em um outro estudo com esse sistema, a recuperação de um complexo formado por 3 proteínas, foi superior a 1mg/L (PORTOLANO et al., 2014). Isto é um indicativo de que a estrutura da proteína a ser expressa tem influência nos níveis de expressão.

Além dos pontos citados anteriormente, o vetor utilizado nas construções recombinantes (pCi-neo, Promega), foi diferente do sugerido pelo fabricante para utilização com o sistema de expressão Expi293™ (pcDNA 3.4, Invitrogen™) (THERMO, F. S., 2019).

Enquanto o vetor pCi-neo é mais antigo e de acordo com o fabricante, possui uma região promotora/intensificadora do citomegalovírus (CMV) humano, que promove uma expressão forte e constitutiva dos insertos de DNA clonados em células de mamíferos. Além de conter o intensificador SV40, que induzirá a replicação episomal transiente do vector pCI-neo em células que expressam o antígeno T de SV40. Possui introns flanqueando a inserção de cDNA, para promover um alto nível de expressão, assim como um sinal de poliadenilação tardia SV40, que aumenta a estabilidade e tradução do RNA (PROMEGA, 2009).

O pcDNA 3.4 é um vetor mais novo, que contém o elemento regulador pós-transcrição da marmota, para melhorar a expressão do transcrito; possui uma região promotora/intensificadora do citomegalovírus (CMV) humano, para alto nível de expressão gênica. Além de sítio de clonagem TOPO® para clonagem rápida e eficiente de produtos de PCR amplificados por Taq, possui sinal de poliadenilação da timidina quinase do vírus herpes simplex para o correto processamento e terminação do transcrito recombinante. Por fim, apresenta uma origem pUC para replicação de alta cópia e manutenção do plasmídeo em *E. coli* (INVITROGEN, 2013). Segundo dissertação de RAMOS, (2019), onde realizou-se a expressão e caracterização do fragmento Fab do anticorpo monoclonal humanizado anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), no qual os dois vetores foram empregados para construção do material recombinante, e após os ensaios de expressão, observou-se que houve um aumento de cerca de 2000 vezes dos níveis alcançados com pcDNA 3.4 em relação ao pCi-neo, neste trabalho.

Ensaio físico-químicos realizados para a caracterização estrutural da proteína candidata a biossimilar geraram dados, que foram usados como parâmetros de comparação com o produto de referência.

O perfil de migração eletroforética do anti-PD-1 em comparação ao Nivolumabe, observado no ensaio de eletroforese desnaturante em gel de

poliacrilamida, sob a condição redutora e não redutora, foi bastante similar e permitiu a visualização de bandas com massas moleculares de aproximadamente 25kD, 50kD e 150kD, as quais correspondem as massas esperadas para as cadeias leve, pesada e para o anticorpo completo, respectivamente. Em um trabalho reportado na literatura, REICHEL e THEVIS, (2013), utilizaram a técnica eletroforética de gel SDS-PAGE, para demonstrar a versatilidade e custo-efetividade dessa ferramenta, avaliando o perfil de migração da eritropoietina humana recombinante original e seus produtos biossimilares, do Brasil, da Europa e Ásia. O resultado demonstrou que muitos produtos mostram diferenças na composição de glicofomas (largura de banda) e massa molecular em comparação ao produto de referência.

Segundo BERKOWITZ, S. A. et al., (2012), o ensaio de SEC tem sido, e provavelmente continuará sendo, o principal método usado para caracterizar agregados de proteínas devido à sua simplicidade, baixo custo, baixa quantidade de amostra necessária, facilidade de uso, alta velocidade e, portanto, alta capacidade de processamento de amostras.

No ensaio de SEC foram observados três picos cromatográficos, tanto para o anticorpo anti-PD1 quanto para o Nivolumabe, dois destes picos podem estar relacionados a presença de agregados. Os picos com Volume de eluição menor apresentaram intensidade ligeiramente maior no perfil do anticorpo anti-PD-1, quando comparado ao perfil do Nivolumabe. Essa diferença pode estar associada ao número de etapas de purificação utilizados na produção do Nivolumabe, pois os processos de manufatura *downstream* incluem três passos cromatográficos: uma etapa de cromatografia de afinidade com a proteína A, uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e uma etapa de cromatografia por troca catiônica (CEX) (THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, 2016). Além disso, foi realizado um novo ensaio de SEC com o candidato a biossimilar em PBS e no tampão do produto de referência, para testar a hipótese de que a diferença poderia estar relacionada a estabilização do Nivolumabe pelos excipientes. Contudo, não foram observadas diferenças relevantes (resultados não mostrados).

O ensaio de SEC também foi uma das ferramentas de análise empregadas, em um trabalho publicado recentemente, para a avaliação de biossimilaridade entre o anticorpo monoclonal CT-P10, biossimilar aprovado recentemente na União Européia (UE) e na Coréia do Sul, e o Rituximabe, produzido na Europa e nos Estados Unidos, foi observado que os 3 produtos demonstravam picos de monômeros proeminentes, sendo que as amostras do biossimilar apresentaram níveis ligeiramente mais

elevados de monómeros e níveis mais baixos de espécies de alto peso molecular em comparação ao produto original. Entretanto, essa diferença não comprometeu a qualidade final do produto (LEE et al., 2018).

As bandas eletroforéticas detectadas na comparação entre o anti PD-1 e o Nivolumabe apresentaram valor de pI próximo a 8,61. Esses resultados de valores de pI, além de similares estão dentro da faixa esperada para anticorpos. No mesmo trabalho realizado por LEE et al., (2018), os resultados obtidos pela análise de focalização isoeétrica demonstraram que os valores do (pI) calculado para as bandas do biossimilar CT-P10 e do medicamento de referência Rituximabe estavam próximos e dentro de um intervalo semelhante para todos os produtos. Em outro trabalho, GOYON et al., (2017), realizaram o ensaio de focalização isoeétrica capilar de imagem (icIEF), e cálculo teórico com o *software* de bioinformática (MassLynx), para determinar o pI de 23 anticorpos monoclonais terapêuticos licenciados pelo EMA e FDA, o valor obtido para o pI do Nivolumabe foi de 8,0 (icIEF) e 8,3 (MassLynx). Porém, é importante considerar as diferenças entre as metodologias comparadas.

Apesar dos espectros de fluorescência indicarem que o espectro do Nivolumabe apresenta intensidade de fluorescência menor quando comparado ao espectro do anti-PD1, o pico máximo de fluorescência observado por volta de 340nm está próximo ao descrito na literatura para outros anticorpos já caracterizados, como em um estudo para avaliação de um biossimilar ao Remicade® (infliximabe) (HONG et al., 2017). Essas variações na intensidade de fluorescência podem ter ocorrido pela diferença na composição do tampão dos anticorpos, uma vez que o Nivolumabe apresenta em sua formulação diferentes excipientes (citrato de sódio, NaCl, Manitol, DTPA e Tween 80), ou devido a diferenças conformacionais sutis, provavelmente relacionadas a pequenas diferenças no enovelamento das proteínas, já que estas foram expressas em sistemas distintos (CHO e HEK), que determinam maior ou menor exposição dos triptofanos dos anticorpos ao solvente (LAKOWICZ, 2006).

Os espectros de dicroísmo circular indicaram que os dois anticorpos possuem o mesmo conteúdo e apresentam o mesmo tipo de estrutura secundária em folha beta, com um pico máximo em torno de 202nm e um pico mínimo de aproximadamente 216nm. Esse tipo de estrutura secundária do Nivolumabe também foi observada por LIU et al., (2016). Além deste, de acordo com o trabalho reportado por LEE et al., (2018), o espectro de UV distante do dicroísmo circular para o anticorpo monoclonal CT-P10, biossimilar aprovado recentemente, e o Rituximabe, produto de referência produzido na Europa e nos Estado Unidos, demonstrou uma forma típica de anticorpo

com média mínima de espectro em 217nm e a média máxima em 202 nm. Além disso, também não foi observado nenhuma diferença significativa entre o comprimento de onda máximo e mínimo do sinal espectral e a elipticidade molar de resíduo médio. Segundo JANEWAY JR. et al., (2001), os anticorpos são ricos em conteúdo de folha beta, e os espectros obtidos na avaliação da estrutura secundária do o anti-PD-1 e do Nivolumabe, foram condizentes com o esperado para este tipo de molécula.

O conhecimento da estrutura de um anticorpo bioessimular torna-se importante pelas características necessárias para garantir sua atividade biológica, pureza, potência, além de reduzido risco de imunogenicidade (KIRCHHOFF et al., 2017), (ISHII-WATABE et al., 2018). Neste contexto, a comparação realizada entre os dados físico-químicos demonstrou que as diferenças estruturais entre o bioessimular proposto e o medicamento de referência são pequenas. Em outro trabalho disponível na literatura, onde um bioessimular (SB2) foi comparado com mais de 80 lotes do Remicade® (Infliximabe), seu produto de referência, algumas poucas diferenças nos atributos físico-químicos também foram observadas. Porém, evidências da literatura relacionada, além de estudos de relação estrutura-atividade e ensaios biológicos comparativos mostraram que essas diferenças eram improváveis de serem clinicamente significativas (HONG et al., 2017).

Uma limitação importante desses métodos de caracterização é que eles geralmente fornecem uma informação que é derivada de uma soma de sinais de entrada que vêm de muitas partes diferentes da proteína sendo sondada (BERKOWITZ, S. et al., 2013). Como exemplo, as IgGs podem conter até 500 diferentes glicofomas devido à glicosilação de Fc. Essas diferenças podem influenciar na solubilidade, estabilidade, depuração, imunogenicidade e funções efetoras imunológicas. Assim, torna-se impossível caracterizar os atributos de qualidade dos mAbs completamente, pela análise físico-química sozinha e prever totalmente o impacto das diferenças sobre a eficácia clínica e a segurança. As diferenças analíticas (incluindo o perfil de glicosilação, se necessário) devem ser justificadas por dados clínicos. Os mAbs sempre serão misturas micro-heterogêneas de um grande número de espécies moleculares. A relevância das principais variantes sobre a eficácia clínica e/ou segurança deve ser estabelecida e refletida na estratégia de controle do produto (KRESSE, 2009).

A capacidade de reconhecimento e ligação dos anticorpos anti-PD-1 e Nivolumabe ao antígeno, foi observada no ensaio de ELISA *in house*. Embora, a maquinaria dos sistemas de expressão empregados para produção dessas proteínas

não serem as mesmas, uma vez que o Nivolumabe é produzido em células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), não foram observadas diferenças na capacidade de reconhecimento do antígeno pelo anticorpo. No trabalho divulgado por LEE et al., (2018), em todos os ensaios utilizados para avaliar a similaridade de atividade biológica, incluindo o ELISA, em 100% dos dados obtidos de CT-P10, os pontos estavam dentro da faixa de qualidade do Rituximabe (UE e US), sugerindo que os 3 produtos têm atividades biológicas altamente similares.

Essa ligação também foi avaliada por meio do ensaio de Western Blotting, utilizando-se o anticorpo anti PD-1 como anticorpo primário, este ensaio apresentou resultado positivo, indicando que o anticorpo é capaz de se ligar ao receptor PD-1 e que essa ligação parece não depender do estado conformacional do receptor, uma vez que a técnica empregada foi realizada em condições desnaturantes, sendo que o mesmo resultado foi obtido para o anticorpo de referência, Nivolumabe. Apesar de outro trabalho reportar que existe uma grande contribuição de aminoácidos do N-loop (L25, S27, P28, D29 e R30) e que eles contribuem com a maioria das pontes de hidrogênio (10 de 16), segundo os quais, essas ligações estabilizam o complexo (TAN et al., 2017).

A capacidade de reconhecimento e ligação ao receptor PD-1 presente na superfície celular, foi avaliada pelo ensaio de citometria de fluxo. Neste ensaio, o resultado demonstrou que o anti-PD-1, candidato a biossimilar, reconheceu de forma bastante parecida ao Nivolumabe, o receptor presente na membrana das células Expi293F. Esse resultado reforça os dados obtidos, durante a avaliação da capacidade de reconhecimento e ligação ao receptor PD-1 presente em uma superfície sólida, por ensaio de ELISA e *Western Blotting*. No mesmo trabalho de TAN et al., (2017) , mencionado anteriormente, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo para avaliar se a ligação do Nivolumabe ao receptor PD-1 é dependente de glicosilação, sendo utilizada uma construção recombinante do receptor nativo ou construções com mutações em sítios específicos do receptor PD-1. Os resultados demonstraram que independente das mutações sítio-dirigidas, o nivolumabe reconhece e se liga ao receptor PD-1. O que contribui para fortalecer a hipótese de que as pequenas diferenças em relação a maquinaria de expressão do hospedeiro não afetariam a ligação.

Estes dados indicam que as pequenas diferenças estruturais observadas não foram capazes de modificar o perfil de interação do anticorpo anti-PD-1 com seu receptor nos ensaios *in vitro*.

## 7. CONCLUSÃO

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho foi possível clonar os genes de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo anti-PD1 em vetor de expressão pCI-neo;

A partir da transfecção transiente com o material recombinante, as células Expi293F foram capazes de expressar o anticorpo;

Foi possível purificar esse anticorpo com o emprego de métodos cromatográficos, além de realizar a sua caracterização quanto aos atributos físico-químicos em comparação ao produto de referência;

As pequenas diferenças estruturais observadas não foram capazes de modificar o perfil de interação do anticorpo anti-PD-1 com seu receptor alvo PD-1 nos ensaios *in vitro*;

Para assegurar a similaridade funcional do anticorpo anti-PD-1 em relação ao Nivolumabe será necessário realizar ensaios de atividade biológica utilizando-se cultura de células e modelo animal de câncer.

### 7.1 PERSPECTIVAS

Clonar os genes de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo em vetor de expressão pCDNA3.4;

Selecionar um clone estável em linhagem de células CHO;

Realizar ensaios para avaliar a atividade biológica do anticorpo anti PD-1 *in vitro* e *in vivo*;

Realizar ensaios complementares para a caracterização físico-química do anti-PD-1 em comparação ao Nivolumabe;

Avaliar a afinidade de ligação ao receptor alvo por ressonância plasmônica de superfície.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R. C. et al. **Immunoglobulin G4: an odd antibody.** *Clinical & Experimental Allergy*, [s.l.], v. 39, p. 469–477, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x.

AALBERSE, R. O. B. C.; SCHUURMAN, J. **IgG4 breaking the rules.** *Immunology*, [s.l.], v. 105, p. 9–19, 2002.

ABRADILAN, A. B. de D. e L. de P. F. **Gasto federal com medicamentos sobe 53%.** São Paulo: [s.n.], 2015. Disponível em: <[http://www.abradilan.com.br/index.php?m=noticiaFE&id\\_noticia=1601](http://www.abradilan.com.br/index.php?m=noticiaFE&id_noticia=1601)>. Acesso em: 07/abr./18.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, A. **Biofármacos: Panorama econômico.** Brasília: [s.n.], 2016. Disponível em: <<http://ats.abdi.com.br/publicações-biofármacos>>.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **Preços Máximos de Medicamentos por Princípio Ativo.** [s.l.]: [s.n.], 2018. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/f6>>. Acesso em: 23/mar./19.

AL-RUBEAI, M. **Antibody Expression and Production.** In: AL-RUBEAI, M. et al. (Orgs.). 7ª ed. Dublin, Ireland: Springer, 2011. 1-356 p. ISBN: 9789400712560.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell.** 6th. ed. ed. New York: Garland, 2014. 1-500 p.

ANG, Y. LE; LIM, J. S.; SOO, R. A. **Profile of nivolumab in the treatment of metastatic squamous non-small-cell lung cancer.** *Onco Targets and Therapy*, [s.l.], v. 9, p. 3187–3195, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S84356.

ASSOCIATION FOR ACCESSIBLE MEDICINES, A. **Why Biosimilars Are Important for Patients | The Biosimilars Council.** 2018. Disponível em: <<https://biosimilarscouncil.org/blog/why-biosimilars-are-important-for-patients>>. Acesso em: 12/mar./18.

BANCROFT, G.; SCHREIBER, R.; UNANUE, E. **Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse.** *Immunology Review*, [s.l.], v. 124, p. 5–24, 1991.

BELL, R. B.; FERNANDES, R.; ANDERSEN, P. E. (Peter E. **Oral, head, and neck oncology and reconstructive surgery.** [s.l.]: Elsevier, 2018. ISBN: 9780323265683.

BENLAGHA, K.; BENDELAC, A. **CD1d-restricted mouse V $\alpha$ 14 and human V $\alpha$ 24 T cells: Lymphocytes of innate immunity.** *Seminars in Immunology*, [s.l.], v. 12, nº 6, p. 537–542, 2000. ISSN: 10445323, DOI: 10.1006/smim.2000.0276.

BERKOWITZ, S. et al. **Implications for Biosimilars.** *Nature reviews. Drug discovery*, [s.l.], v. 11, nº October 2010, p. 527–540, 2013. ISSN: 1474-1784, DOI: 10.1038/nrd3746.Analytical.

BERKOWITZ, S. A. et al. **Analytical tools for characterizing implications for biosimilars.** *Nature Reviews/Drug discovery*, [s.l.], v. 11, p. 527–540, 2012. DOI: 10.1038/nrd3746.

BLACKSTONE, E. A.; FUHR, J. P. **The economics of biosimilars.** *American Health and Drug Benefits*, [s.l.], v. 6, n° 8, p. 469–477, 2013. ISBN: 9780444508706, ISSN: 19422962, DOI: 10.1016/S1574-0676(06)01021-0.

BRAHMER, J. R.; HAMMERS, H.; LIPSON, E. J. **Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity.** *Future Oncology*, [s.l.], v. 11, n° 9, p. 1307–1326, 2015a. ISSN: 1479-6694, DOI: 10.2217/fon.15.52.

\_\_\_\_\_. **Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity.** *Future Oncology*, [s.l.], v. 11, n° 9, p. 1307–1326, 2015b. ISBN: 1479669407, ISSN: 1479-6694, DOI: 10.2217/fon.15.52.

BRASIL, G. Do. **Governo apresenta para indústria lista de produtos prioritários.** [s.l.]: [s.n.], 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/12/governo-apresenta-para-industria-lista-de-produtos-prioritarios>>. Acesso em: 07/abr./18.

BRAY, F. et al. **Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study.** *The Lancet Oncology*, [s.l.], v. 13, n° 8, p. 790–801, 2012. ISBN: 1474-5488 (Electronic)r1470-2045 (Linking), ISSN: 14702045, DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.

BROMBERG, J. F. et al. **Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 93, n° 15, p. 7673–7678, 1996. ISBN: 0027-8424 (Print), ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.93.15.7673.

BUI, L. A. et al. **Key considerations in the preclinical development of biosimilars.** *Drug Discovery Today*, [s.l.], v. 20, n° S1, p. 3–15, 2015. ISBN: 1359-6446, ISSN: 18785832, DOI: 10.1016/j.drudis.2015.03.011.

CHAN, A. C. et al. **ZAP-70: A 70kd Protein-Tyrosine Kinase That Associates with the TCR Zeta Chain.** *Cell*, [s.l.], v. 71, n° 4, p. 649–662, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90598-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90598-7).

CHEN, D. S.; IRVING, B. A.; HODI, F. S. **Molecular pathways: Next-generation immunotherapy-inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1.** *Clinical Cancer Research*, [s.l.], v. 18, n° 24, p. 6580–6587, 2012. ISBN: 1078-0432 (Print)r1078-0432 (Linking), ISSN: 10780432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1362.

CHEN, L. **CO-INHIBITORY MOLECULES OF THE B7 – CD28 FAMILY IN THE CONTROL OF T-CELL IMMUNITY.** *Nature Reviews immunology*, [s.l.], v. 4, n° May, p. 336–347, 2004. DOI: 10.1038/nri1349.

COUGHLIN, C. M. et al. **Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis.** *Immunity*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 25–34, 1998. ISBN: 1841-8724 (Print)n1841-8724 (Linking), ISSN: 10747613, DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80585-3.

COZMA, C. **Determination of Primary Structure and Affinity Characterization of Naturally Occurring  $\beta$ -Amyloid Autoantibodies.** 1-221 p. 2014.

DECISION RESOURCES GROUP, D. **Global Biosimilars Markets (Regulations, Pipelines and Major Players) | Biosimilars Advisory Service | US/EU5/Asia Pacific | 2014 | Research & reports | DRG.** 2014. Disponível em: <<https://decisionresourcesgroup.com/report/244624-biopharma-global-biosimilars->

markets-regulations-pipelines/>. Acesso em: 12/mar./18.

DIEFENBACH, A. et al. **Ligands for the murine NKG2D receptor: Expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.** *Nature Immunology*, [s.l.], v. 1, n° 2, p. 119–126, 2000. ISBN: 1529-2908, ISSN: 15292908, DOI: 10.1038/77793.

DOUGHERTY, M. K.; ZINEH, I.; CHRISTL, L. **Perspectives on the Current State of the Biosimilar Regulatory Pathway in the United States.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 103, n° 1, p. 36–38, 2018. ISSN: 00099236, DOI: 10.1002/cpt.909.

DRUGS.COM. **List of Anti-PD-1 monoclonal antibodies (Anti-programme cell death protein 1 monoclonal antibodies) - Drugs.com.** *c2000-2010*. 2018. Disponível em: <<https://www.drugs.com/drug-class/anti-pd-1-monoclonal-antibodies.html>>. Acesso em: 04/mar./18.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. **The Three Es of Cancer Immunoediting.** *Annual Review of Immunology*, [s.l.], v. 22, n° 1, p. 329–360, 2004. ISBN: 0732-0582 (Print)n0732-0582 (Linking), ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.

DYCK, L.; MILLS, K. H. G. **Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases.** *Eur. journal Immunology*, [s.l.], v. 47, p. 765–779, 2017. DOI: 10.1002/eji.201646875.

EMA. **Guideline on development, production, characterisation and specifications for monoclonal antibodies and related products (EMA/CHMP/BWP/157653/2007).** *Guideline*, [s.l.], v. 44, n° July, p. 1–13, 2016. DOI: EMA/CHMP/BWP/157653/2007.

EPSTEIN, M. **Food and Drug Administration guidances on biosimilars: an update for the gastroenterologist.** *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, [s.l.], v. 11, p. 1–16, 2018. ISSN: 17562848, DOI: 10.1177/1756284818799600.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, E. **Assessment report.** In: *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*. [s.l.]: [s.n.], 2015. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/003840/WC500190651.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/003840/WC500190651.pdf)>.

EVALUATEPHARMA®. **EvaluatePharma ®.** *World Preview 2017, Outlook to 2022*, [s.l.], v. 10th Editi, p. 1–41, 2017.

FDA. **Sandoz: Arthritis advisory committee briefing document.** [s.l.]: [s.n.], 2016.

FDA, F. and D. A. **Overview of the regulatory framework and FDA's guidance the development and approval of biosimilar products in the US.** Silver Spring: [s.n.], 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM561565.pdf>>. Acesso em: 05/abr./18.

FRANCISCO, L. M. et al. **PD-L1 regulates the development , maintenance , and function of induced regulatory T cells.** *Journal of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 206, n° 13, p. 3015–3029, 2009. DOI: 10.1084/jem.20090847.

FREDERICK, M. J.; CLAYMAN, G. L. **Chemokines in cancer.** *Expert Reviews in Molecular Medicine*, [s.l.], v. 13, n° July, p. 1–18, 2001.

GARIDEL, P. et al. **A rapid, sensitive and economical assessment of monoclonal antibody conformational stability by intrinsic tryptophan fluorescence**

**spectroscopy.** *Biotechnology Journal*, [s.l.], v. 3, n° 9–10, p. 1201–1211, 2008. ISSN: 18606768, DOI: 10.1002/biot.200800091.

GEROSA, F. et al. **Reciprocal Activating Interaction between Natural Killer Cells and Dendritic Cells.** *The Journal of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 195, n° 3, p. 327–333, 2002. ISBN: 0022-1007 (Print)r0022-1007 (Linking), ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20010938.

GHIOTTO, M. et al. **PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1.** *International Immunology*, [s.l.], n° 10, p. 1–10, 2010. DOI: 10.1093/intimm/dxq049.

GORDON, S. R. et al. **PD-1 expression by tumor-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumor immunity.** *Nature*, [s.l.], v. 545, n° 7655, p. 87–97, 2017. ISBN: 2403688096, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.015.Tunable.

GOTHAM, D. **Cell line access to revolutionize the biosimilars market.** *F1000Research*, [s.l.], v. 7, n° May, p. 537, 2018. ISSN: 2046-1402, DOI: 10.12688/f1000research.14808.1.

GOYON, A. et al. **Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies.** *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, [s.l.], v. 1065–1066, n° August, p. 119–128, 2017. ISSN: 1873376X, DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.09.033.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre.** *Cell*, [s.l.], v. 100, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*, [s.l.], v. 144, n° 5, p. 646–674, 2011. ISBN: 1097-4172 (Electronic)r0092-8674 (Linking), ISSN: 00928674, DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HAYAKAWA, Y. et al. **Cutting Edge: Tumor Rejection Mediated by NKG2D Receptor-Ligand Interaction Is Dependent upon Perforin.** *The Journal of Immunology*, [s.l.], v. 169, n° 10, p. 5377–5381, 2002. ISBN: 0022-1767 (Print)n0022-1767 (Linking), ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.169.10.5377.

HINO, R. et al. **Tumor Cell Expression of Programmed Cell Death-1 Ligand 1 Is a Prognostic Factor for Malignant Melanoma.** *Cancer*, [s.l.], p. 1757–1766, 2010. DOI: 10.1002/cncr.24899.

HODGE-DUFOUR, J. et al. **Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages.** *The Journal of Immunology*, [s.l.], v. 159, n° 5, p. 2492–2500, 1997.

HONG, J. et al. **Physicochemical and biological characterization of SB2, a biosimilar of Remicade® (infliximab).** *mAbs*, [s.l.], v. 9, n° 2, p. 364–382, 2017. ISBN: 1942-0870 (Electronic) 1942-0862 (Linking), ISSN: 19420870, DOI: 10.1080/19420862.2016.1264550.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, I. **Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017.** *Agência IBGE Notícias*. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>>. Acesso em: 02/abr./19.

INSTITUTO DE ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, I. **A indústria farmacêutica no Brasil: Evolução recente e desafios futuros.** 2016.

Disponível em: <[http://www.iedi.org.br/cartas/carta\\_iedi\\_n\\_766.html](http://www.iedi.org.br/cartas/carta_iedi_n_766.html)>. Acesso em: 16/mar./18.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l.]: [s.n.], 2018. 1-126 p. ISBN: 78-85-7318-283-5.

INTERFARMA, A. da indústria F. de P. **Brasil gasta R\$ 7 bilhões com ações de Justiça na área da Saúde, diz Gebran Neto** -. São Paulo: [s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.interfarma.org.br/noticias/1585>>. Acesso em: 07/abr./18.

ISAACS, J. et al. **The biosimilar approval process: how different is it?** *BMJ Journals*, [s.l.], v. 1, n° 1, p. 3–6, 2017. DOI: 10.1136/conmed-2017-100003.

ISHII-WATABE, A. et al. **Immunogenicity of therapeutic protein products: Current considerations for anti-drug antibody assay in Japan**. *Bioanalysis*, [s.l.], v. 10, n° 2, p. 95–105, 2018. ISSN: 17576199, DOI: 10.4155/bio-2017-0186.

JANEWAY JR., C. A. et al. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. In: AUSTIN, P.; LAWRENCE, E. (Orgs.). 5th editio ed. New York: Garland Publishing, 2001. 1-884 p.

KAZANDJIAN, D. et al. **FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy**. *The Oncologist*, [s.l.], v. 21, n° 5, p. 634–642, 2016. ISBN: 1083-7159, ISSN: 1083-7159, DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0507.

KEIR, M. E. et al. **PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity**. *Annual Review of Immunology*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 677–704, 2008. ISBN: 0732-0582 (Print)r0732-0582 (Linking), ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.

KHAN, K. H. **Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications**. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, [s.l.], v. 3, n° 2, p. 257–263, 2013. DOI: 10.5681/apb.2013.042.

KIRCHHOFF, C. F. et al. **Biosimilars: Key regulatory considerations and similarity assessment tools**. *Biotechnology and Bioengineering*, [s.l.], v. 114, n° 12, p. 2696–2705, 2017. ISBN: 0376-7388, ISSN: 10970290, DOI: 10.1002/bit.26438.

KRESSE, G. **Session 1 CMC Innovator Industry Presentation**. In: *EMA Workshop on Biosimilar Monoclonal Antibodies*. London: European Medicines Agency, 2009. Disponível em: <[https://www.ema.europa.eu/documents/presentation/session-1-cmc-innovator-industry-presentation-prof-georg-b-kresse\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/presentation/session-1-cmc-innovator-industry-presentation-prof-georg-b-kresse_en.pdf)>.

KUMAR, A. et al. **Defective TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases**. *Science*, [s.l.], v. 278, n° 5343, p. 1630–1632, 1997. ISBN: 9781467350907, ISSN: 00368075, DOI: 10.1126/science.278.5343.1630.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. *Transactions 12th Caribbean Geological Conference, St. Croix, Aug. 7-11, 1989*. Third Edit ed. Baltimore: Springer US, 2006. 1-960 p. ISBN: 9780387312781, ISSN: 0033-4553, DOI: 10.1007/BF02629943.

LÁZÁR-MOLNÁR, E. et al. **Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy**. *EBioMedicine*, [s.l.], v. 17, p. 30–44, 2017. ISBN: 7184302745, ISSN: 23523964, DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.02.004.

LEE, K. H. et al. **Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product**. *mABS*, [s.l.], v. 10, p. 380–396, 2018. DOI:

10.1080/19420862.2018.1433976.

LIM, J. S. J.; SOO, R. A. **Nivolumab in the treatment of metastatic squamous non-small cell lung cancer: a review of the evidence.** *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, [s.l.], v. 10, n° 5, p. 444–454, 2016. ISSN: 1753-4658, DOI: 10.1177/1753465816661091.

LIU, B. et al. **Acid-induced aggregation propensity of nivolumab is dependent on the Fc.** *mAbs*, [s.l.], v. 8, n° 6, p. 1107–1117, 2016. ISBN: 1942-0870 (Electronic)1942-0862 (Linking), ISSN: 19420870, DOI: 10.1080/19420862.2016.1197443.

LIU, Y. et al. **Regulation of arginase I activity and expression by both PD-1 and CTLA-4 on the myeloid-derived suppressor cells.** [s.l.], p. 687–697, 2009. ISBN: 0026200805, DOI: 10.1007/s00262-008-0591-5.

LÓPEZ-MORALES, C. A. et al. **Physicochemical and biological characterization of a biosimilar trastuzumab.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2015, 2015. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2015/427235.

LUSTER, A. D.; LEDER, P. **IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo.** *Journal of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 178, n° 3, p. 1057–1065, 1993. ISBN: 0022-1007 (Print)0022-1007 (Linking), ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1016/j.imlet.2003.10.020.

MARINCOLA, F. M. et al. **Escape of Human Solid Tumors from T-Cell Recognition: Molecular Mechanisms and Functional Significance.** *Advances in Immunology*, [s.l.], v. 74, p. 181–273, 1999. ISBN: 9780120224746, ISSN: 00652776, DOI: 10.1016/S0065-2776(08)60911-6.

MARKET RESEARCH, A. **Biosimilar Market Size, Share and Forecast by Types, 2020.** 2014. Disponível em: <<https://www.alliedmarketresearch.com/global-biosimilars-market>>. Acesso em: 12/mar./18.

MATZINGER, P. **Tolerance, danger, and the extended family** \*. *Annual Review of Immunology*, [s.l.], v. 12, p. 991–1045, 1994.

MENDOZA-MACEDO, K. et al. **Characterization and comparability of biosimilars: A filgrastim case of study and regulatory perspectives for Latin America.** *Electronic Journal of Biotechnology*, [s.l.], v. 24, p. 63–69, 2016. ISBN: 0013-936x, ISSN: 07173458, DOI: 10.1016/j.ejbt.2016.10.003.

MIAO, S. et al. **Physicochemical and Biological Characterization of the Proposed Biosimilar Tocilizumab.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2017, 2017. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2017/4926168.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: [s.n.], 2017. ISBN: 78-85-7318-283-5.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. **Em cinco anos, mais de R\$ 2,1 bilhões foram gastos com ações judiciais.** *Notícia - Ascom SE/UNA-SUS*. 2015. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/noticia/em-cinco-anos-mais-de-r-21-bilhoes-foram-gastos-com-aco-es-judiciais>>. Acesso em: 07/abr./18.

MORA, F. DE. **Biosimilar: What it is not.** *British Journal of Clinical Pharmacology*, [s.l.], v. 80, n° 5, p. 949–956, 2015. ISSN: 13652125, DOI: 10.1111/bcp.12656.

NAKAMURA, M. et al. **Nivolumab in the treatment of malignant melanoma: review of the literature.** *Oncotargets and Therapy*, [s.l.], v. 8, p. 2045–2051, 2015. ISSN: 1178-6930, DOI: 10.2147/OTT.S62102.

NEEL, B. G.; GU, H.; PAO, L. **The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling.** *Trends in Biochemical Sciences*, [s.l.], v. 28, n° 6, p. 284–293, 2003. ISBN: 0968-0004 (Print)n0968-0004 (Linking), ISSN: 09680004, DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00091-4.

NIH, N. C. I. **NCI dictionary of cancer terms: Definition of premature death.** *Dictionary of Cancer Terms*. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/premature-death>>. Acesso em: 11/abr./18.

OKAZAKI, T. et al. **PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 98, n° 24, p. 13866–13871, 2001. ISBN: 0027-8424 (Print)r0027-8424 (Linking), ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.231486598.

OSTRAND-ROSENBERG, S.; HORN, L. A.; HAILE, S. T. **The Programmed Death-1 Immune-Suppressive Pathway: Barrier to Antitumor Immunity.** *The Journal of Immunology*, [s.l.], v. 193, n° 8, p. 3835–3841, 2014. ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1401572.

PACE, J. L. et al. **Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, [s.l.], v. 80, n° 12, p. 3782–3786, 1983. ISBN: 0027-8424 (Print)r0027-8424 (Linking), ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.80.12.3782.

PACHMAYR, E.; TREESE, C.; STEIN, U. **Underlying Mechanisms for Distant Metastasis – Molecular Biology.** *Visc Med*, [s.l.], v. 33, p. 11–20, 2017. DOI: 10.1159/000454696.

PARDOLL, D. M. **The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.** *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 12, n° 4, p. 252–264, 2012. ISBN: 1474-1768 (Electronic)r1474-175X (Linking), ISSN: 1474175X, DOI: 10.1038/nrc3239.

PARK, Y.-J.; KUEN, D.-S.; CHUNG, Y. **Future prospects of immune checkpoint blockade in cancer: from response prediction to overcoming resistance.** *Experimental & Molecular Medicine*, [s.l.], v. 50, n° 8, p. 109, 2018. ISSN: 2092-6413, DOI: 10.1038/s12276-018-0130-1.

PEDOEEM, A. et al. **Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity.** *Clinical Immunology*, [s.l.], v. 153, n° 1, p. 145–152, 2014. ISBN: 1521-7035 (Electronic)r1521-6616 (Linking), ISSN: 15217035, DOI: 10.1016/j.clim.2014.04.010.

PORTOLANO, N. et al. **Recombinant Protein Expression for Structural Biology in HEK 293F Suspension Cells: A Novel and Accessible Approach.** *Journal of Visualized Experiments*, [s.l.], v. 1, n° 92, p. 1–8, 2014. ISBN: 1940-087X, ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/51897.

PROMEGA, C. **pCI-neo Mammalian Expression Vector.** Madison: [s.n.], 2009. Disponível em: <<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/pci-neo-mammalian-expression-vector-protocol.pdf>>. ISBN: 6082744330.

QIN, Z.; BLANKENSTEIN, T. **CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN $\gamma$  receptor expression by nonhematopoietic cells.** *Immunity*, [s.l.], v. 12, n° 6, p. 677–686, 2000. ISBN: 1074-7613, ISSN: 10747613, DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80218-6.

RAMOS, F. R. S. **Expressão e caracterização do fragmento Fab do anticorpo**

**monoclonal humanizado anti-PBP2a de Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA).** 1-105 p. - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, 2019.

RAMSAY, A. G. **Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity.** *British Journal of Haematology*, [s.l.], v. 162, n° 3, p. 313–325, 2013. ISBN: 1365-2141 (Electronic)r0007-1048 (Linking), ISSN: 00071048, DOI: 10.1111/bjh.12380.

RAO, M. et al. **International Journal of Infectious Diseases Anti-PD-1 / PD-L1 therapy for infectious diseases : learning from the cancer paradigm.** *International Journal of Infectious Diseases*, [s.l.], v. 56, p. 221–228, 2017. ISSN: 1201-9712, DOI: 10.1016/j.ijid.2017.01.028.

REICHEL, C.; THEVIS, M. **Gel electrophoretic methods for the analysis of biosimilar pharmaceuticals using the example of recombinant erythropoietin.** *Bioanalysis*, [s.l.], v. 5, n° 5, p. 587–602, 2013. ISBN: 1757-6199 (Electronic)r1757-6180 (Linking), ISSN: 17576180, DOI: 10.4155/bio.13.9.

RIBAS, A. **Adaptive immune resistance: How cancer protects from immune attack.** *Cancer Discovery*, [s.l.], v. 5, n° 9, p. 915–919, 2015. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0563.Adaptive.

ROUSSEY, J. A. et al. **Anti-PD-1 Antibody Treatment Promotes Clearance of Persistent Cryptococcal Lung Infection in Mice.** *The Journal of Immunology*, [s.l.], v. 199, n° 10, p. 3535–3546, 2017. ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1700840.

ROZALI, E. N. et al. **Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression.** *Clinical and Developmental Immunology*, [s.l.], v. 2012, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1155/2012/656340.

SALFELD, J. G. **Isotype selection in antibody engineering.** *Nature Biotechnology*, [s.l.], v. 25, n° 12, p. 1369–1372, 2007.

SALLUSTO, F.; MACKAY, C.; LANZAVECCHIA, A. **The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses.** *Annual Review of Immunology*, [s.l.], v. 18, p. 593–620, 2000. DOI: 10.1146/annurev.physiol.66.032802.155556.

SAMARASINGHE, B. **The Hallmarks of Cancer: 4 – Limitless Replicative Potential.** *Scientific American*. 2015. Disponível em: <<https://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/the-hallmarks-of-cancer-4-limitless-replicative-potential/>>. Acesso em: 08/fev./19.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, [s.l.], v. 1,2 e 3, n° 3rd ed, p. 1–2100, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. **Biochemistry DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174).** [s.l.], v. 74, n° 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS, A. F. et al. **IgG 4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens.** *Journal of allergy and clinical immunology*, [s.l.], v. 135, n° 5, p. 1249–1256, 2015. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.012.

SCHEINBERG, M. A. et al. **Partnership for productive development of biosimilar products: perspectives of access to biological products in the Brazilian market.**

*Einstein (São Paulo)*, [s.l.], v. 16, n° 3, p. 1–6, 2018. ISSN: 2317-6385, DOI: 10.1590/s1679-45082018rw4175.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. **Structure and Function of Immunoglobulins**. *Journal of allergy and clinical immunology*, [s.l.], v. 125, n° 202, p. S41–S52, 2010. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.Structure.

SELA-CULANG, I.; KUNIK, V.; OFRAN, Y. **The structural basis of antibody-antigen recognition**. *Frontiers in Immunology*, [s.l.], v. 4, n° OCT, p. 1–13, 2013. ISBN: 1664-3224 (Electronic)r1664-3224 (Linking), ISSN: 16643224, DOI: 10.3389/fimmu.2013.00302.

SHEPPARD, K. A. et al. **PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 $\zeta$  signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$** . *FEBS Letters*, [s.l.], v. 574, n° 1–3, p. 37–41, 2004. ISBN: 0014-5793 (Print)r0014-5793 (Linking), ISSN: 00145793, DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.083.

SUBEDI, G. P. et al. **High Yield Expression of Recombinant Human Proteins with the Transient Transfection of HEK293 Cells in Suspension**. *Journal of Visualized Experiments*, [s.l.], n° 106, p. 1–10, 2015. ISBN: 1940-087X (Electronic)r1940-087X (Linking), ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/53568.

SULLIVAN, P. M.; DIGRAZIA, L. M. **Analytic characterization of biosimilars**. *American Journal of Health-System Pharmacy*, [s.l.], v. 74, n° 8, p. 568–579, 2017. ISSN: 15352900, DOI: 10.2146/ajhp150971.

TAN, S. et al. **An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab**. *Nature Communications*, [s.l.], v. 8, 2017. ISSN: 20411723, DOI: 10.1038/ncomms14369.

TEIXEIRA, M. **Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico**. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, [s.l.], v. 10, n° 4, p. 664–676, 2007. ISSN: 1415-4714, DOI: 10.1590/S1415-47142007000400008.

THE NOBEL ASSEMBLY AT KAROLINSKA INSTITUTET, N. P. **Discovery of cancer therapy by inhibition of negative immune regulation**. [s.l.]: [s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-medicineprize2018.pdf>>. Acesso em: 02/abr./19.

THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION, T. **Australian Public Assessment Report for nivolumab**. Canberra: [s.n.], 2016. Disponível em: <<https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-nivolumab-160823.pdf>>. ISBN: 2012027083.

THERMO, F. **Expi293 Expression System - BR**. *Mammalian Transient Protein Expression*. 2019. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-expression/mammalian-protein-expression/transient-mammalian-protein-expression/exp293-expression-system.html>>. Acesso em: 19/jan./19.

THERMO, F. S. **Expi293™ Expression System Kit**. *Product catalog*. 2019. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A14635>>. Acesso em: 12/fev./19.

TOPALIAN, S. L. et al. **Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab**. *J Clin Oncol*, [s.l.], v. 32, p. 1020–1030, 2014. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.0105.

TSAI, K. K.; ZARZOSO, I.; DAUD, A. I. **PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, [s.l.], v. 10, p. 3111–3116, 2014. DOI: 10.4161/21645515.2014.983409.

TYKODI, S. S. **PD-1 as an emerging therapeutic target in renal cell carcinoma: Current evidence.** *OncoTargets and Therapy*, [s.l.], v. 7, n° (Tykodi S.S., stykodi@fhcrc.org) Department of Medicine, Division of Medical Oncology, University of Washington, Seattle, WA, United States, p. 1349–1359, 2014. ISBN: 1178-6930, ISSN: 1178-6930, DOI: 10.2147/OTT.S48443.

VASSILIKI, A. B.; CHATTERJEE, P.; LI, L. **Biochemical signaling of PD-1 on T cells and its functional implications.** *Cancer Journal (United States)*, [s.l.], v. 20, n° 4, p. 265–271, 2014. ISBN: 1540-336X (Electronic)r1528-9117 (Linking), ISSN: 1540336X, DOI: 10.1097/PPO.0000000000000059.

WEISE, M. et al. **Biosimilars : the science of extrapolation.** *Blood Journal*, [s.l.], v. 124, n° 22, p. 3191–3197, 2019. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583617.

WHO, W. H. O. **WHO Global Conference on Noncommunicable diseases: Enhancing policy coherence between different spheres of policy making that have a bearing on attaining SDG target 3.4 on NCDs by 2030.** WHO. World Health Organization, 2019. Disponível em: <<http://www.who.int/nmh/events/2017/montevideo/about/en/>>. Acesso em: 23/fev./18.

WINDISCH, J. **Biosimilars versus originators: similarities and differences from development to approval.** *International Journal of Clinical Rheumatology*, [s.l.], v. 10, n° 6, p. 0–0, 2015. ISSN: 1758-4272, DOI: 10.2217/ijr.15.49.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. **Cancer.** WHO. World Health Organization, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 18/fev./18. ISSN: WHO/HTM/GMP/2016.6, DOI: /entity/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html.

WRENSHALL, L. E. et al. **Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans.** *Journal of Leukocyte Biology*, [s.l.], v. 66, n° 3, p. 391–400, 1999. ISBN: 0741-5400 (Print)r0741-5400 (Linking), ISSN: 07415400, DOI: 10.1002/jlb.66.3.391.

WROBLEWSKI, M. S. et al. **Emerging health care issues: follow-on biologic drug competition.** *Federal Trade Commission Report*, [s.l.], n° June, 2009. ISBN: 9781611220766.

YOUNGNAK, P. et al. **Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1.** *ScienceDirect*, [s.l.], v. 307, n° 3, p. 672–677, 2003. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01257-9.

YU, P. et al. **Complementary Role of CD4+ T Cells and Secondary Lymphoid Tissues for Cross-presentation of Tumor Antigen to CD8+ T Cells.** *The Journal of Experimental Medicine*, [s.l.], v. 197, n° 8, p. 985–995, 2003. ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20021804.

ZEE, J. S. V. A. N. D. E. R.; SWIETEN, P. V. A. N.; AALBERSE, R. C. **Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies.** *Clinical & Experimental Immunology*, [s.l.], v. 64, p. 415–422, 1986.

ZHANG, J. X. et al. **The efficacy and safety of nivolumab in the treatment of advanced melanoma: a meta-analysis of clinical trials.** *Onco Targets and Therapy*, [s.l.], v. 9, n° 16-03-16, p. 1571–1578, 2016. DOI: 10.2147/OTT.S96762.

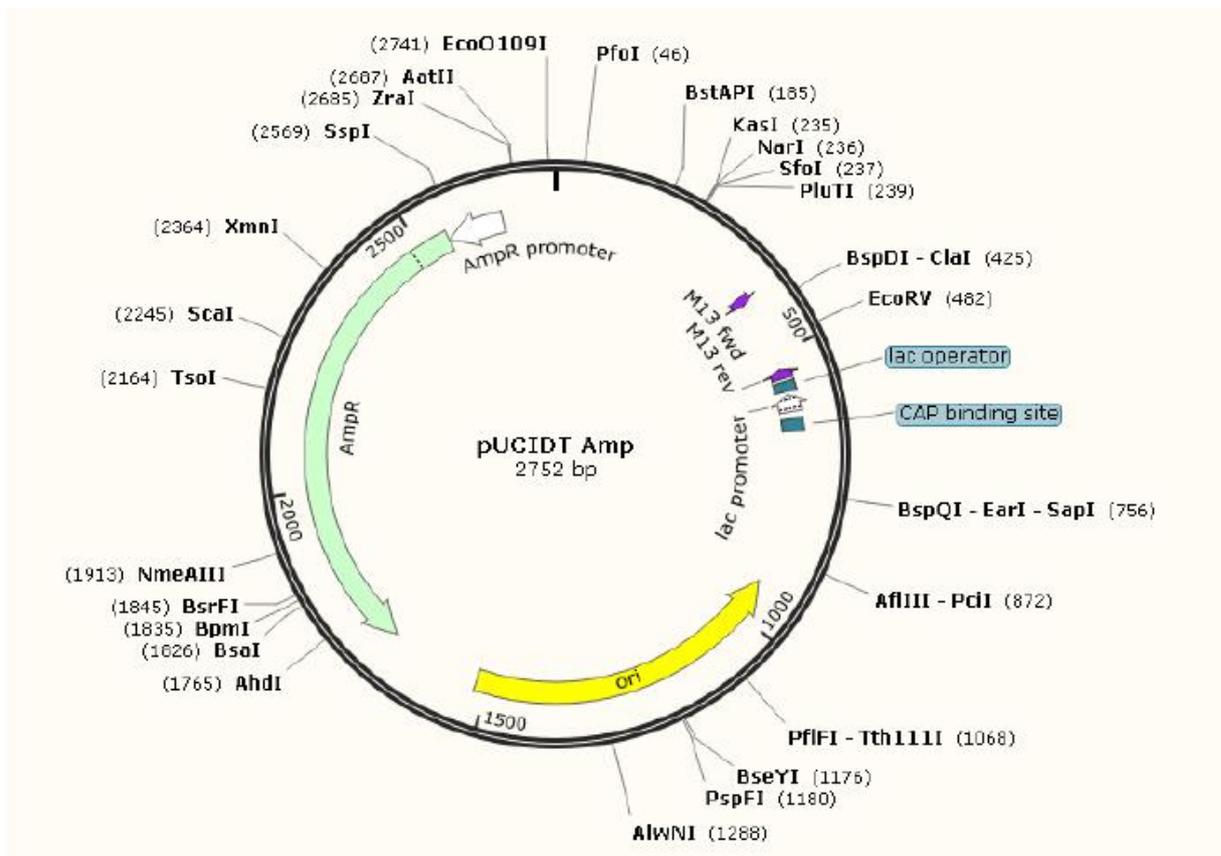
ZOU, W.; CHEN, L. **Inhibitory B7-family molecules in the tumour**

**microenvironment.** *Nature Reviews immunology*, [s.l.], v. 8, n° june, p. 467–477, 2008. DOI: 10.1038/nri2326.

## 9. ANEXOS.

### Anexo 1: Vetor comercial pUCIDT Amp

Vetor comercial enviado pela empresa Integrated DNA Technologies com os genes sintéticos de cadeia leve e de cadeia pesada.



## Anexo 2: Alinhamento com software BLAST® dos genes de cadeia pesada

Alinhamento com software BLAST® entre a sequência do gene de cadeia pesada obtido do clone 1 com a sequência do gene de cadeia pesada sintetizado pela empresa Intregated DNA Technologies. Query – gene de cadeia pesada do anti PD-1 sequenciado. Sbjct – sequência do gene de cadeia pesada sintetizado pela empresa Intregated DNA Technologies.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2556 bits(1384)	0.0	1384/1384(100%)	0/1384(0%)	Plus/Plus
Query 7	GCCACCATGGGCTGGAGCCTGATCCTGCTGTTCTTGGTGGCCGTGGCTACAAGAGTGC	66		
Sbjct 7	GCCACCATGGGCTGGAGCCTGATCCTGCTGTTCTTGGTGGCCGTGGCTACAAGAGTGC	66		
Query 67	TCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCAGGTCTCTGCGG	126		
Sbjct 67	TCTCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGAGTGGTGCAGCCAGGCAGGTCTCTGCGG	126		
Query 127	CTGGACTGCAAGGCCTCCGGCATCACCTTTTCTAACTCCGGAATGCACTGGGTGAGGCAG	186		
Sbjct 127	CTGGACTGCAAGGCCTCCGGCATCACCTTTTCTAACTCCGGAATGCACTGGGTGAGGCAG	186		
Query 187	GCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTGTGATCTGGTACGACGGCAGCAAGCGGTAC	246		
Sbjct 187	GCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCTGTGATCTGGTACGACGGCAGCAAGCGGTAC	246		
Query 247	TATGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACAATCTCTCGCGACAACCTCAAGAATACCCCTG	306		
Sbjct 247	TATGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACAATCTCTCGCGACAACCTCAAGAATACCCCTG	306		
Query 307	TTTCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGTGTACCAAT	366		
Sbjct 307	TTTCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGTGTACCAAT	366		
Query 367	GACGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACAAGGGGACCA	426		
Sbjct 367	GACGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACAAGGGGACCA	426		
Query 427	TCCGTGTTCCCACTGGCTCCATGCAGCCGGTCTACATCCGAGAGCACCCCGCTCTGGGA	486		
Sbjct 427	TCCGTGTTCCCACTGGCTCCATGCAGCCGGTCTACATCCGAGAGCACCCCGCTCTGGGA	486		
Query 487	TGCTGGTGAAGGATTATTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGGAGCTGGAATTTGGCGCCCTG	546		
Sbjct 487	TGCTGGTGAAGGATTATTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGGAGCTGGAATTTGGCGCCCTG	546		
Query 547	ACATCTGGCGTGACACCTTTCTGCTGTGTGCAGTCTTCCGGCCTGTACTCCCTGAGC	606		
Sbjct 547	ACATCTGGCGTGACACCTTTCTGCTGTGTGCAGTCTTCCGGCCTGTACTCCCTGAGC	606		
Query 607	TCTGTGGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACATATACCTGCAACGTGGAC	666		
Sbjct 607	TCTGTGGTGACAGTGCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACATATACCTGCAACGTGGAC	666		
Query 667	CATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCTTGC	726		
Sbjct 667	CATAAGCCTTCCAATACCAAGGTGGATAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGACCACCTTGC	726		
Query 727	CCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAG	786		
Sbjct 727	CCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTTCTGGGAGGACCATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAG	786		
Query 787	CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTG	846		
Sbjct 787	CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACACCTGAGGTGACCTGCGTGGTGGACGTG	846		
Query 847	TCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAAT	906		
Sbjct 847	TCTCAGGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAAT	906		
Query 907	GCTAAGACCAAGCCTAGAGAGGAGCAGTTAACTCCACATACCCGCTGGTGGAGCTGCTG	966		
Sbjct 907	GCTAAGACCAAGCCTAGAGAGGAGCAGTTAACTCCACATACCCGCTGGTGGAGCTGCTG	966		
Query 967	ACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAG	1026		
Sbjct 967	ACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGAAGGTGTCCAATAAG	1026		
Query 1027	GGCCTGCCATCCAGCATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCA	1086		
Sbjct 1027	GGCCTGCCATCCAGCATCGAGAAGACAATCAGCAAGGCTAAGGGACAGCCTAGGGAGCCA	1086		
Query 1087	CAGGTGTACACCTGCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACC	1146		
Sbjct 1087	CAGGTGTACACCTGCCCTTCTCAGGAGGAGATGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACC	1146		

```

Query 1147 TGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAG 1206
Sbjct 1147 TGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCTGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAG 1206
Query 1207 CCCGAGAACAAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTG 1266
Sbjct 1207 CCCGAGAACAAATTACAAGACCACACCACCCGTGCTGGACTCCGATGGCAGCTTCTTTCTG 1266
Query 1267 TATTCAGGCTGACAGTGGATAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTTCTTGCTCC 1326
Sbjct 1267 TATTCAGGCTGACAGTGGATAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTGTTTTCTTGCTCC 1326
Query 1327 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCTCTGTCCTGGGC 1386
Sbjct 1327 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCTCTGTCCTGGGC 1386
Query 1387 AAGT 1390
Sbjct 1387 AAGT 1390

```

### Anexo 3: Alinhamento com software BLAST® dos genes de cadeia leve

Alinhamento com software BLAST® entre a sequência do gene de cadeia leve obtida do clone 4 com a sequência do gene de cadeia leve sintetizada pela empresa Intregated DNA Technologies. Query – gene de cadeia leve do anti PD-1 sequenciado. Sbjct – sequência do gene de cadeia leve sintetizado pela empresa Intregated DNA Technologies.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1321 bits(715)	0.0	715/715(100%)	0/715(0%)	Plus/Plus
Query 7	GCCACCATGGACTTCCAGGTGCAGATCATCTCTTTTCTGCTGATCAGCGCCTCTGTGATC	66		
Sbjct 7	GCCACCATGGACTTCCAGGTGCAGATCATCTCTTTTCTGCTGATCAGCGCCTCTGTGATC	66		
Query 67	ATGTCCAGGGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACACTGTCCCTGAGCCAGGA	126		
Sbjct 67	ATGTCCAGGGGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCTACACTGTCCCTGAGCCAGGA	126		
Query 127	GAGAGGGCCACCCTGTCTGCCGGGCTTCTCAGTCCGTGTCAGCTACCTGGCCTGGTAT	186		
Sbjct 127	GAGAGGGCCACCCTGTCTGCCGGGCTTCTCAGTCCGTGTCAGCTACCTGGCCTGGTAT	186		
Query 187	CAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCAAGGCTGCTGATCTACGATGCCAGCAACAGAGCTACC	246		
Sbjct 187	CAGCAGAAGCCAGGACAGGCTCCAAGGCTGCTGATCTACGATGCCAGCAACAGAGCTACC	246		
Query 247	GGAAATCCCTGCTCGCTTCCAGCGGATCTGGATCCGGCACAGACTTTACCCCTGACAATCTCT	306		
Sbjct 247	GGAAATCCCTGCTCGCTTCCAGCGGATCTGGATCCGGCACAGACTTTACCCCTGACAATCTCT	306		
Query 307	TCCCTGGAGCCCAGGATTTGCCCGTGTACTATTGCCAGCAGAGCTCTAATTGGCCTAGG	366		
Sbjct 307	TCCCTGGAGCCCAGGATTTGCCCGTGTACTATTGCCAGCAGAGCTCTAATTGGCCTAGG	366		
Query 367	ACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCATCCGTGTT	426		
Sbjct 367	ACCTTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCATCCGTGTT	426		
Query 427	ATCTTTCCCCCTAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACAGCCTCTGTGGTGTGCCCTGCTG	486		
Sbjct 427	ATCTTTCCCCCTAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACAGCCTCTGTGGTGTGCCCTGCTG	486		
Query 487	AACAATTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCTCTGCAGAGC	546		
Sbjct 487	AACAATTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGATAACGCTCTGCAGAGC	546		
Query 547	GGCAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTACATATTCCTGTCC	606		
Sbjct 547	GGCAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTACATATTCCTGTCC	606		
Query 607	AGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGGCAGGTG	666		
Sbjct 607	AGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGGCAGGTG	666		
Query 667	ACCCATCAGGGCCTGTCTTCCCAAGTGCAGAAAGTCTTTTAAACAGGGGCGAGTGTT	721		
Sbjct 667	ACCCATCAGGGCCTGTCTTCCCAAGTGCAGAAAGTCTTTTAAACAGGGGCGAGTGTT	721		

#### Anexo 4. Lista de anticorpos Anti-PD-1 aprovados pelo FDA que interferem na via PD-1

**Quadro 9.1: Anticorpos monoclonais terapêuticos que interferem na via de sinalização do receptor PD-1, aprovados pelo FDA para o tratamento de câncer.**  
**Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos de DRUGS.COM (2018) e \* lista de preços ao consumidor, com preço de fábrica (ICMS 12%), da AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2018, p.63, 316, 486, 533).**

Medicamento	Alvo	Nome genérico	Aprovação FDA	Indicações aprovadas pela FDA	*Preço outubro/2018
Opdivo® (Bristol-Myers Squibb)	PD-1	Nivolumabe	2014	Melanoma (câncer de pele), câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de bexiga, câncer de fígado, câncer de rim, câncer de células escamosas da cabeça e pescoço, câncer de colón e reto, lymphoma de Hodgkin's clássico e carcinoma urotelial	US \$2,705.56 BR R\$7.432,23 Frasco-ampola x 10mL
Keytruda® (Merck Sharp & Dohme)	PD-1	Pembrolizumabe	2014	Melanoma metastático, certos tipos de câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de cabeça e pescoço, lymphoma de Hodgkin's clássico, certo tipo de câncer da bexiga e do trato urinário, um tipo de câncer em que o teste de laboratório revele ser um tumor sólido com deficiência de reparo de incompatibilidade ou por auto grau de instabilidade de microssatélite	US \$2,295.30 BR R\$13.378,03 Frasco-ampola x 4mL
Tecentriq® (Roche/Genentech, Inc.)	PD-L1	Atezolizumabe	2016	Câncer da bexiga metastático ou que não pode ser removido por cirurgia, câncer de pulmão de células não pequenas que se espalhou para outras partes do corpo	US \$9,142.83 BR R\$22.471,68 Frasco-ampola x 20mL
Bavencio® (Pfizer Inc./ EMD Serono, Inc.)	PD-L1	Avelumabe	2017	Câncer de pele metastático (carcinoma de células de Merkel), câncer da bexiga ou do trato urinário metastático ou que não pode ser removido cirurgicamente	US \$1,602.29 BR *não consta Frasco-ampola x 10mL
Imfinzi® (AstraZeneca)	PD-L1	Durvalumabe	2017	Câncer de bexiga ou trato urinário, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), ou canceres que não podem ser removidos com cirurgia ou não respondem a quimioterapia com outros medicamentos	US \$3,640.44 BR R\$11.146,75 Frasco-ampola x 10mL

## Anexo 5. Ensaios que avaliaram o emprego do Nivolumabe para o tratamento de câncer de pulmão

Tabela 9.1: Ensaios clínicos de Nivolumabe para o tratamento de câncer de pulmão de células escamosas (SCC). Fonte: Adaptado de LIM; SOO (2016, p.447). IC 95% – Intervalo de confiança de 95%; NA – não disponível; SCC – carcinoma de células escamosas (do inglês squamous cell carcinoma).

Fase	Autor	Linha de tratamento	Tamanho da amostra	Taxa de resposta objetiva (%)	Braço controle	Sobrevida livre de progressão (meses) IC 95%	Sobrevida global (meses) IC 95%	Limitações
I	Topalian NEJM2012 [Topalian et al. 2012], Gettinger JCO2015 [Gettinger et al. 2015]	2ª Linha e outras linhas	54	16,7	Eficácia e segurança (0,3 a 10 mg/kg)	NA	9.2 (7.3–12.5)	Amostra pequena Múltiplas linhas de tratamento
I	Gettinger ASCO2015 [Gettinger et al. 2015]	1ª linha	13	15	Eficácia e segurança (0,3 a 10 mg/kg)	NA	18.2 (IC não relatado)	Amostra pequena Somente primeira linha
II (Checkmate 063)	Rizvi Lancet 2015 [Rizvi et al. 2015]	3ª Linha e outras linhas	117	14,5	Braço único 3mg/kg cada 2 semanas	1,9 (1,8-3,2)	8.2 (6.1–10.9)	População fortemente pré-tratada, com 20,5% dos pacientes com 4 ou mais linhas de tratamento prévio
II (ONO-4538-050)	Nakagawa JTO2015 [Nakagawa et al. 2015]	2ª Linha e outras linhas	35	25,7	Braço único 3mg/kg até progressão/toxicidade	4,2 (1,5-7,1)	Não alcançado (12.4 – não alcançado)	Resultados preliminares Amostra pequena População asiática Múltiplas linhas de tratamento
II (Checkmate 153)	Hussein WLCC2015 [Hussein et al. 2015]	2ª Linha ou mais linhas	145	13	1 ano de Nivolumabe x Nivolumabe contínuo	NA	NA	Resultados preliminares Múltiplas linhas de tratamento
III (Checkmate 017)	Brahmer NEJM2015 [Brahmer et al. 2015]	2ª Linha	272	20	Docetaxel	3,5 (2,1-4,9)	9.2 (7.3–13.3)	Análise retrospectiva da expressão de PD-L1 Regimes como docetaxel + ramucirumabe é superior

## Anexo 6. Ensaios que avaliaram a combinação de Nivolumabe com outras terapias para o tratamento de câncer

**Tabela 9.2: Estudos de combinação de Nivolumabe em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC). Fonte: Adaptado de LIM; SOO (2016, p.448). EGFR - receptor do fator de crescimento epidérmico; NA - não disponível; NR - não relatado.**

Fase	Autor	Linha de tratamento	Tamanho da amostra	Taxa de resposta objetiva (%) (faixa)	Sobrevida livre de progressão (meses) (faixa)	Sobrevida global (meses) (faixa)
I	Antonia [Antonia et al. 2014a]	1ª Linha com quimioterapia	56	33–57	4.1–6.1	50.5–NR
I	Rizvi [Rizvi et al. 2014]	EGFR+ nivolumabe resistente + erlotinib	21	19	NA	NA
I	Antonia [Antonia et al. 2014b]	2ª Linha com ipilimumabe	148	13–39	4.9–10.6	NR