

B11 Clonagem e expressão de anticorpo monoclonal anti-CD20 recombinante: primeiros passos para desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos contra o câncer

Vinicius da Cunha Lisboa¹, Eneida Almeida Santos¹, Maria da Glória Martins Teixeira¹, Carlos Otávio Vianna¹, Aline Almeida-Oliveira¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: O Linfoma não-Hodgking (LNH) é uma neoplasia maligna que acomete os linfócitos B, sendo a segunda doença hematológica maligna mais frequente. Entre todas as neoplasias no Brasil é a décima primeira e, segundo o Instituto Nacional de Câncer existe a estimativa de 9079 casos para o ano de 2014. Além da quimioterapia convencional, a utilização de anticorpos monoclonais como tratamento contra o câncer vem sendo amplamente empregada. Em 1997, o FDA aprovou o primeiro medicamento composto por anticorpo monoclonal para o tratamento de LNH, o Rituximab (Mabthera), que revolucionou a terapia desta doença. O alvo molecular é a proteína CD20, que é expressa na membrana plasmática de quase todas as células B, inclusive linfócitos B tumorais. Atualmente, por conta do fim da vigência da patente do Rituximab, novos anticorpos anti-CD20 estão sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica deste biofármaco.

Objetivo: Realizar clonagem e expressão das sequências de cadeias leve e pesada do Rituximab, a partir da sequência adquirida comercialmente, a fim de padronizar metodologia para posteriores ensaios com uma nova molécula produzida a partir do Rituximab.

Metodologia: Os genes do Rituximab foram sintetizados e clonados nos plasmídeos pDTSmart (cadeia leve) e pUCIDT (cadeia pesada). Após digestão enzimática sítio específica, os insertos foram subclonados no plasmídeo comercial pCDNA3, específico para expressão em células de mamíferos. Sequenciamento nucleotídico para confirmação das sequências gênicas. Para transfecção transitória em células da linhagem HEK 293T, utilizou-se o método FuGene (Roche). A primeira análise do sobrenadante da cultura de células foi feita pelo teste imunoenzimático ELISA.

Resultados: As digestões enzimáticas revelaram que os insertos correspondentes à sequência do Rituximab, apresentavam o tamanho esperado (1400pb para a cadeia pesada e 726pb para a cadeia leve), quando comparados ao padrão de peso molecular. O sequenciamento nucleotídico confirmou a sequência gênica dos insertos. A análise do sobrenadante, pelo método de ELISA das culturas de HEK 293T transfectadas, revelou uma concentração de aproximadamente 10ng/mL de anticorpo.

Conclusão: A metodologia utilizada se mostrou eficaz na expressão e detecção do anticorpo recombinante, sendo uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais contra o câncer a partir do Rituximab.

Palavras-Chave: Anticorpo Monoclonal Quimérico, Linfoma