

B16 - DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE EXPRESSÃO EM PLATAFORMA DE CÉLULA EUCARIOTA PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RECOMBINANTES

Luis Vidal Conde¹, Anna Erika Vieira de Araújo¹, Lucas de Almeida Machado¹, Priscila Muniz da Paz², Hilton Jorge Nascimento², Jose Godinho da Silva Junior², José Procópio Moreno Senna¹. ¹

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), Programa de Biofármacos. ²Laboratório de Macromoléculas (LAMAM).

INTRODUÇÃO: A tecnologia de hibridomas (Köhler e Milstein, 1975) foi muito utilizada nas últimas décadas para produzir anticorpos monoclonais (AcMs) a partir de clones originados da fusão entre células B murinas e células de mieloma. Porém, esta técnica apresenta limitações para a produção de AcMs para uso terapêutico, principalmente pela resposta imune do hospedeiro contra as imunoglobulinas murinas. Uma alternativa consiste em produzir anticorpos recombinantes (quimeras ou humanizados) em células eucariotas. Para o estabelecimento deste sistema, utilizou-se como modelo um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer e neutralizar cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA).

OBJETIVO: Desenvolver um sistema de expressão de anticorpos monoclonais recombinantes em plataforma de célula eucariota empregando como modelo anticorpos monoclonais anti-MRSA.

METODOLOGIA: A partir do RNA de um hibridoma murino produtor de anticorpo anti-MRSA (desenvolvido previamente no laboratório), foram sintetizadas as sequências de DNA codificante das regiões variáveis de IgG (VHH -*variable heavy chain* e VLH -*variable light chain*). As sequências foram clonadas em plasmídeos (pAG4622 e pAH4604) que permitem expressar as regiões variáveis clonadas junto com regiões constantes de IgG1, sob o controle de um promotor de cadeia pesada murino. Células de mieloma murino (NS0) foram transfectadas por eletroporação e semeadas em placas de 96 poços, dentre os quais foram selecionados os poços com colônias únicas e resistentes a altas concentrações de L-histidinol. Os clones com maior concentração de IgG₁ (ELISA) nos sobrenadantes de cultivos foram selecionados para gerar um banco celular de trabalho

e posteriormente re-avaliados em garrafas T25 (batelada simples) usando meio DMEM LG/F12 10 % SFB para seleção do melhor clone produtor de IgG₁. A afinidade do anticorpo pela bactéria foi avaliada por ensaio do tipo ELISA indireto. O anticorpo foi purificado a partir de sobrenadantes de cultivo em sistemas estáticos T175 por cromatografia de afinidade à proteína A (MabSelectSure™ - GE) e concentrado por unidades filtrantes Amicon® MWCO 10 kDa. Amostras de anticorpo purificado foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e focalização isoelétrica (IEF – PAGE).

RESULTADOS: Foram analisados 60 clones com colônia única e resistentes a L-histidinol, dos quais 10 apresentaram títulos de IgG₁ acima de 100 ng mL⁻¹. Todos os clones apresentaram afinidade pelo alvo, entre estes se selecionou o melhor clone produtor (K4F2) com título de IgG₁ de 3422 ± 717 ng mL⁻¹. O anticorpo purificado apresentou um peso molecular de 149 kDa e 2 isoformas com pIs 8,64 e 8,57.

CONCLUSÃO: O sistema de expressão empregando célula eucariota possibilitou obter um clone NS0 produtor de anticorpo anti-MRSA em sistemas estáticos e purificá-lo por cromatografia de afinidade. O anticorpo demonstrou ter afinidade pela proteína alvo o que permitirá avaliar a eficácia terapêutica em ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro*.