

## **B19 - DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS ANTI-PBP2a DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA (MRSA) PARA OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS F(ab')<sub>2</sub>**

Anna Erika Vieira de Araujo<sup>1</sup>, Natália Plínio de Souza<sup>1</sup>, Luis Vidal Conde<sup>1</sup>, Lucas Almeida Machado<sup>1</sup>, Álvaro Paiva Braga de Sousa<sup>1</sup>, José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Programa de Biofármacos Laboratório de Tecnologia Recombinante, Rio de Janeiro, Brasil.

**INTRODUÇÃO:** Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) são um problema de saúde mundial, especialmente devido à dificuldade de tratamento, alto grau de virulência e elevada morbidade associada. Por ser uma bactéria multirresistente, estratégias alternativas de tratamento têm sido pesquisadas, como, por exemplo, imunoterapias passiva e ativa, porém até agora nenhuma obteve sucesso. Diante desse quadro, Bio-Manguinhos vem desenvolvendo um anticorpo monoclonal para o tratamento de infecções causadas por MRSA tendo como alvo a PBP2a, uma proteína de baixíssima afinidade por  $\beta$ -lactâmicos encontrada exclusivamente em cepas de MRSA. Fragmentos de anticorpos, contendo apenas as duas porções Fab', são descritos na literatura como ferramentas imunoquímicas, reagentes de diagnóstico e terapêutica, apresentando uma farmacocinética mais rápida, menor imunogenicidade e maior poder de penetração em tecidos quando comparados à IgG.

**OBJETIVOS:** Digestão enzimática de anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2a por papaína e pepsina para a obtenção de fragmento F(ab')<sub>2</sub> e avaliação da afinidade à PBP2a do fragmento F(ab')<sub>2</sub> por ensaios imunoenzimáticos.

**METODOLOGIA:** Para otimizar a obtenção dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> por digestão enzimática com papaína e pepsina, foram testadas diversas variáveis, como diferentes proporções enzima/anticorpo, variabilidade nos tempos de digestão e uso de inibidor de proteases (PMSF, para a papaína). As frações F(ab')<sub>2</sub> obtidas foram purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando resinas de Proteína A, como a MabSelectSure (GE) e concentradas por unidades filtrantes Amicon<sup>®</sup> MWCO 50 kDa. As amostras de

anticorpo digerido e suas frações foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência de agente redutor. Para avaliar a afinidade do fragmento F(ab')<sub>2</sub> pela PBP2a foram realizados ensaios imunoenzimáticos, como ELISA do tipo indireto e *Western Blot*.

**RESULTADOS:** A análise dos SDS-PAGE indicaram que foi possível a obtenção e o isolamento de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> por digestão com papaína e pepsina (banda de aproximadamente 110 kDa), nas proporções de 1:10 (enzima/anticorpo, p/p) por 30 minutos e com uso de PMSF, para a digestão com a papaína. A digestão com a pepsina apresentou melhor produção de F(ab')<sub>2</sub> com melhor rendimento (74%, enquanto que a digestão com a papaína obteve 56%). Os ensaios de ELISA e *Blot* demonstraram que os F(ab')<sub>2</sub> não perderam afinidade pela PBP2a, apresentando perfil semelhante ao da IgG, mesmo após o processo de digestão enzimática com pepsina e papaína.

**CONCLUSÃO:** Foi possível obter o fragmento F(ab')<sub>2</sub> por digestão enzimática e isolá-lo por cromatografia de afinidade e ultrafiltração. Tal fragmento apresentou afinidade à PBP2a de forma semelhante à IgG, demonstrando que o processo de digestão enzimática não foi capaz de alterar esse parâmetro.