

Título: Expressão e caracterização do fragmento Fab do anticorpo monoclonal humanizado anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Autor: Felipe Rodrigues Semcovici Ramos

RESUMO

As infecções por bactérias multirresistentes a antibióticos são um problema de saúde pública de dimensão global que vêm adquirindo considerável importância em termos de disseminação, impactos sobre índices epidemiológicos, aumento do tempo de internação hospitalar e dos custos para o cuidado em saúde. O insucesso das terapias antimicrobianas tradicionais tem trazido sérias consequências sobre o desfecho do tratamento de infecções e na realização de procedimentos cirúrgicos invasivos. Dentre as bactérias multirresistentes, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) é um dos principais agentes associados a infecções em ambientes hospitalares e comunitários. Os crescentes relatos epidemiológicos de circulação e infecções provocadas por MRSA demonstram a importância do desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico e tratamento de infecções por este micro-organismo. Neste contexto, os imunobiológicos se apresentam como ferramenta com grande potencial de aplicação, dada a sua reduzida capacidade de induzir resistência microbiana e a sua alta especificidade para determinantes antigênicos de interesse. Nas cepas de MRSA, o principal fator de resistência é uma proteína conhecida como proteína de ligação à penicilina 2A (PBP2a), uma transpeptidase multimodular que atua na etapa de formação da ligação peptídica cruzada entre os aminoácidos que compõem o peptidoglicano da parede celular. As características da PBP2a conferem propriedades atrativas como alvo antigênico para o desenvolvimento de imunobiológicos. Este trabalho descreve o desenvolvimento de um fragmento recombinante Fab de anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra a proteína PBP2a, para aplicações em imunoterapia e no diagnóstico *in situ* de focos infecciosos provocados por MRSA. As sequências genéticas das cadeias leve e Fd para produção do Fab anti-PBP2a foram amplificadas e ligadas a diferentes vetores de expressão em células eucarióticas. As construções obtidas foram utilizadas para transfectar células do sistema de cultivo EXPI293F, a fim de se expressar a proteína de interesse. O sobrenadante do cultivo foi submetido a análise por ELISA e *Western Blot* para confirmação da expressão do Fab e determinação do ponto ideal de coleta do material. Diferentes metodologias de purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica foram avaliadas para isolamento do fragmento de anticorpo expresso a partir do sobrenadante do meio de cultivo, seguido da avaliação da capacidade de reconhecimento e interação com o alvo antigênico isolado e na superfície celular do MRSA. A execução da abordagem experimental permitiu a obtenção de níveis de expressão de 0,8 mg/mL de Fab no sistema de células EXPI293F transfectadas com as construções genéticas em vetor pCDNA3.4. As diferentes abordagens cromatográficas testadas permitiram identificar uma técnica de isolamento do Fab com considerável rendimento e homogeneidade, baseada na captura de cadeia leve do tipo *kappa*. Os ensaios de ligação do Fab anti-PBP2a ao seu alvo antigênico, isoladamente e na superfície celular bacteriana, demonstraram a capacidade deste fragmento

de anticorpo reconhecer e interagir com a proteína PBP2a. Diante dos resultados obtidos, verifica-se uma perspectiva de continuidade de avaliação do Fab anti-PBP2a, a fim de determinar sua atividade neutralizante e posteriores aplicações para imunoterapia e radioimunodiagnóstico *in situ* de pacientes acometidos por infecções com MRSA.