

**Título: Obtenção de anticorpos monoclonais humanizados anti-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) empregando o sistema de expressão transitória EXPI293™ e avaliação da sua reatividade à proteína PBP2a**

**Autora: Ana Caroline Cavalcante de Araújo**

## **RESUMO**

A partir do surgimento dos antibióticos, a utilização indiscriminada desses produtos aumentou significativamente, o que resultou numa propagação global de cepas bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos. As infecções causadas por *S. aureus* sempre despertaram interesse no âmbito mundial, por sua alta incidência, taxa de mortalidade e os altos custos relacionados ao seu tratamento. Com o surgimento de cepas MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*), resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos e a diversas classes de antibióticos, assegurar um tratamento adequado e eficaz se tornou um problema ainda mais complexo. A resistência das cepas MRSA é resultado da produção da PBP2a, uma enzima transpeptidase extra, que apresenta afinidade muito baixa aos  $\beta$ -lactâmicos. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos desenvolveu um anticorpo monoclonal murino anti-PBP2a que demonstrou bons resultados de redução da carga bacteriana *in vitro* e de proteção *in vivo*, desta maneira, a utilização desta proteína, específica de cepas resistentes, como alvo terapêutico se mostrou um caminho promissor ao combate dessas infecções. O AcM murino foi submetido ao processo de humanização por CDR *grafting*, realizado pelo CIM (Cuba) e posterior identificação de epítomos imunogênicos e “desarme” (*detoping*) destes, realizado pela empresa Abzena. Três diferentes anticorpos monoclonais, Abzena 1, Abzena 2 e Cimab foram expressos em sistema de expressão transiente, em células Expi293T™ (Thermo Fischer Scientific). As três construções de anticorpos presentes em sobrenadantes demonstraram ser capazes de reconhecer e se ligar à PBP2a recombinante e nativa, presente em lisados de MRSA, e também mostraram reconhecer a PBP5 recombinante, uma proteína homóloga à PBP2a presente em *Enterococcus* spp. Esses anticorpos foram purificados do sobrenadante através de cromatografia de afinidade pela proteína A. Ensaios de ELISA sugerem que o AcM Abzena 1 possui maior afinidade à PBP2a e o Abzena 2 à PBP5. Ensaios de Citometria de Fluxo e Imunofluorescência confirmaram que os AcMs se ligam à PBP2a na superfície bacteriana de MRSA. Através de ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície foi demonstrado que a construção Abzena 1 apresenta taxas de associação/dissociação equivalentes as do AcM murino (PBP2a), e que esse AcM também foi capaz de se ligar à PBP5, embora seja uma ligação mais fraca. Através de um ensaio *in vitro*, observou-se que a construção Abzena 1 foi capaz de reduzir a quantidade de bactérias em um sistema fechado (anticorpo e bactéria incubados em meio de cultivo). Adicionalmente, foi realizado um ensaio profilático utilizando AcM murino, humanizado Abzena 1 e fragmentos de AcM murino, o qual mostrou que o AcM humanizado confere proteção *in vivo* similar à proteção conferida por fragmentos de anticorpos murinos. Ensaios posteriores com as três construções deverão ser realizados para confirmar a atividade *in*

*vitro* e *in vivo* destes AcMs contra cepas MRSA e *Enterococcus* portadores de PBP5.