

BIO.04 - Expressão transiente e caracterização de construções biossimilar e *biobetter* do rituximabe

Ana Beatriz Teixeira Frederico^{1*}; Maria da Glória Martins Teixeira¹; Eneida Almeida Santos¹; Carlos Otávio Alves Vianna¹; Martín Hernán Bonamino²; Aline de Almeida Oliveira¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;
2VPPCB/Fiocruz.

Introdução:

O rituximabe (anti-CD20) foi o primeiro anticorpo monoclonal (mAb) terapêutico aprovado contra o câncer. A partir deste sucesso, diversos mAbs foram aprovados para o tratamento de câncer aumentando a sobrevida. Entretanto, um grande número de pacientes não responde (cerca de 70%). Portanto, existe uma necessidade de melhorar a atividade biológica destes mAbs, através do desenvolvimento dos chamados “*biobetters*”, que são anticorpos que possuem a mesma especificidade do produto original, mas apresentam alteração na molécula para melhorar o seu desempenho terapêutico. Um ligante do receptor NKG2D (NKG2DL) foi selecionado como alvo para o desenvolvimento de um *biobetter*. Este receptor é expresso em células NK e linfócitos T, portanto, os NKG2DLs ativam a resposta celular tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Assim, representam um alvo terapêutico promissor para melhorar a resposta celular dependente de anticorpos (ADCC), que é um dos efeitos biológicos mais relevantes para os mAbs antitumorais. Futuramente, esses anticorpos serão analisados quanto à sua funcionalidade através de ensaios de atividade biológica.

Objetivo:

Expressar de forma transiente, purificar e caracterizar os anticorpos monoclonais anti-CD20, biossimilar e *biobetter*, obtidos em Bio-Manguinhos.

Metodologia:

A partir da sequência nucleotídica do rituximab descrita na patente foram sintetizados três genes: um biossimilar e dois *biobetters* adicionados do NKG2DL (um com adição na porção N-terminal da cadeia pesada e o outro na porção C-terminal). Os genes sintetizados de cadeia leve e pesada foram subclonados

em vetor pcDNA3 (Invitrogen), para expressão em células de mamíferos. Após confirmação das sequências gênicas (por sequenciamento nucleotídico), foram realizados os ensaios de transfecção utilizando o Sistema Expi293F (Expi293 Expression System Kit). Os sobrenadantes foram purificados utilizando-se cromatografia de alta afinidade com coluna HiTrap MabSelect SuRe. O material purificado e sobrenadantes obtidos nas transfecções foram avaliados por ELISA para a identificação e quantificação das construções e para detecção da presença do ligante. Para quantificação, também foi utilizada espectrometria (Nanodrop 1000). Os ensaios de SDS-PAGE e *Western Blot* foram empregados para avaliar a integridade da molécula.

Resultado:

O Sistema Expi293F proporcionou rendimento médio de 0,120 mg/mL para as avaliações de caracterização. Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA e *Western Blot*, sugerem a correta expressão das construções, com expressão de cadeia leve e pesada e a presença do ligante. Nos ensaios de SDS-PAGE e de *Western Blot* foi observado que as cadeias leves e pesadas do biossimilar são semelhantes ao rituximab comercial, já os *biobetters* apresentaram um pequeno aumento no peso molecular da cadeia pesada, conforme o esperado, devido à presença do ligante.

Conclusão:

Este estudo mostrou que o Sistema de expressão Expi293F apresenta rendimento satisfatório para análises de caracterização de anticorpos recombinantes. As construções de anticorpos obtidas se mostraram estruturalmente corretas durante as análises de caracterização.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal; anti-CD20; expressão de anticorpos