

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA: FISIOPATOLOGIA E  
TOXICOLOGIA  
ÁREA DE FISIOPATOLOGIA

Izabella de Macedo Henrique

Desenvolvimento da reação sítio-específica de PEGuilação do FabC11:Stx1/Stx2

São Paulo

2023

## RESUMO

HENRIQUE, Izabella de Macedo. **Desenvolvimento da reação sítio- específica de PEGuilação do FabC11:Stx1/Stx2**. 2023. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) é de grande interesse médico pois sua infecção, em casos mais graves, pode levar ao desenvolvimento de síndrome hemolítica-urêmica (SHU). A SHU associada a STEC ocorre quando a toxina de Shiga (Stx) infiltra o organismo até alcançar os rins, onde se liga a receptores Gb<sub>3</sub> e causa os três sintomas clínicos clássicos da doença: microangiopatia, trombocitopenia e insuficiência renal. As terapias atuais para SHU auxiliam na redução dos sintomas, mas não são específicas para o combate da Stx. Neste trabalho, foi realizada a modificação do anticorpo FabC11:Stx1/Stx2 por PEGuilação no intuito de aprimorar a farmacocinética desse candidato a biofármaco que demonstrou uma meia-vida curta em estudos anteriores. Foram testadas a PEGuilação com PEG-mal 20 e 40 kDa ao anticorpo por meio de um resíduo de cisteína presente no C-terminal do FabC11:Stx1/Stx2. O anticorpo foi produzido por *E. coli* BL21, um estudo do cultivo em agitador orbital foi realizado e a utilização de meio *terrific broth* com adição de 5 g/L de glicose ocasionou o aumento de 58% da produtividade de proteína de interesse expressa após a indução. Para de reação de PEGuilação, o Fab foi reduzido com 0,1 mM de TCEP, as pontes de dissulfeto foram reconstituídas por 24 h e a conjugação ocorreu na proporção de 1:15 (Fab:PEG). A purificação foi realizada por troca catiônica em tampão MES (10 mM) pH 6,7 e gradiente de NaCl de 1M. O rendimento final do FabC11:Stx1/Stx2 monoPEGuilado foi de 58%. A caracterização por dicróismo circular mostrou ligeira alteração, de cerca de 1%, das estruturas secundárias. Os testes *in vitro* demonstraram que o anticorpo manteve a atividade funcional após a conjugação. Assim, os resultados indicam exíguas mudanças do FabC11:Stx1/Stx2 após a conjugação.

Palavras-chave: monoPEGuilação, Anticorpo monoclonal, Toxina de Shiga, SHU, Bioconjugação.