

Universidade Federal do Ceará
Unidade Multiusuário NPDM

Desenvolvimento de fragmentos de anticorpos para aplicação na imunoterapia e terapia celular

1. Informações do Projeto

Proponente: GILVAN PESSOA FURTADO

CPF: 05486311664

Comitê de Ética: Não foi submetido a nenhum comitê

2. Descrição

Os diversos tipos de câncer estão entre as doenças que mais afetam a população mundial, sendo que, em muitos deles, não existem tratamentos eficazes e, portanto, a busca por novas drogas e agentes antitumorais têm sido o maior desafio da indústria farmacêutica. Diante disso, a imunoterapia tem surgido como uma abordagem promissora no tratamento de diversas neoplasias, estratégia em que o sistema imune do próprio paciente é artificialmente estimulado a responder contra as células malignas que podem representar uma ameaça. Recentemente, a utilização de células T engenheiradas para expressar Receptores de Antígenos Quiméricos (CARs) tem demonstrado excelente resposta clínica, especialmente no tratamento de neoplasias hematológicas. A imunoterapia com CAR-T-cells envolve a tecnologia de transferência gênica, em que os linfócitos T do paciente são retirados e modificados, sendo a região de reconhecimento do antígeno substituída por um fragmento de um anticorpo específico para o alvo tumoral, aumentando o potencial citotóxico dessas células e levando a morte das células malignas. O principal formato utilizado para esse fim são os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) e para garantir o sucesso do tratamento, o fragmento do anticorpo utilizado deve possuir alta especificidade para o marcador tumoral, a fim de evitar off-targets e uma afinidade ideal, capaz de gerar uma ativação correta dos linfócitos. Assim, o desenvolvimento do scFv é uma etapa fundamental no processo da imunoterapia celular e abordagens modernas de engenharia de proteínas podem ser usadas para desenvolver o fragmento ideal. Este trabalho propõe a obtenção de fragmentos de anticorpos do tipo scFv que apresentem diferentes afinidades por marcadores tumorais expressos na superfície de células B em linfomas e que tem sido alvo para diversas construções de CAR. Para isso será utilizado uma abordagem que utiliza análises de simulação de dinâmica molecular para proposição de mutações que promovam a melhor interação do anticorpo, com seu antígeno. A capacidade dos scFv selecionados de promover atividade citotóxica e ativação linfocitária será avaliada por ensaios de ELISA, citometria de fluxo e kits para dosagem de citocinas, marcadores de superfície celular e ativação de fatores de transcrição. As células a serem usadas nos ensaios serão provenientes de linhagens estabelecidas, como Jurkat, Raji e K562. Os scFv serão expressos de forma recombinante em linhagem de Escherichia coli comercial (Shuffle), utilizando plasmídeo pET28a que insere uma cauda de histidina (His-tag) na porção N-terminal da proteína, possibilitando sua posterior purificação usando cromatografia de afinidade em resina de níquel. Um passo adicional de purificação será feito em coluna cromatográfica de gel-filtração, garantindo a obtenção de proteínas com alto grau de pureza e sem a presença de ácidos nucleicos provenientes do organismo usado na expressão, uma vez que além dos passos de purificação já descritos, é sabido que ácidos nucleicos são degradados durante o processo de sonicação, usado na etapa de lise celular. Por fim, importante ressaltar que todas etapas envolvendo a expressão e purificação de proteínas recombinantes serão realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do NPDM, que

possui Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) no 102/99, processo nº: 01250.030106/2018-96.

3. Justificativa de Uso

A Fiocruz Ceará atua no estado desde 2009, e em 2018, inaugurou sua sede que fica na cidade de Eusébio. O núcleo promove o intercâmbio de profissionais e iniciativas para a estruturação de suas ações na região. Enquanto a sede administrativa já está em plena atividade, o uso das instalações laboratoriais está previsto para segundo semestre de 2020. Enquanto isso, colaborações foram firmadas com instituições de pesquisa públicas e privadas do Estado, dentre as quais, destacamos a parceria com a Universidade Federal do Ceará. Desta forma, a utilização da unidade multiusuário é de fundamental importância para continuidade das pesquisas em andamento e fortalecimento do processo de colaboração com os grupos de pesquisa do NPDM.

4. Participantes do Projeto

Participante 1

Nome: Gilvan Pessoa Furtado

Email: gilvan.furtado@fiocruz.br

Participante 2

Nome: Ludmilla Freire Caetano

Email: ludmillafbiotecnologia@gmail.com

Participante 3

Nome: Marcus Rafael Lobo Bezerra

Email: rafael.lobobezerra@gmail.com

Participante 4

Nome: Larissa Queiroz Pontes

Email: lariqbiotec@gmail.com

Participante 5

Nome: Daniel Pascoalino Pinheiro

Email: danielpascoalino@gmail.com