

Universidade Federal do Ceará
Unidade Multiusuário NPDM

**Desenvolvimento de novas variantes de enzimas L-asparaginase com
baixo potencial imunogênico**

1. Informações do Projeto

Proponente: GILVAN PESSOA FURTADO

CPF: 05486311664

Comitê de Ética: Não foi submetido a nenhum comitê

2. Descrição

A L-asparaginase (L-ASNase) é uma proteína terapêutica utilizada na quimioterapia da Leucemia Linfóide Aguda, atuando na depleção de asparagina sérica, imprescindível na proliferação de células tumorais. A maior fonte produtiva dessa proteína são bactérias, sendo as principais formulações disponíveis originadas de *Erwinia chrysanthemii* e *Escherichia coli*. Apesar de sua eficácia terapêutica, reações de hipersensibilidade são relatadas durante o tratamento com a enzima, dentre outras causas, pela presença de epítomos imunogênicos, que ao serem processados, são apresentados como antígenos às células do sistema imune. Ferramentas de Bioinformática permitem a predição e localização desses fragmentos de peptídeos, e técnicas de Engenharia de Proteínas podem ser utilizadas na desimunização por deleção destas sequências, propiciando a geração de proteínas com propriedades terapêuticas melhoradas. O objetivo desse trabalho é combinar técnicas de análise *in silico* e *in vitro* para desenvolver versões mutadas de L-ASNase, para retirada de epítomos imunogênicos. Para isso, serão realizadas a clonagem, expressão, purificação por cromatografia de afinidade, avaliação da atividade citotóxica e de imunogenicidade da proteína recombinante nativa e engenheirada. Os ensaios citotóxicos serão realizados em linhagens leucêmicas como HL-60, Jurkat e Raji. Espera-se obter resultados que confirmem a menor imunogenicidade da L-ASNase mutada frente a nativa, sem a perda das características estruturais e funcionais da enzima. As variantes de L-asparaginase serão expressas de forma recombinante em linhagem de *Escherichia coli* comercial (BL21), 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: Larissa Queiroz Pontes

Email: lariqbiotec@gmail.com

Participante 4

Nome: Marcus Rafael Lobo Bezerra

Email: rafael.lobobezerra@gmail.com

Participante 5

Nome: Daniel Pascoalino Pinheiro

Email: danielpascoalino@gmail.com