

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Produção de anticorpo recombinante humano anti-tumoral e construção de um sistema de liberação dirigida de fármacos para adenocarcinomas.

Creator: Marcelo Dias Baruffi

Affiliation: Universidade de São Paulo (www5.usp.br)

Principal Investigator: Lúcia Helena Faccioli

Project Administrator: Marcelo Dias Baruffi

Contributor: Jose Alexandre Marzagão Barbuto, Ivone Carvalho , Andréa Queiroz Maranhão , Marcelo de Macedo Brigido , Vânia Luiza Deperon Bonato , Vanessa Leiria Campo , Richard D. Cummings , Sean R. Stowell , VICTOR ALEXANDRE FELIX BASTOS, Ademilson Panunto Castelo , Emerson Soares Bernardes , Carlos Alessandro Fuzo, Renata Fonseca Vianna Lopez , Lilian Cataldi Rodrigues , Thais Canassa de Leo , Sofia Nascimento do Santos , Gilvan Pessoa Furtado, Marcos Roberto Lourenzoni

Funder: Universidade de São Paulo (www5.usp.br)

Funding opportunity number: PRP-822/2021 (Edital - PIPAE)

Grant: 21.1.10424.01.9

Template: Template USP - Mínimo

Project abstract:

O câncer é uma doença severa que pode ser caracterizada por alterações nos padrões moleculares de glicosilação, os quais associam-se a consequências fisiopatológicas e à descoberta de biomarcadores tumorais. A mucina tipo 1 hipoglicosilada (MUC1 - glicoproteína transmembrana tipo 1) é um marcador tumoral importante para vários tipos de câncer. Dentre os diversos desafios na pesquisa clínica de câncer, destaca-se o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas acuradas que permitam a entrega de fármacos antitumorais direto para a célula cancerosa, sem comprometer as células saudáveis. Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e avaliação de uma estratégia antitumoral baseada na ação de um sistema de liberação dirigida de drogas anti-tumorais baseado em fragmentos de anticorpos anti-marcador tumoral (MUC1 hipoglicosilada). Dados preliminares reportam a seleção, caracterização e produção de fragmentos de anticorpos recombinantes anti-MUC1 hipoglicosilada pela técnica de “Phage Display” associada a sequenciamento de

nova geração, análise “in silico” e tecnologia do DNA recombinante. Os fragmentos de anticorpos recombinantes obtidos foram capazes de detectar células de linhagem tumoral associadas à adenocarcinomas. Para continuidade deste projeto, propomos a clonagem dos domínios VH e VL do clone HAbMuc no arcabouço de uma imunoglobulina G humana, para melhor estabilidade e purificação da molécula, executar análises de biologia computacional quanto as propriedades imunogênicas do HAbMuc, visando importantes etapas de imunocaracterização como “glycan-array” e “tissue array”, biodistribuição *in vivo* e elaboração e testagem de imuno-lipossomos.

Start date: 09-28-2021

End date: 09-28-2022

Last modified: 04-10-2023

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Produção de anticorpo recombinante humano anti-tumoral e construção de um sistema de liberação dirigida de fármacos para adenocarcinomas. - Descrição dos Dados e Metadados produzidos pelo projeto

Os dados e metadados (“dados sobre os dados”) coletados durante a execução deste projeto serão categorizados em partes: (I) Produção e caracterização de anticorpo humano recombinante (IgG) específico para a MUC1 tumoral; (II) Construção do imunolipossomas compostos por IgG anti-MUC1 tumoral e agente quimioterápico (cisplatina) e (III) testagem do imunolipossoma em modelos tumorais (*in vitro* e *in vivo*). Cada uma destas etapas será organizada em sub-etapas obedecendo uma ordem cronológica de execução com base no cronograma de atividades proposto. Os descritores dos metadados serão preparados por meio da combinação de códigos de cor (etapa I = verde; etapa II = amarela e etapa III = vermelha), letra indicadora de cada sub-etapa (primeira sub-etapa = letra a; segunda sub-etapa = letra b; e assim por diante) e data de sua coleta (dia_mês_ano). O formato dos dados coletados depende do equipamento e da análise, sendo a maioria podendo ser convertido em xls, cvs, txt, pdf ou tiff, permitindo compartilhamento e acesso por longo período.

Dados sobre procedimentos e execução dos experimentos serão relatados no caderno de laboratório do pesquisador durante todo o período de desenvolvimento do projeto. Serão criadas pastas compartilhadas no google drive para acesso de todos os colaboradores. As pastas serão divididas de acordo com os itens descritos na metodologia do projeto. Dentro de cada pasta serão abertas subpastas nomeadas de acordo com as técnicas utilizadas, onde serão armazenados os dados brutos, classificados com a data dos experimentos.

Os dados serão coletados de acordo com as etapas determinadas anteriormente (I, II e III).

Os dados da etapa (I) incluem:

1. Dados sobre a síntese de glicopeptídeo sintético mimético de MUC1 tumoral (gpMUC) serão obtidos por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), ressonância (RMN - 1 H e 13 C) e espectrometria de massas (ESI-MS) MALDI-TOF. Esses serão armazenados na forma de gráficos do sistema max-links, com extensão .emz. No caso de dados de /rmn serão armazenados na forma de gráfico de distribuição de frequência em campo (MHz);
2. Dados do processo de seleção de fagos de uma biblioteca de *Phage Display* de fragmentos (Fab) de anticorpos humanos imunorreativos ao gpMUC. Dados de sequenciamento de ácidos nucleicos de nova geração (NGS) dos fagos selecionados contra gpMUC e dados de suas análises *in silico*;
3. Imagens de géis de SDS-PAGE e Western-Blot referentes aos experimentos de expressão proteica e imunoreatividade do fragmento de anticorpo humano *single chain fragment variable* (scFv) anti-gpMUC (*Human Antibody for MUC1*- HAbMuc) frente a extratos de linhagens humanas de adenocarcinomas tumorogênicas ou não-tumorogênicas. Imagens de microscopia de fluorescência (confocal) sobre a imunoreatividade do HAbMuc com microesferas contendo apenas a porção carboidrato do gpMUC (antígeno Tn-GalNAc);
4. Imagens de eletroforese em gel de agarose sobre os processos de construção do vetor de expressão para células de mamífero (pBudCE4.1) contendo o gene da molécula de IgG humana completa, composto pelas sequências gênicas dos domínios variáveis das cadeias leves e pesadas do HAbMuc (HAbMuc IgG) e denominado pBudCE4.1-HAbMuc -IgG. Imagens de eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e de Western blot relacionados ao monitoramento da produção do vetor pBudCE4.1-HAbMuc-IgG. Imagens e/ou dados relativos aos processos de purificação da HAbMuc IgG por cromatografia de afinidade (Agarose-Proteína-A) e determinação da massa molecular da HAbMuc IgG (espectrometria de massas, MALDI-TOF). Dados sobre a interação entre o HAbMuc IgG e o composto gpMUC derivados de experimentos de ELISA e de ressonância plasmônica ("Surface Plasmon Resonance - SPR");
5. Imagens e dados de Western-blot e citometria de fluxo sobre a imunoreatividade da molécula HAbMuc IgG

frente a extratos de linhagens humanas de adenocarcinomas tumorigênicas ou não-tumorigênicas. Imagens e dados derivados de microarranjos de glicanas (*Microarray-Glycan*). Imagens e dados derivados de arranjos de tecidos (*Tissue-Array*) obtidos com o uso da molécula HAbMuc IgG. Imagens de tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), tomografia por emissão de pósitron (PET) e tomografia computadorizada (CT) e dados de biodistribuição das moléculas anti-gpMUC e HAbMuc IgG em camundongos portadores de adenocarcinoma positivo para MUC1

6. Dados e imagens de análises *in silico* de estudos de *docking* e dinâmica molecular sobre a interação entre as moléculas HAbMuc IgG e glicopeptídeo sintético mimético de MUC1 tumoral (gpMUC).
7. Dados de análises *in silico* de estudos de *docking* e dinâmica molecular sobre a interação entre as moléculas HAbMuc IgG e glicopeptídeo sintético mimético de MUC1 tumoral (gpMUC). Arquivos contendo coordenadas atômicas e descrição de tipos de átomos e aminoácidos derivados das análises de modelagem molecular, *docking* e dinâmica molecular. Dados utilizados na visualização das estruturas moleculares, determinação de estabilidade estrutural e dinâmica, solubilidade e energias de afinidade.

Os dados da etapa (II) incluem:

1. Dados sobre a construção de imunolipossomas pelo método de hidratação que será realizada pelo método clássico da hidratação do filme lipídico associados a quantificação de proteína e anticorpo HAbMuc IgG tiolado a ser ligado ao lipossoma. Esses dados serão obtidos em leitor de placas e armazenados como xls.
2. Com o imunolipossoma pronto, serão realizadas caracterizações físico-química de tamanho, índice de polidispersividade e potencial zeta que serão coletados no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) e pelo NanoSight NS300 (Malvern) (tamanho e polidispersividade) e salvos em pdf; planilhas geradas em excel para compilação destes dados em conjunto serão também obtidas e armazenadas em extensão .xls. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para análise da morfologia dos imunolipossomas serão obtidas e mantidas como arquivos .tiff.
3. Além dessas, o imunolipossoma será caracterizado quanto à eficiência de encapsulação e perfil de liberação *in vitro*. Para isso, as frações eluídas em coluna de Sepharose CL-4B e as amostras coletadas em diferentes tempos de análise no meio de liberação utilizado serão quantificadas por método analítico previamente validado. Os dados obtidos dessas análises serão mantidos no software do equipamento, e salvos em .cvs e met.

Os dados da etapa (III) incluem:

1. Após caracterizados, os imunolipossomas serão avaliados *in vitro* quanto ao seu potencial citotóxico em células normais e potencial antitumoral em células de adenocarcinoma gástrico. Ambas as avaliações serão realizadas pelo método de viabilidade celular por ensaio de resazurina. Os dados serão obtidos em leitor de placas e exportados do software do equipamento como arquivos .xls. Além disso, o tipo de morte celular causado pelo tratamento com o imunolipossoma será avaliado por citometria de fluxo e os dados obtidos serão armazenados como pdf.
2. A eficácia dos imunolipossomas será avaliada *in vivo* em modelo tumoral induzido em camundongos. Ao final do protocolo de tratamento, os animais serão sacrificados e os dados de tamanho e massa tumoral serão obtidos com auxílio de paquímetro e balança analítica, assim como a massa corporal de cada animal. Esses dados serão armazenados em planilhas de excel (.xls) e as imagens dos tumores retirados serão salvas como arquivos .tiff,
3. Citometria de fluxo: As células das linhagens MKN45 e MCF10A serão tratadas sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. A partir dos resultados observados no tratamento de viabilidade celular com resazurina, serão determinadas as concentrações e períodos de incubação celular com os imunolipossomas. Posteriormente, as células serão removidas com o auxílio de um *cell scraper* e quantificadas em câmara de

Neubauer. A detecção das células no ensaio de citometria de fluxo será feita utilizando-se um anticorpo comercial anti-FLAG e marcação com iodeto de propídeo e anexina-V para análise de morte celular utilizando um citômetro BD FACSCantoTM.

4. Imagens de tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT), tomografia por emissão de pósitron (PET) e tomografia computadorizada (CT) e dados de biodistribuição de imunolipossoma composto por molécula HAbMuc IgG e por cisplatina em camundongos portadores de adenocarcinoma positivo para MUC1.

