

**Título: Avaliação da Atividade Biológica de Anticorpos Monoclonais Terapêuticos anti-CD20 (Biossimilar e Biobetter) Desenvolvidos em Bio-Manguinhos para o Tratamento de Linfoma**

**Autora: Ana Beatriz Teixeira Frederico**

**RESUMO**

Um dos principais anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados no combate ao câncer é o rituximabe. O principal mecanismo de ação deste mAb é através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) por intermédio das células NK. Um dos receptores das células NK é o NKG2D, que ativa a citotoxicidade das células NK de forma independente, funcionando assim como um ativador primário. Os ligantes do NKG2D, normalmente, se encontram na superfície da célula alvo quando elas estão infectadas por vírus ou quando possuem danos em seu DNA. Essas moléculas aparentam ser um alvo promissor para melhorar a resposta imune na terapia contra o câncer, visto que são capazes de ativar a resposta imune celular inata e adaptativa e estão ausentes ou raramente expressos em tecidos saudáveis. Os tratamentos quimioterápicos contra câncer levam a danos no DNA das células, o que, conseqüentemente, gera um aumento na expressão de moléculas ligantes de NKG2D. Por este motivo, acredita-se que a resposta imune do paciente aos quimioterápicos seja mediada, pelo menos parcialmente, por NKG2D. Diante deste contexto, foi desenvolvido uma estratégia com objetivo de aumentar o efeito biológico de mAb através de sua fusão com ligantes de NKG2D de humanos. Foi desenvolvido um biossimilar e dois biobetter do rituximabe. Este projeto vem sendo desenvolvido em Bio-Manguinhos/Fiocruz e está dissertação avaliou a atividade biológica das três construções em desenvolvimento. Os mAbs foram produzidos utilizando o sistema de expressão Expi293F e caracterizados através das metodologias de SDS-PAGE, Western Blot, ELISA quantitativo para IgG e ELISA qualitativo para avaliar a presença da molécula NKG2DL. Foram realizados também ensaios de citometria de fluxo para avaliar as propriedades de ligação das construções ao antígeno CD20 na superfície das células K562 CD20 + e a presença de NKG2DL nas construções. Os potenciais ADCC e CDC foram avaliados utilizando o kit CytoTox96, um ensaio colorimétrico não-radioativo de citotoxicidade capaz de medir a lactato desidrogenase no meio. As células NK utilizadas nos ensaios de ADCC foram produzidas utilizando sangue de doadores saudáveis, onde os PBMCs foram separados e estimulados durante 21 dias para a expansão apenas de células NK utilizando células K562 APC clone 9 irradiadas e IL-2. Foi também iniciada a padronização da avaliação da atividade biológica dos anticorpos produzidos em modelos animais de xenotransplante da linhagem de linfoma humano CD20+ (RAJI) em camundongos imunodeficientes. Este estudo demonstrou que as construções de anticorpos produzidas em Bio-Manguinhos são capazes de se ligar ao antígeno CD20. Além disso, as construções biobetter portadoras da molécula NKG2DL apresentaram a atividade biológica in vitro superior ao rituximabe, sugerindo que a fusão do ligante de células NK pode aumentar a eficácia terapêutica do rituximabe e de outros anticorpos terapêuticos. Para confirmar essa hipótese, estabelecemos um modelo in vivo que futuramente será utilizado para o efeito terapêutico sistêmico dos biobetter de anti-CD20 desenvolvidos neste estudo.