

ANEXO III

APRESENTAÇÃO DE PROJETOS REFERENTES AO PROGRAMA NACIONAL DE APOIO À ATENÇÃO ONCOLÓGICA (PRONON) OU AO PROGRAMA NACIONAL DE APOIO À ATENÇÃO DA SAÚDE DA PESSOA COM DEFICIÊNCIA (PRONAS/PCD)

2019

A - INFORMAÇÕES DA INSTITUIÇÃO

Programa: ☒ PRONON ☐ PRONAS/PCD		Portaria de credenciamento: nº e data: 108 de 17/02/2014
Razão Social: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre		
CNPJ: 92.815.000/0001-68		Agência Bancária do Banco do Brasil*: 3168-2
Endereço: Rua Prof Annes Dias, 295		
Bairro: Centro	Município: Porto Alegre	UF: RS
CEP: 90020-090	Fone: 51 – 3213-7300	
E-mail: projetos@santacasa.org.br		CNES: 2237253
Dirigente: Alfredo Guilherme Englert - Provedor		
Procurador (se aplicável): Diretor Geral e de Relações Institucionais Julio Flavio Dornelles de Matos, Diretor Administrativo Jader Pires, Diretor Financeiro Ricardo Englert, Diretor de Operações Oswaldo Luis Balparda, Diretor Médico e de Ensino e Pesquisa Antonio Nocchi Kalil e Diretor Técnico Operativo Ricardo Gallichio Kroef.		

B.1 - INFORMAÇÕES GERAIS DO PROJETO

2.1 Título do Projeto: Desenvolvimento de imunoterápicos oncológicos seus testes preditivos de resposta para o SUS

2.2 Valor total do Projeto: R\$ 5464.856,78

2.3 Prazo de execução (em meses): 36 meses

B.2 - DA(S) AÇÕES E SERVIÇOS DE ONCOLOGIA E REABILITAÇÃO

De acordo com os artigos 5º e 9º desta Portaria, registrar o campo de atuação pretendida. Assinalar apenas uma única opção.

() Prestação de serviços médico-assistenciais;

() Formação, treinamento e aperfeiçoamento de recursos humanos em todos os níveis;

(x) realização de pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais.

B.3 - ÁREA(S) PRIORITÁRIA(S) DO PRONON (De acordo com o artigo 6º) *Preenchimento exclusivo para projeto apresentados no âmbito do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON). Neste item, descrever, de forma resumida, a área prioritária de que trata o projeto, considerando as opções citadas no Art. 6º.

Este é um projeto que intersecciona com as áreas:

V - Realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para diagnóstico e terapêutica em câncer;

VII - realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer;

e

VIII - realização de pesquisas básicas e pré-clínicas que levem ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou terapêuticos em oncologia;

B.6 - INFORMAÇÕES ESPECÍFICAS DO PROJETO DE PESQUISA
Descrição do projeto:
a) Informações gerais do projeto:
a.1) Título do projeto: Desenvolvimento de imunoterápicos oncológicos seus testes preditivos de resposta para o SUS
a.2) Pesquisadores principais Cristina Bonorino Professor Titular Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA Antonio Nocchi Kalil, Diretor Médico e de Ensino e Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre cristinabcb@ufcspa.edu.br +55 51 999965331 ankalil@terra.com.br +55 51 99810098
a.3) Valor total do projeto: R\$ 5.464.856,78
a.4) Período de execução: 36 meses: janeiro de 2021 a janeiro de 2024

b) Informações específicas do projeto.

b.1) i - Introdução:

Apresentação do problema

Este é um projeto de pesquisa focado em inovação na área de biotecnologia da saúde. O câncer constitui a segunda principal causa de mortalidade e morbidade no Brasil. Enquanto os custos diretos com tratamento oncológico aproximam-se de 4 bilhões de reais anuais (segundo o INCA, 2018), custos indiretos podem alcançar quatro vezes esse valor. São urgentemente necessárias alternativas inovadoras que levem, principalmente, à diminuição da incidência de câncer, e a um aumento da qualidade de vida dos pacientes já afetados. **Atualmente, a terapia oncológica passa por uma revolução:** o uso de anticorpos monoclonais desbloqueadores da resposta imune tem respostas inéditas e históricas que vão em média de 20 a 40%, podendo alcançar mais de 50% quando drogas imunoterápicas são conjugadas, em pacientes de diversos tipos de tumor, incluindo cânceres metastáticos. Esses medicamentos, que deram o Prêmio Nobel em 2018 para Jim Allison e Tetsuo Honjo, não estão hoje disponíveis pelo SUS, devido principalmente ao seu alto custo. Um tratamento custa centenas de milhares de reais, constituindo um mercado mundial que movimenta cerca de 90 bilhões de dólares ao ano. **O presente projeto pretende desenvolver para o SUS essa forma de tratamento oncológico**, produzindo alternativas nacionais para esses anticorpos monoclonais, bem como os testes de precisão necessários para a otimização de seu uso.

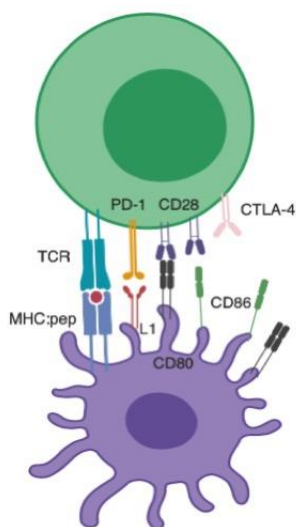
Enquanto outras empresas, nacionais e internacionais, podem hoje estar desenvolvendo a produção de imunoterapia, todas elas visam entrar nesse mercado gigantesco. **Este projeto vai disponibilizar para o SUS os seus próprios imunoterápicos, para que o Ministério da Saúde possa oferecer esses produtos aos seus pacientes, repassando-os ao Complexo Industrial da Saúde.** Nesse processo, o estudo revelará um perfil genético e imunológico dos pacientes do Rio Grande do Sul, possibilitando o acesso de pacientes do SUS a estudos clínicos multicêntricos que dispensam o tratamento disponível comercialmente, e desonerando o SUS enquanto são desenvolvidas as drogas alternativas nacionais.

Significância

Existe uma revolução no tratamento do câncer, e essa revolução é imunológica. A terapia do câncer ainda hoje inclui cirurgia, radioterapia, e intervenções medicamentosas. Mais recentemente, uma abordagem inovadora, baseada na ativação do sistema imune para controlar o câncer chegou ao mercado com o nome abrangente de imunoterapia. Essa metodologia trouxe uma virada de jogo para a terapia oncológica, pois não foca no tumor. Nesta abordagem terapêutica, estratégias tecnológicas exploram o próprio sistema imune do paciente para tratar o câncer. Assim, drogas ou processos tecnológicos são empregados para ativar ou modular células imunológicas e fazer com que elas reconheçam as diferenças que o tecido tumoral apresenta comparado às células normais do corpo. Dentro dessas terapias, estão moléculas e células que atuam no desbloqueio do sistema imunológico (*immune checkpoint blockade inhibitors*).

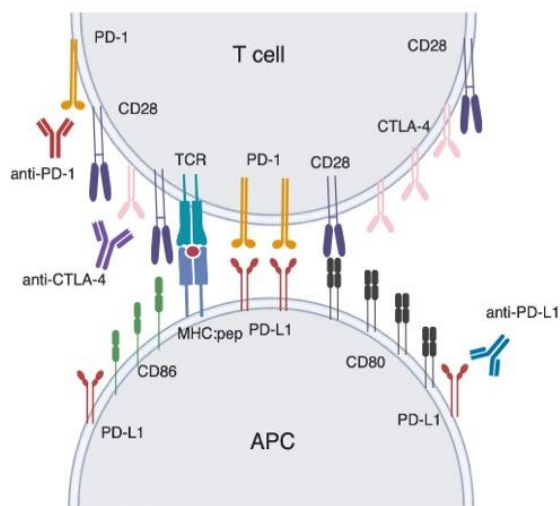
Desbloqueadores imunológicos agem nas moléculas co-estimulatórias ou co-inibidoras e/ou em seus receptores localizados nas membranas de células do sistema imune envolvidas na resposta ao tumor, restabelecendo a atividade de células imunológicas efetoras que vão eliminar os tumores. Esse bloqueio imune é naturalmente usado pelo corpo, para evitar efeitos colaterais da reação do sistema imune ativado contra infecções, contra os próprios tecidos saudáveis. Entretanto, em pacientes com tumores clinicamente detectáveis, muitas vezes, houve ativação desses mecanismos bloqueadores, impedindo a

resposta imune, que poderia controlar o crescimento tumoral, ou erradicá-lo. Consequentemente, no caso do câncer, a remoção deste bloqueio imune permite retomar o nível de resposta imune no microambiente tumoral, por ativação de células T citotóxicas (Pardoll 2012) além de outros mecanismos efetores.



A Figura 1 (ao lado) esquematiza o racional para a interferência medicamentosa na sinapse imune, que ocorre nos órgãos linfoides, e os sinais trocados entre células dendríticas – em roxo – apresentadoras de antígeno, ou APC – e os linfócitos T, em verde, que efetuam a resposta. As interações MHC com TCR (o chamado sinal 1) e CD80 ou CD86 com CD28 (sinal 2) fornecem sinais de ativação para as células T, estimulando a resposta imune e a destruição do tumor. As interações de PD-1 com PD-L1 e de CTLA-4 com CD80 ou CD86 fornecem um sinal negativo para o linfócito T – em verde. Atualmente, a modulação da sinapse imune é feita utilizando-se anticorpos monoclonais. O anticorpo monoclonal anti-CTLA4 - ipilimumab (Yervoy®) desenvolvido e comercializado pela Bristol-Myers Squibb o foi o primeiro exemplo de terapia aprovada clinicamente com modo de ação de modular o sistema imune para tratar câncer. O anticorpo Ipilimumab foi aprovado pelo FDA em 2011 para tratamento de pacientes com melanoma metastático

(Lipson and Drake 2011). Hoje, há uma série de anticorpos monoclonais (mAbs) utilizados na modulação da tolerância imune para o tratamento do câncer e esta área de desenvolvimento tecnológico mostra-se extremamente ativa. A lógica de tratar o sistema imune para que este, por sua vez, reconheça o células tumorais e desencadeie respostas adaptativas de eliminação, transcendeu a terapia medicamentosa moderna e tem potencial pan-oncológico, ou seja, pode ser aplicado a todos os tipos de câncer, possivelmente como um potencializador de outras terapias e para prevenção do câncer (Postow, Callahan, and Wolchok 2015) (Webber et al. 2018). As duas outras drogas aprovadas depois do ipilimumab (anti-CTLA-4) para tratamento clínico foram o anticorpo monoclonal anti-PD-1 (Nivolumab da Bristol-Myers Squibb, Pembrolizumab da Merck); e o anti-PD-L1 (BMS-936559 da Bristol-Myers Squibb), esquematizados na Figura 2, ao lado. Em 2018, James Allison e Tetsuo Honjo dividiram o Prêmio Nobel de Medicina por seu trabalho pioneiro na área. Atualmente, todas as grandes empresas farmacêuticas possuem anticorpos contra moléculas da sinapse imunológica em desenvolvimento e/ou em ensaios clínicos. Como pode ser visto na figura abaixo, adaptada de (Kruger et al. 2019), há diferentes anticorpos (fármacos, ou moléculas) produzidas por diferentes empresas farmacêuticas para bloquear a mesma interação, e há aproximadamente dois mil estudos clínicos em andamento, em diferentes tipos de câncer. Esta é uma modificação de paradigma irreversível no tratamento oncológico.



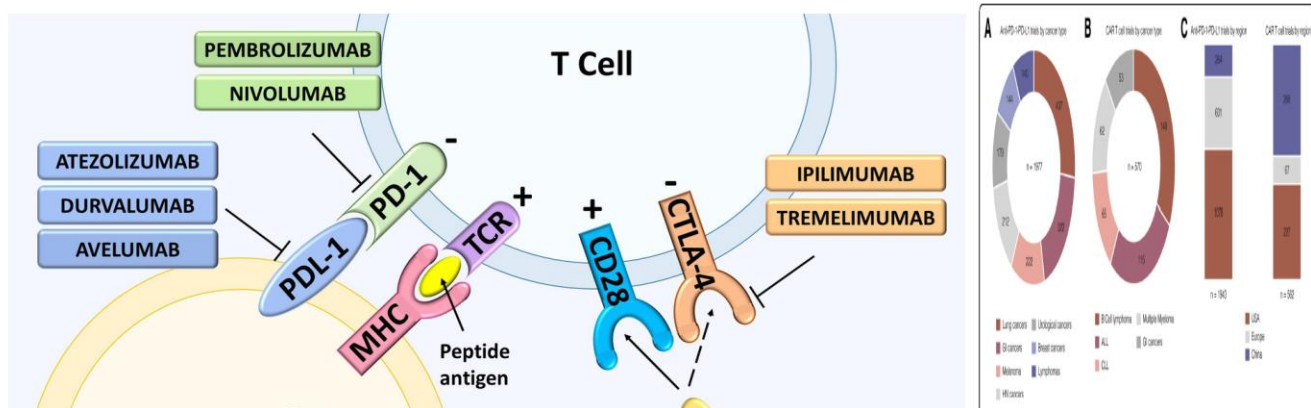


Figura 3. Em A, anticorpos monoclonais diferentes para o bloqueio do mesmo “checkpoint” imune, os sinais positivos e negativos na célula T significando ativação ou inibição. Em B, estudos clínicos em andamento no mundo para diferentes tipos tumorais focados na interação PD-1/PD-L1.

Este é um mercado que mobiliza hoje 98 bilhões de dólares mundialmente, com previsão de crescimento de aproximadamente 10% ao ano, ao menos até 2022 (Grilo and Mantalaris 2019). Estudos clínicos mostram que a taxa de sucesso de tratamento usando apenas um desbloqueador imune fica ao redor de 25%. Contudo, mais de um estudo clínico mostrou que a associação de desbloqueadores imunes para CTLA-4, PD-1 ou PD-L1 tem a taxa de sucesso aumentada para além de 50%, em diferentes combinações entre eles (Tawbi et al. 2018) (Drake 2012)(Ribas and Wolchok 2018), ou com outras terapias oncológicas (Mahoney, Rennert, and Freeman 2015) (Khalil et al. 2016).

Table 1. Summary of the tumor types for which immune checkpoint blockade therapies are FDA-approved

Tumor type	Therapeutic agent	FDA approval year
Melanoma	Ipilimumab	2011
Melanoma	Nivolumab	2014
Melanoma	Pembrolizumab	2014
Non-small cell lung cancer	Nivolumab	2015
Non-small cell lung cancer	Pembrolizumab	2015
Melanoma (BRAF wild-type)	Ipilimumab + nivolumab	2015
Melanoma (adjuvant)	Ipilimumab	2015
Renal cell carcinoma	Nivolumab	2015
Hodgkin lymphoma	Nivolumab	2016
Urothelial carcinoma	Atezolizumab	2016
Head and neck squamous cell carcinoma	Nivolumab	2016
Head and neck squamous cell carcinoma	Pembrolizumab	2016
Melanoma (any BRAF status)	Ipilimumab + nivolumab	2016
Non-small cell lung cancer	Atezolizumab	2016
Hodgkin lymphoma	Pembrolizumab	2017
Merkel cell carcinoma	Avelumab	2017
Urothelial carcinoma	Avelumab	2017
Urothelial carcinoma	Durvalumab	2017
Urothelial carcinoma	Nivolumab	2017
Urothelial carcinoma	Pembrolizumab	2017
MSI-high or MMR-deficient solid tumors of any histology	Pembrolizumab	2017
MSI-high, MMR-deficient metastatic colorectal cancer	Nivolumab	2017
Pediatric melanoma	Ipilimumab	2017
Hepatocellular carcinoma	Nivolumab	2017
Gastric and gastroesophageal carcinoma	Pembrolizumab	2017
Non-small cell lung cancer	Durvalumab	2018
Renal cell carcinoma	Ipilimumab + nivolumab	2018

Na Figura 4, ao lado, adaptada da tabela de (Wei, Duffy, and Allison 2018), vemos o número de tumores para os quais já estão aprovadas essas drogas, na FDA (e também na ANVISA). Se incluirmos 2019, já está aprovado na ANVISA o uso de atezolizumab para o câncer de mama triplo negativo metastático, o mais agressivo dos cânceres de mama.

Quem pode hoje se beneficiar do uso desses medicamentos? Terapias oncológicas de primeira linha são aquelas que o oncologista recomendará para o paciente como a mais efetiva, naquele momento, para seu tipo de câncer. Hoje, a imunoterapia com anti-CTLA-4 é a primeira linha para pacientes de melanoma metastático. Pacientes de câncer de pulmão, por exemplo, ainda possuem como primeira linha o tratamento com quimioterápicos do tipo das platinas. Os efeitos

colaterais são ainda muito debilitantes. Contudo, a imunoterapia com anti-PD-1 já está aprovada como primeira linha para alguns pacientes de câncer de pulmão, **mas apenas quando conectada a um teste de biomarcador: seu ligante, PD-L1, precisa ser positivo no tumor do paciente.** O estudo KEYNOTE- 001 em pacientes de câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) mostrou que, se os tumores forem positivos em de mais de 50% das suas células para PD-L1, o benefício com o tratamento por anti-PD-1 é de 45% comparado com 16% se os pacientes expressarem menos de 50% de células positivas para PD-L1. Esse teste é realizado atualmente por imunohistoquímica, sendo hoje o requisito para o uso dessa terapia em pacientes de câncer de pulmão. Em 2019, a FDA aprovou pembrolizumab (Keytruda, Merck), um anti-PD-1, como primeira linha para pacientes com cancer de pulmão de células não pequenas em estadiamento III (ou *stage III non-small cell lung cancer* - NSCLC) que for PD-L1-positivo, não tratável por cirurgia e resistente à quimioterapia.

Assim, para pacientes desse tipo de tumor, o anti-PD-1 é hoje a primeira linha de tratamento, se seus tumores forem positivos para PD-L1. Para alguns, o biomarcador PD-L1 é um dos maiores sucessos do conceito de oncologia de precisão: existem testes moleculares que precisam ser realizados para que o paciente receba indicação do tratamento com determinados fármacos, como no caso do anticorpo anti-PD-1. Outro exemplo é a alta expressão do fator HER-2 em alguns tipos de câncer de mama, que correlaciona com o benefício ao tratamento pelo anticorpo anti-HER2 ou Herceptina. Em câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), pacientes negativos para PD-L1 são testados por sequenciamento gênico para certas mutações para as quais existem inibidores específicos. Para as mutações na enzima ALK, que ativa rotas oncogênicas nesse tipo de tumor, foi aprovado em 2014 o uso da droga Ceritinib se o paciente apresenta a mutação L119M, e a droga Alectinib se o paciente apresenta as mutações L119M, R1174L e R1275Q. Esses testes predizem que o paciente tem maior chance de sucesso com a terapia dirigida para o alvo, do que com a quimioterapia convencional. Como podemos ver ainda na tabela acima, pacientes de tumores sólidos, e principalmente tumores colorretais, se possuírem alta instabilidade de microssatélite (MSI-high) e/ou deficiência de Mismatch repair (MMR-deficient) tem recomendação para o tratamento com anti-PD-1(Yi et al. 2018). Para outras terapias, já existem também testes moleculares, de sequenciamento de genes com mutações importantes para diferentes tipos de tumor.

Não é conhecido ainda o mecanismo pelo qual tais biomarcadores estão associados à resposta ao tratamento. Eles podem estar envolvidos diretamente nos processos celulares da resposta, ou da doença; ou ainda constituir apenas indicadores correlacionados com a resposta, por representarem um processo biológico ainda desconhecido. Existem diferentes estudos em andamento para tentar responder essa pergunta. Eles são extremamente importantes, pois envolvem não apenas testes de imunohistoquímica, mas testes genômicos, utilizando sequenciamento de última geração. Esses estudos geram uma grande quantidade de dados, a ser utilizada não apenas para otimizar o tratamento, mas principalmente servir como fonte de informação para o desenho de estratégias terapêuticas, políticas públicas, e fonte de novas descobertas relevantes para o tratamento do câncer. Enquanto essas informações estão sendo amplamente coletadas e compiladas na Europa, America do Norte e China, que hoje lideram os estudos clínicos mundialmente, aqui no Brasil essas informações ainda são inexistentes.

Os diferentes anticorpos monoclonais usados para bloquear um mesmo “checkpoint” imune não são genéricos ou biossimilares. Eles são diferentes em estrutura e sequência de aminoácidos, constituindo moléculas com alto potencial de inovação e propriedade intelectual. Se desenvolvidos aqui no Brasil, com apoio do Ministério da Saúde, tanto os anticorpos monoclonais quanto os testes preditivos que otimizam seu uso constituirão uma alternativa a ser utilizada como tratamento pelo SUS, que ainda pode transferir

a propriedade intelectual associada para a indústria nacional, fortalecendo as bases tecnológicas de saúde do País, e o Complexo Industrial da Saúde.

Este projeto de pesquisa visa incluir o SUS nessa virada de jogo mundial da terapia oncológica. Investigaremos a população de pacientes oncológicos do Rio Grande do Sul atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, o mais antigo hospital do estado, e que atende o maior número de pacientes de câncer Rio Grande do Sul (e um dos maiores do Brasil). Desenvolveremos anticorpos monoclonais humanos, para imunoterapia oncológica, em estágio pré-clínico, com prova de conceito robusta. Desenvolveremos ainda alternativas nacionais para os testes de biomarcadores preditivos (já validados internacionalmente) de resposta. Em uma parceria entre o corpo clínico da Santa Casa de Porto Alegre e pesquisadores da UFCSPA reconhecidos internacionalmente, criaremos uma estrutura de P&D especializada em fornecer alternativas nacionais de produtos para imunoterapia oncológica, que sejam competitivas para seguir o fluxo regulatório, até alcançar o mercado.

O projeto se divide em dois subprojetos científicos. O primeiro lança as bases para desenvolver tecnologia de última geração utilizando técnicas de biotecnologia imunológica e molecular para isolar anticorpos já existentes em células do sangue humano (plasmablastos) que reconheçam os alvos desejados, bem como estratégias de aprimorar esse reconhecimento e ação utilizando técnicas *in silico* de biologia estrutural, testando os resultados em modelos pré-clínicos. Essa estratégia é hoje utilizada no desenvolvimento de imunoterapias já em testes clínicos para HIV (Caskey, Klein, and Nussenzweig 2016), Ebola vírus (Corti et al. 2016) e mesmo câncer, evitando o tempo necessário para humanizar anticorpos monoclonais desenvolvidos em roedores e o uso de animais. O segundo projeto desenvolve os testes companheiros preditivos de resposta aos tratamentos hoje aprovados na FDA e ANVISA, sua validação junto aos testes comerciais existentes no mercado. Os novos testes desenvolvidos na Santa Casa de Porto Alegre e UFCSPA serão repassados para o SUS. Os dois subprojetos criam uma base de informação biológica caracterizando os tumores da população do RS, constituindo assim uma base de descoberta para novos alvos e moléculas.

ii - Justificativa:

O Ministério da Saúde vem liderando um trabalho de incorporação ao SUS de imunobiológicos para tratamentos de doenças inflamatórias e autoimunes como artrite reumatoide, colite, e asma alérgica, entre outros. A CONITEC (comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS) vem sugerindo agentes biológicos, especialmente anticorpos monoclonais (mabs) para incorporação no SUS devido a sua demanda clínica. Isso é corroborado pelo conteúdo da portaria 2.888 de 30 de dezembro de 2014 do ministério da saúde, que lista 6 medicamentos de origem biológica de uma lista de 11 medicamentos de interesse para o SUS. Contudo, a incorporação das drogas imunoterápicas para oncologia é hoje proibitiva em termos de custo para o SUS, e não há como disponibilizar aos pacientes de câncer esses tratamentos ou seus testes preditivos de resposta. O aumento dos gastos públicos com medicamentos está relacionado à necessidade de incorporação dessas novas tecnologias ao SUS, enfrentando ainda o problema da judicialização da saúde. A falta de acesso dos pacientes públicos aos testes preditivos impede que eles participem de estudos clínicos multicêntricos sendo realizados pela indústria farmacêutica internacional em diferentes hospitais. Essa possibilidade poderia desonerar o SUS do tratamento desses pacientes, permitindo ainda a eles o tratamento com as mais modernas terapias oncológicas. Hoje, mesmo em situações em que a indústria internacional pode doar esses medicamentos a pacientes do SUS, não existe nenhum estudo ou compilação de pacientes candidatos aos tratamentos, uma vez que não são realizados os testes de caracterização molecular e imunológica desses tumores. Os pacientes podem receber apenas a quimioterapia convencional, que cada vez mais se coloca como menos

competitiva no mercado oncológico, em comparação com as altas taxas de sucesso da imunoterapia com anticorpos monoclonais desbloqueadores de “checkpoints”.

Nossa proposta visa alinhar esforços de desenvolvimento de medicamentos um panorama tecnológico capaz de impactar o mercado nacional de terapia oncológica, especialmente o SUS. A política de incorporação ao SUS de drogas já existentes não pode constituir o único esforço de inovação em saúde: não apenas é custosa, mas pode gerar um quadro crônico desfavorável à economia nacional, frustrando planejamentos de longo prazo do Complexo Industrial da Saúde. O Brasil não deve apenas saber como reproduzir tecnologias em detrimento ao know-how de “como desenvolver de forma plena”, ou seja, criar novas terapias de uso próprio. Nossa proposta visa contribuir para que o ministério da saúde amplie as políticas nacionais de inovação em saúde com estratégias paralelas às parcerias de desenvolvimento produtivo, avançando em projetos tecnológicos que tomam como base para o processo de inovação o conhecimento recém obtido ao nível da biologia do câncer, e, de fato, de qualquer patologia.

Os fármacos imunoterápicos e os testes desenvolvidos por este projeto na Santa Casa de Porto Alegre e na UFCSPA, após a conclusão do projeto que fornecerá prova de conceito da ação terapêutica desses em estágio pré-clínico, poderão ser ofertados pelo SUS e/ou Ministério da Saúde para parcerias e agentes públicos ou privados que são parte do Complexo Industrial da Saúde. Embora baseado no Rio Grande do Sul, o projeto fornece elementos que poderão beneficiar a população em todo o território nacional. A Santa Casa de Porto Alegre inaugurou em 2018 um centro de Inovação em Saúde para captar verba e acelerar o desenvolvimento de startups que contribuam para o setor produtivo nacional. A Santa Casa pode assim trabalhar juntamente com o SUS, se for de interesse, para formar parcerias consistentes para o desenvolvimento de novas tecnologias com o setor produtivo, preferencialmente, em estruturas contratuais envolvendo laboratórios com capacidade produtiva, já visando facilitar o acesso de pacientes do SUS a futuros tratamentos oriundos desta pesquisa. Nesse caminho, planejamos a formação e capacitação de recursos humanos não apenas para a academia, mas contemplando também o mercado de trabalho para o setor produtivo, que carece de profissionais com experiência técnica, gestora e jurídica na área de desenvolvimento de novas drogas

iii - Hipótese:

A hipótese deste estudo é a de que os tumores de pacientes do SUS têm características genéticas e imunológicas que hoje não são detectadas. Ao serem detectadas, candidatam o paciente a um tratamento otimizado, na fronteira do conhecimento e da tecnologia terapêutica atual, que podem ser desenvolvidos no Brasil.

iv - objetivo geral:

Nesta parceria entre a Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e pesquisadores da UFCSPA especializados em imunoterapia, genômica, nanotecnologia, biologia estrutural, biologia molecular e oncologia, nosso objetivo geral é desenvolver imunoterápicos anti-CTLA4-4, anti-PD-1 e anti-PD-L1, bem como seus testes preditivos, para o SUS, criando uma base de dados de caracterização imunológica e molecular dos tumores dos pacientes do Rio Grande do Sul.

v - Objetivos Específicos do Projeto:

1. Proporcionar ao SUS opções de acesso a tratamentos oncológicos com alta qualidade tecnológica e de favorável custo-benefício.

2. Obter, ao nível pré-clínico, anticorpos humanos ou humanizados anti-PD-1, anti-PD-L1 e anti-CTLA-4, para seguir desenvolvimento no Brasil.
3. Reunir e organizar um grupo de cientistas e pesquisadores clínicos para desenvolver novas moléculas imunoterápicas, alinhadas a estratégias de diagnóstico inovadoras para o estudo e tratamento do câncer
4. Organizar um banco de dados caracterizando o perfil molecular e imunológico de tumores de pacientes do Rio Grande do Sul atendidos pelo SUS.
5. Proporcionar ao setor produtivo nacional opções para desenvolver moléculas e tecnologias de origem biológica em parceria com o SUS
6. Formar recursos humanos e interações entre acadêmicos, médicos, pesquisadores empreendedores, entidades com capacidade produtiva e investidores público e/ou privado pesquisadores interessados em oferecer qualidade de vida e soluções a pacientes sem opções terapêuticas.
7. Engajar e mostrar à comunidade não-científica a importância da pesquisa sobre o câncer e o que pode ser desenvolvido no Brasil.

Os objetivos específicos dos dois subprojetos científicos – mais adiante – e suas metas e indicadores quantitativos do cumprimento do plano de atividades estão detalhados em cada subprojeto.

vi - Procedimentos Metodológicos:

Este é um estudo experimental, de P&D, mas com características de pesquisa básica, contendo ainda um subprojeto com características descritivas/analíticas.

- Participantes de pesquisa e tamanho amostral:

O projeto está dividido em dois subprojetos científicos. Para o Subprojeto 1, serão recrutados inicialmente 30 indivíduos, entre pacientes oncológicos da Santa Casa e indivíduos saudáveis para doação de sangue e busca de células B circulantes produtoras de anticorpos para os alvos escolhidos. Para o Subprojeto 2, pacientes com diagnósticos confirmados por biópsia ou outro método padrão de neoplasias de mama, próstata, pulmão (carcinoma de células-não pequenas), cólon e reto e melanoma, atendidos no Ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital Santa Rita da ISCMPA. O cálculo amostral será baseado no número total de casos no Brasil e aqueles atendidos durante 2018 na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Pretende-se incluir cerca de: 100 de cada um dos seguintes tumores: pulmão, câncer colorretal, próstata e mama e 50 casos de melanoma.

- Descrição do local do estudo.

O estudo é uma parceria entre a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e a Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em que pesquisadores clínicos da Santa Casa auxiliarão na seleção de voluntários e pacientes que doarão amostras, e os pesquisadores da UFCSPA realizarão o trabalho de pesquisa, envolvendo discentes das duas instituições.

A Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) é uma instituição filantrópica assistencial médico-hospitalar, constituindo-se também como centro de ensino, pesquisa e cultura, reconhecida de Utilidade Pública pelas três esferas do governo e de natureza jurídica fundacional. Cabe à Irmandade, atualmente presidida pelo Provedor Alfredo Guilherme Englert, a responsabilidade

pelo provimento e administração dos hospitais e demais serviços da instituição. Importante destacar que do total de seu volume assistencial, cerca de 70% é destinado a pacientes do Sistema Único de Saúde.

Reconhecimento de Utilidade Pública

Decreto Federal nº 12.949, de 20/07/1943

Decreto Estadual nº 2.217, de 08/11/1946, Lei Municipal nº 61, de 14/05/1998

A Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre é o mais antigo hospital do Rio Grande do Sul e um dos mais modernos complexos hospitalares do país, sendo referência brasileira pela qualidade e segurança da Medicina, pelo humanismo de sua assistência, pela excelência de seus profissionais e pela modernidade de seus processos e equipamento, além de ser o complexo hospitalar do RS que mais atende pacientes do Sistema Único de Saúde nesse Estado.

Forma-se por um complexo integrado com oito hospitais; três unidades se constituem em hospitais gerais (para atendimento de adultos e outra pediátrica) e outras cinco especializadas em cardiologia, neurocirurgia, pneumologia, oncologia e transplantes. A instituição também disponibiliza à população serviços de consultas ambulatoriais eletivas e de urgência e emergência, além de serviços auxiliares de diagnóstico e tratamento, procedimentos cirúrgicos e obstétricos, internações hospitalares, clínicas e cirúrgicas, entre outros. Conta com o primeiro Centro de Transplantes da América Latina – onde realiza todos os tipos de transplantes de órgãos – e é referência em diagnóstico e tratamento de doenças e procedimentos de alta complexidade. Integram-se ao complexo o Cemitério da Santa Casa, a Casa e Apoio Madre Ana e as gestões do Hospital da Criança Santo Antônio da Patrulha e Hospital Dom João Becker de Gravataí.

Em paralelo, a Santa Casa desenvolve intensa atividade de Ensino e Pesquisa, áreas nos quais historicamente possui relevância, sendo igualmente reconhecida como referência. É certificada como hospital de Ensino e promove em suas unidades programas de Residência Médica e cursos de especialização próprios ou associados a diversas universidades e faculdades do Brasil. Desde 1961 é o Hospital Escola da hoje denominada Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Inspirada na Missão de atender bem a todos e com uma trajetória de conquistas nos campos da medicina, ensino e pesquisa, tornou-se referência pela qualificação dos profissionais e pelo humanismo, segurança e alta tecnologia empregados em sua assistência. Em meados dos anos 90, a Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre iniciou o processo de implantação da filosofia da qualidade total, focada em clientes, processos e participação de todos, tendo no princípio de auto sustentação um valor determinante desta metodologia.

Como mérito máximo do seu modelo de gestão conquistou o Prêmio Nacional da Qualidade, tornando-se o primeiro hospital e a primeira instituição de direito privado, sem fins lucrativos, a receber tal distinção no país. Os resultados da progressiva incorporação da filosofia e metodologia da qualidade total, como método de gestão, proporcionaram a Santa Casa sucessivas conquistas de reconhecimento, culminando também com os troféus Ouro e Diamante, do Prêmio Gaúcho da Qualidade. Mas o maior reconhecimento da Santa Casa é o respeito e a confiança da comunidade assistida.

Em 31 de dezembro de 2018, a Santa Casa contava com uma força de trabalho formada por 7.593 profissionais ativos das mais diferentes áreas, além de 2.600 médicos. Também atuam na Santa Casa 210 voluntários executando projetos e ações de apoio a pacientes de todas as idades e condições sociais. Entre outras tarefas e processos, esse contingente de 10.193 profissionais realizou, em 2018, um total de:

1.008.660 consultas
59.970 internações
67.160 procedimentos cirúrgicos e obstétricos
6.523.906 serviços auxiliares de diagnóstico e tratamento

A **Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)**, criada pela Lei nº 11.641, de 14 de janeiro de 2008, por transformação da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, é uma Instituição Federal de Ensino Superior, dedicada à criação, transmissão crítica e difusão da ciência, tecnologia e cultura, na área da saúde, mantida pela União Federal e com sede no município de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul.

Tem como missão institucional "produzir e compartilhar conhecimento e formar profissionais da área das ciências da saúde com princípios humanistas e responsabilidade social". Sua visão institucional é "ser modelo de instituição de ensino superior e referência nacional na área de ciências da saúde". Entre seus objetivos estão a formação de profissionais aptos para a inserção no mercado de trabalho e para a participação no crescimento da sociedade; o incentivo ao trabalho de pesquisa, visando ao desenvolvimento da ciência, da tecnologia e da criação e difusão da cultura; o incentivo à divulgação de conhecimentos científicos, técnicos e culturais que constituem patrimônio da humanidade; a promoção da extensão, com vistas ao permanente aperfeiçoamento profissional e cultural da comunidade acadêmica e da comunidade externa; o incentivo e a consolidação do compromisso com a responsabilidade social no ensino, na pesquisa e na extensão.

Originalmente criada pela Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, em 08 de dezembro de 1953, a instituição iniciou suas atividades didáticas a 22 de março de 1961, autorizada pelo Decreto nº 50.165/1961. Em 22 de agosto de 1969, por força do Decreto-Lei Federal nº 781 passou a Fundação de Direito Privado com o nome de Fundação Faculdade Católica de Medicina de Porto Alegre. Em 11 de dezembro de 1980, de acordo com a Lei nº 6.891, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, dotada de Personalidade Jurídica de Direito Privado e vinculada ao então Ministério da Educação e Cultura. Em 1987, com a promulgação da Lei nº 7.596, classificou-se como Fundação Pública e, em 2008, estabelecida como a Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, pela Lei nº 11.641. Inicialmente, a instituição concentrou-se na oferta do curso de graduação em Medicina, mas com a implantação da Residência Médica em 1964 demonstrou seu forte ideal na busca da mais alta qualificação no ensino médico. Esse objetivo, fundamental na história da instituição, continuou sendo norteador das ações quando, em 1968, implementou seu primeiro curso de pós-graduação lato sensu.

Essa trajetória agregou experiência, possibilitando a partir de 1988, a oferta de cursos de pós-graduação stricto sensu, em nível de Mestrado, seguido posteriormente pelo Doutorado. Com essa abrangência das ações na área de ensino a partir de 2004, a instituição ampliou sua atuação, ultrapassando o campo circunscrito da área médica oferecendo dois novos cursos de graduação; Nutrição e Biomedicina. Desde sua transformação, a UFCSPA vem passando por uma intensa reestruturação e expansão, potencializada pela oferta de novos cursos de graduação e pós-graduação e pelo expressivo aumento no quantitativo de alunos, de docentes e de técnicos-administrativos.

Em 2019, a UFCSPA conta com 16 cursos de graduação (bacharelados e tecnológicos), 12 Programas de Pós-Graduação stricto sensu, 09 Cursos de Pós-Graduação lato sensu (07 presenciais e 02 a distância), 64 Programas de Residência Médica e 04 Programas de Residência Multiprofissional Integrada em Saúde Localizada no Centro Histórico de Porto Alegre, a universidade dispõe de uma infraestrutura compacta, com um campus em funcionamento, instalado em uma área física de 9.473,27 m². A UFCSPA possui autonomia administrativa, pedagógica e disciplinar, sendo regida pela legislação federal, pelo seu Estatuto, pelo Regimento Geral e por outros atos normativos internos.

O Campus Central da UFCSPA é constituído por três edificações, sendo estas o Prédio Principal, em construção quando do início das atividades da Instituição, em 1961; o Prédio 2, concluído no ano de 2010 e o Prédio 3, inaugurado no ano de 2015.

O Prédio Principal do Campus conta com área construída total de 10.940,00m², abrigando a Reitoria, os Conselhos Superiores, as Assessorias Especiais e a Área Administrativa da Universidade. Este edifício também é a sede principal dos cursos de graduação oferecidos pela Instituição, contando com infraestrutura composta por gabinetes de coordenação de cursos, salas de aula e de professores, salas de reuniões, salas de estudo individual ou em grupo, entre outras. O Prédio Principal ainda disponibiliza outros espaços, tais quais: anfiteatro, auditório, laboratórios diversos, biotério, sala de videoconferência, biblioteca, espaço de artes, capela ecumênica, cafeteria e ainda um terraço a céu aberto, no último andar, que serve como área de convivência para a comunidade interna da UFCSPA. A universidade conta também com dois laboratórios de informática numa área total de 93 m² e que possuem capacidade para atender, um a 19 e outro, a 25 alunos simultaneamente. As salas de aula possuem mobiliário, ar-condicionado e iluminação adequados, sendo equipadas com quadro branco, tela de projeção, projetor multimídia, computador com leitor de CD/DVD e caixas de som. Os laboratórios de aulas práticas e de pesquisa contam com bancadas, equipamentos adequados e insumos suficientes, elencados pelos professores que os utilizam.

Contando com área total de 8.508,84m², o Prédio 2 do Campus é destinado às áreas de Graduação e Pós-Graduação. Este prédio é majoritariamente composto por laboratórios para realização de pesquisas e aulas práticas, além de contar com salas de aula e de professores e áreas administrativas. Outras estruturas disponibilizadas neste edifício são: teatro, restaurante panorâmico e um amplo espaço de convivência para alunos e servidores. Os laboratórios possuem condições adequadas de mobiliário, equipamentos, iluminação, ventilação.

O Prédio 3 do Campus consiste em uma edificação com metragem total de 6.064,56m² destinada prioritariamente à Pesquisa e Pós-Graduação. O Prédio acomoda salas de aula e de professores, biotério, vários laboratórios de pesquisa, unidades multiusuárias como a Bioanalítica e a de Esterilização, sala de ultra freezers, cafeteria e um moderno anfiteatro com capacidade para 100 pessoas. Neste prédio também estão localizados o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, a Comissão de Pesquisa em Animais e o Escritório de Projetos. Ali, no oitavo andar, se localiza o Laboratório de Imunoterapia, com 100 m², construído neste ano de 2019 abrigando um grupo interdisciplinar de cientistas. A Dra. Cristina Bonorino, imunologista com especialização em imunoterapia e vacinação, coordena o Laboratório que conta com pesquisadores em Química (Dra. Tanira Aguirre, especialista em nanotecnologia), Biologia Estrutural (Dr. Rafael Cáceres, especializado em desenho molecular), e Dra. Melissa Markoski, bióloga molecular. O grupo atua nas seguintes linhas: Desenvolvimento de anticorpos monoclonais para terapia e diagnóstico, Desenho de drogas para imunoterapia, Teste de sistema de “delivery” de drogas e Edição genética utilizando sistema CRISPR. No sétimo andar, encontra-se o Laboratório de Genética Toxicológica, criado em 2010 e que realiza pesquisas na área de reparação de DNA, câncer e pesquisa de novos agentes farmacológicos de origem natural e sintética. O Laboratório, atualmente coordenado pela Dra. Dinara Moura, especialista em genética molecular, e onde também atua a Dra. Jenifer Saffi, especialista em genética mutacional e oncológica, realiza sequenciamento genômico e transcriptômico entre outras análises genéticas e conta com uma área total de 92,74 m². Ainda no Prédio 3 encontra-se o Laboratório de Biologia Molecular, com infraestrutura para análises moleculares como PCR tempo real e clonagem molecular.

- Planejamento do estudo:

Subprojetos Científicos

Procedimentos Metodológicos de cada subprojeto

SUBPROJETO 1. Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais Terapêuticos para PD-1, PD-L1 e CTLA-4

Objetivos:

Este subprojeto visa lançar as bases para desenvolver tecnologia de última geração, utilizando técnicas de biotecnologia imunológica e molecular para isolar anticorpos já existentes em células do sangue humano (plasmablastos). Células produtoras de anticorpos que reconheçam os alvos desejados (inicialmente, CTLA-4, PD-1 e PD-L1) serão isoladas utilizando citometria de fluxo e *sorting*. Os genes codificadores desses anticorpos serão clonados, e produzidos de forma recombinante para caracterização e teste de afinidade ao alvo. Utilizaremos estratégias *in silico* de biologia estrutural para investigar os pontos de interação do anticorpo com o alvo, podendo aumentar sua afinidade se necessário. Os anticorpos selecionados serão testados em modelos pré-clínicos. Essa estratégia é hoje utilizada no desenvolvimento de imunoterapias já em testes clínicos para HIV, Ebola vírus e câncer, e evita o tempo necessário para humanizar anticorpos monoclonais desenvolvidos em roedores, além de minimizar o uso de animais. **Ao ser implantada, esta estrutura torna-se uma fonte de descoberta de novas moléculas e alvos, que podem ser investigados em projetos futuros para isolar novos fármacos para o SUS.**

Desenho do estudo: Este subprojeto exploratório descreve uma proposta científica para preparar condições experimentais para o desenvolvimento tecnológico de terapias medicamentosas baseadas em recentes descobertas sobre a relação ao nível molecular entre o sistema imune do paciente com o câncer. É um projeto de P&D.

Participantes de pesquisa e tamanho amostral: Serão recrutados inicialmente 30 indivíduos, entre pacientes oncológicos da Santa Casa e indivíduos saudáveis para doação de sangue e busca de células B circulantes produtoras de anticorpos para os alvos escolhidos.

Descrição do local do estudo. O Estudo será realizado no Hospital Santa Rita da Santa Casa de Misericórdia e nos Laboratórios de Imunoterapia, Imunologia Celular, Biologia Molecular, Genômica e áreas multiusuário da UFCSPA.

Planejamento do estudo, Métodos e Análise dos Dados:

ETAPA A. Isolamento de plasmablastos do sangue de pacientes e identificação de células B produtoras de anticorpos contra PD-1, PD-L1, e CTLA-4.

Cronograma: Meses 01-18

Justificativa/Descrição: Esta etapa identifica anticorpos naturais, humanos, existentes no sangue de indivíduos saudáveis ou pacientes oncológicos, contra os alvos desejados. Tal metodologia é hoje uma tendência que minimiza o tempo e os recursos necessários com as metodologias anteriores que envolviam imunização de ratos e camundongos, biotério, e humanização de anticorpos. Os anticorpos monoclonais desenvolvidos para uso terapêutico em humanos não podem ser utilizados em sua forma original, pois

constituem proteínas estranhas ao organismo humano, e geram reações de hipersensibilidade – conhecida como doença do soro ou reação de Arthus. Recursos consideráveis são empregados na “humanização” desses anticorpos para que possam ter utilidade terapêutica. Para evitar isso, focaremos na obtenção direta de anticorpos humanos, específicos para os antígenos desejados. Para isso, necessitamos um citômetro de fluxo especial, que funciona como um “*sorter*”, um isolador de células, que a partir de células do sangue, concentra e enriquece uma população desejada de células a partir de seus marcadores de superfície, separando inclusive uma célula por tubo (*single-cell sorting*). Uma máquina dessas é solicitada no orçamento (existem apenas duas no RS, e nenhuma na UFCSPA/ISCOMPA). Uma segunda máquina, também solicitada no orçamento, inexistente no Sul do País, nos permite depois sequenciar os genes de uma única célula, e isolar o monoclonal humano.

Primeiramente, isolaremos células B humanas de sangue periférico, fazendo uma separação das células mononucleares por centrifugação de gradiente e marcação com corante para viabilidade, e as células B são purificadas por *sorting* (células CD27+) ou utilizando o kit magnético para isolamento de células B de memória da Milteny. Após o *sorting* dessas células, utilizaremos um método de estimulação dessas células em cultura, chamado de “**vacinação *in vitro*” (Nandin et al. 2017), em que os plasmablastos são estimulados em cultura** em meio RPMI completo suplementado com beta-mercaptoetanol, aminoácidos e antibióticos, **com nano partículas contendo o antígeno (que será PD-1, PD-L1 ou CTLA-4 humanos, obtidos comercialmente da Sigma) e o ligante de receptor tipo Toll (TRL) 3 CpG**, por 3 dias.

Para a preparação das nanopartículas, a Dra. Tanira Aguirre utilizará matérias-primas principais: óleo de babaçu (*Orbignya oleífera*, Mundo dos Óleos, Brasil), poli(ε-caprolactona) (Sigma-Aldrich, Brasil) triglicerídeos de cadeia média (ácidos cáprico e caprílico, Delaware, Brasil), oleato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), trioleato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), polissorbato 80 (Tween 80, Sigma-Aldrich, Brasil), monoestearato de sorbitano (Sigma-Aldrich, Brasil), além das moléculas PD1 e CPG. Os solventes orgânicos serão etanol e acetona (Neon, Brasil) para o preparo das NPs e acetonitrila para quantificação.

Serão feitas duas fases, uma orgânica (FO) e uma aquosa (FA). Inicialmente, na FO serão misturados PCL (100 mg), combinação entre acetona e etanol (25 mL), óleo de babaçu (30mg), triglicerídeo de cadeia média do ácido cáprico-caprílico (10 µL) e a proteína PD1 e/ou moléculas CpG. A FA, por outro lado, será composta de água ultrapura (55 mL) e polissorbato 80 (65 mg). Ambas as fases serão colocadas sob agitação e aquecimento a 36 °C. Após completa homogeneização das fases, a fase orgânica será injetada na fase aquosa lentamente o auxílio de funil específico. A formulação é deixada em agitação magnética controlada por 10 min e, posteriormente, será levada ao rota-evaporador e seu volume será reduzido a 10 mL. As incorporações dos antígenos nas nano partículas será testada na Unidade Bioanalítica do Prédio 3, por HPLC e espectrometria de massas.

Após 3 dias em cultura com nanopartículas, as células serão tratadas com 10 ng de IL-3 humana para mais 3 dias de cultura, sendo cultivadas por um total de seis dias. Essa estratégia comprovadamente garante uma proliferação robusta de células B *in vitro*, sem necessidade de ajuda de células T. Importante, as células vêm de indivíduos saudáveis ou pacientes, que não são “vacinados” *in vivo* com o antígeno – não há manipulação ou intervenção no doador, que apenas contribui com doação de sangue, que consente assinando um TCLE. Após seis dias em cultura, em que o nível de produção de anticorpos específicos é monitorado por ELISA, as células estimuladas são coletadas, marcadas com anticorpos anti-CD27 e anti-CD38, e separadas individualmente em poços individuais de placas de PCR, sendo imediatamente congeladas e preservadas a -80°C.

ETAPA B. Clonagem, expressão e caracterização dos anticorpos monoclonais obtidos na Etapa A.

Cronograma: Meses 06-24

Justificativa/Descrição: Nesta etapa os genes de anticorpos específicos das células B isoladas a partir do sangue são clonados para produção por biologia molecular. cDNA de células isoladas será sintetizado na placa de 96 poços com transcriptase reversa Superscript III usando oligo-dT. E 150 ng de primers randômicos, como descrito em (Tiller et al. 2008). Os transcritos para IgH, Ig lambda ou Ig Kappa são amplificados independentemente, por um PCR do tipo “*nested*”, descrito pelo estudo de Tille e colaboradores, em que cada “round” tem 40 ciclos. Os produtos de PCR são purificados com o kit de purificação Qia-Quick 96 PCR (Qiagen) e processados para digestão enzimática por enzimas de restrição específicas para clonagem em vetores de expressão específicos para Ig gamma 1, Ig kappa e Ig lambda. O DNA clonado será sequenciado no sequenciador Illumina MiSeq, existente na UFCSPA. As sequências obtidas serão comparadas com as sequências “*germline*” dos genes (sem rearranjo), utilizando a ferramenta *in silico* Ig BLAST. Os plasmídeos contendo as sequências clonadas para as cadeias leve e pesada serão co-transfectados por eletroporação em células HEK293T em crescimento exponencial. Essas células podem ser compradas da ATCC, mas podem também ser doadas pelos colaboradores da UC San Diego da Dra. Cristina. Após 3 dias, os sobrenadantes serão testados por ELISA para a produção do anticorpo recombinante.

Os anticorpos serão primeiramente purificados por cromatografia de afinidade com proteína G ou A de *Staphylococcus aureus*. Tais proteínas ligam-se a porções glicosiladas do fragmento Fc das imunoglobulinas, com afinidade diferente entre as diferentes subclasses destas. Para tal, o sobrenadante das culturas dos hibridomas clonais é extensamente centrifugado, filtrado e o pH ajustado para 8.0 utilizando NaOH 1 M. Colunas com proteína A conjugada a Sepharose são preparadas no mesmo pH, e o sobrenadante colocado para correr na coluna. Os anticorpos serão eluídos da coluna com ácido cítrico 0.1M no pH apropriado para cada subtipo (entre 6,5 e 3), em tubo contendo Tris base 2M. Os anticorpos assim eluídos e neutralizados serão dializados ou o tampão trocado para PBS pH 7.0 utilizando centrifugação em tubo Amicon, ou troca de tampão em colunas PD10. A concentração do eluído será determinada por espectrofotometria ou em aparato Nanodrop, e a pureza analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração de sais de prata. Os anticorpos eluídos da coluna serão subtipados para classe e subclasse de anticorpos - IgG1, IgG2a, IgG2b, ou IgG3 – por kits de ELISA específicos para tal função.

Anticorpos anti-PD-L1 obtidos serão utilizados no subprojeto 2, sendo testados para sua capacidade de prever a expressão de PD-L1 em testes imuno-histoquímicos – constituindo o preditivo de resposta para o tratamento anti-PD-1.

A cinética da interação dos anticorpos monoclonais obtidos será testada por ressonância plasmática de superfície (SPR) usando um sistema Biacore 2000, disponível em colaboração com o Dr. Cristiano Bizarro, da PUCRS. Os anticorpos serão purificados por HPLC, diluídos a uma concentração de 30 µg/mL em 10 mM acetato de sódio, e covalentemente imobilizados na matriz de um chip sensor CM5. A taxa de associação (K_{on}) e dissociação (K_{off}) bem como a constante de equilíbrio de dissociação (K_d) serão calculadas alinhando as curvas de ligação para um modelo Langmuir usando o *software* próprio do Biacore.

A afinidade dos anticorpos obtidos e seus pontos de interação com os alvos específicos será analisada por biologia estrutural computacional, no grupo do Dr. Rafael Cáceres. Serão empregados de forma integrada

métodos computacionais a fim de se obter anticorpos mais efetivos, com maior afinidade, especificidade e estabilidade (**Figura 1A**). Dentre os métodos serão utilizados a modelagem molecular por homologia e para simular a interação entre antígeno computacionalmente planejado e anticorpo utilizaremos a docagem molecular por homologia (**Figura 1B**). Com o intuito de avaliar a estabilidade do complexo antígeno-anticorpo empregaremos a simulação por dinâmica molecular e métodos de quantificação da ΔG de associação utilizando os métodos de MM/PBSA e MM/GBSA.

Após a modelagem molecular das interações antígeno-anticorpo, baseadas em suas sequências, modificações estruturais para obter um aumento da afinidade – se necessário – podem ser obtidas utilizando técnicas de mutação sítio-dirigida, que serão realizadas pelo grupo da Dra. Jenifer Saffi e da Dra. Melissa Markoski.

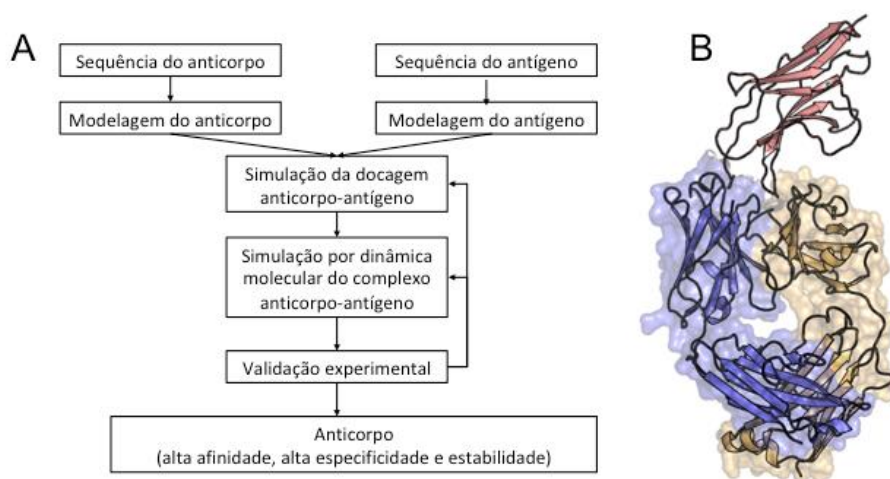


Figura 1. (A) Fluxograma das metodologias computacionais a serem empregadas no projeto. (B) Representação da estrutura do complexo PD1:Fragmento Fab Nlvolumab. A estrutura do anticorpo representado com a superfície molecular (transparente) e a representação da sua estrutura secundária na forma de cartoon, em azul a cadeia pesada e em amarelo a cadeia leve, respectivamente. Em salmão, representado na forma de *cartoon*, a estrutura do PD1. Figura gerada pelo Pymol. PDB ID: 5GGR.

ETAPA C. Prova de conceito funcional em modelos pré-clínicos dos anticorpos monoclonais obtidos e caracterizados

Cronograma: 18-36

Justificativa/Descrição: Esta etapa será realizada com experimentos *in vitro* e *in vivo*. A parte *in vivo* contará com a colaboração da Dra. Vivian Vasconcelos, da UFMG, que desenvolveu um sistema de camundongo humanizado para o estudo de drogas antitumorais, e com o Dr. Alexander Birbrair, também da UFMG, recentemente premiado pelo Instituto Serrapilheira e especialista em imagem de tumores e modelos pré-clínicos para o estudo de tumorigênese e angiogênese.

Para os estudos *in vitro*, realizaremos ensaios em que medimos a interrupção de proliferação de linfócitos T humanos com os anticorpos anti-PD-1, anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4 obtidos. A metodologia destes ensaios está descrita em um artigo aceito para publicação ainda em 2019 na revista *Immunity* (Zhao et al, 2019), em que a Dra. Cristina colaborou com colegas da UC San Diego em um novo mecanismo de resistência a terapias com anti-PD-1 e anti-PD-L1, e também está brevemente descrita em (Zhao et al. 2018).

Brevemente, células Jurkat (linhagem de células T humanas) expressando PD-1 e o TCR para MHC I-Ova peptide (OT-I) serão incubadas com células HEK293 expressando MHC I, e peptídeo SINFEKKL de ovalbumina. Essa interação induz proliferação de linfócitos T, e é desestabilizada pelos anticorpos anti-PD-1, anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4. A proliferação é lida em citometria de fluxo, com diluição do corante CFSE.

Para o teste de prova de conceito *in vivo*, células mononucleares (PBMCs, 7×10^6 células por camundongo) de sangue periférico de doadores saudáveis serão usadas para reconstituir camundongos imunodeficientes NOD-SCID- γ null (NSG), presentes no biotério da UFMG e que serão doados para a UFCSPA. Cada animal terá sido previamente injetado subcutaneamente (ou próximo à glândula mamária, se tratando de câncer de mama) com células tumorais das linhagens de câncer humano HT-29 (câncer colorretal) ou adenocarcinoma de cólon MC-38 como descrito em (Sanmamed et al. 2015), ou MDA-231 de mama, como descrito em (Park, Lee, and Lee 2018). Os tumores estabelecidos serão imageados por microscopia de imunofluorescência e confocal, e a sua infiltração pelos linfócitos T comprovada. Após 14 dias de crescimento, serão analisados para expressão de PD-L1, e caracterizados molecularmente e imunologicamente como descrito no subprojeto 2. Os animais serão a seguir tratados com os anticorpos obtidos anti-PD-1, anti-PD-L1, ou anti-CTLA-4, ou combinações destes, em curvas de dose/resposta e diferentes regimes de tempo, como resumido em (De La Rochere et al. 2018), e as curvas de inibição de crescimento tumoral e sobrevivência serão determinadas. Esta metodologia é a mais avançada, dentro do estado da arte, em estudos pré-clínicos para imunoterapia. Poderemos, ao longo do estudo, ou obter, ou terceirizar, estudos em animais NSG nulos para MHC I e II, que recentemente vem trazendo resultados com menor variação nesses testes. Esse serviço é oferecido pelo Jax Labs, nos EUA, mas pode também ser realizado em colaboração com a UCSD.

Resultados esperados do Subprojeto 1:

1. Isolar anticorpos humanos anti-CTLA-4, anti-PD-1 e anti-PD-L1, determinar sua afinidade ao alvo e seu efeito a nível pré-clínico;
2. Solicitar ao menos **1 (um) pedido de patente de alta competitividade**, precedidas de busca de anterioridade especializada e contemplando aspectos de novidade, atividade inventiva e aplicabilidade diagnóstica preditiva/prognóstica e, preferencialmente, respaldada por resultados *in vivo* ou corroborado biomarcador com amostras clínicas preliminares;
3. Publicar **2 (dois) trabalhos em periódicos “peer reviewed”** de alto impacto na área de oncologia;
4. Formar **3 (três) profissionais: 01** doutorado, e dois pós-doutorados, na área da biologia do câncer focada na descoberta/desenvolvimento de novos fármacos

SUBPROJETO 2. Desenvolvimento de Testes Preditivos de Resposta Terapêutica e Caracterização Molecular e Imunológica dos Tumores de Pacientes Oncológicos da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Objetivos:

Este subprojeto possui uma abordagem de pesquisa, descoberta e desenvolvimento e tem por objetivos: (1) realizar testes genéticos e moleculares com valor preditivo comprovado a terapias já aprovadas pelas agências reguladoras (FDA e ANVISA) e validá-los junto aos testes comerciais existentes no mercado; (2) explorar o perfil celular e genômico dos componentes do sistema imune existentes nos tumores sólidos para gerar informações regionais sobre parte da população atendida pelo SUS na Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre; (3) fornecer uma base de dados para o Ministério da Saúde com informações biológicas, que possam ser utilizadas em estudos epidemiológicos e de custo-efetividade em relação aos perfis moleculares e imunológicos de parte dos pacientes oncológicos atendidos pelo SUS, visando subsidiar discussões e tomadas de decisões em relação à gestão dos custos relativos ao tratamento oncológico, melhorias ao atendimento prestado e aumento da qualidade de vida e das taxas de sobrevivência.

Somente em 2018, a Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre atendeu **934 pacientes com tumores de cólon e reto, pulmão, mama, próstata e melanoma pelo SUS**. Nosso enfoque nestes tipos de tumores é baseado na sua prevalência e mortalidade (Tabela I), mas também elegibilidade à imunoterapia conforme o estado-da-arte neste momento. Os cânceres de mama e próstata são os mais prevalentes em mulheres e homens, respectivamente, seguidos pelos tumores de pulmão e de cólon e reto (Fonte: INCA, 2018). Estes quatro tipos de tumores são principais responsáveis pelas mortes por câncer no Brasil e no mundo (INCA, 2018; (Siegel, Miller, and Jemal 2019)). O melanoma, por sua vez, embora de incidência muito inferior, apresenta um perfil extremamente agressivo pela geração de metástases, cujo tratamento com quimioterapia comum ainda não alcança a cura (Hodi et al. 2018).

Para todos estes tipos de tumores, muitos avanços foram realizados durante os últimos anos em termos de desenvolvimento de marcadores moleculares e terapias direcionadas de acordo com os aspectos moleculares específicos. Dentre elas, as terapias-alvo e a imunoterapia, as quais mudaram completamente o paradigma de tratamento de tumores considerados incuráveis. Já foi reportado em que a imunoterapia é, de fato, custo efetiva no tratamento do carcinoma de pulmão de não-pequenas células e no melanoma metastático (Verma et al. 2018).

Tabela I: Aspectos epidemiológicos do câncer no País e na ISCMPA

	<i>No. novos casos no Brasil*</i>	<i>No. de novos casos no RS*</i>	<i>No. de casos atendidos pelo SUS na ISCMPA</i>
<i>Pulmão**</i>	31.270	8.460	228
<i>Cólon e reto</i>	36.360	6.710	187
<i>Mama</i>	59.700	11.030	715
<i>Próstata</i>	68.220	14.290	435
<i>Melanoma</i>	6.260	2.000	84

*Estimativas de novos casos por ano no biênio 2018-2019. **compreende tumores de traqueia, brônquio e pulmão. Fontes: INCA, 2018; Sistema de Registro Hospitalar de Câncer (SisRHC).

O tratamento atualmente empregado para o melanoma metastático com as terapias-alvo demanda 200% a mais de recursos do que a imunoterapia (Pompilio, Campanella, and Integlia 2017). Contudo, como estes dados não refletem a realidade do cenário brasileiro, e para tornar possível a incorporação destes tratamentos para o SUS são necessárias informações sobre perfil molecular dos seus usuários e do desenvolvimento de alternativas diagnósticas e terapêuticas nacionais.

Ao estabelecer o perfil molecular dos tumores, a prescrição de estratégias terapêuticas direcionadas substitui os tratamentos atuais, baseados em agentes com ação ampla e considerados inespecíficos (“*one-size-fits-all model*”). Consequentemente, estes tratamentos (quimioterapia e radioterapia), ao desconsiderar a complexidade molecular da doença, não raramente resultam em descontinuidade decorrente de toxicidade e na facilitação da ocorrência dos processos metastáticos. Estes eventos são os maiores responsáveis por adicionar custos diretos e indiretos ao SUS, que incluem maiores frequências de visitas hospitalares e tempos de internação e demanda por processos diagnósticos e terapêuticos. Atualmente, não há cobertura para os testes já aprovados e disponíveis comercialmente como direcionadores da decisão terapêutica por parte do SUS (Tabela II). Os testes, que são baseados em imunohistoquímica, expressão gênica e pesquisa de mutações através do sequenciamento do DNA, variam entre 800 e 4000 reais, dependendo do número de marcadores incluídos. Testes mais robustos como o FoundationOne® (Roche) e o Oncotype Dx® (Genomic Health Inc.) podem custar mais de R\$15.000,00. Estes testes são indicados para tumores de próstata, cólon e mama e abrangem as principais mutações que possuem valor preditivo estabelecido, embora também tragam informações prognósticas, como risco de recidivas e metástase. **Todavia, as metodologias empregadas por estes kits, bem como as sequências (padrões) utilizadas na confecção dos painéis são de domínio público e comercializadas para a pesquisa.** Isto permite, portanto, que sejam desenhados e validados painéis alternativos com menores custos aos pacientes. Como pode ser visto na Tabela II, a seguir, um paciente do SUS de câncer de pulmão, por exemplo, não tem seu tumor analisado por testes preditivos de resposta a tratamentos com as diferentes terapias disponíveis. Ele recebe uma quimioterapia convencional, que custa entre 4 e 5 mil reais, e tem chance de recuperação total praticamente nula. Como ele não tem seu tumor analisado para marcadores imunológicos e moleculares, ele também não é direcionado para estudos clínicos multicêntricos sendo desenvolvidos com as mais novas terapias, e o custo de sua quimioterapia fica com o SUS.

Já um paciente de convênio faz análise mutações nos genes *EGFR*, *ALK*, *ROS* e *BRAF*, além do perfil imunológico quanto à expressão de PD-L1. Cada um desses testes custa, comercialmente, em média 1500 reais – um custo que se aproxima de 8 mil reais. Sendo positivo, para um ou mais desses marcadores, pode ou entrar em um ensaio clínico ou recebe do convenio terapia dirigida para o alvo que pode elevar para 20 a 40% sua média de recuperação total. Contudo, esses tratamentos podem custar de 23 mil até 3 milhões de reais. Nosso projeto propõe desenvolver esses testes para o SUS, e também o tratamento imunoterápico – o mais caro, e com maior chance de recuperação total do paciente. O rastreamento destes perfis moleculares pode ser uma estratégia para fomentar a indicação destes pacientes para os estudos clínicos patrocinados pela indústria farmacêutica. Por exemplo, atualmente há dezenas destes estudos com recrutamento ativo no Brasil com os agentes anti-PD1, anti-PD-L1 e anti-CTLA4 isoladamente ou em combinação para diversos tipos de tumores. Somente em Porto Alegre, em outubro de 2019, há 46 estudos com recrutamento ativo. Portanto, em posse dos testes moleculares, o paciente do SUS poderia ser encaminhado diretamente para os centros de pesquisa para verificação da elegibilidade. Em havendo a sua inclusão no estudo, o paciente imediatamente passa a ser parte do estudo clínico e todos os custos assistenciais passam a ser cobertos pelo patrocinador. Além disto, este rastreamento, executado sob a forma de pesquisa exploratória para delineamento de perfis populacionais, serve de base para a criação de um portfólio para captar mais estudos clínicos localmente.

Tabela II: Marcadores moleculares - MSI: Instabilidade de Microssatélites; FOLFIRI: 5-fluoracil, leucovorin e irinotecano; AC-T: docetaxel + ciclofosfamida + paclitaxel) + inibidor de aromatase. Fontes: CONITEC; (Corrêa et al. 2019)

Neoplasia	Biomarcador	Método	Prevalência (teste positivo)	Valor comercial médio (este)	Tratamento previsto no SUS	Valor médio do tratamento no SUS	Terapias Aprovadas	Valor aproximado do tratamento direcionado
Cólon e reto estágios III e IV	MSI	IHQ (Benchmark Ultra-Ventana e Autostainer Dako) ou PCR	15-20%	R\$800,00	FOLFIRI	R\$76.734,54	Pembrolizumabe	\$3.000.000,00
	Mutações nos genes <i>KRAS/NRAS</i>	RT-PCR ou NGS	60%	R\$1.000,00			Cetuximabe	R\$30.000,00
							Panitumimabe	R\$30.000,00
Pulmão de não-pequenas células	Mutações no gene <i>EGFR</i>	RT-PCR ou NGS	10-15% (171 casos no SUS em 2018)	R\$1.200,00 - R\$1500,00	Cisplatina + docetaxel, Cisplatina + vinorelbina Cisplatina+gencitabina, Carboplatina + paclitaxel	R\$4.000,00 - R\$8.000,00	Afatinibe, Gefitinib, Nectumumab	R\$23.000,00
	Mutação T790M no gene <i>EGFR</i>	RT-PCR ou NGS	60% dos pacientes que progridem pós-terapia com anti-EGFR e TKI				Osimertinib Crizotinibe, Ceritinibe Alectinibe Brigatinibe Crizotinibe Dabrafenibe Trametinibe	R\$25000,00 - R\$50.000,00
	ALK (rearranjo)	IHQ e FISH	3-7%					
	ROS1 (rearranjo)	IHQ e FISH	1-2%					
	Mutações V600E/K/R/D do gene <i>BRAF</i>	RT-PCR ou NGS	1-3%					
	PD-L1	IHQ (Benchmark Ultra-Ventana e Autostainer Dako)	30%				Pembrolizumabe	R\$3.000.000,00
Pele tipo melanoma avançado	Mutações V600E/K/R/D do gene <i>BRAF</i>	RT-PCR ou NGS	50%	R\$1.200,00	Dacarbazina	R\$13.000,00	Vemufarenibe	R\$257.673,60
							Vemurafenibe + Cobimetinibe	R\$375.631,2
							Dobrafenibe + Trametinibe	R\$375.631,20

							Ipilimumabe	R\$3.000.000,00
--	--	--	--	--	--	--	-------------	-----------------

Esta proposta visa à criação de uma base de dados baseada em informações genéticas e imunológicas de parte representativa da população para (1) compilar evidências que possam subsidiar a discussão sobre a modernização de estratégias diagnósticas e terapêuticas para o SUS; (2) adquirir evidências sobre o perfil imunológico dos tumores e auxiliar na construção de um racional biológico para desenvolvimento de tecnologias nacionais baseadas na imunoterapia; e (3) fomentar a inclusão de pacientes atendidos pelo SUS em estudos clínicos multicêntricos conduzidos pela indústria farmacêutica internacional, visando à redução do contingente de pacientes complexos ao mesmo tempo criando oportunidades de tratamento mais avançado disponível no mercado internacional.

Entre 1999 e 2015, houve um aumento nos gastos com tratamentos oncológicos de R\$470 milhões para R\$3,5 bilhões, sendo 2/3 deste valor com quimioterapia. Parte expressiva deste valor é destinado a tratamentos paliativos, ou seja, quando as chances de cura são remotas ou mesmo nulas (Fonte: Ministério da Saúde. Sistema de Gerenciamento da Tabela de Procedimentos, Medicamentos e OPM do SUS). Considerando-se o acima exposto e a previsão de um aumento de cerca de 70% no número de casos de câncer no mundo em 2030 (segundo a Organização Mundial de Saúde), plausível prever que haverá uma sobreposição entre novos casos e casos tratados de forma inadequada, possivelmente resultando em uma sobrecarga no número total de usuários do SUS por razões oncológicas. Portanto, há uma necessidade urgente em compreender a realidade nacional e promover ações realísticas para acompanhamento das tendências mundiais de rastreamento, diagnóstico e terapêutica do câncer.

Desenho do estudo: Trata-se de um projeto de P&D com aspectos de pesquisa básica e descoberta e características epidemiológicas, bem como de translação de metas no decorrer de sua execução;

Participantes de pesquisa e tamanho amostral: Pacientes com diagnósticos confirmados por biópsia ou outro método padrão de neoplasias de mama, próstata, pulmão (não-pequenas células), cólon e reto e melanoma, atendidos no Ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital Santa Rita da ISCMPA. O cálculo amostral será baseado no número total de casos no Brasil e aqueles atendidos durante 2018 na Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Portanto, pretende-se incluir cerca de: 100 de cada um dos seguintes tumores: pulmão, câncer colorretal, próstata e mama e 50 casos de melanoma.

Descrição do local do estudo: O Estudo será realizado no Hospital Santa Rita da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e nos Laboratórios de Imunoterapia, Imunologia Celular, Biologia Molecular, Genômica e áreas multiusuário da UFCSPA.

Planejamento do estudo, Métodos e Análise dos Dados:

ETAPA A. Caracterização genética de tumores de pacientes oncológicos atendidos no Hospital Santa Rita (ISCMPA)

Cronograma: Meses 01 – 18

Justificativa/Descrição: Esta etapa visa executar a pesquisa dos marcadores moleculares com valor preditivo estabelecido para terapias já aprovadas e o rastreamento das sequências mutadas geradoras de neoantígenos nas neoplasias de maior incidência (mama, próstata, pulmão não-pequenas células- NSCLC, colorretal - CCR e melanoma) de pacientes recém diagnosticados. Portanto, é um projeto exploratório com potencial desdobramento em produtos.

A primeira finalidade desta etapa é delinear o perfil molecular de parte dos pacientes atendidos pelo SUS através da pesquisa por alterações nos tumores (mutações e modificação na expressão de proteínas) que sabidamente influenciam a resposta terapêutica e o prognóstico. Estes dados serão utilizados para (1) prospectar a elegibilidade de pacientes do SUS em estudos multicêntricos patrocinados pela indústria em Porto Alegre; (2) gerar uma base de dados local com finalidade de suporte aos órgãos responsáveis pelas tomadas de decisão e incorporação de novas tecnologias em saúde; (3) promover descobertas em relação aos mecanismos envolvidos na geração de neoantígenos.

A grande maioria dos tumores apresenta defeitos em vias de reparo do DNA, as quais permitem que eles se desenvolvam, escapem dos mecanismos de morte celular e adquiram resistência ao tratamento. Em 2015, descobriu-se que tumores que tinham uma destas vias inativadas, mais precisamente a via de reparo de malpareamento (MMR), eram extremamente sensíveis à imunoterapia (Aparicio 2015). Neste momento, a pesquisa de instabilidade de microssatélites (MSI), que reflete a deficiência desta via, passou a ser o principal marcador de sensibilidade à imunoterapia. A MSI é um fenótipo molecular que gera uma carga mutacional muito elevada em células replicativas, como as tumorais. Estas mutações resultam em proteínas disfuncionais ou não-funcionais, as quais, são encaminhadas a um sistema intracelular de destruição, gerando pequenos peptídeos - ou neoantígenos. Os neoantígenos, portanto, são proteínas produzidas pelas células tumorais não reconhecidas pelo sistema imune (Heemskerk, Kvistborg, and Schumacher 2013).

Contudo, os rápidos avanços na área vêm demonstrando que tumores sem deficiência na via MMR ou sem MSI também produzem neoantígenos, portanto, podem ser sensíveis à imunoterapia. Daí a identificação de sequências de DNA alteradas que dão origem aos neoantígenos em tumores com outros perfis moleculares é um alvo extremamente atraente para o desenvolvimento de novas abordagens imunoterapêuticas (Garcia-Garijo, Fajardo, and Gros 2019). Diante disto, queremos identificar nos tumores mais prevalentes no nosso Estado as principais sequências geradoras de neoantígenos para, futuramente, desenvolvermos alvos terapêuticos baseados na nossa realidade.

Nesta etapa, iremos extrair o DNA e o RNA de tumores emblocados em parafina com mais de 20% de células neoplásicas, confirmadas por um patologista, através de kits comerciais (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit e RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE, Invitrogen). Com o DNA, faremos a análise somática das seguintes mutações será feita através do Sequenciamento de Segunda Geração por Multiplex (NGS - *Next Generation Sequencing*): **KRAS e NRAS** (éxons 2 - códons 12, 13 e 33; 3 - códons 59 e 61; e 4 - códons 117 e 146) para tumores colorretais; **BRAF** (mutações V600E nos códons 600 e 601 para melanoma); **EGFR** (deleções no éxon 19 e alterações nos éxons 20 (T790M0) e 21 (L858R) para NSCLC); **ALK, ROS1, NTRK1, NTRK2, NTRK3** (rearranjos/fusões para NSCLC); amplificação de **ERBB2 (HER2)** para câncer de mama; e mutações em **BRCA 1 e 2** para câncer de mama e próstata. Será realizado também, o sequenciamento do genoma global para pesquisa variação no número de cópias, inserções e deleções. Todos os testes serão lidos pelo do sequenciador MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA), com um valor aproximado de 1 milhão de reais, já disponível no Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA.

Através da mesma metodologia, temos por objetivo **validar a pesquisa de MSI, hoje feita individualmente por imunohistoquímica** (Haraldsdottir 2017) **ou, quando feita por NGS, faz parte de painéis que hoje custam cerca de 15 mil reais.** Para a avaliação de MSI e do status da carga mutacional, será utilizado o painel da TruSight™ Oncology 500 (Illumina). Serão feitas associações entre as análises mutacionais, MSI e a *Tumor Mutational Burden* (TMB) (ou carga mutacional). Desta forma, será possível operar o rastreamento deste fenótipo molecular concomitantemente à pesquisa de mutações somáticas de valor preditivo estabelecido em um mesmo painel.

ETAPA B. Caracterização tumoral imunológica e desenvolvimento de novos marcadores

Cronograma: Meses 6-24

Justificativa/Descrição: Esta etapa visa à descoberta de novos marcadores imunológicos com potencial valor preditivo e que sirvam de alvo para o desenvolvimento de novos alvos para a imunoterapia nos pacientes com os tumores de maior incidência no País. Como mencionamos anteriormente, tumores apresentam níveis de mutações variados, as quais podem ser atribuídas a muitos mecanismos, como a inativação da via MMR. Esta carga mutacional é responsável pela produção de neoantígenos, os quais são antígenos ideais de rejeição de tumores. Portanto, a identificação de mutações que originam estes neoantígenos é fundamental para o sucesso da imunoterapia. Contudo, a geração de neoantígenos é um processo complexo e ainda pouco conhecido e apenas através da tecnologia de ponta e da geração de dados robustos será possível que dados e tecnologias produzidos no País sejam competitivos mundialmente. Nesta etapa, temos por objetivo estudar os infiltrados imunes através de tecnologias de ponta, o que nos permitirá demonstrar (1) quais genótipos tumorais determinam imunofenótipos específicos; (2) quais as principais mutações somáticas que determinam a formação de neoantígenos; (3) quais neoantígenos apresentam potencial terapêutico. Adicionalmente, iremos desenvolver o teste imuno-histoquímico da presença de anti-PD-L1 a partir dos anticorpos desenvolvidos no subprojeto 1.

Mutações, alteração no número de cópias de certos genes e a fusão gênica no DNA das células tumorais geram neoantígenos. Células imunes infiltradas no tumor, mais precisamente os linfócitos, tendem a retardar a progressão do tumor. Porém, há vários tipos de linfócitos, incluindo linfócitos citotóxicos T CD8+ (que atuam diretamente na morte das células tumorais) e os T CD4+ (que se diferenciam de acordo com os estímulos no ambiente tumoral). **Portanto, buscaremos desenvolver a caracterização celular global do tumor, mas com enfoque nas células infiltradas do sistema imune e nos neoantígenos.**

A caracterização das populações celulares dos infiltrados imunes nos tumores e a identificação dos potenciais neoantígenos será realizada através da técnica de *Single Cell Sequencing*, realizada no equipamento BD Rhapsody™ (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Esta técnica permite estudar célula por célula em nível transcricômico, o que é de particular interesse no que tange aos linfócitos infiltrados no tumor. Estas populações são heterogêneas, dinâmicas e suscetíveis ao microambiente tumoral, características que podem contribuir para diferentes respostas à imunoterapia (Zhang and Zhang 2019).

Para esta análise, fragmentos dos tumores frescos coletados durante o procedimento cirúrgico serão desagregados, ou seja, as células serão separadas, gerando suspensões celulares. Esta suspensão será filtrada para evitar a presença de grumos ou impurezas e diluída em PBS ou meio de cultivo livre de soro. Então, cerca de 20.000 células serão introduzidas em um cartucho que contém 200.000 poços microscópicos. Cada cartucho permite o sequenciamento por célula isolada (*single cell*) da massa tumoral de até 12 pacientes. Subsequentemente, serão adicionadas contas magnéticas (*beads*) marcadas com oligonucleotídeos, cada uma com um código de barras único contendo uma *tag* de poliadenilação capaz de se ligar ao RNA mensageiro de interesse. Uma vez que cada célula única está pareada à uma *bead* com o código de barras, o sistema interno do equipamento lisa as células, realiza a transcrição reversa do mRNA e, então, sequencia o DNA resultante. Serão montados painéis com as sequências geradoras de neoantígenos mais prevalentes de acordo com a *database* “The Cancer Immunome Atlas” (<https://tcia.at>). Finalmente, será aplicado o “imunofenograma”, que compila os imunofenótipos dos tumores em um escore com valor preditivo e prognóstico. Este escore é baseado na expressão dos principais determinantes do sistema imune tumoral: moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), imunomoduladoras e de células efectoras e supressoras (Charoentong et al. 2017).

Finalmente, iremos validar a presença de atividade **anti-PD-L1** a partir dos anticorpos produzidos durante o subprojeto 1. Esta etapa será executada junto ao Laboratório de Patologia do Hospital Santa Rita, de modo a aproveitar os fluxogramas do processamento histológico e a expertise dos patologistas. Serão utilizados cortes histológicos dos tumores emblocados em parafina e controles sabidamente positivos seccionados de 2-3 micras, desparafinizados e submetidos à reação de imunohistoquímica. Adicionalmente, as amostras serão encaminhadas à validação da expressão **de PD-L1** pelo teste comercial (reação automatizada no equipamento Benchmark Ultra-Ventana (Clone:SP263-Roche) e Autostainer Dako (Clone: 22C3-Dako)), o qual também se baseia na mesma técnica, para fins de comparação com a alternativa a ser desenvolvida neste projeto.

ETAPA C. Validação dos testes moleculares

Cronograma: Meses 18-36

Justificativa/Descrição: Esta etapa prevê a condução de um estudo diagnóstico para validação dos testes moleculares para pesquisa somática de mutações e alterações genéticas frente àqueles comercialmente disponíveis. Os desfechos destas análises serão comprovar a não-inferioridade técnica e diagnóstica dos testes executados localmente e a sua superioridade em relação aos custos.

Para os tumores de não hereditários de cólon, pulmão (não-pequenas células), pele-melanoma, diversos marcadores moleculares preditivos constam no rol da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), mas ainda não foram incluídos no SUS. Os valores individuais dos testes variam entre 800 e 4 mil reais. Isto ocorre porque os tratamentos direcionados aos alvos moleculares identificados nestes testes ainda não foram aprovados pelo CONITEC em termos de custo-efetividade ou ainda não há evidências para solicitação de apreciação por este órgão.

O dimensionamento do número de participantes foi obtido através de (1) número de casos de neoplasias avançadas de mama, colorretal, pulmão e pele tipo melanoma entre 2014 e 2017 atendidos na ISCMPA e reportados no Sistema de Registro Hospitalar de Câncer (SisRHC); (2) número de testes realizados em pacientes do SUS através de plataformas da indústria farmacêutica intermediada pelo Núcleo de Novos Tratamentos em Câncer (NNTC) do Hospital Santa Rita no mesmo período. O NNTC é o centro de pesquisa clínica em oncologia do HSR, o qual recebe periodicamente uma cota de testes moleculares fornecidos por pelos patrocinadores dos estudos clínicos e que são designados a critério dos médicos assistentes. Durante este período, foram registrados atendimentos de 772 casos de neoplasias de cólon e reto, pele, mama e pulmão com estadiamento TNM IV (isto é, indicando a presença de doença metastática). Destes, 183 neoplasias de cólon e reto (C18, C19, C20); 331 neoplasias de brônquio e pulmão (C34) (destas, 97 com subtipo histológico carcinoma de células não pequenas); 40 melanomas malignos (C44); e 218 neoplasias da mama (C50). Ainda, foram realizados os seguintes testes através do NNTC durante 2016 e 2019 para pacientes do SUS: Mutação em *RAS*, câncer colorretal – 75; pulmão 76; mutação em *EGFR*, pulmão – 172; *ALK*, pulmão – 72; mutação *BRAF*^{V600E}, melanoma – 93. Portanto, considerando-se dados epidemiológicos locais e a presença das mutações e/ou fenótipos moleculares de interesse para esta proposta, cuja prevalência precisou ser estimada por dados da literatura científica (uma vez que estes pacientes não são rotineiramente testados para estes marcadores), calculou-se o número mínimo de pacientes que atendessem estes critérios, conforme tabela III.

Tabela III: Bases epidemiológicas para cálculo amostral.

	Casos atendidos ^a	Prevalência da mutação/fenótipo molecular ^b	Número estimado de casos elegíveis ^c	Número de testes patrocinados ^d
Neoplasia de cólon e reto, TNM IV	183 (20%)	<i>RAS</i> mutado – 40%	73	75
		MSI – 15%	27	0
Neoplasia de pulmão, subtipo histológico carcinoma de células não pequenas, TNM IV	97 (10%)	<i>EGFR</i> mutado – 20%	19	172
		<i>ALK</i> positivo – 5%	5	82
		<i>KRAS</i> mutado – 15%	14	76
		<i>PD-L1</i> positivo – 28%	29	0
Melanoma maligno, TNM IV	40 (100%)	Mutação <i>BRAF V600E</i> – 50%	20	93
Neoplasia da mama, TNM IV	218 (8%)	Mutação germinativa <i>BRCA1/2</i> (3%)	6	0

^ana ISCMPA entre 2014 e 2017; ^bde acordo com a literatura; ^cno período de execução do projeto; ^dpela indústria farmacêutica através do NNTC entre 2016-2019 para pacientes encaminhados pelo SUS.

Como o estudo proposto sugere a concordância entre os testes comerciais e a metodologia realizada internamente, optou-se pelo cálculo do coeficiente Kappa, que considera as proporções observada e esperadas de concordâncias entre as metodologias. Estimamos um coeficiente Kappa = 0,9, com margem de erro de 10% e considerando incluir o mesmo número de casos positivos e negativos (50%/50%). Assim, será necessário incluir 84 pacientes em cada um dos grupos descritos na tabela I (42 positivos e 42 negativos).

Portanto, para execução desta etapa, iremos conduzir um estudo diagnóstico para validação das tecnologias diagnósticas desenvolvidas localmente. Iremos incluir retrospectivamente pacientes com registros nos prontuários eletrônicos do Hospital Santa Rita de resultados de testes de análise somática estudos em *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, fusão *EML4-ALK*, deficiência no reparo de mau pareamento/MSI e expressão positiva de *PD-L1* e material biológico disponível para análise (tumores emblocados em parafina). Primeiramente, o material histológico, juntamente com o laudo original do patologista, será submetido à um novo corte e coloração com Hematoxilina e Eosina para reavaliação da celularidade tumoral adequada por um patologista cegado aos objetivos do estudo. Cortes com mais de 20% de células neoplásicas serão submetidas à extração de DNA, seguida de sequenciamento por NGS (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, fusão *EML4-ALK*) ou diretamente à técnica de imunohistoquímica (reação da Streptavidina-biotina com anticorpo anti-*PD-L1* obtido no subprojeto 1). Esta fase será conduzida por operadores técnicos cegados a quaisquer registros do paciente. Finalmente, serão validados junto aos testes comerciais vigentes 20 testes originalmente positivos e 20 testes originalmente negativos que obtiverem concordância com as metodologias desenvolvidas neste projeto. Ao final, serão calculados: especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e *likelihood ratio*.

Resultados esperados do Subprojeto 2:

1. Desenvolver **12 (doze) testes** preditivos de resposta para terapias oncológicas dirigidas ao alvo
2. Solicitar ao menos **1 (um) pedido de patente de alta competitividade**, precedidas de busca de anterioridade especializada e contemplando aspectos de novidade, atividade inventiva e aplicabilidade diagnóstica preditiva/prognóstica e, preferencialmente, respaldada por resultados *in vivo* ou corroborado biomarcador com amostras clínicas preliminares;
3. Publicar **2 (dois) trabalhos em periódicos “peer reviewed”** de alto impacto na área de oncologia;
4. Formar **3 (três) profissionais** com mestrado ou doutorado, e um pós-doutorado, na área da biologia do câncer focada na descoberta/desenvolvimento de novos marcadores e fármacos.

viii - Aspectos éticos:

Em conformidade com a legislação vigente e com as diretrizes institucionais da UFCSPA e da Santa Casa, este Subprojeto será encaminhado para aprovação pela Comissão de Pesquisa (Compesq) da UFCSPA, e aos Comitês de Ética da Santa Casa e da UFCSPA, bem como ao Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UFCSPA.

ix - Cronograma de atividades:

SUBPROJETO	ETAPA	Janeiro 2021	Julho 2021	Janeiro 2022	Julho 2022	Janeiro 2023	
1	A						
	B						

x - Referências:

Referências da Introdução

Borges, Thiago J., Naoka Murakami, Felipe D. Machado, Ayesha Murshid, Benjamin J. Lang, Rafael L. Lopes, Laura M. Bellan, et al. 2018. “March1-Dependent Modulation of Donor MHC II on CD103+ Dendritic Cells Mitigates Alloimmunity.” *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05572-z>.

Caskey, Marina, Florian Klein, and Michel C. Nussenzweig. 2016. “Broadly Neutralizing Antibodies for HIV-1 Prevention or Immunotherapy.” *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1613362>.

Corti, Davide, John Misasi, Sabue Mulangu, Daphne A. Stanley, Masaru Kanekiyo, Suzanne Wollen, Aurélie Ploquin, et al. 2016. "Protective Monotherapy against Lethal Ebola Virus Infection by a Potently Neutralizing Antibody." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aad5224>.

Czepielewski, R. S., B. N. Porto, L. B. Rizzo, R. Roesler, A. L. Abujamra, L. G. Pinto, G. Schwartzmann, F. d. Q. Cunha, and C. Bonorino. 2012. "Gastrin-Releasing Peptide Receptor (GRPR) Mediates Chemotaxis in Neutrophils." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2): 547–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110996109>.

Drake, C. G. 2012. "Combination Immunotherapy Approaches." In *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds262>.

Grilo, António L, and A Mantalaris. 2019. "The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market." *Trends in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>.

Khalil, Danny N., Eric L. Smith, Renier J. Brentjens, and Jedd D. Wolchok. 2016. "The Future of Cancer Treatment: Immunomodulation, CARs and Combination Immunotherapy." *Nature Reviews Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.25>.

Kruger, Stephan, Matthias Ilmer, Sebastian Kobold, Bruno L. Cadilha, Stefan Endres, Steffen Ormanns, Gesa Schuebbe, et al. 2019. "Advances in Cancer Immunotherapy 2019 - Latest Trends." *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1266-0>.

Lipson, Evan J., and Charles G. Drake. 2011. "Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma." *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1595>.

Mahoney, Kathleen M., Paul D. Rennert, and Gordon J. Freeman. 2015. "Combination Cancer Immunotherapy and New Immunomodulatory Targets." *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd4591>.

Pardoll, Drew M. 2012. "The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy." *Nature Reviews Cancer* 12 (4): 252–64. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.

Postow, Michael A., Margaret K. Callahan, and Jedd D. Wolchok. 2015. "Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy." *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>.

Ribas, Antoni, and Jedd D. Wolchok. 2018. "Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>.

Tawbi, Hussein A., Peter A. Forsyth, Alain Algazi, Omid Hamid, F. Stephen Hodi, Stergios J. Moschos, Nikhil I. Khushalani, et al. 2018. "Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain." *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805453>.

Webber, Andrea L., Erin Murphy, Andrey Loboda, Nageatte Ibrahim, Antoni Ribas, Tanguy Y. Seiwert, Patrick A. Ott, et al. 2018. "Pan-Tumor Genomic Biomarkers for PD-1 Checkpoint Blockade-Based Immunotherapy." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aar3593>.

Wei, Spencer C., Colm R. Duffy, and James P. Allison. 2018. "Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy." *Cancer Discovery*. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>.

Yi, Ming, Dechao Jiao, Hanxiao Xu, Qian Liu, Weiheng Zhao, Xinwei Han, and Kongming Wu. 2018. "Biomarkers for Predicting Efficacy of PD-1/PD-L1 Inhibitors." *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0864-3>.

Referências dos Subprojetos

Aparicio, T. 2015. "PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency: Le DT (2015) N Engl J Med May 30." *Colon and Rectum*. <https://doi.org/10.1007/s11725-015-0588-4>.

Charoentong, Pornpimol, Francesca Finotello, Mihaela Angelova, Clemens Mayer, Mirjana Efremova, Dietmar Rieder, Hubert Hackl, and Zlatko Trajanoski. 2017. "Pan-Cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade." *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.019>.

Corrêa, Flávia de Miranda, Renata Leborato Guerra, Ricardo Ribeiro Alves Fernandes, Mirian Carvalho de Souza, and Ivan Ricardo Zimmermann. 2019. "Target Therapy versus Dacarbazine in First-Line Treatment of Advanced Non-Surgical and Metastatic Melanoma: Budget Impact Analysis from the Perspective of the Brazilian National Health System, 2018-2020." *Epidemiologia e Serviços de Saude : Revista Do Sistema Unico de Saude Do Brasil*. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000200013>.

Garcia-Garijo, Andrea, Carlos Alberto Fajardo, and Alena Gros. 2019. "Determinants for Neoantigen Identification." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01392>.

Haraldsdottir, Sigurdís. 2017. "Microsatellite Instability Testing Using Next-Generation Sequencing Data and Therapy Implications." *JCO Precision Oncology*. <https://doi.org/10.1200/po.17.00189>.

Heemskerk, Bianca, Pia Kvistborg, and Ton N.M. Schumacher. 2013. "The Cancer Antigenome." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.333>.

Hodi, Frank Stephen, Vanna Chiarion-Sileni, Rene Gonzalez, Jean Jacques Grob, Piotr Rutkowski, Charles Lance Cowey, Christopher D. Lao, et al. 2018. "Nivolumab plus Ipilimumab or Nivolumab Alone versus Ipilimumab Alone in Advanced Melanoma (CheckMate 067): 4-Year Outcomes of a Multicentre, Randomised, Phase 3 Trial." *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30700-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30700-9).

La Rochere, Philippe De, Silvia Guil-Luna, Didier Decaudin, Georges Azar, Sukhvinder S. Sidhu, and Eliane Piaggio. 2018. "Humanized Mice for the Study of Immuno-Oncology." *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.07.001>.

- Nandin, Irene Sanjuan, Carol Fong, Cecilia Deantonio, Juan A. Torreno-Pina, Simone Pecetta, Paula Maldonado, Francesca Gasparrini, et al. 2017. "Novel in Vitro Booster Vaccination to Rapidly Generate Antigen-Specific Human Monoclonal Antibodies." *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20170633>.
- Park, Mi Kyung, Chang Hoon Lee, and Ho Lee. 2018. "Mouse Models of Breast Cancer in Preclinical Research." *Laboratory Animal Research*. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.160>.
- Pompilio, G, P Campanella, and D Integlia. 2017. "Cost-Effectiveness and Budget Impact of New Therapies for Metastatic Melanoma in Italy." *Value in Health*. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2017.08.159>.
- Sanmamed, Miguel F., Inmaculada Rodriguez, Kurt A. Schalper, Carmen Oñate, Arantza Azpilikueta, Maria E. Rodriguez-Ruiz, Aizea Morales-Kastresana, et al. 2015. "Nivolumab and Urelumab Enhance Antitumor Activity of Human T Lymphocytes Engrafted in Rag2-/-IL2Rnull Immunodeficient Mice." *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3510>.
- Siegel, Rebecca L, Kimberly D Miller, and Ahmedin Jemal. 2019. "Cancer Statistics, 2019: {Cancer} {Statistics}, 2019." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>.
- Tiller, Thomas, Eric Meffre, Sergey Yurasov, Makoto Tsuiji, Michel C. Nussenzweig, and Hedda Wardemann. 2008. "Efficient Generation of Monoclonal Antibodies from Single Human B Cells by Single Cell RT-PCR and Expression Vector Cloning." *Journal of Immunological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.09.017>.
- Verma, Vivek, Tanja Sprave, Waqar Haque, Charles B. Simone, Joe Y. Chang, James W. Welsh, and Charles R. Thomas. 2018. "A Systematic Review of the Cost and Cost-Effectiveness Studies of Immune Checkpoint Inhibitors." *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0442-7>.
- Zhang, Lei, and Zemin Zhang. 2019. "Recharacterizing Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Single-Cell RNA Sequencing." *Cancer Immunology Research*. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0658>.
- Zhao, Yunlong, Devin L Harrison, Yunlong Zhao, Devin L Harrison, Yuran Song, Jie Ji, Jun Huang, and Enfu Hui. 2018. "Article PD-1 Neutralizes PD-L1 in Cis to Attenuate PD-1 Signaling in T Cells," 379–90.
- Zhao, Yunlong, Lee, Calvin, Lin, Chia-Hao, Gassen, Rodrigo B., Xu, Xiaozheng, Huang, Zhe, Xiao, Changchun, Bonorino Cristina, Lu, Li-Fan, Bui, Jack, & Hui, Enfu. Immunity, in press. PD-L1:CD80 Cis-heterodimer Triggers CD28 While Repressing both PD-1 and CTLA-4 Pathways

c) Descrever os resultados anuais esperados, decorrentes da execução do projeto, seus indicadores e respectivas metas a serem atingidas

Os resultados anuais resultados encontram-se detalhados na tabela abaixo:

Ano	Resultado Esperado	Metas	Indicadores
Primeiro	MAbs para PD-L1 ou PD-1 isolado	Isolar plasmablastos de pacientes e doadores	Nr. pacientes/doadores recrutados Nr. plasmablastos positivos/paciente
		Clonar genes de Ig** dos plasmablastos positivos e produzir proteínas	Nr. genes clonados e nr. de anticorpos produzidos
		Testar especificidade do anticorpo	Nr. anticorpos específicos testados
	Teste Imunoquímico PD-L1	Determinar especificidade do anti-PD-L1 isolado	Nr. amostras de pacientes testadas Nr. amostras positivas validadas
	Início Testes Moleculares Preditivos		
Segundo	MAbs para CTLA-4, além de PD-1 e PD-L1	Isolar plasmablastos de pacientes e doadores	Nr. pacientes/doadores recrutados Nr. plasmablastos positivos/paciente
		Clonar genes de Ig** dos plasmablastos positivos e produzir proteínas	Nr. de genes clonados e nr. de anticorpos produzidos
		Testar especificidade do anticorpo	Nr. de anticorpos específicos testados
	Finalização Montagem de Testes Moleculares Preditivos		
Terceiro	Prova de Conceito dos MAbs	Teste dos MAbs obtidos <i>in vitro</i>	Nr. de ensaios realizados/MAbb purificado Nr. de ensaios positivos para efeito bloqueador/MAB

		Teste dos MAb's obtidos <i>in vivo</i>	Nr. de animais testados/MAb Nr. de animais que responderam ao tratamento/MAb
	Validação dos Testes Diagnósticos		
	Geração de Base de Dados	Compilação de Dados de pacientes tumorais atendidos na Santa Casa	Número de pacientes registrados Quantidade de dados coletada

*MAb: anticorpo monoclonal

**Ig: imunoglobulina

Em resumo:

Ao final do ano 1, teremos isolado anticorpos monoclonais para PD-1 e /ou PD-L1, estruturado o teste de imunohistoquímica para PD-L1 e montado ao menos quatro testes preditivos moleculares de resposta

Ao final do ano 2, teremos isolado novos anticorpos monoclonais para PD-L1 ou PD-1, e CTLA-4, caracterizado os mesmos, e estruturado o restante dos testes preditivos moleculares de resposta

Ao final do ano 3, teremos realizado as provas de conceito para os anticorpos monoclonais isolados, e validado os testes desenvolvidos para entrega ao SUS, bem como gerado uma base de informação biológica sobre tumores da população atendida pelo SUS no RS.

d) Descrever os produtos gerados com a execução do projeto, seus indicadores e metas;

Ao final de 3 (três) anos, pretendemos

1. Desenvolver 12 (doze) testes preditivos de resposta para terapias oncológicas dirigidas ao alvo
2. Isolar anticorpos humanos anti-CTLA-4, anti-PD-1 e anti-PD-L1, determinar sua afinidade ao alvo e seu efeito a nível pré-clínico.
3. Solicitar ao menos 2 (dois) pedidos de patente de alta competitividade, precedidas de busca de anterioridade especializada e contemplando aspectos de novidade, atividade inventiva e aplicabilidade diagnóstica preditiva/prognóstica e, preferencialmente, respaldada por resultados *in vivo* ou corroborado biomarcador com amostras clínicas preliminares;
4. Publicar 2 (dois) trabalhos em periódicos “*peer reviewed*” de alto impacto na área de oncologia por subprojeto, totalizando 04 publicações ao final do período.
5. Formar 6 (seis) profissionais: 02 de doutorado, e 04 pós-doutorandos, na área da biologia do câncer focada na descoberta/desenvolvimento de novos fármacos.

e) Descrever as atividades de monitoramento e de avaliação e seus respectivos valores;

Detalhadas nos subprojetos 1 e 2.

f) Descrever a abrangência do projeto quanto a:

i - população e/ou instituição beneficiada, seja diretamente - que receberá a intervenção do projeto - seja indiretamente - que poderá se beneficiar dos resultados do projeto, com indicação de nº CNES

Este projeto é de pesquisa, para obter resultados que permitam ao SUS ser detentor de terapias oncológicas de última geração, e seus testes preditivos de resposta clínica. Ele estuda uma população de pacientes do RS, mas poderá beneficiar pacientes em todo o território nacional.

ii - dimensão geográfica, com indicação de UF/município beneficiário

O projeto será realizado em Porto Alegre, RS.

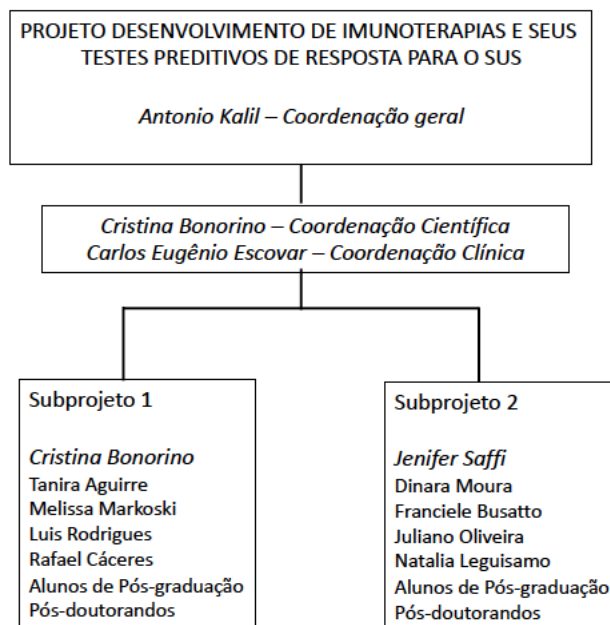
iii - número de vagas ofertadas, quando aplicável.

Não se aplica

g) Quando aplicável, descrever formas de disseminação dos resultados do projeto, tais como: eventos científicos, oficinas, material de divulgação/publicação, dentre outras formas.

Este projeto engaja profissionais de diferentes áreas da Saúde, e mostra como o Brasil pode ser colocado na fronteira da produção tecnológica em terapias anticâncer. Solicitamos aqui verba para participações em eventos científicos internacionais e publicações científicas de alto impacto na área de descobrimento de novas drogas e/ou oncologia pré-clínica. Queremos gerar patentes competitivas internacionalmente. Iremos dar ampla visibilidade a isso, utilizando tanto as participações em eventos e publicações científicas, como não científicas. Os proponentes deste projeto estão ativamente envolvidos em atividades de ensino a nível de graduação e pós-graduação e são convidados para palestras em eventos na área de pesquisa oncológica, para toda a comunidade da saúde. A Dra. Cristina Bonorino, assina uma coluna quinzenal focada em divulgação científica no Jornal Zero Hora, o maior do RS, e atualmente estuda com a Radio Gaúcha uma participação regular em programas de rádio, estando envolvida ativamente em popularização da ciência.

h) Organograma e Quadro de Atribuições



Formação e experiências:

Antonio Nocchi Kalil, Coordenador Geral (link para o CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/5836502798185607>)

- Possui graduação em Medicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (1985), mestrado em Medicina: Ciências Médicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1990) e doutorado em Medicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1995). Fellow do Centro Hepato-Biliar da Universidade de Paris (92-93). Diploma Universitário de Cirurgia Hepato-Biliar e Transplante Hepático pela Faculdade de Medicina Paris-Sud/Université de Paris XI. Especialista em Cirurgia Geral e Cirurgia do Aparelho Digestivo e membro titular do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, do Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva e da Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica. É Membro Correspondente Estrangeiro pela Academia Argentina de Cirurgia em Buenos Aires (2017) e Membro Honorário da Academie Nationale de Chirurgie/França (2018). Ex-Presidente do Brazilian Chapter of International Hepato-Pancreato-Biliary Association. É Professor Associado da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Docente Permanente dos Programa de Pós-Graduação em Hepatologia e Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atua na coordenação docente de serviços assistenciais como Chefe do Serviço de Cirurgia Oncológica e Geral e Coordenador do Programa de Transplante Hepático Infantil da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Atualmente é Diretor Médico e de Ensino e Pesquisa da Direção Executiva na mesma Instituição.

Cristina Bonorino, Coordenadora Científica, link para CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4152545470767003>

O projeto contará com a excelência científica e infraestrutura do recém criado Laboratório de Imunoterapia da UFCSPA, liderado pela Prof.^a Cristina Bonorino, imunologista, formada pela UFRGS e pela

Universidade do Colorado. Professora Titular da UFCSPA e pesquisadora 1B do CNPq, tem também uma posição como pesquisador assistente, não remunerado, na Universidade da Califórnia em San Diego, há três anos. Tem experiência na obtenção de anticorpos monoclonais e peptídeos para uso terapêutico. O grupo tem experiência em trabalhos com células dendríticas, biologia de linfócitos T, transplantes, e identificou um novo receptor migratório para neutrófilos (Czepielewski et al. 2012). Recentemente publicaram na Nature Communications (Borges et al. 2018) um mecanismo candidato para reduzir os níveis de MHC nas células dendríticas e prolongar a vida de transplantes de pele. Iniciando na PUCRS há 21 anos atrás, ela nucleou um grupo de Imunologia no Rio Grande do Sul, onde não havia profissionais nessa área. Este núcleo é hoje extremamente ativo e reconhecido como um grupo de excelência de imunologia no país, sendo o grupo um dos poucos do Brasil ativo na área de Imunologia Tumoral. Atua há 1,5 anos como Professor Titular da UFCSPA, e os recursos humanos formados ao longo de duas décadas pela coordenadora científica deste projeto encontram-se hoje colocados profissionalmente e lideram seus próprios grupos de pesquisa não apenas na PUCRS, mas no IPA, na UFCSPA, na UNIFRA, em Santa Maria, enquanto outros estão radicados no exterior (EUA – Harvard, Mount Sinai Hospital e Sanford Burnham Institute) onde realizam pesquisa contratados por Instituições desses países. A Dra. Cristina participa do Conselho da Sociedade Brasileira de Imunologia e é Fellow da Cell Stress Society International, tendo organizado diversos eventos nacionais e internacionais para essas Sociedades, e possui uma extensa rede de colaboradores no país e fora dele, realizando intercâmbio de alunos e professores constantemente entre grupos de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Holanda, Estados Unidos, França e Portugal. A Dra. Cristina realizou intercâmbios trabalhando no exterior nesse período, na Universidade de Minnesota, com o Dr. Marc Jenkins, e na Universidade da Califórnia em San Diego, com o Dr. Stephen Hedrick, ambos especialistas em linfócitos T, com os quais mantém colaborações ativas. Ela é membro do corpo editorial de revistas científicas nacionais (BJMBR) e internacionais (Frontiers in Immunology, Cell Stress and Chaperones), e consultora ad hoc de diversas agências de fomento, e revisora de periódicos como Cancer Research e Journal of Immunology. Tem ativa participação em processos de divulgação da ciência, escrevendo quinzenalmente no jornal Zero Hora, o de maior em tiragem no RS e SC, sobre ciência, cientistas brasileiros e internacionais. Já palestrou para a ANVISA e para diversos eventos médicos e farmacêuticos sobre os mecanismos da imunoterapia oncológica. A Dra Cristina teve experiência extensa na PUCRS de coordenação de projetos institucionais, como o Convênio FINEP 1310/13 selecionado por concorrência nacional para o “Desenvolvimento de Inovações para Prevenção e/ou Tratamento de Câncer” referente à Chamada Pública MCTI/FINEP/MS/SCTIE/DECIT – CT-SAÚDE e FNS — 01/2013). Também aprovou três projetos de pesquisa junto ao PRONON, em 2014, 2015 e 2016 com seu então colega Dr. Dyeison Antonow, e ainda participa como colaboradora dos mesmos (que recentemente foram avaliados), mesmo estando na UFCSPA. Importante, tem se dedicado ao estudo da interação PD-1-PD-L1, e em um trabalho em colaboração com colegas da UCSD que se encontra no prelo na revista Immunity mostrou evidências de mecanismos moleculares de resistência ao tratamento com anti-PD-L1 versus o tratamento com anti-PD-1 (Zhao et al, 2019), que deve ser publicado ainda em 2019.

Jenifer Saffi (link para CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/3179264934205423>) - Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS (1992), Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS (1999), com Doutorado Sanduíche na Ludwig-Maximilians Universität München - Alemanha (1996) e no Massachusetts Institute of Technology - EUA (1997). Realizou seu Pós-Doutorado no Institut de Cancérologie Gustave- Roussy - IGR (2008) - França, na área de reparo de DNA e drogas antitumorais inibidoras da topoisomerase II. É professora Associada da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) - Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Bioquímica. Atualmente exerce o cargo de Vice-reitora (mandato 2017-2021) e coordenadora do Escritório de Internacionalização. Coordena o Laboratório de Genética Toxicológica e foi membro fundadora do Núcleo de Inovação Tecnológica e Empreendedorismo (NITE-Saúde) da UFCSPA. A nível de Pós-Graduação, foi

membro fundadora e a primeira coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFCSPA (PPGBio - 2015-2017), em nível de Mestrado e Doutorado. É também professora do núcleo permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFCSPA. Atua também como professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS. Já orientou ou co-orientou 31 dissertações de Mestrado, 15 teses de Doutorado e 6 pós-doutorados. Foi membro eleito do Conselho Universitário (CONSUN) da UFCSPA, por dois mandatos (2011 à 2015). Foi Vice-Presidente da Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental - MutaGen-Brasil (mandato 2014-2016), anteriormente denominada Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (SBMCTA) e atualmente é membro do seu Conselho Diretor. É Membro da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio - 2014-2016; 2016-2018; 2018-2020), como Especialista na Área de Saúde Humana e foi membro do Comitê da Área da Saúde da FAPERGS (2013-2015). Revisora de diversos periódicos internacionais, entre eles Apoptosis, Molecular Aspects of Medicine, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Mutation Research/ Environmental and Molecular Mutagenesis, Journal of Food and Chemical Toxicology, Current Medicinal Chemistry, Toxicology in vitro, Redox Report. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Mutagênese, atuando principalmente nos seguintes temas: reparo de DNA e mutagênese, estresse oxidativo e toxicologia aplicada a fármacos e produtos naturais. Foi membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INPeTAM - 2009 -2014).

Carlos Eugênio Santiago Escovar (link para o CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/6881518448535491>) será o **coordenador clínico do projeto**. É oncologista, orientador da residência oncológica, Coordenador do Serviço de Cancerologia Clínica e Coordenador Médico do Centro de Pesquisa Novos Tratamentos em Câncer do Hospital Santa Rita. Além da atividade de Coordenação Médica do Centro de Pesquisa Clínica Novos Tratamentos em Câncer, desenvolve estudos clínicos nas áreas de oncologia e hematologia, nas funções de Investigador Principal e Sub-Investigador. É atualmente Diretor Médico do Hospital Santa Rita, o Hospital de Câncer da Santa Casa.

Tanira Aguirre (link para o CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/7141154110549425>) é professora de Físico-Química do Departamento de Farmacociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil. É formada em química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2005) e é doutora em Drug Delivery pela University College Dublin (2013). Trabalhou como pesquisadora de pós-doutorado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Nanotecnologia Farmacêutica (2016). Possui experiência no campo da química coloidal, principalmente no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas estruturados contendo peptídeos e proteínas com potencial aplicação terapêutica. Além disso, trabalha com a entrega de medicamentos biotecnológicos usando nanopartículas, minisferas e microemulsões. No doutorado trabalhou em cooperação com a empresa Sigmoid Pharma dentro do convênio Irish Drug Delivery Network (IDDN) no desenvolvimento e avaliação pré-clínica do sistema SmPillTM para administração oral de calcitonina de salmão. Atualmente coordena projetos para desenvolvimento de sistemas para administração de peptídeos como insulina e SSIEFARL e pequenas moléculas orgânicas como a temozolomida e a dexametasona por via oral, transdérmica ou nasal.

Rafael Cáceres (link para o CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/2268580664900763>) possui doutorado em Medicina e Ciências da Saúde (2012) com ênfase em Farmacologia Molecular Bioquímica, mestrado em Biologia Celular e Molecular (2008), ambos pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e graduação em Química pela Universidade Luterana do Brasil (2005). Atua principalmente na área de biofísica molecular computacional (bioinformática estrutural, modelagem, docagem e dinâmica molecular), possui experiência em cristalização de proteínas e difração de raios X. Atualmente é Professor

Adjunto da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, membro do corpo permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e do Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFCSPA. Possui como linha de pesquisa a prospecção e planejamento de moléculas com potencial terapêutico utilizando como alvos macromoléculas biológicas de patógenos, também coordenador dos projetos relacionados a purina nucleosídeo fosforilase de mycobacterium tuberculosis, chiquimato quinase de Mycobacterium tuberculosis (sendo o primeiro contemplado no edital Universal MCT/CNPq) e no desenvolvimento de inibidores não competitivos ao ATP contra o complexo enzimático mTOR ((Mechanistic Target Of Rapamycin).

Luis Rodrigues (link para ao CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/6354567436180190>) Possui graduação em Farmácia, especialização em Análises Clínicas e Mestrado em Microbiologia pela na Universidade Federal do RS, Doutorado em Biologia Celular em Molecular/Imunologia pela Pontifícia Universidade Católica do RS com estágio doutoral estendido na The University of Tennessee- EUA. Atua na linha de Imunologia Viral e resposta imune a outros patógenos intracelulares, desenvolve e coordena projetos de análise e otimização da resposta de linfócitos T, desenvolvimento de Imunobiológicos incluindo derivados de Biologia Molecular, proteínas de fusão e nanosistemas. Tem experiência no desenvolvimento e avaliação de vacinas de DNA, terapia gênica com citocinas e construção e purificação de proteínas fusionadas com anticorpos. Atualmente é professor adjunto na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) na área de Imunologia, orientador permanente no Programa de Pós-graduação em Biociências e coordenador do Laboratório de Imunovirologia, na mesma universidade.

Melissa Markoski (link para ao CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/1872859400316329>) - Possui graduação em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Molecular e Biotecnologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1998), mestrado (2000) e doutorado (2006) em Biologia Celular e Molecular pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Fez estágios de doutorado na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) e na Facultad de Medicina (Universidad de Chile, Santiago, Chile). Realizou pós-doutorados em Diagnóstico Fitossanitário (2006-2007, UFRGS), Sinalização Celular (2007-2008, PUCRS), Imunologia (2018, UFCSPA). Atualmente é professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), vice-coordenadora do Núcleo de Gestão Ambiental (NGA), membro do Comitê Técnico de Biossegurança (CTBio) e Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA), além de orientadora junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foi professora e orientadora junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (2009-2017), da Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC), onde também atuou como membro da Comissão de Pós-Graduação, Pró-Diretora de Pesquisa e Coordenadora do Serviço de Medicina Experimental (2012-2016). No ICFUC foi coordenadora técnica de projetos envolvendo aplicação pré-clínica e clínica de terapia celular e gênica. É Guest-editor na Stem Cells International. Tem experiência nas áreas de Biossegurança e Biologia Celular e Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: terapia celular e gênica, regulação e controle da expressão gênica, gene knockdown com RNA de interferência, edição genômica, vias de interação e sinalização celular, bioinformática e biologia de sistemas, imunologia celular e molecular, fisiologia de doenças cardiovasculares, diagnóstico molecular, fitopatologia e parasitologia. A principal linha de pesquisa é focada na sinalização celular de processos regenerativos desencadeados por células-tronco e respostas moleculares a intervenções físicas, nutricionais, farmacológicas e fisio-patológicas.

Dinara Moura (link para ao CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/3915597208191837>) Possui graduação em Farmácia pela Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (2002), mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2006), doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2010) e pós-doutorado pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2013). É professora adjunta da Fundação

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Atualmente, atua como Coordenadora de Pesquisa da UFCSPA. Tem experiência nas áreas de reparação de DNA, genotoxicidade, farmacologia e toxicidade atuando principalmente nos seguintes temas: estrutura funcional de proteínas associadas a sinalização de danos no DNA, determinação de propriedades farmacológicas e avaliação de segurança de novos compostos, de origem natural e sintética.

Natalia Leguisamo (link para ao CV Lattes <http://lattes.cnpq.br/1114221257776527>) - Biomédica formada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Mestre em Ciências da Saúde: Cardiologia pelo Fundação Universitária de Cardiologia do Rio Grande do Sul. Doutora em Ciências da Saúde: Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Realizou período sanduíche na University of Surrey (Guildford, Reino unido). É membro do Grupo de Pesquisa da Dra. Jenifer Saffi, e da Sociedade Brasileira de Mutagênese. Atua nas seguintes linhas de pesquisa: sistemas de reparo do DNA, aspectos celulares e moleculares do câncer, biomarcadores preditivos e prognósticos do câncer. Atualmente, atua como coordenadora do Laboratório de Cardiologia Molecular e Celular e docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul.

Franciele Faccio Busatto: Biomédica formada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com as habilitações de Genética e Farmacologia. Possui Especialização em Farmacologia e Toxicologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), mestrado e doutorado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Realizou estágio de doutorado sanduíche com bolsa CAPES na Université Laval trabalhando no laboratório de Instabilidade genômica do professor Jean-Yves Masson na Cidade de Quebec, Canadá. Atualmente é pesquisadora em estágio de pós-doutorado no laboratório de pesquisa de Genética Toxicológica da UFCSPA desenvolvendo pesquisas relacionadas à biologia celular e molecular do câncer e reparo de DNA. Tem interesse em pesquisa e docência no ensino superior. Bolsista CAPES, trabalhará em apoio aos pesquisadores contratados pelo projeto.

Juliano de Oliveira Silveira: Bacharel em Ciências Biomédicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil. Mestre em Biologia Celular e Molecular (UFRGS). Ex-bolsista do programa de intercâmbio de bolsistas *Brazil Scientific Mobility Scholarship*. A experiência no exterior inclui cursos de graduação e algumas pesquisas na Missouri State University e cursos somente na New York University, ambos nos EUA. Os interesses acadêmicos incluem genômica evolutiva e comparativa, biologia molecular e co-evolução de patógenos hospedeiros. Bolsista CAPES, trabalhará em apoio aos pesquisadores contratados pelo projeto.

i) Apresentar o Plano de Atividades do Projeto com as seguintes especificações:

- i - descrição da atividade;**
- ii - definição da data de início e fim de cada atividade;**
- iii - descrição do indicador da atividade;**
- iv - unidade de medida;**
- v - metas quantitativas**
- vi - valor estimado de cada atividade (anexar memória de cálculo) e total.**

Todas essas informações encontram-se detalhadas nos Subprojetos 1 e 2, e no documento anexo, que constitui a Memória de Cálculo. Resumidamente,

j) Demais informações relevantes em conformidade com as especificidades da área de atuação e do projeto.

Além do alinhamento com as necessidades tecnológicas do SUS, este projeto parte de premissas onde coexistem a liberdade de escolha pelos pesquisadores para a produção do conhecimento e as ambições de mercado, focado na aplicabilidade no SUS. É nossa intenção atuar visando complementariedades de políticas públicas interministeriais (Ministérios da Educação/ME, Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/MCTIC, Desenv. Ind. & Comércio Exterior/MDIC, e Saúde/MS) relacionadas ao desenvolvimento nacional da indústria de medicamentos inovadores.

ORÇAMENTOS DO PROJETO

DESCRIÇÃO	ORÇAMENTO APROVADO	ORÇAMENTO SOLICITADO
Serviços de terceiros - Pessoa Jurídica – de captação de recursos, transporte de animais e amostras, publicações em revistas e patente	R\$ 219.155,00	R\$240.395,00
Material de Consumo	R\$ 936.978,08	R\$1.124.017,42
Bolsas	R\$ 849.600,00	R\$849.600,00
Equipamentos/Informática	R\$ 2.547.788,22	R\$3.250.844,34
TOTAL	R\$ 4.553.521,30	R\$ 5.464.856,76