



DOCTORATS
INDUSTRIALS

EL PLA DE
DOCTORATS
INDUSTRIALS

PROJECTE DE DOCTORAT INDUSTRIAL EXPEDIENT 2016 DI 057

DADES DE L'EMPRESA I DE L'ENTORN ACADÈMIC

Títol del projecte

Nous biomarcadors pel diagnòstic de toxoplasmosi / IgM-specific Sequences for Toxoplasmosis

Empresa

Biokit Research & Development SLU

Responsable de l'empresa

Pau Planas Almazán

Universitat

Universitat Pompeu Fabra

Director/a de tesi

David Andreu Martínez

Treballador/a de l'empresa i doctorand/a

Greta Ripoll Pastor

BREU DESCRIPCIÓ DEL PROJECTE DE RECERCA

El *Toxoplasma gondii* és un paràsit protozou intracel·lular que causa la toxoplasmosis. Aquesta malaltia pot ser greu en casos d'infecció congènita i individus immunodeprimits. El diagnòstic de la toxoplasmosi es basa en assaigs serològics que detecten anticossos específics anti-T.gondii en la mostra de sèrum del pacient. La sensibilitat i especificitat dels assaigs serològics depenen en gran mesura dels antígens utilitzats. En el cas de toxoplasmosi la majoria d'assaigs utilitzen lisats del paràsit i presenten una sensibilitat i especificitat limitada. Aquests paràmetres es veuen empitjorats en la detecció d'IgMs la detecció de les quals és molt important en el cas d'embarassades.

S'han descrit diferents proteïnes recombinants com a font alternativa d'antígens per la detecció de *Toxoplasma*. A dia d'avui es requereixen de més estudis per poder utilitzar aquestes proteïnes en assaigs comercials i a més existeix la necessitat de trobar nous epítops antigènics. En aquests moments tan sols dues companyies utilitzen una proteïna recombinant en el seu assaig.

Biokit està interessada en dissenyar i produir nous biomaterials que permetin el desenvolupament d'un reactiu per la detecció de *Toxoplasma* IgMs de nova generació utilitzant eines de biologia molecular avançada per tal d'aconseguir una assaig de millor característiques que els actuals. Alhora es pretén desenvolupar una font alternativa a les mostres sèriques humanes positives com a Controls i Calibradors.



Generalitat de Catalunya
Departament d'Empresa i Coneixement
Secretaria d'Universitats i Recerca



Agència
de Gestió
d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Els objectius específics del projecte són:

- 1- Identificar nous epítops antigènics específics per a la detecció d'IgMs anti-T. gondii.
- 2- Dissenyar una proteïna recombinant multiepítop que contingui repeticions dels diferents epítops i ens permeti la identificació de la totalitat de les mostres positives de manera específica.
- 3- Desenvolupar un hibridoma que expressi IgMs quimèriques o dissenyar i expressar un anticòs IgM recombinant que pugui ser utilitzat com a control i calibradors en un immunoassaig per a la detecció de la toxoplasmosis.
- 4- Generar la prova de concepte per demostrar que els nous biomaterials, antigen recombinant i IgMs, funcionen correctament en un immunoassaig quimioluminiscent i proporcionen l'especificitat i sensibilitat desitjada.

Per tal d'assolir els objectius marcats es seleccionaran i caracteritzaran un elevat nombre de mostres positives per *Toxoplasma gondii* amb diferents immunoassaigs comercials. Una part de les mostres consensuades com a positives s'utilitzaran per la identificació d'epítops específics. Per tal d'identificar-los s'hibridaran individualment a un microarray peptídic que estarà format per un elevat nombre de pèptids solapats corresponents a la seqüència de les proteïnes del *Toxoplasma*. Un anàlisi estadístic ens permetrà identificar aquells pèptids diferencials per les IgMs. Per a la realització d'aquest estudi col.laborarem amb una companyia experta en el disseny de microarrays de pèptids personalitzats.

Un cop identificats els epítops s'escollirà un nombre determinat de pèptids per tal de fer l'estudi extensiu a la resta de mostres positives per IgM i escollir aquells presents en el major número de mostres de manera que la suma d'aquests epítops ens permetin detectar la totalitat de les mostres positives.

Amb els pèptids identificats es dissenyarà una proteïna recombinant multiepítop per intentar així tenir més sensibilitat. Per tal d'aconseguir una proteïna funcional i soluble es dissenyaran in silico diferents proteïnes afegint-los-hi aquells tags que es cregui que puguin facilitar l'expressió i purificació d'aquesta proteïna artificial. Les proteïnes que seleccionades seran expressades i purificades per tal de poder ser utilitzades en la prova de concepte de l'immunoassaig.

Paral·lelament, un cop identificats els pèptids específics, s'immunitzaran ratolins transgènics amb els pèptids que es consideri per tal d'aconseguir anticossos monoclonals quimèrics humanitzats contra aquest pèptid.

Es seleccionaran els millors ratolins i s'immortalitzaran els limfòcits d'aquests. Es subclonarà el hibridoma i es seleccionaran els clons.

Per tal de poder realitzar aquesta tasca es col.laborarà amb una companyia externa. El cribratge i la selecció dels clons al llarg de tot el procés així com l'expressió i purificació de les IgM serà realitzada per l'estudiant en col.laboració amb aquesta companyia.

Utilitzant la proteïna recombinant seleccionada i purificada es sensibilitzaran partícules magnètiques. Com a traçador s'utilitzarà un anticòs anti-IgM de la casa marcat amb isoluminol. S'optimitzarà l'assaig fins al nivell que permeti analitzar un elevat nombre de mostres positives per tal d'assegurar-nos de que es detecten en la seva totalitat.

Amb aquest reactiu es demostrarà també que les IgMs quimèriques humanitzades o recombinants són adients per a ser utilitzades com a Controls i Calibradors en el mateix immunoassaig.