



Produção de anticorpos monoclonais quiméricos terapêuticos anti-hIL7R α partir de seus equivalentes murinos para tratamento da Leucemia Linfóide Aguda

Palavras-Chave: anticorpo quimérico, IL-7R, leucemia linfóide aguda

**Rhaissa Godoi (aluna) - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp),
Centro de Pesquisa Boldrini**

**Dra. Priscila Pini Zenatti (orientadora) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp),
Centro de Pesquisa Boldrini**

INTRODUÇÃO:

A leucemia é um câncer das células hematopoiéticas, sendo a leucemia linfóide aguda (LLA) a malignidade mais comum em crianças¹, com altos níveis de recaída². O IL-7R é um receptor transmembrana, formado por uma cadeia alpha e uma cadeia gamma, expresso principalmente na superfície de linfócitos³ e, na presença da IL-7 ativa vias de sinalização cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência de linfócitos T⁴. A ativação constitutiva deste receptor leva à progressão da leucemia e 10% dos pacientes com LLA-T possuem a cadeia IL7R α mutada⁵, classificando-o como um alvo de interesse para a imunoterapia.

Um tipo de imunoterapia é o uso de anticorpos monoclonais, proteínas capazes de reconhecer e se ligar de forma específica aos seus antígenos alvo, e seu principal mecanismo de ação no contexto terapêutico é a morte da célula alvo por citotoxicidade⁶. Nosso grupo de pesquisa previamente obteve três anticorpos monoclonais murinos anti-hIL7R α , e validou o potencial terapêutico na progressão da LLA em ensaios pré-clínicos. Assim, os objetivos deste projeto foram obter três anticorpos anti-hIL7R α a partir das sequências das regiões variáveis de suas versões murinas correspondentes, e validá-los quanto à especificidade ao alvo.

METODOLOGIA:

A metodologia foi iniciada a partir do sequenciamento das cadeias variáveis leve e pesada (VH e VL na *Figura 1*) dos 3 anticorpos murinos já validados anteriormente (representados pelo mAb). Em seguida, essas sequências foram sintetizadas, e por clonagem inseridas em vetores contendo as sequências codificantes das porções constantes humanas de anticorpos (hCH e hCL). Após padronizar a produção transiente desses biofármacos em linhagem celular de HEK293T por

meio do protocolo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, obtivemos os anticorpos quiméricos (cAbs). Ou seja, anticorpos que mantêm as porções variáveis de seus correspondentes murinos, com o intuito de manter a especificidade pelo alvo, porém agora contendo as porções constantes humanas, com a finalidade de reduzir a imunogenicidade destas proteínas no organismo humano ou modelos animais humanizados.

Ao longo do projeto, optamos por realizar uma combinação entre as cadeias variáveis leve e pesada dos três anticorpos de estudo, logo, ao invés de produzir três anticorpos quiméricos, nós produzimos nove. Confirmamos a produção dos anticorpos por SDS-page e validamos a afinidade, sensibilidade e especificidade pelo alvo por meio de ensaios de western blot, ELISA e citometria de fluxo.

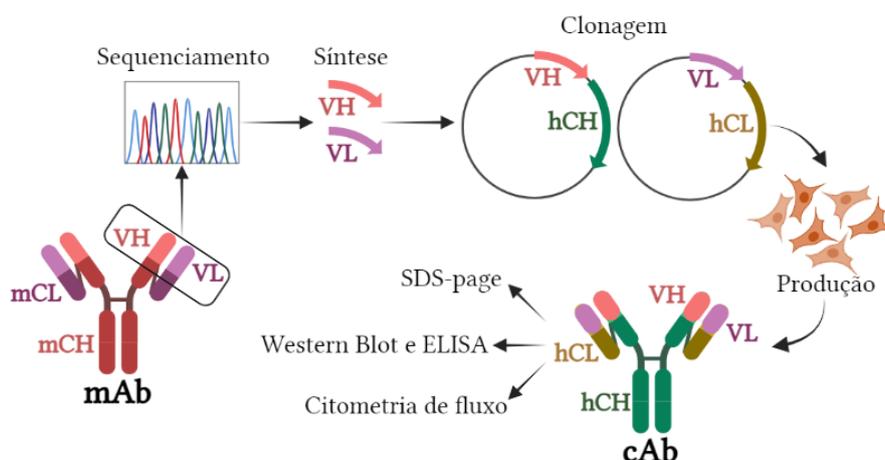


Figura 1. Esquema representativo da metodologia utilizada para a realização do projeto. “mAb” é anticorpo murino; “VH e VL” são porções variáveis pesada e leve; “mCH e mCL” são porções constantes pesada e leve murinas; “hCH e hCL” são porções constantes pesada e leve humanas; “cAb” é anticorpo quimérico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados serão apresentados considerando que os números inteiros na nomenclatura correspondem aos anticorpos obtidos por meio de seus correspondentes murinos, ou seja: os cAbs “1”, “2” e “3” são os anticorpos quiméricos obtidos a partir dos murinos mAbs “1”, “2” e “3”, e os anticorpos com “.2” e “.3” correspondem às combinações entre as porções variáveis.

A confirmação da produção dos anticorpos quiméricos pode ser observada no SDS-page da *Figura 2*, pela presença das cadeias leve e pesada, com aproximadamente 20 e 55kDa respectivamente.

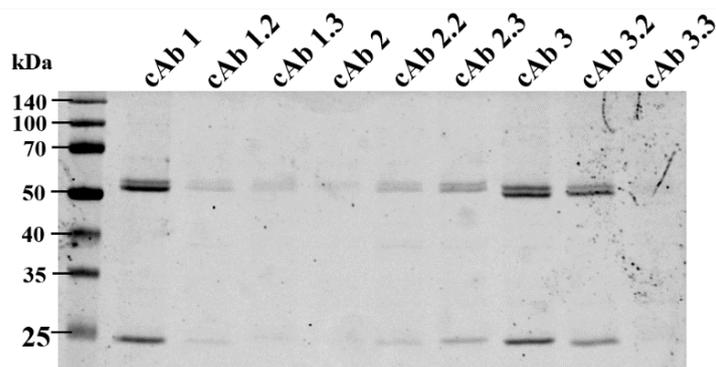


Figura 2. SDS-page dos anticorpos quiméricos clonados e produzidos, com suas respectivas cadeias leve (~20kD) e pesada (~55kD).

O western blot da *Figura 3* indica que os anticorpos 1 e 3 mantiveram a especificidade pelo hIL7R α recombinante desnaturado, enquanto o anticorpo 2 perdeu esta característica quando comparados aos seus respectivos anticorpos murinos. Além disso, as combinações dos cAbs 1.2 e 1.3 também reconheceram a proteína recombinante desnaturada.

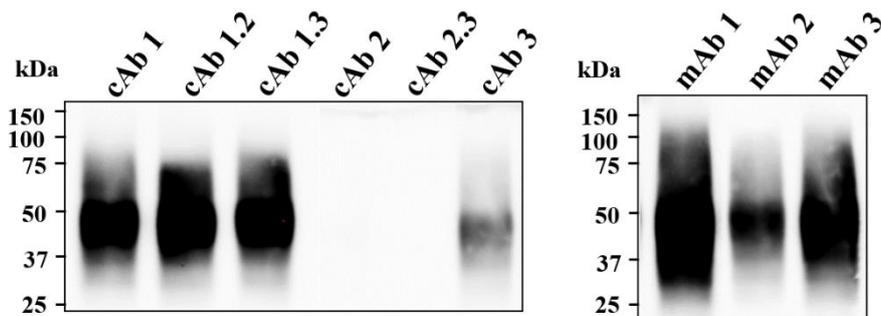


Figura 3. Western blot com hIL-7R recombinante des-naturada e marcação com os respectivos anticorpos quiméricos ou (B) murinos.

Por outro lado, no ensaio de ELISA na *Figura 4*, realizado com a mesma proteína recombinante desta vez não desnaturada, verificamos que os cAbs 1, 1.2, 2.3 e 3 foram os mais sensíveis. Essa consideração pode ser baseada na observação do padrão dos valores de absorvâncias das diluições utilizadas, nas quais houve menor diferença entre a as barras correspondentes a original e a diluição 1:10.

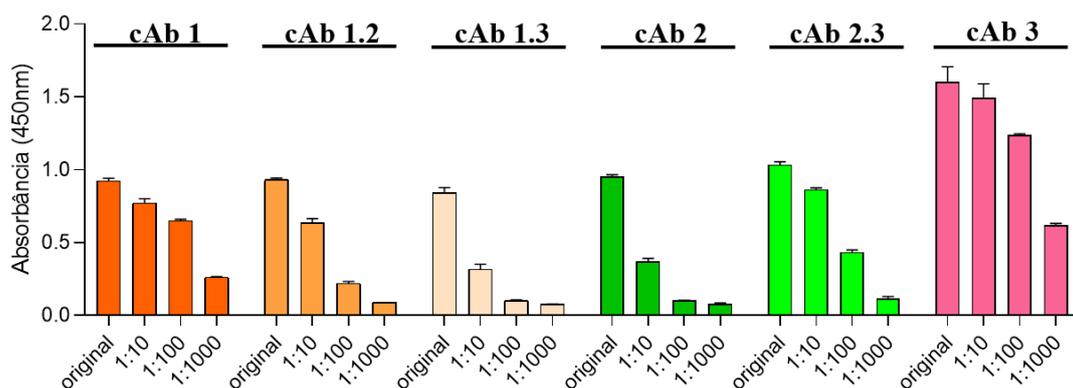


Figura 4. ELISA direto com curva de diluição (1:10, 1:100, 1:1000 e o anticorpo diretamente da alíquota original) e a proteína hIL-7R recombinante como alvo dos anticorpos quiméricos.

A fim de verificar se os cAbs são capazes de se ligar ao receptor na superfície celular, ou seja, se reconhecem o alvo em sua forma natural, utilizamos a linhagem celular murina BaF3 expressando o receptor humano IL7R α e a técnica de citometria de fluxo. A *Figura 5* explicita que os anticorpos 1 e 3 reproduziram as características de suas versões murinas, e as combinações 1.2 e 2.3 também reconheceram o alvo, da mesma forma que estes quatro anticorpos quiméricos demonstraram maior sensibilidade (como descrito anteriormente no ensaio de ELISA).

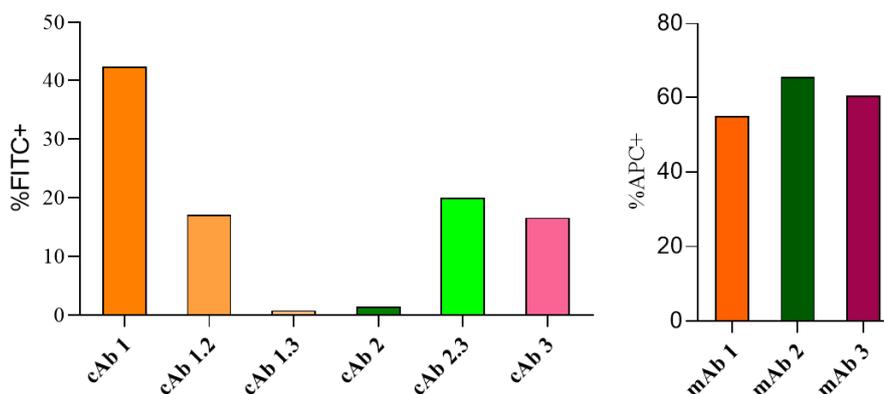


Figura 5. Representativos de citometria de fluxo dos anticorpos quiméricos e suas versões murinas, em BaF3.WT.RFP. Os valores para a construção dos gráficos foram obtidos a partir do valor da porcentagem positiva para o fluoróforo subtraído da porcentagem do respectivo controle negativo.

CONCLUSÕES:

Ao fim deste projeto, produzimos 9 anticorpos quiméricos, e validamos 4 destes quanto à especificidade e afinidade pelo alvo: 2 correspondentes às suas versões murinas e 2 obtidos através de combinações entre as cadeias variáveis leve e pesada. Também padronizamos a produção transiente destes biofármacos em linhagem celular, sendo algo muito importante para a futura produção em larga escala e para que avancem para ensaios pré-clínicos em modelo animal no tratamento da LLA infantil.

BIBLIOGRAFIA

1. Siegel, R. L. & Miller, K. D. Cancer Statistics , 2019. *Am. Cancer Soc. Journals* **69**, 7–34 (2019).
 2. Pui, C., Carroll, W. L., Meshinchi, S. & Arceci, R. J. Biology , Risk Stratification , and Therapy of Pediatric Acute Leukemias : An Update. *J. Clin. Oncol.* **29**, 551–565 (2011).
 3. Mazzucchelli, R. & Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression : intelligent design. *Nat. Publ. Gr.* **7**, 144–154 (2007).
 4. Jiang, Q. *et al.* Cell biology of IL-7 , a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 513–533 (2005).
 5. Zenatti, P. P. *et al.* Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **43**, 932–941 (2011).
 6. Michaeli, Y., Zafir-Lavie, I. & Reiter, Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Nat. Publ. Gr.* **26**, 3714–3733 (2007).
-