



ENGENHARIA DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS anti-hCD73 PARA TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA E OUTRAS MALIGNIDADES

Palavras-Chave: Imunoterapia, anti-hCD73, Leucemia Linfóide Aguda.

Autoras: Gabriella Lima dos Reis^{1,2}, Letícia Grillo Guimarães Pereira^{1,2}, Rhaissa Godoi^{1,2} e Mayara Ferreira Euzébio^{1,2}.

Orientadora: Dr.^a Priscila Pini Zenatti^{1,2}.

¹Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, Inst. de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

²Centro de Pesquisa Boldrini, Laboratório de Anticorpos Terapêuticos.

INTRODUÇÃO:

A leucemia pediátrica continua sendo a causa mais comum de câncer em crianças (Hunger, 2015). Uma das principais falhas no tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA) é o processo de recidiva, em que células leucêmicas resistentes à quimioterapia não respondem ao tratamento. Atualmente, novas abordagens terapêuticas têm sido incorporadas aos tratamentos das leucemias, contribuindo para um significativo progresso na cura dessas malignidades. Terapias direcionadas, como o uso de anticorpos monoclonais (AcM), oferecem vantagens em relação aos métodos convencionais e, em combinação com quimioterapia ou radioterapia, podem contribuir para uma significativa melhora no tratamento de diversas malignidades. Anticorpos murinos, se usados de forma continuada em humanos, estimulam uma reação imunológica conhecida como HAMA (Human "Anti-mouse Antibody"), ou seja, uma resposta de anticorpos humanos contra os anticorpos de origem murina. Por

consequente, a quimerização, humanização e produção de anticorpos totalmente humanos são importantes, principalmente para estudar de forma mais fidedigna o potencial terapêutico do anticorpo.

Recentemente, o grupo de pesquisa do nosso colaborador investigou o perfil de expressão gênica das LLA-B "Ph-like" em 92 pacientes e a partir deste estudo, foram selecionados um conjunto mínimo de 15 genes, os quais estavam diferencialmente expressos nesta leucemia, e que permitiam discriminar com eficácia a LLA-B "Ph-like" das demais leucemias (Centoducatte, 2017). Dentre os genes diferencialmente expressos em LLA-B "Ph-like" identificados, um deles é o NT5E. Esse gene codifica a enzima CD73, uma ecto-5'- nucleotidase, que possui a capacidade de hidrolisar adenosina monofosfato (AMP) extracelular em adenosina (Figura 1), um potente imunossupressor. Esses nucleosídeos gerados por CD73 têm um papel chave na regulação de reações inflamatórias e respostas imunes, modulando adesão celular,

transmigração e atividade de células T. Além disso, desempenham um papel central na geração de um ambiente pró-angiogênico que contribui para a progressão do câncer (Yegutkin, 2014).

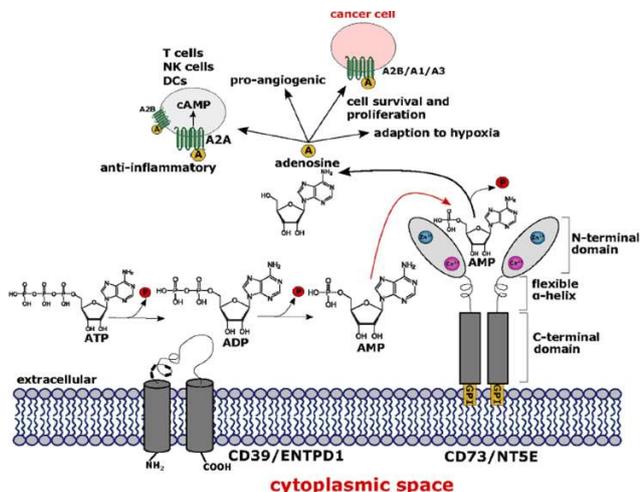


Figura 1: Importância da proteína CD73 para o microambiente tumoral. O AMP, previamente hidrolisado pela proteína CD39 (ATP → ADP → AMP), é quebrado pelo CD73 em adenosina. A adenosina permite manter um microambiente imunossupressor, anti-inflamatório, pró hipóxia e pró angiogênico, que contribui para a sobrevivência e proliferação da célula tumoral (Kordaß, et al., 2018).

Logo, a proteína CD73 se mostra um excelente alvo para o desenvolvimento de terapia alvo-específica contra diversos tipos de cânceres, além da LLA. Por isso, esse projeto propôs a construção, expressão e caracterização da versão quimérica anti-hCD73 de um anticorpo murino obtido em nosso laboratório, e do anticorpo humano MEDI9447 (oleclumab) - já em ensaio clínico de fase II para o tratamento de tumores sólidos adulto (Harvey, et.al., 2020).

METODOLOGIA:

As sequências variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) foram sintetizadas e clonadas nos plasmídeos pUC19 γ 1, em *frame* com a porção constante pesada humana, e

pUC19 κ ou pUC19 λ , em *frame* com a porção constante leve humana, respectivamente. Ambos os plasmídeos pUC19 foram amplificados em bactéria e a clonagem foi confirmada por sequenciamento Sanger. Para a produção *in vitro* dos anticorpos, a linhagem celular HEK293T foi transfectada com ambos os plasmídeos e a obtenção dos mesmos foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blotting (WB), após purificação do sobrenadante celular. A sensibilidade e especificidade foram verificadas por ELISA, WB, e Citometria de Fluxo. A metodologia foi ilustrada na Figura 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O anticorpo quimérico anti-CD73 (cAb-CD73#7) reconhece a proteína CD73-GST recombinante por ELISA, e é sensível até uma diluição de 1:100 (Figura 3).

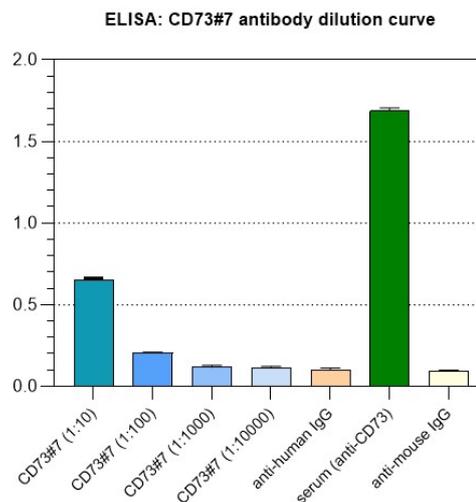


Figura 3: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) do anticorpo quimérico anti-CD73#7 contra a proteína CD73-GST. A placa foi carregada com 20 ng/poço da proteína CD73-GST. Em degradê azul temos as diluições do anticorpo anti-CD73#7 de 1:10 até 1:10.000. Em laranja temos o controle negativo, anticorpo anti-human-IgG, mesmo anticorpo utilizado como secundário do anti-CD73#7. Em verde temos o soro do dia do sacrifício do camundongo imunizado com a proteína CD73, controle positivo. E em amarelo está o controle negativo anti-mouse-IgG, que se correlaciona com o controle positivo. Média das triplicatas.

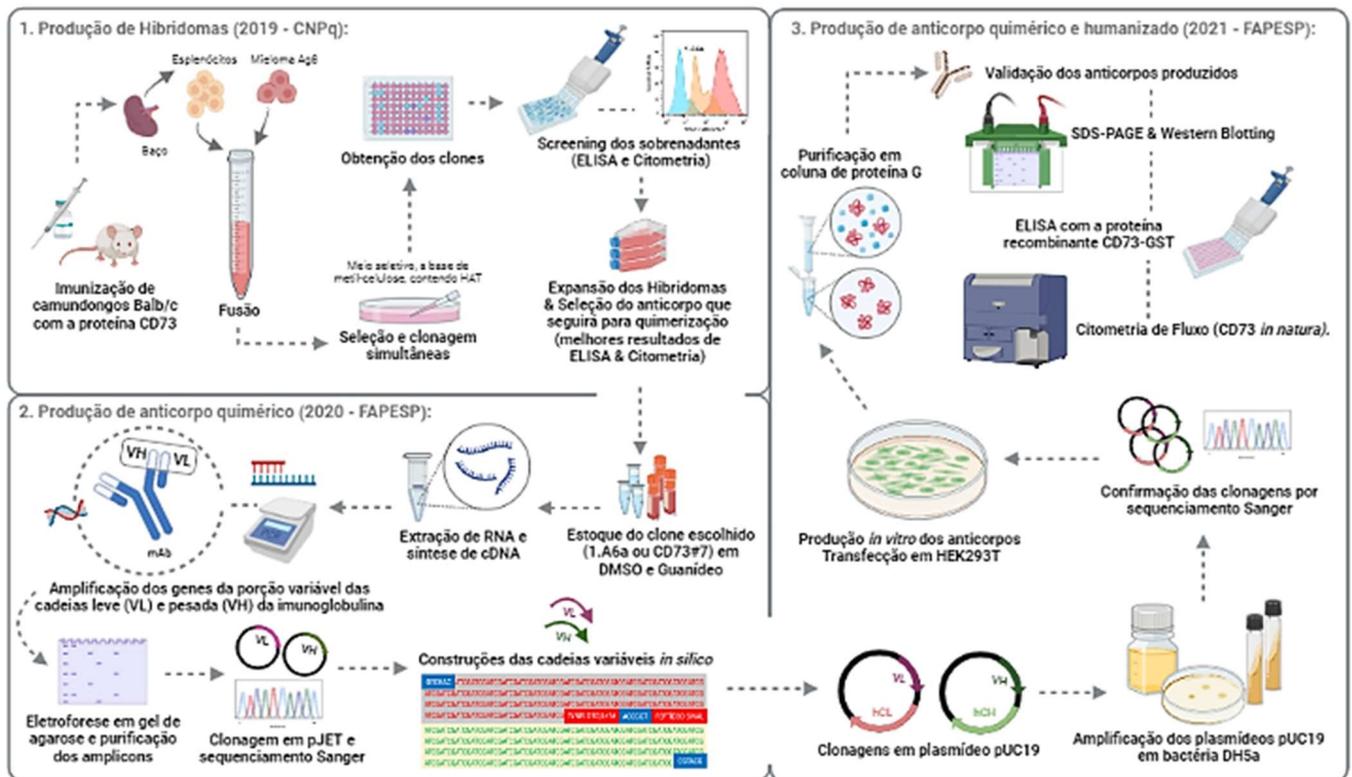


Figura 2: Metodologia utilizada no projeto. 1. Produção de Híbridomas: o anticorpo escolhido para quimerização (cAb.anti-CD73#7) foi obtido pela metodologia de híbridomas. Com base nos resultados de ELISA e citometria o clone 1.A6a (#7) foi escolhido. 2. Produção de anticorpo quimérico: o cAb.anti-CD73#7 foi construído com base em nossos resultados de sequenciamento. 3. Produção de anticorpo quimérico e humano: ambos os anticorpos seguiram a mesma metodologia desde a “construção das cadeias variáveis *in silico*”, a única diferença é que as sequências utilizadas na construção do MEDI9447 foram obtidas da literatura. Created with BioRender.com

É importante ressaltar que a proteína CD73 utilizada no ELISA tem uma cauda GST, o que pode interferir em sua conformação. Por isso os testes de citometria (Figura 4) são tão importantes, para conseguirmos observar se o anticorpo de fato consegue reconhecer a proteína em sua conformação nativa, essencial para os testes de funcionalidade e uma futura utilização clínica.

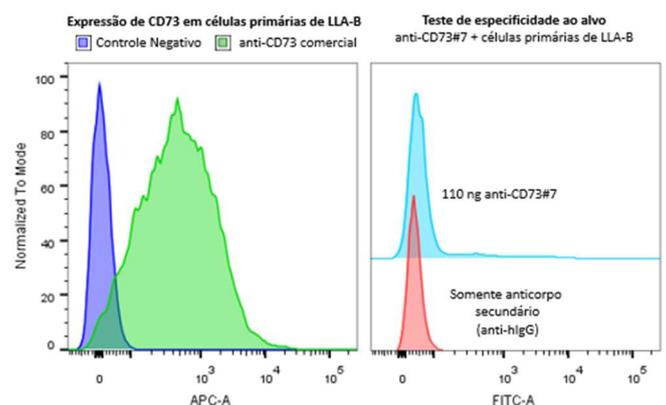


Figura 4: Teste de expressão e especificidade ao alvo com células primárias de LLA-B “Ph-like”. (a.) Teste de expressão de CD73 com controle negativo (azul) e anti-CD73 comercial (verde). A partir do histograma observa-se a expressão de CD73 nas células primárias de LLA-B. (b.) Teste de especificidade ao alvo com controle negativo (apenas anticorpo secundário) (vermelho) e 110 ng de cAb anti-CD73#7 (azul claro). A partir desse teste, observa-se que o anticorpo anti-CD73#7 não consegue reconhecer a

proteína CD73 em sua forma nativa, em células de LLA-B.

Nesse contexto, acreditamos que o anticorpo consiga reconhecer a proteína no ELISA e não na citometria devido a conformação da mesma ao estar associada à porção GST. Por isso, realizamos alguns testes, mostrados abaixo, afim de validar melhor a especificidade do anticorpo.

Um Western Blotting foi feito com a proteína CD73-GST em sua forma *in natura* e desnaturada, e também com lisados de células DAOY e células primárias de LLA-B (ambas com expressão endógena da proteína) nas mesmas duas condições, para verificar se ocorreria o reconhecimento da proteína pelo anticorpo anti-CD73#7.

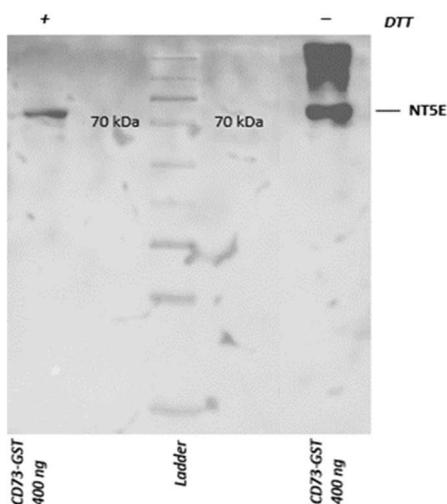


Figura 5: Western Blotting para verificação do reconhecimento do cAb CD73#7 ao alvo em proteína CD73-GST nas formas *in natura* e desnaturada. O anticorpo em questão reconhece a proteína CD73 no formato *in natura* e desnaturado.

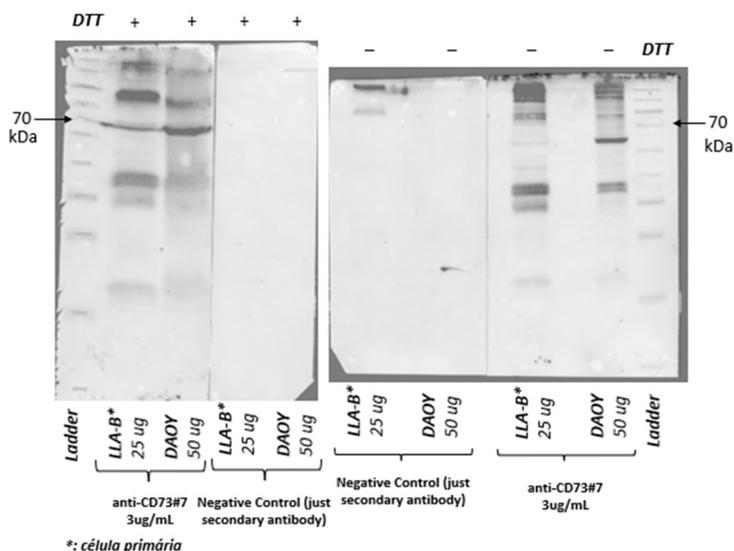


Figura 6: Western Blotting para verificação do reconhecimento do cAb CD73#7 ao alvo em lisado de DAOY e células primárias de LLA-B nas formas *in natura* e desnaturada. São colocadas amostras em duas membranas, uma delas com as amostras desnaturadas (Sample buffer 5x + DTT 100mM) e a outra com as amostras *in natura*, em ambas as membranas há lisados celulares marcados somente com o anticorpo secundário, para verificar sua possível inespecificidade também. A incubação com o anticorpo primário [3ug/mL] foi realizada a 4°C overnight. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-human IgG-HRP (1:10.000, Goat anti-human-IgG-HRP, Invitrogen).

A partir das figuras 5 e 6, é possível observar que o cAb anti-CD73#7 reconhece a proteína CD73 em seu formato *in natura* e desnaturado, tanto no lisado da linhagem DAOY como também no lisado de células primárias de LLA-B. Entretanto, aparecem diversas bandas nos dois lisados, sugerindo que o anticorpo é inespecífico – visto que em ambas as membranas marcadas com somente o anticorpo secundário, controle negativo, é encontrada apenas uma pequena marcação inespecífica, nenhuma no mesmo peso molecular da CD73.

O anticorpo MEDI9447 está em fase de produção *in vitro*.

CONCLUSÕES:

O anticorpo anti-CD73#7 consegue reconhecer a proteína CD73 em sua forma recombinante por ELISA, assim como, consegue reconhecer a proteína nas formas *in natura* e desnaturada por Western Blotting. Infelizmente, o anticorpo não possui a capacidade de reconhecer a proteína em seu formato natural, na membrana celular, como mostrado com os testes de citometria em células com expressão endógena da proteína.

É necessário rastrear mais clones murinos para encontrar aquele capaz de reconhecer a proteína CD73 em sua forma nativa. Paralelamente, estamos produzindo o anticorpo humano anti-CD73 (MEDI9447, ou oleclumab) para ser utilizado como controle positivo para ensaios terapêuticos. Isso é necessário porque não há na literatura informações sobre a ação terapêutica do anti-CD73 em Leucemia Linfoblástica Aguda.

BIBLIOGRAFIA

Centoducatte, GL. Método para identificar a leucemia linfóide aguda (LLA) pediátrica do subgrupo BCR-ABL1-Like (Ph-Like). 2017. 1 recurso online (95 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.

Harvey, J. B., Phan, L. H., Villarreal, O. E., & Bowser, J. L. CD73's Potential as an Immunotherapy Target in Gastrointestinal Cancers. *Frontiers in immunology*, 11, 508 (2020).

Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *New Engl J Med* 373:1541–1552 (2015).

Kordass T, Osen W, Eichmuller SB. Controlling the immune suppressor: transcription factors and microRNAs regulating CD73/NT5E. *Front Immunol.* (2018).

Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49:473–497; (2014).