



# CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE TIM-3\_ECD-FC RECOMBINANTE EM CÉLULAS HEK293-T COMO FERRAMENTA PARA IMUNOTERAPIA ANTI-TUMORAL

**Palavras-Chave:** TIM-3, IMMUNE CHECKPOINT, IMUNOTERAPIA

**Autores(as):**

**MARIELLY CÂMARA ROCHA, INSTITUTO BUTANTAN**

**GABRIEL CORREIA LIMA, INSTITUTO BUTANTAN**

**Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. DANIELA LUZ (orientador(a)), INSTITUTO BUTANTAN**

---

## INTRODUÇÃO:

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos, o câncer ainda representa um problema de saúde pública mundial. Ainda, levando em conta o crescente ritmo de envelhecimento da população, é importante projetar um crescimento expressivo na prevalência destas doenças pelos próximos anos, demandando ofertas de serviços de atendimento e tratamentos adequados, além de investimento em alternativas aos tratamentos convencionais já estabelecidos (Kanavos, 2006).

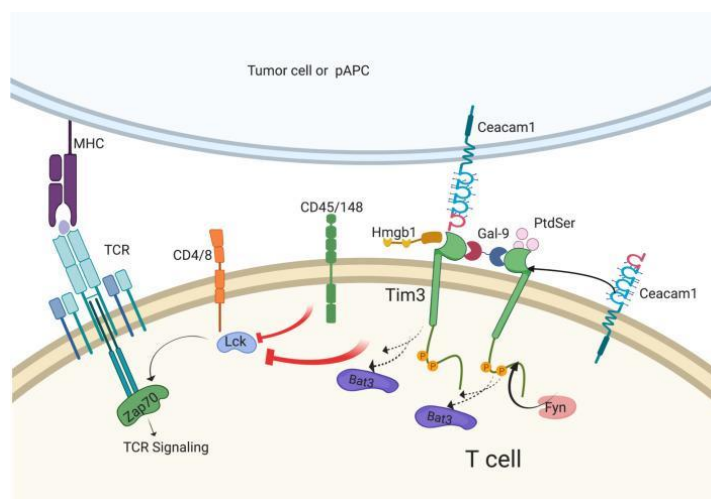
No câncer, o escape à eliminação pelo sistema imune e o estabelecimento da doença ocorrem pela modulação e regulação da resposta imune do hospedeiro. Em muitos casos, esta condição crônica leva à diferenciação das células T CD8+, que sofrem com o estímulo constante do antígeno, formando uma população de células T com deficiência em sua função, as quais não conseguem proliferar ou se tornar células efetoras funcionais (Mclane et al., 2019).

Essas populações de linfócitos exauridos apresentam níveis persistentemente elevados de expressão de múltiplos receptores inibitórios, conhecidos como pontos de controle imunológicos, os quais são componentes endógenos do sistema imune responsáveis por coordenar a resposta imune fisiológica, controlando negativamente a estimulação de linfócitos T (Di Cosimo et al., 2020). Sob condições fisiológicas normais, sua função é servir de um ponto de controle, mantendo a auto tolerância e prevenindo imunopatologias. Entretanto, essas moléculas também participam de mecanismos de escape, causando disfunções nas populações de células T em diversos tipos de tumores (Cai et al., 2020).

O ponto de controle imunológico TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) é expresso por uma variedade de células imunes como T CD4+, T CD8+, NK, macrófagos, células dendríticas e

células B (Wolf et al., 2020). O TIM-3 é um regulador negativo de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IFN- (Anderson, 2012; Yan et al., 2013), além de atuar diretamente na exaustão de células T e indiretamente na promoção de células supressoras derivadas de mielóides 3, regulação da resposta de citocinas em células mielóides e expressão no endotélio associado a tumor. Além disso, o TIM-3 pode influenciar o desenvolvimento do câncer diretamente por meio de sua expressão em células-tronco cancerígenas. Esse potencial de múltiplos modos de ação do TIM-3, posiciona o TIM-3 como um candidato atraente como alvo clínico (Anderson, 2012).

Até o momento, a molécula de TIM-3 foi descrita interagindo com quatro ligantes distintos, aos quais pode se ligar simultaneamente: Galactina-9, Fosfatidilserina, HMGB-1 (high mobility group protein B1) e CEACAM-1 (carcinoembryonic antigen-relates cell adhesion molecule -1), no entanto, ainda existe controvérsias a respeito dessas interações. No entanto, a inibição das interações de TIM-3 com os receptores das células imunes, pode trazer informações relevantes que auxiliem na modulação dessa molécula e consequente a melhora do prognóstico dos tumores relacionados a sua expressão, uma vez que os tumores evadem o sistema imunológico a partir da seleção de variantes celulares resistentes a células efectoras, regulando positivamente os receptores imunes inibitórios das células T (Beatty and Gladney, 2015; Vinay et al., 2015).



**Figura 1.** Modelo de sinalização de TIM-3 em células T. FONTE: (Acharya et al., 2020)

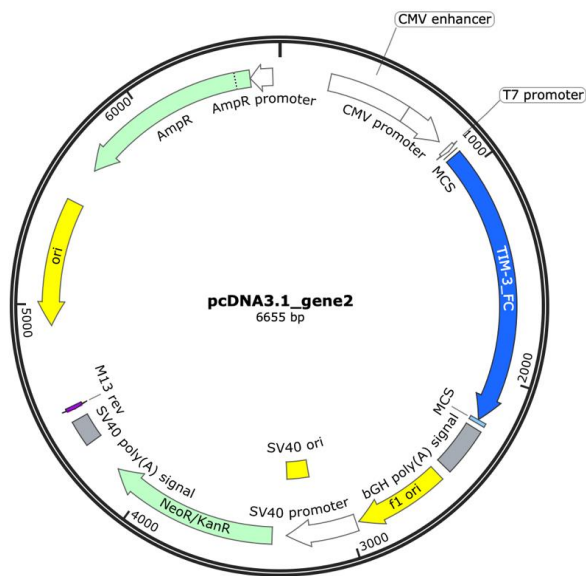
Neste contexto, o bloqueio deste ponto de controle imunológico pode restaurar a capacidade das células T de eliminar tumores.

O uso da tecnologia do DNA recombinante permitiu a clonagem e expressão de proteínas heterólogas em larga escala, este método tão extenso leva à produção e purificação de proteínas com alto rendimento. Uma das técnicas mais utilizadas dentro da expressão e purificação heteróloga é construir uma proteína de fusão recombinante contendo a proteína de interesse e um marcador de afinidade. O fragmento constante do anticorpo IgG1 (domínio Fc) é um marcador de afinidade conveniente que afeta positivamente o rendimento, a solubilidade, a estabilidade, o dobramento e até a atividade das proteínas.

Ainda, no caso de proteínas cujas modificações pós-traducionais podem ser fundamentais para sua funcionalidade, a utilização de protocolos de expressão em células eucarióticas é o mais adequado. Dessa forma, o presente trabalho produziu o ponto de restrição imunológico TIM-3 fusionado a porção FC da imunoglobulina IgG1, expressando essa molécula em células HEK293. As linhagens de células de rim embrionário humano 5 (HEK) são usadas para o desenvolvimento de proteínas recombinantes porque são altamente transfectáveis. Essas células contêm a região inicial 1 (E1) do genoma adenoviral e expressam as proteínas adenovirais E1A e E1B. Já as células, 293T, são derivadas de HEK293 - transfectadas de forma estável com o antígeno T de SV40 e com suspensão adaptada (Arena et al., 2018).

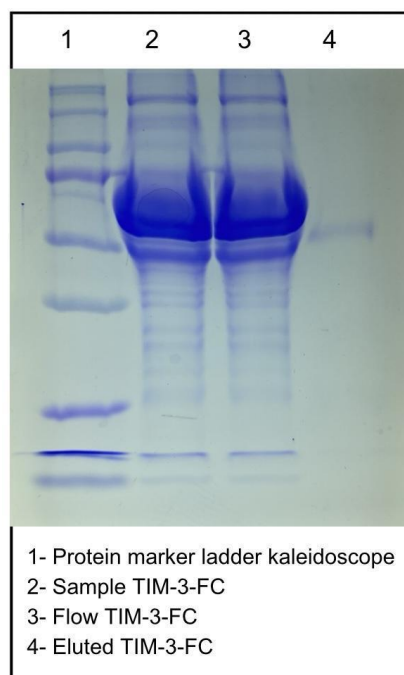
## **METODOLOGIA:**

Bactérias DH5a quimiocompetentes foram transformadas com a construção sintética pcDNA3.1-TIM-3\_ECD-FC (Figura 2), clones positivos foram selecionados para crescimento em meio Luria-Bertani (LB) e antibiótico ampicilina. Em seguida, realizou-se a extração de DNA plasmidial para amplificação da construção sintética, obtendo-se 1942.2 ng/ul de DNA plasmidial purificado.



**Figura 2.** Representação esquemática da construção pcDNA3.1-TIM-3-FC enviado para síntese.

O DNA plasmidial foi então transfectado em células HEK 293-T para expressão transitória da proteína recombinante, realizando-se cromatografia de afinidade com a proteína G do sobrenadante das células para a purificação de TIM-3\_ECD-FC. O rendimento da purificação foi de 1,3 mg/L e a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) da proteína recombinante purificada exibiu uma única faixa em ~ 50kDa (Figura 3), sugerindo alta pureza.



**Figura 3.** SDS-PAGE da amostra de TIM-3-FC, flow e eluído da purificação.

A funcionalidade da proteína foi primeiramente analisada por ELISA indireto, avaliando o reconhecimento do TIM-3-Fc por anticorpos de conformação específica anti-TIM-3 e anti-humano Fc, confirmando o seu adequado estado de dobramento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nossos resultados parciais demonstram o sucesso da clonagem, expressão e purificação de TIM-3\_ECD-FC funcional em células HEK-293T. Análises funcionais para avaliar a capacidade imunomoduladora da molécula estão sendo realizadas para validar o seu potencial como ferramenta imunoterapêutica antitumoral. Ademais, a transfecção de células HEK-293 com a construção plasmidial pcDNA3.1-TIM-3-FC está em andamento para estabelecimento de linhagem celular com expressão contínua de TIM-3\_ECD-FC.

## BIBLIOGRAFIA

- ACHARYA, N.; SABATOS-PEYTON, C.; ANDERSON, A. C. Tim-3 finds its place in the cancer immunotherapy landscape. **J Immunother Cancer**, v. 8, n. 1, 06 2020. ISSN 2051-1426.
- ANDERSON, A. C. Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 24, n. 2, p. 213-6, Apr 2012. ISSN 1879-0372.
- ARENA, T. A.; HARMS, P. D.; WONG, A. W. High Throughput Transfection of HEK293 Cells for Transient Protein Production. **Methods Mol Biol**, v. 1850, p. 179-187, 2018. ISSN 1940-6029.
- BEATTY, G. L.; GLADNEY, W. L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 4, p. 687-92, Feb 15 2015. ISSN 1557-3265.
- CAI, H. et al. Immune Checkpoints in Viral Infections. **Viruses**, v. 12, n. 9, 09 21 2020. ISSN 1999-4915.

DI COSIMO, S. et al. Immune checkpoint inhibitors: a physiology-driven approach to the treatment of coronavirus disease 2019. **Eur J Cancer**, v. 135, p. 62-65, 08 2020. ISSN 1879-0852.

MCLANE, L. M.; ABDEL-HAKEEM, M. S.; WHERRY, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 37, p. 457-495, 04 26 2019. ISSN 1545-3278.

VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Semin Cancer Biol**, v. 35 Suppl, p. S185-S198, Dec 2015. ISSN 1096-3650.

WOLF, Y.; ANDERSON, A. C.; KUCHROO, V. K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. **Nat Rev Immunol**, v. 20, n. 3, p. 173-185, 03 2020. ISSN 1474-1741.

YAN, J. et al. Tim-3 expression defines regulatory T cells in human tumors. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58006, 2013. ISSN 1932-6203.