



Produção de anticorpo quimérico anti-hCD73 e validação do seu potencial terapêutico na leucemia linfóide aguda e outras malignidades

G.L. dos Reis^{1,2}, D.D. Maldonado^{1,2}, M.F. Euzébio^{1,2}, P.P. Zenatti²

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

²Centro de Pesquisa Boldrini, Laboratório de Anticorpos Terapêuticos, Campinas, Brasil.

RESUMO

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é uma enzima que possui a capacidade de hidrolisar adenosina monofosfato (AMP) extracelular em adenosina, um potente imunossupressor. Diante disso, a CD73 se mostra um excelente alvo para o desenvolvimento de imunoterapias específicas contra diversos tipos de cânceres. Estudos demonstraram que este antígeno de membrana se encontra superexpresso em grande parte dos pacientes de Leucemia Linfóide Aguda do tipo B, sendo um marcador de Doença Residual Mínima (DRM). Atualmente, novas abordagens terapêuticas têm sido incorporadas aos tratamentos das leucemias, contribuindo para um significativo progresso na cura destas, como o uso de anticorpos monoclonais (AcM), que oferecem vantagens em relação aos métodos convencionais. Dessa forma, propomos obter nesse projeto um anticorpo anti-CD73 quimérico a partir de um anticorpo murino já existente em nosso laboratório. Este anticorpo quimérico é obtido pela fusão da região variável murina (VH e VL) à região constante humana (CH e CL) da imunoglobulina IgG1. A proposta para construção do anticorpo quimérico deve-se ao fato dos AcM obtidos de células murinas serem muito imunogênicos, ou seja, podem levar à produção de anticorpos anti-camundongo no organismo humano, inviabilizando o tratamento. Dada a associação de CD73 com outros tumores, o anticorpo aqui desenvolvido poderá ser testado futuramente em outras malignidades como agente modulador do microambiente tumoral.

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

1. INTRODUÇÃO:

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 (Anderson et al., 2017). A leucemia pediátrica continua sendo a causa mais comum de câncer em crianças (Hunger, 2015). Consequentemente, muitos avanços a partir de novas abordagens terapêuticas foram desenvolvidos visando obter um significativo progresso nos resultados de cura dessa malignidade, como a aplicação clínica da imunoterapia. Esta, incluindo uso de anticorpos monoclonais (AcM), oferece vantagens em relação aos métodos convencionais, como por exemplo boa solubilidade e estabilidade, alta seletividade e especificidade, baixo risco de bioconversão em metabólitos tóxicos, boa tolerância pelos pacientes na maioria das vezes,

propriedades farmacocinéticas ajustáveis e habilidade de ativar o sistema imune do paciente. Algumas das leucemias mais difíceis de tratar agora podem ser erradicadas usando o poder do sistema imunológico (Foster, 2018).

Entretanto, ainda há necessidade de se desenvolver novas terapias e melhorar as já utilizadas, para que sejam alvo-específicas, buscando a diminuição da intensidade dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, eliminação dos efeitos-colaterais e redução na porcentagem de reincidência da doença. O resultado do tratamento de crianças com leucemia linfóide aguda (LLA) tem melhorado muito nas últimas décadas, porém aproximadamente 20% dos casos ainda não são curados e continuam a ser uma das principais causas de mortes em crianças (Pieters e Carroll, 2008; Pui e Evans, 2006). Sendo assim, a necessidade de novas abordagens terapêuticas (incluindo o uso de

anticorpos, como proposto neste projeto) que pudessem ser incorporadas no tratamento da LLA tem sido muito discutida (Smith, 2009).

Recentemente, o grupo de pesquisa do nosso colaborador investigou o perfil de expressão gênica das LLA-B ph-like em 92 pacientes e 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.

Este gene, localizado no cromossomo 6 entre as posições 14 e 21, codifica a proteína CD73, composta por duas subunidades idênticas de 70 KDa, unidas por ligações não covalentes inseridas na membrana plasmática, ligada à glicosil fosfatidilinositol (GPI). É uma ecto-5'-nucleotidase que catalisa a desfosforilação de monofosfatos de nucleosídeos extracelulares em nucleosídeos (nucleotídeo sem o grupamento fosfato) (Figura 1). A adenosina monofosfato (AMP) é o substrato preferencial para a CD73 gerar adenosina (Colgan, 2006). 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.

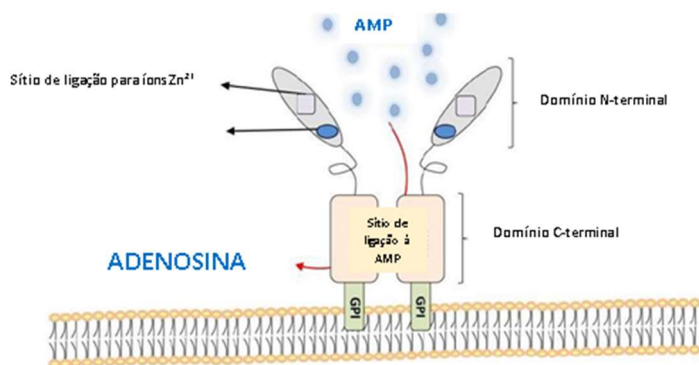


Figura 1: Representação da proteína CD73, caracterizada por um domínio N-terminal com locais de ligação para íons zinco e cobalto e um domínio C-terminal com local de ligação para AMP. A proteína está ligada à membrana plasmática através de uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esses dois domínios são conectados por uma hélice α curta. Através da CD73 o AMP é convertido em adenosina (Antonioli et al., 2011) (Imagem modificada).

Além disso, desempenham um papel central na geração de um ambiente imunossupressor e pró-angiogênico que contribui para a progressão do câncer (Yegutkin, 2014). Em células tumorais, a CD73 contribui para a supressão imune induzida e a adenosina gerada por ela diminui a função das células T antitumorais, promovendo apoptose, contribuindo assim para a evasão imunológica do tumor (Jin et al., 2010; Stagg et al., 2010). Portanto, acreditamos que

um anticorpo anti-CD73 direcione a resposta ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) e CDC (citotoxicidade mediada pelo complemento), bem como, module o sistema imune contra a leucemia.

Nosso grupo de pesquisa obteve um anticorpo murino anti-CD73 pela metodologia de hibridomas. Neste projeto propomos obter um anticorpo anti-CD73 quimérico a partir deste anticorpo murino já existente em nosso laboratório. Este anticorpo quimérico é obtido pela fusão da região variável murina (VH e VL) do nosso anticorpo à região constante humana (CH e CL) da imunoglobulina IgG1, que está clonada em plasmídeo pUC19. 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 isso é importante obtermos anticorpos quiméricos. Se houver tempo, propomos verificar o potencial terapêutico deste anticorpo em camundongos imunodeficientes (NSG) enxertados com a linhagem celular DAOY. Usaremos esta linhagem celular, pois é a única linhagem com expressão endógena de CD73 que temos no nosso laboratório neste momento e porque é representativa de meduloblastoma, o tumor cerebral maligno mais frequente em crianças (Neumann, 2017) – malignidade que também poderia ser tratada a partir do anticorpo anti-CD73 aqui desenvolvido.

Dada a associação de CD73 com outros tumores, este anticorpo poderá também ser testado futuramente em leucemias e outras malignidades. Uma vez que o CD73 é uma molécula imunossupressora, poderá ter uso como agente modulador do microambiente tumoral.

2. OBJETIVOS:

Este projeto propõe construir uma versão quimérica do anticorpo anti-CD73 murino (clone CD73.#7) e testá-lo quanto à especificidade e potencial efeito ADCC.

Se houver tempo, pretendemos realizar um teste preliminar *in vivo* para avaliar o potencial terapêutico do anticorpo CD73.#7 em camundongos imunodeficientes (NSG) enxertados com a linhagem celular DAOY e tratá-los com o anticorpo quimérico anti-CD73.

3. RESULTADOS:

O anticorpo murino que propomos quimerizar neste projeto foi obtido a partir da metodologia de hibridomas. Todos os procedimentos envolvendo animais foram feitos

com a concessão e orientação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas.

Uma camundongo fêmea da linhagem Balb/c foi imunizada intraperitonealmente (IP) com 75 ug da proteína NT5E.His (hCD73.HIS), ressuspensa em PBS e emulsificada com Adjuvante de Freund Completo (Sigma Life Science). No dia 15 do cronograma de imunização foi utilizado 25 ug da proteína como booster e no dia 29 o mesmo foi feito, ambos emulsificados com Adjuvante Incompleto de Freund (FIA) (IP) (Sigma Life Science). Para verificar os níveis de anticorpos circulantes no sangue do animal, um ELISA foi realizado, utilizando soro colhido no dia 43. No dia 63 ocorreu a primeira parte da injeção final da proteína com FIA (IP) e no dia 65 a segunda, em PBS, intravenosamente. No dia 67, novamente sangue foi recolhido para monitoramento do título de anticorpos circulante e o animal foi sacrificado. Paralelamente ao camundongo imunizado, o controle recebeu todos os tratamentos com PBS emulsificado com Adjuvante de Freund Completo e Incompleto (Sigma Life Science). O resultado presente na Figura 2 sugere que nossa estratégia de imunização foi realizada com sucesso, induzindo respostas de anticorpos anti-CD73.

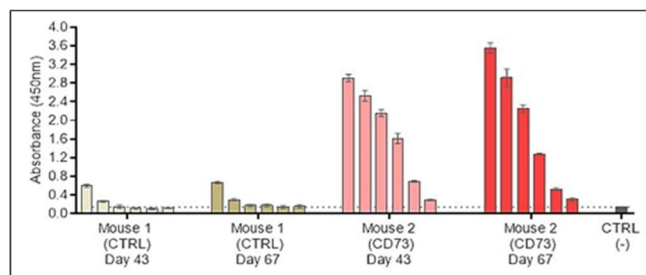


Figura 2: ELISA do soro dos camundongos 1 (controle negativo) e 2 (imunizado) para confirmar a eficiência da imunização com a proteína recombinante CD73.HIS humana. Os resultados apresentados são de amostras de plasmas coletados de ambos os camundongos em dois momentos: 15 dias após o segundo reforço (dia 43) e no dia que o animal foi sacrificado (dia 67) para obtenção das células do baço. Para a quantificação de anticorpos anti-CD73 no sangue periférico, as amostras foram diluídas (1:500, 1:2500, 1:12500, 1:62500, 1:312500 e 1:1562500) e incubadas contra a proteína CD73.GST (20 ng/poço), em placa de 96 poços. No eixo Y está representando a absorbância em 450 nanômetro e no eixo X estão os animais analisados com as diluições do plasma. Em cinza está o controle de background do experimento.

A partir da imunização, células esplenocíticas do baço do camundongo imunizado foram recolhidas e a

produção de hibridomas se sucedeu. A partir desse processo obtivemos 50 clones de hibridomas produtores de anticorpos anti-CD73 humano (h-CD73), como sumarizado na Figura 3.

Para este projeto, propomos construir um anticorpo quimérico do clone CD73.#7 (1.A6a), pois foi o que sempre apresentou bons resultados nos ELISAs realizados para seleção e expansão dos hibridomas. Na figura 4 estão representados os resultados de ELISA obtidos para o clone CD73.#7.

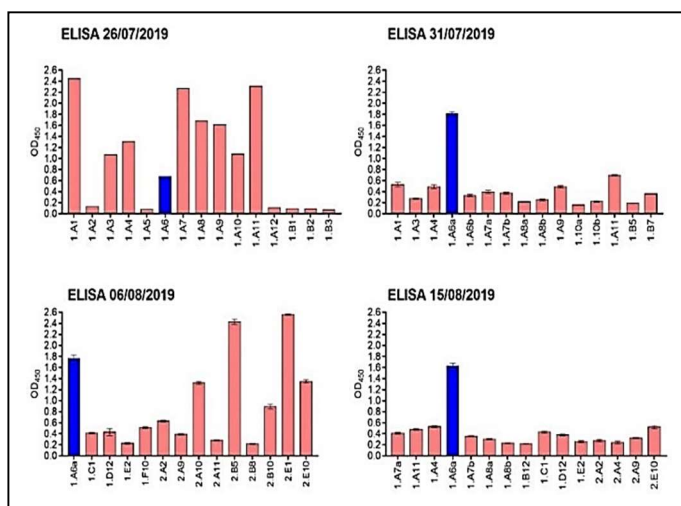


Figura 4: Resultados de ELISA realizados ao longo do processo de seleção dos clones de hibridomas, para expansão e armazenamento dos que se mostrassem positivos. Os gráficos mostram apenas um resultado parcial do total de clones, com destaque para o CD73.#7 (1.A6a) que foi promissor mesmo depois de ser transferido para uma placa de cultura maior (representado pela barra azul). Observe que houve clones altamente positivos no início, mas que perderam a capacidade de produção após algum tempo em cultura. Evento muito comum na técnica de hibridomas.

A fim de nos certificarmos da capacidade dos clones de hibridomas produzirem anticorpos que reconhecem a proteína CD73 na superfície da célula, realizamos uma análise por citometria com células DAOY, como mencionado anteriormente. A figura 5 confirma que os anticorpos que obtivemos por hibridomas reconhecem a proteína CD73 na superfície celular.

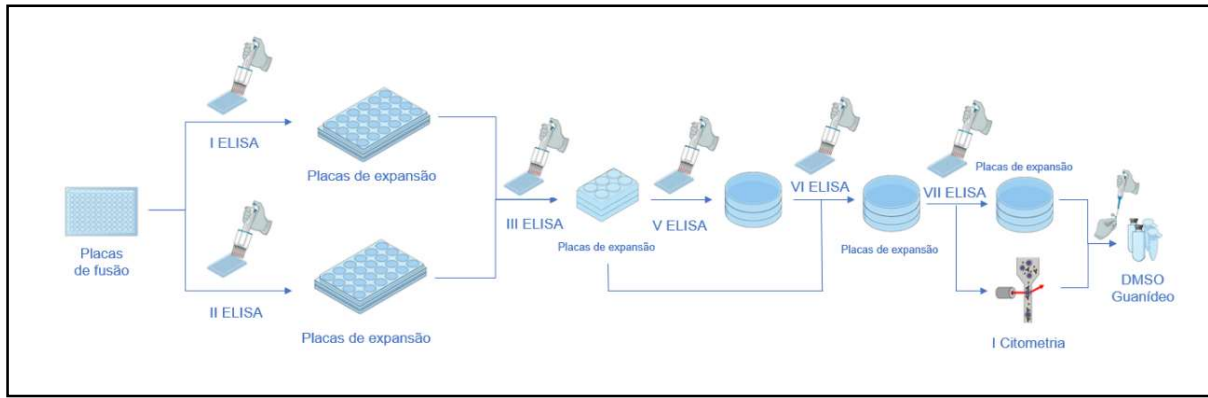


Figura 3: Processo para seleção de hibridomas por ELISA e citometria de fluxo. Os hibridomas foram analisados quanto ao reconhecimento da proteína CD73-GST por ELISA e conforme resultado positivo foram replicados para placas maiores afim de expandirem-se. Quando haviam poucas células em sua placa original, os clones continuavam nela até a possibilidade de serem replicados, como é o caso das células nas placas de 6 well, que passaram por outro ELISA (VI ELISA) para serem replicadas, finalmente. Os 50 clones positivos foram avaliados por citometria de fluxo com células DA0Y e congelados em DMSO e guanidina.

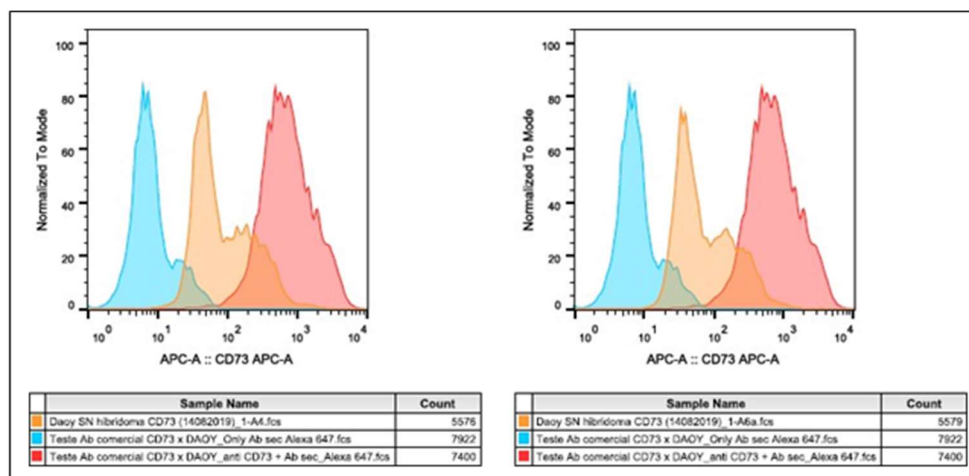


Figura 5: Citometria de fluxo para validar a especificidade de anticorpos anti-hCD73 em células de mieloblastoma Daoy. Em azul, controle negativo (isotipo controle #400121; BioLegend), em vermelho, controle positivo com anticorpo comercial (#344005; BioLegend) e em laranja representa a marcação específica com anticorpos de sobrenadante de hibridomas. Uma observação é que não se sabe a quantidade de anticorpo que estava presente no sobrenadante do hibridoma, o que não nos permite comparar quantitativamente com o anticorpo comercial. O gráfico da direita representa o anticorpo que será utilizado no presente projeto (clone #7).

Diante destes resultados, extraímos RNA total de um clone de hibridomas, que estava guardado em guanidina para síntese de cDNA e amplificação dos genes da porção variável das cadeias leve (VL) e pesada (VH) da imunoglobulina. Purificamos os amplicons do gel de agarose e clonamos em plasmídeo pJET. A figura 6 mostra e uma digestão-teste com enzima de restrição dos plasmídeos pJET já contendo os amplicons da PCR das cadeias leve e pesada.

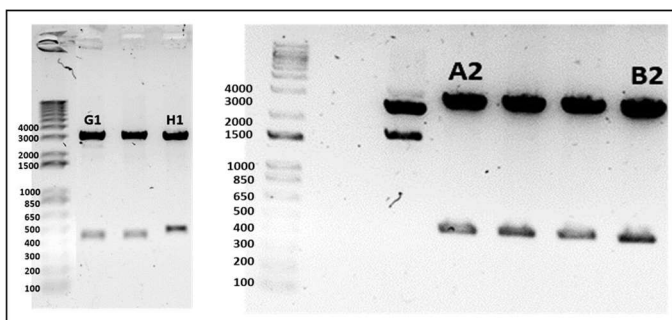


Figura 6: Digestão teste de plasmídeo pJET contendo a porção VH ou VL do anticorpo CD73.#7, digerido com BglI. As amostras G1 e H1 são clones para VL; as amostras A2 e B2 são clones diferentes para VH.

Os clones que foram confirmados na digestão-teste foram enviados para sequenciamento Sanger. A figura 7 mostra uma parte do eletroferograma das porções VL e VH do clone CD73.#7.

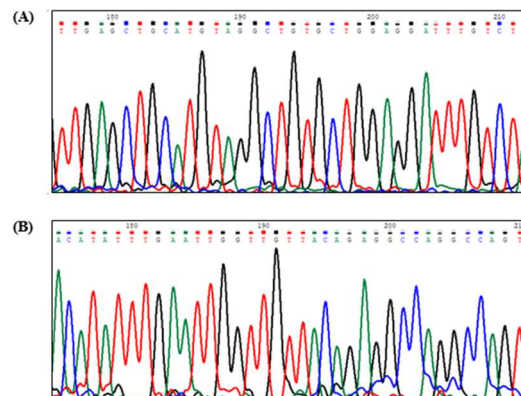


Figura 7: Representação dos eletroferogramas das porções VH e VL da imunoglobulina CD73.#7, clonados em pJET. Sequenciado com o primer Forward pJET. (A) Sequenciamento da porção VH do clone#7. (B) Sequenciamento da porção VL do clone #7.

A análise destas sequências no IgBlast e no IMGT confirmou a integridade das sequências e classificou esta

imunoglobulina quanto à semelhança com as famílias gênicas V(D)J da linhagem germinativa. Sendo assim, enviamos estas sequências para serem sintetizadas em empresa terceirizada e daremos continuidade à produção do anticorpo quimérico e testes in vitro (ADCC) e/ou in vivo.

REFERÊNCIAS:

- Anderson, M.A., et al.,2017. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood* 129, 3362–3370 (2017).
- Antonioli L, et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*;19:355–367 (2013).
- 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.
- Colgan SP , Eltzschig HK , Eckle T , Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351-60 (2006).
- Coustan-Smith et al., 2011 New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 117: 6267-6276.
- Foster JB, Maude SL. New developments in immunotherapy for pediatric leukemia. *Current Opinion in Pediatrics*, vol.30 25,29 (2018).
- Hunger SP, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia in children. *New Engl J Med* 373:1541–1552 (2015). Jefferis, R, et al. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunological reviews* 163, 59-76 (1998).
- Jin D, Fan J, Wang L et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.*70,2245–225. Crossref, Medline (2010).
- Neumann, J. E.; Swartling, F. J.; Schüller, U. Medulloblastoma: experimental models and reality *Acta Neuropathologica* Springer Verlag, , 1 nov. 2017.
- Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 55(1):1-20; (2008).
- Pui, C.H. and Evans, W.E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 354, 166-178; (2006).
- Pui, C.H., Robison, L.L., Look, A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.*;371(9617):1030- 1043 (2008).
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*107,1547–1552. Crossref, Medline (2010).
- Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29:5346–58 (2010).
- 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).