

ENGENHARIA DE ANTICORPOS TERAPÊUTICOS ANTI-HCD73 PARA TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA E OUTRAS MALIGNIDADES.Gabriella dos Reis^{1,2*}, Mayara Euzébio^{1,3}, Letícia Pereira^{1,2}, Aryanny Ferreira^{1,3}, Priscila Zenatti⁴

1. Estudante: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (IB-UNICAMP)

2. Estudante de Iniciação Científica, Centro de Pesquisa Boldrini (CPB)

3. Estudante de Doutorado, Centro de Pesquisa Boldrini (CPB)

4. Orientadora: Pesquisadora, Centro de Pesquisa Boldrini (CPB)

Resumo

A ecto-5'-nucleotidase (CD73) é uma enzima que tem a capacidade de hidrolisar o monofosfato de adenosina extracelular (AMP) em adenosina, um potente imunossupressor. Este antígeno de membrana é um marcador molecular para um subgrupo de leucemia linfóide aguda do tipo B (LLA-B), *Philadelphia-like leukemia* ("Ph-like"), que ocorre em cerca de 10% das crianças e tem altas taxas de recaída pós-tratamento. Portanto, a CD73 se mostra um excelente alvo para o desenvolvimento de imunoterapias específicas contra a LLA. Logo, o objetivo do projeto foi a construção, expressão e caracterização da versão quimérica anti-hCD73 de um anticorpo murino obtido em nosso laboratório, e do anticorpo humano MEDI9447 (oleclumab). Através da produção transiente desses biofármacos, sua afinidade, sensibilidade e especificidade foram avaliadas por diversos ensaios. Isso é necessário porque até o momento não há na literatura informações sobre a ação terapêutica de um anti-CD73 em modelos de LLA.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais do CPB (CEUA – Boldrini) 0004/2020.

Palavras-chave: Adenosina, Imunossupressão, Imunoterapia.

Apoio financeiro: CNPq e FAPESP.

Trabalho selecionado para a JNIC: Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP.

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). 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. Entretanto, 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 conseguinte, a quimerização, humanização e produção de anticorpos totalmente humanos são importantes.

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 amplamente distribuída, que possui a capacidade de hidrolisar adenosina monofosfato (AMP) extracelular em adenosina, um potente imunossupressor. Esses nucleosídeos têm um papel central na regulação de reações inflamatórias e respostas imunes, gerando um ambiente pró-angiogênico que contribui para a progressão do câncer (Yegutkin, 2014). Logo, a proteína CD73 se mostra um excelente alvo para o desenvolvimento de terapia alvo-específica não só para a LLA, mas também para outros diversos tipos de cânceres.

Portanto, esse projeto propôs a construção, expressão e caracterização da versão quimérica anti-hCD73 de um anticorpo murino obtido em nosso laboratório pela metodologia de hibridomas, 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

A metodologia foi iniciada a partir do Sequenciamento Sanger das cadeias variáveis leve (V_L) e pesada (V_H) do anticorpo murino anti-CD73 #7, obtido em nosso laboratório pela metodologia de hibridomas. A análise destas sequências no IgBlast e no IMGT confirmou sua integridade e classificou esta imunoglobulina quanto à semelhança com as famílias gênicas V(D)J da linhagem germinativa, então pudemos seguir para os próximos experimentos. Para realizar a quimerização do mesmo, primeiramente ambas as sequências V_L e V_H passaram pelo processo de otimização de códons – etapa necessária, dado que a produção do anticorpo ocorre em células humanas – utilizando o software SerialCloner 2.6.1. Em seguida, elas foram enviadas para a síntese em empresa terceirizada, juntamente com as sequências das cadeias variáveis do anticorpo humano MEDI9447, obtidas

através da literatura.

Após a síntese, as sequências variáveis das cadeias pesada (V_H) e leve (V_L) de cada um dos anticorpos (tanto o quimérico, quanto o humano) foram fusionadas às regiões constante humana pesada (C_H) e leve (C_L) da imunoglobulina IgG1, nos plasmídeos pUC19 γ 1 e pUC19 κ/λ , respectivamente. Todos os plasmídeos pUC19 foram amplificados em bactéria DH5 α e a clonagem foi confirmada por Sequenciamento Sanger. Para a produção *in vitro* dos anticorpos, a linhagem celular HEK293T foi co-transfectada com os plasmídeos contendo os genes das cadeias leve e pesada de ambos os anticorpos (com suas respectivas combinações) e a obtenção dos mesmos foi confirmada por SDS-PAGE e Western Blotting (WB), após purificação do sobrenadante celular. A sensibilidade e especificidade do anticorpo quimérico foram verificadas por ELISA, WB, e citometria de fluxo. Para validar a especificidade e atividade do anticorpo humano MEDI9447 foram realizadas citometria de fluxo e o ensaio AMP-Glo™. A metodologia foi ilustrada na Figura 1.

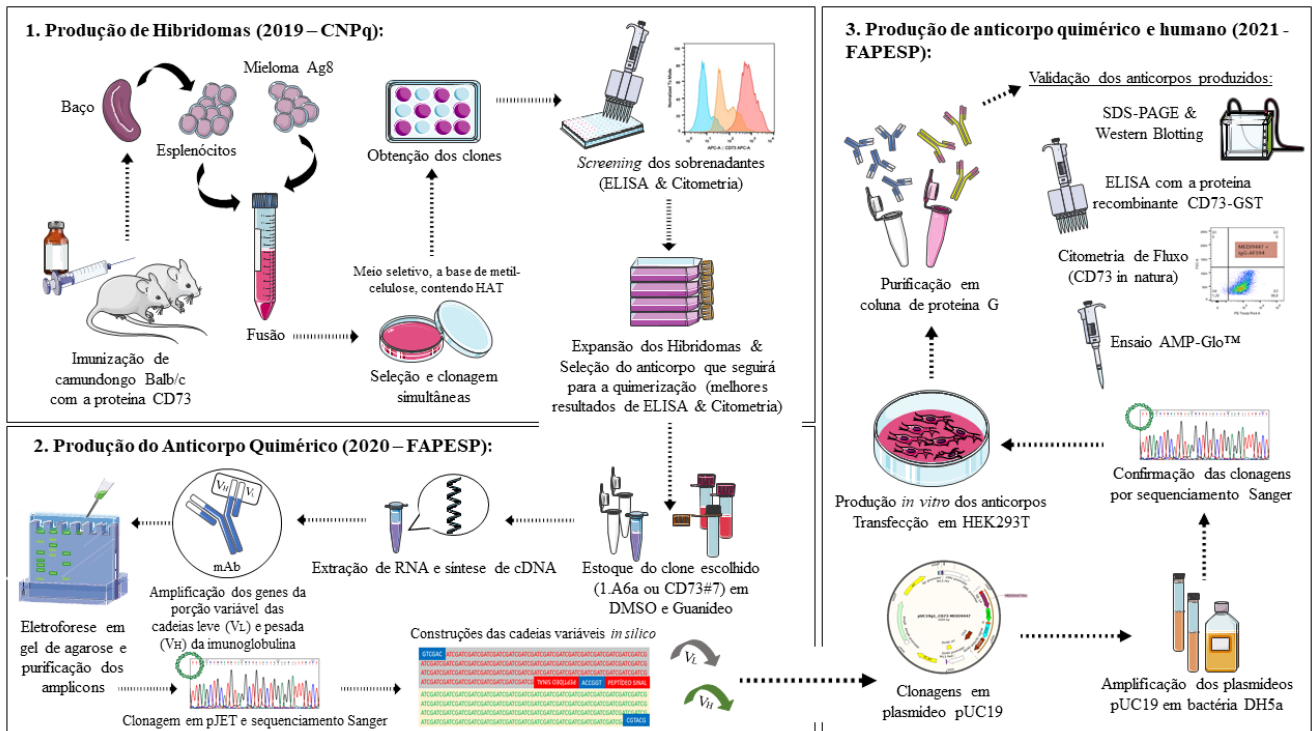


Figura 1. Metodologia utilizada no projeto: 1. Produção de Hibridomas: o anticorpo escolhido para quimerização (anti-CD73#7) foi obtido pela metodologia de hibridomas. Com base nos resultados de ELISA e citometria o clone 1.A6a (#7) foi escolhido. 2. Produção de anticorpo quimérico: o anti-CD73#7 foi 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. Criado com Servier Medical Art (smart.servier.com).

Resultados e Discussão

1. Anticorpo Quimérico

O anticorpo quimérico anti-CD73 (cAb-CD73#7) foi produzido com sucesso, reconhece a proteína CD73-GST recombinante por ELISA, e é sensível até uma diluição de 1:100 (Figura 2A). A proteína CD73 utilizada nesse teste tem uma cauda GST, uma proteína de fusão longa, que pode interferir em sua conformação e atividade biológica (Bucher et al., 2002). Por isso os testes de citometria (Figura 2B) são tão importantes, para confirmar que o anticorpo reconhece a proteína também em sua conformação nativa, essencial para análises de funcionalidade e uma futura utilização clínica. Os resultados nas Figuras 2A e 2B mostram que o anticorpo reconhece a proteína no ELISA, mas não no ensaio de citometria. Uma hipótese para esse resultado é que, devido à conformação estrutural da proteína utilizada no ELISA, uma proteína recombinante associada a um tag GST (#1302H Human – CreativeBioMart), o epítipo reconhecido pelo anticorpo está acessível, o que não acontece na proteína em sua conformação natural, avaliado na citometria de fluxo. Uma forma de comprovar essa hipótese é pelo ensaio de Espectrometria de Massas por Cross-Link (CLMS), que permite identificar o epítipo de interação do anticorpo no antígeno. Outra hipótese se refere ao processo de mudança de isotipo do anticorpo, que pertencera à classe IgM (origem murina, 1.A6a) e ao ser quimerizado, teve suas cadeias variáveis fusionadas às porções constantes de uma IgG. Essa mudança foi feita, porque a classe IgG é, além da mais escolhida para quimerização, humanização e produção de anticorpos totalmente humanos, a que possui características mais ativas, como a interação com células efectoras do sistema imune, podendo atuar através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Portanto, supõe-se que essa conformação diferente das classes de imunoglobulinas possa ser a responsável pelo não reconhecimento da proteína, em sua conformação natural, pelo anticorpo

quimérico. É por isso que para realizar a escolha, ou mudança de isotipos, testes cuidadosos precisam ser feitos (Salfeld, 2007).

Por conseguinte, a fim de validar melhor a especificidade do anticorpo, realizamos dois testes de Western Blotting (Figura 2C e 2D). A partir desses testes, foi possível observar que o anti-CD73#7 reconhece a proteína CD73, que está conjugada à GST em seu formato *in natura* e desnaturado, e também nos lisados da linhagem DAOY e nas células primárias de LLA-B. Entretanto, devido ao segundo experimento, observamos o aparecimento de diversas bandas nos dois lisados, sugerindo que o anticorpo é inespecífico.

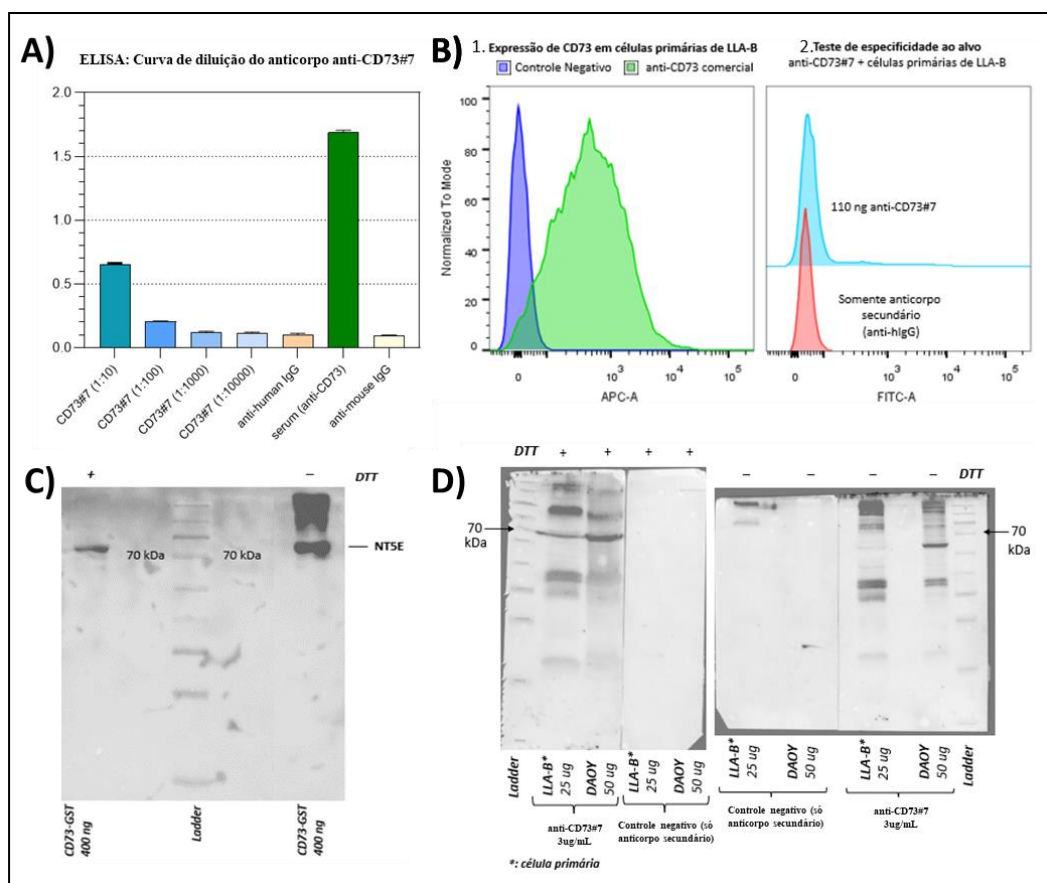


Figura 2. Testes de especificidade do anticorpo quimérico. A) Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) do anticorpo anti-CD73#7 contra a proteína CD73-GST. A placa foi carregada com 20 ng/poço da proteína CD73-GST. Em degradê azul temos as diluições do anticorpo anti-CD73#7 de 1:10 até 1:10.000. Em laranja temos o controle negativo, 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. **B)** Teste de expressão e especificidade ao alvo com células primárias de LLA-B "*Ph-like*". (B1.) Teste de expressão de CD73 com controle negativo (azul) e anti-CD73 comercial (verde). Observa-se a expressão de CD73 nas células primárias de LLA-B. (B2.) Teste de especificidade ao alvo com controle negativo (apenas anticorpo secundário) (vermelho) e 110 ng de anti-CD73#7 (azul claro). O anticorpo anti-CD73#7 não reconhece a proteína CD73 em sua forma nativa, em células de LLA-B. **C)** WB para verificação do reconhecimento do anti-CD73#7 ao alvo, em proteína CD73-GST, nas formas *in natura* e desnaturada. Foram utilizados 400 ng de CD73-GST em cada condição, sendo que parte das amostras foi desnaturada (Sample buffer 5x + DTT 100mM) e o restante mantida na conformação *in natura*. A incubação com o anticorpo primário [3 μ g/mL] foi realizada a 4°C overnight e o anticorpo secundário utilizado foi o anti-human IgG-HRP (1:20000, Rhea Biotech). **D)** WB para verificação do reconhecimento do anti-CD73#7 ao alvo em lisado de DAOY e células primárias de LLA-B, nas formas *in natura* e desnaturada. A incubação com o anticorpo primário [3 μ g/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).

2. Anticorpo Humano

O anticorpo foi produzido e testado por Citometria de Fluxo em linhagem leucêmica REH com a expressão ectópica da proteína CD73 (Figura 3). Essas células foram transduzidas com o gene NT5E humano, juntamente com um gene repórter (GFP) para servir como ferramenta de validação do potencial terapêutico de um anticorpo anti-CD73 contra LLA. A partir dessa citometria é possível observar que o MEDI9447 reconhece a proteína em sua forma natural na superfície celular e é específico. Logo, o utilizaremos para os futuros testes *in vitro* e *in vivo*. A fim de validar a atividade inibitória do CD73 pelo anticorpo MEDI9447, medimos a degradação de AMP em adenosina pelas células RS4;11-WT e RS4;11-NT5E, utilizando o kit AMP-Glo™ (Figura 4).

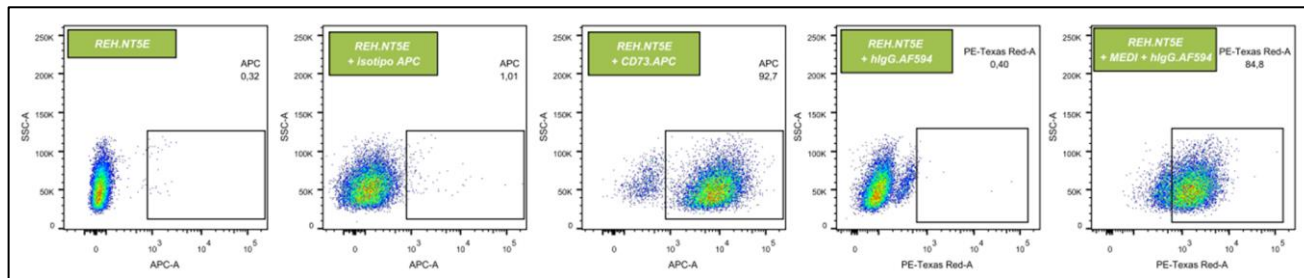


Figura 3. Teste de especificidade ao alvo com a linhagem leucêmica REH-NT5E. Da esquerda para a direita estão: somente as células, utilizadas para ajustar os parâmetros do citômetro; REH-NT5E marcada com controle negativo (isotipo controle #400121; BioLegend); REH-NT5E marcada com controle positivo (anti-CD73 #344005; BioLegend), confirmando a expressão ectópica da CD73 nestas células; REH-NT5E marcada com controle negativo anti-IgG.AF594 (#A-11014; ThermoFisher); e REH-NT5E marcada com o anticorpo primário MEDI9447, produzido em nosso laboratório, conjugado com o anticorpo secundário hlgG.AF594.

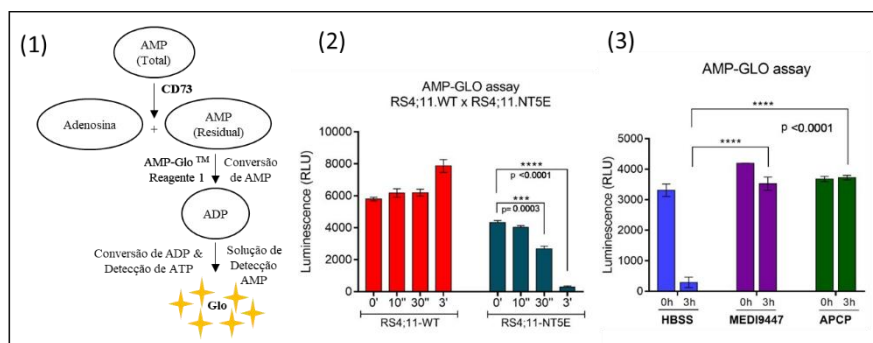


Figura 4. Teste de especificidade e atividade do anticorpo humano MEDI9447 com a linhagem leucêmica RS4;11-NT5E. Ensaio AMP-Glo™ com células RS4;11-WT/NT5E: monitoramento da atividade da ectoCD73 em formato celular. (1) Descrição do ensaio. O AMP presente no meio é degradado pela CD73 em adenosina. O AMP restante será convertido em ATP pelas enzimas AMP polifosfato

fosfotransferase e adenilato quinase (Reagente 1) e o ATP gerado é detectado pela reação de luciferase. (2) Comparação da degradação de AMP entre RS4;11-WT e RS4;11-NT5E. Cinquenta mil células de cada linhagem receberam 25 μ M de AMP no tempo zero. A concentração de AMP foi medida (de forma indireta) 0 min, 10 min, 30 min e 3 horas. A linhagem RS4;11-NT5E consumiu quase que totalmente o AMP presente no meio, confirmando a atividade enzimática da CD73 ectópica. (3) Efeito bloqueador do anticorpo MEDI9447. Células RS4;11-NT5E foram incubadas ou não com MEDI9447 [10 μ g/mL] ou com APCP, um inibidor de CD73 [10 μ M] por 30 minutos. Em seguida foram incubadas com 25 μ M de AMP. Após 3h mediu-se a concentração de AMP em cada condição, verificando que o anticorpo MEDI9447 bloqueou a degradação de AMP, igualmente ao inibidor APCP. Cada barra representa a média das duplicatas; as barras de erro representam o desvio padrão.

Conclusões

A metodologia de produção dos anticorpos foi bem-sucedida. O anticorpo quimérico anti-CD73#7 consegue reconhecer a proteína CD73 em sua forma recombinante por ELISA, assim como nas formas *in natura* e desnaturada por Western Blotting. Infelizmente, ele não possui a capacidade de reconhecer a proteína em seu formato *in natura*, como mostrado com os testes de citometria em células com expressão endógena da proteína. Logo, novos estudos serão necessários para identificar o epítipo de ligação do anti-CD73#7. Paralelamente, construímos e produzimos o anticorpo humano MEDI9447, ou oleclumab. Ele reconhece a CD73 em seu formato *in natura*, por citometria de fluxo, e se mostra funcional ao bloquear a quebra de AMP em adenosina, como mostrado no ensaio AMP-Glo™. Portanto, o MEDI9447 servirá para confirmar se o antígeno CD73 representa, de fato, um alvo terapêutico contra a LLA. Isso é necessário porque não há na literatura informações sobre a ação terapêutica do anti-CD73 em Leucemia Linfoblástica Aguda.

Referências bibliográficas

- Anderson, Mary Ann, et al. "Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 129.25 (2017): 3362-3370.
- Bucher, Matthew H., Artem G. Evdokimov, and David S. Waugh. "Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 58.3 (2002): 392-397.
- 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, Jerry B., et al. "CD73's potential as an immunotherapy target in gastrointestinal cancers." *Frontiers in Immunology* 11 (2020): 508.
- Salfeld, Jochen G. "Isotype selection in antibody engineering." *Nature biotechnology* 25.12 (2007): 1369-1372.
- Yegutkin, Gennady G. "Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 49.6 (2014): 473-497.