



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: Avaliação do bloqueio do checkpoint imunológico de linfócitos T expressando receptores quiméricos de antígeno anti-anidrase carbônica capazes de secretar anticorpos anti-PD-L1

Palavras-chave do projeto: CAR T, CAIX, PD-L1, células tumorais triplo-negativas de mama, células tumorais renais, exaustão de linfócitos T

Área do conhecimento do projeto: 2.11.02.00-7-Imunologia Celular

Sumário

1 Resumo	3
2 Introdução e Justificativa	3
3 Objetivos	5
4 Metodologia	5
5 Viabilidade	7
6 Cronograma de atividades	7
Referências	9

1 Resumo

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) apresenta alta agressividade com rápida evolução clínica e baixas taxas de sobrevivência, além disso, é definido pela elevada heterogeneidade celular e molecular, dificultando a descoberta de terapias alvo efetivas. O carcinoma renal de células claras (ccRCC) é o mais comum entre os subtipos de cânceres renais, apresentando alto índice metastático, além de representar 2% dentre todos os cânceres no mundo. A anidrase carbônica IX (CAIX) é uma metaloenzima associada a membrana com a função de regular o pH em condições de hipoxia promovendo a invasão das células tumorais em microambientes hipóxicos, essa enzima encontra-se superexpressa em TNBCs e ccRCC. O ligante de morte celular programada-1 (PD-L1) também é superexpresso em diversos tipos de tumores, sendo que o PD-L1 é capaz de interagir com o receptor de morte celular programada-1 (PD-1) que está localizado em linfócitos T (LT) favorecendo a exaustão dos LT e tornando-os incapazes de coibir a progressão tumoral. Este projeto tem como objetivo analisar uma possível reversão da exaustão promovida potencialmente pelos LT CAR (chimeric antigen receptor T cells) anti-CAIX liberadores de anticorpos anti-PD-L1 *in vitro* em co-cultura com linhagens de TNBCs e ccRCC.

2 Introdução e Justificativa

O câncer de mama é atualmente um problema de saúde pública, em 2020 foram registrados mais de 2 milhões de casos e quase 700 mil mortes em todo o mundo, representando 11,7% e 6,9% dos casos de câncer e de mortes por câncer no mundo respectivamente (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). No Brasil nesse mesmo ano, de acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer) foram registrados cerca de 66 mil novos casos e mais de 17 mil mortes decorrentes ao câncer de mama (INCA, 2022). Dentre os tumores de mama, os do subtipo triplo negativo (TNBC – *Triple-negative Breast Cancer*) correspondem a cerca de 10 a 20% de todos os casos de câncer de mama no mundo (SCHETTINI; GIULIANO; DE PLACIDO; ARPINO, 2016), apresentando alta agressividade e índice metastático, com uma evolução clínica agressiva e baixa sobrevivência (DEEPAK; VEMPATI; NAGARAJU; DASARI *et al.*, 2020). Ademais esse câncer apresenta seis subtipos os quais não possuem expressão de receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) ou do fator de crescimento epidérmico 2 humano

(HER2) (WANG; JIANG; BEN-DAVID; WOODGETT *et al.*). Não existem terapias alvo-específicas para este tipo de tumor.

Em 2020 foram registrados mais de 400 mil novos casos de câncer renal e foram contabilizadas cerca de 179 mil mortes devido ao câncer renal no mundo (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). Os tumores renais malignos representam 2% de todos os cânceres no mundo, e sua incidência tem aumentado ao longo dos anos (TURAJLIC; SWANTON; BOSHOF, 2018). Dentre todos os seus subtipos, o mais comum é o câncer renal de células claras (ccRCC), que corresponde a 75% dos casos e que se mostra com alta malignidade e resistência, com prevalência crescente na população (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; TURAJLIC; SWANTON; BOSHOF, 2018). De acordo com INCA o principal tipo de câncer que pode atingir o rim é o carcinoma renal de células claras (CRCC) e no Brasil a incidência estimada é de 7 a 10 casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2022). Além disso, cerca de 30% dos pacientes com carcinoma renal apresentam metástase devido à dificuldade de diagnóstico em fases iniciais para a maioria dos pacientes (CORONA; BETTI; GATTA; ROILA *et al.*, 2007).

Comentado [VP1]: Câncer renal

O sistema imunológico interage com o câncer, reconhecendo a célula tumoral e ativando linfócitos T (LT). Os linfócitos T são capazes de expressar diversos receptores inibitórios quando superativados. Dentre eles, destaca-se o receptor de morte celular programada 1 (PD-1), o qual interage com o ligante de morte células programada-1 (PD-L1) superexpresso em diversos tumores favorecendo um processo denominado exaustão dos LT, caracterizada pela perda das funções efetoras dos linfócitos que tornam-se incapazes de impedir a progressão tumoral (JIANG; LI; ZHU, 2015; SUN; MEZZADRA; SCHUMACHER, 2018). Estudos demonstraram que certos anticorpos monoclonais são capazes de impossibilitar a interação PD-L1/PD-1 dessa forma, bloqueando a exaustão dos LT, estudos com anticorpos monoclonais anti-PD-L1 tem se mostrado promissores no tratamento de tumores de mama triplo negativos e tumores renais, fazendo com que as respostas imunes sejam aprimoradas (RINNERTHALER; MÜLLER; BALIC; ZAMAN *et al.*, 2021)

A anidrase carbônica IX (CAIX) é uma metaloenzima induzível por hipóxia via HIF-1 que regula o pH intra e extracelular em condições de hipóxia promovendo a invasão das células tumorais em microambientes hipóxicos (LOU; MCDONALD; OLOUMI; CHIA

et al., 2011). Aproximadamente 50% dos tumores de mama TN apresentam expressão de CAIX, por esse motivo estudos tem indicado que uma terapia alvo baseada em CAIX pode ser eficaz contra tais tumores (CAMPOS; SOUZA; SILVA; PORTO *et al.*, 2022; DOLATKHAH; OMIDI, 2019). Em carcinoma renal de células claras, uma mutação no gene von Hippel Lindeau favorece a expressão constitutiva de CAIX, tornando esta molécula um alvo terapêutico ainda mais interessante.

A expressão manipulada de receptores quiméricos de antígeno (CAR) na superfície dos LT promove o redirecionamento dos mesmos de forma altamente específica. Resultados promissores vêm sendo obtidos com LT CAR direcionadas ao CD19 no tratamento de pacientes com malignidades de células B (JACKSON; RAFIQ; BRENTJENS, 2016). Os CARs são receptores híbridos que compreendem um domínio de ligação extracelular derivado de um anticorpo selecionado contra certo alvo molecular e um domínio transmembranico ligado a um domínio co-estimulatório e a um domínio de sinalização intracelular, responsáveis pela ativação completa dos LTs (CAMPOS; SOUZA; SILVA; PORTO *et al.*, 2022).

O uso de LT CAR anti-CAIX por liberação de anticorpos anti-PD-L1 apresenta um excelente potencial terapêutico contra o TNBC e ccRCC, visto que tais tumores possuem elevada expressão de CAIX e PD-L1.

Excluído: p

3 Objetivos

Este projeto tem como objetivo avaliar a exaustão dos T CAR anti-CAIX liberadores de anti-PD-L1 *in vitro* em diferentes linhagens celulares triplo-negativas de mama e de tumores renais positivas para CAIX/ PD-L1.

4 Metodologia

4.1 Linhagens celulares e cultura. As células HS578 T (CAIX+/ PD-L1+) e MDA-MB-231 (CAIX-/ PD-L1+) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar. As células HS578 T (CAIX+/ PD-L1+) serão cultivadas em DMEM suplementados com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 100 IU/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e as células MDA-MB-231 (CAIX-/ PD-L1+) em RPMI 1640 suplementados com 10% v/v de soro fetal bovino inativado por calor (SFB, Gibco).

As células de carcinoma renal SKRC 59 (CAIX+/PDL1+) foram gentilmente

cedidas pelo Dr. Wayne Marasco (Dana Farber Cancer Institute, MA, USA). Estas células serão cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 100 IU/mL de penicilina de 100 µg/mL de estreptomicina.

- 4.2 Produção de Lentivirus:** Os lentivírus serão produzidos através da transfecção transitória de cinco plasmídeos nas células 293T utilizando polietilenoimina (PEI) (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, EUA). Cada placa contendo as células 293T LentiX com 80% de confluência serão transfectadas com 5 µg de cada um dos cinco plasmídeos, portanto 30 µg no total. Os plasmídeos estruturais utilizados serão: pHDL-Hgpm2 (HIV gag-pol), pMD-tat, pRC/CMV-rev e Env VSV-G - e 10 µg do plasmídeo que codifica para os diferentes tipos de CAR. Os sobrenadantes contendo os vírus serão concentrados utilizando uma concentração final de 8,5% de polietilenoglicol 6000 e eletrolito de sódio 0.3M diluído em PBS e mantidos congelados a -80 °C.
- 4.3 Seleção, ativação e transdução do PBMC:** O sangue total de doadores voluntários saudáveis será coletado após os doadores assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A fração mononuclear do sangue periférico será separada utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). Afim de promover a ativação e expansão dos linfócitos serão utilizados os Dynabeads CD3/CD28 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) na proporção de 2:1. Os linfócitos serão mantidos em meio RPMI completo contendo 20 mM de HEPES. A cada 2 dias serão adicionadas ao meio 10 ng/mL de interleucina-5 (IL-5) e interleucina-17 (IL-17) (Peprotech). Todas as linhagens serão mantidas a 37°C, as duas primeiras em 5% CO₂.
- 4.4 Transdução das células T e análise da transdução:** Em seguida as células serão transduzidas com lentivírus na multiplicação de infecção de 6 e 10 µg/mL de dietilaminoetil. A transdução será confirmada pela análise de ZsGreen ou marcação com 10 µg/mL de CAIX-Fc humano (Ab Biosciences, Concord, MA, EUA) e em seguida incubadas com 2 µg/mL de IgG de camundongo anti-IgG humano conjugado com APC (ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). As amostras serão analisadas por meio de citometria de fluxo e os dados obtidos serão analisados por meio do programa FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

Para execução deste projeto serão utilizados equipamentos presentes do laboratório do orientador e do multiusuário de nível 2 de biossegurança do CCNH para vetores lentivirais, além do de colaboradores (incubadora de CO2, cabine de segurança biológica, microscópio convencional, banho-maria, centrífuga), além de equipamentos multiusuário da instituição, como citômetro de fluxo. Os reagentes a serem utilizados serão adquiridos com verba de financiamento de projeto de pesquisa FAPESP do orientador. Além disso o projeto já foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa em humanos e ao comitê de ética em pesquisa animal.

[illegible][illegible]

[illegible]

Referências

CAMPOS, N. S. P.; SOUZA, B. S.; SILVA, G.; PORTO, V. A. *et al.* Carbonic Anhydrase IX: A Renewed Target for Cancer Immunotherapy. **Cancers (Basel)**, 14, n. 6, Mar 9 2022.

CORGNA, E.; BETTI, M.; GATTA, G.; ROILA, F. *et al.* Renal cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, 64, n. 3, p. 247-262, Dec 2007.

DEEPAK, K. G. K.; VEMPATI, R.; NAGARAJU, G. P.; DASARI, V. R. *et al.* Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. **Pharmacol Res**, 153, p. 104683, Mar 2020.

DOLATKHAH, M.; OMIDI, Y. Renewed interests in carbonic anhydrase IX in relevance to breast cancer treatment. **Bioimpacts**, 9, n. 4, p. 195-197, 2019.

JACKSON, H. J.; RAFIQ, S.; BRENTJENS, R. J. Driving CAR T-cells forward. **Nat Rev Clin Oncol**, 13, n. 6, p. 370-383, Jun 2016.

JIANG, Y.; LI, Y.; ZHU, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. **Cell Death Dis**, 6, n. 6, p. e1792, Jun 18 2015.

LOU, Y.; MCDONALD, P. C.; OLOUMI, A.; CHIA, S. *et al.* Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. **Cancer Res**, 71, n. 9, p. 3364-3376, May 1 2011.

RINNERHALER, G.; MÜLLER, V.; BALIC, M.; ZAMAN, K. *et al.* Expert Discussion: Immunotherapy in Breast Cancer - Ready for Prime Time? **Breast Care (Basel)**, 16, n. 2, p. 188-191, Apr 2021.

SCHETTINI, F.; GIULIANO, M.; DE PLACIDO, S.; ARPINO, G. Nab-paclitaxel for the treatment of triple-negative breast cancer: Rationale, clinical data and future perspectives. **Cancer Treat Rev**, 50, p. 129-141, Nov 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 69, n. 1, p. 7-34, 2019.

SUN, C.; MEZZADRA, R.; SCHUMACHER, T. N. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. **Immunity**, 48, n. 3, p. 434-452, Mar 20 2018.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

TURAJLIC, S.; SWANTON, C.; BOSHOFF, C. Kidney cancer: The next decade. **The Journal of experimental medicine**, 215, n. 10, p. 2477-2479, 2018.

WANG, D.-Y.; JIANG, Z.; BEN-DAVID, Y.; WOODGETT, J. R. *et al.* Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes.