

Projeto para Iniciação Científica – 25/04/2019

Proponente: Dr. Marcio Bajgelman – LNBio

Título: Desenvolvimento de aptâmeros quiméricos para inativação de células T regulatórias humanas

Abstract

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada por se desenvolver a partir de células do próprio organismo, que adquirem alterações genéticas. A célula tumoral pode apresentar características que propiciem seu crescimento, tal como o escape do sistema imunológico. Esta capacidade de evasão do sistema imunológico é atribuída em grande parte à existência de mecanismos de imunossupressão que regulam o equilíbrio entre imuno-tolerância e imuno-vigilância, com a finalidade de evitar uma resposta autoimune de células T sensibilizadas com antígenos próprios. Na última década, observou-se um significativo desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuam em mecanismos relacionados com o controle da imuno-tolerância em células T, mediados por receptores como CTLA-4 e PD1. A utilização de fármacos que atuam nestes receptores tem revolucionado a prática médica. Em adição a estes receptores, outro importante mecanismo de imunossupressão está relacionado a atividade de células T regulatórias. Esta população se caracteriza por inibir a proliferação de células T e antagonizar a resposta imune antitumoral. Nosso grupo do LNBio-CNPEM desenvolve uma estratégia para inativação da atividade imunossupressora de Treg baseada em aptâmeros quiméricos, para veiculação intracelular de moléculas de RNA de interferência. Observamos previamente em modelos animais a possibilidade de utilizar estes aptâmeros para potencializar a e resposta antitumoral mediada pela vacina antitumoral GVAX. Neste projeto, planejamos desenvolver aptâmeros quiméricos para veiculação destas moléculas de RNAi para células humanas. Estas moléculas poderão ser utilizadas no desenvolvimento de futuras abordagens para o tratamento de câncer humano.

Introdução e estado da arte

As células T regulatórias (Treg) apresentam a propriedade de inibir a proliferação de células T efectoras e portanto podem antagonizar a resposta imune antitumoral (Curiel et al. 2004, Cao 2010). Dados clínicos demonstram a significativa presença de Treg em sítios tumorais, associada a um mal prognóstico no tratamento (Liyanage et al. 2002, Wolf et al. 2003, Wolf et al. 2005, Betts et al. 2011, Chen et al. 2011, Liotta et al. 2011). Dessa forma, a inativação de células T regulatórias pode potencializar terapias antitumorais (Curtin et al. 2008, Li et al. 2010, Marabelle et al. 2013).

Existem estratégias para inativação de células T regulatórias, como a utilização do fármaco ciclofosfamida (Ghiringhelli et al. 2007), anticorpos monoclonais dirigidos ao receptor CD25, ou mesmo da utilização de uma imunotoxina quimérica recombinante que consiste na fusão da toxina diftérica com a IL2, conhecida por danileukin diftotox (Ontak®), disponível comercialmente (Waters et al. 1990, Knutson et al. 2006, Morse et al. 2008). É interessante observar que estas estratégias não são específicas para inibição de Treg e também podem causar a eliminação de células T efectoras, antagonizando a resposta imune antitumoral. No trabalho descrito pelo grupo do Dr. Pastan (Onda et al. 2019), efetuou-se um protocolo de injeção de imunotoxina intratumoral, para que o efeito associado a citotoxicidade sistêmica fosse reduzido, observando-se menor toxicidade.

O Alvo deste projeto consiste em desenvolver uma estratégia seletiva para inibição de células T regulatórias para que não haja antagonização da resposta imune antitumoral. Dessa forma, escolhemos alvos moleculares inativação do fenótipo imunossupressor de Treg. Desenvolveremos aptâmeros quiméricos contendo sequências de RNAi para silenciamento destes alvos moleculares.

Os aptâmeros de RNA são pequenas moléculas de cerca de 100 nucleotídeos fita simples, que apresentam alta seletividade e afinidade por alvos, da mesma forma que anticorpos monoclonais (Tuerk and Gold 1990, Santulli-Marotto et al. 2003, Ni et al. 2011, Morita et al. 2018). Modificações químicas como a introdução de grupos metil ou bases fluorinadas podem ser facilmente

implementadas aumentando-se significativamente a estabilidade da molécula, possibilitando-se sua administração de forma sistêmica (Kuwahara and Sugimoto 2010).

Em contraste aos anticorpos monoclonais que necessitam ser gerados em sistemas biológicos, os aptâmeros são gerados de forma sintética, simplificando-se os processos de produção. É possível introduzir modificações na sequência com alvo de otimizar o tamanho da molécula (Dassie et al. 2009). Conforme mencionamos, a molécula de aptâmero pode ser utilizada como vetor para veicular moléculas de RNA de interferência. Esse mecanismo é baseado em endocitose mediada por receptores de superfície das células-alvo. É possível engenheirar uma molécula de aptâmero que apresente alta especificidade e afinidade por um receptor de superfície de uma célula-alvo, para veicular uma molécula de RNA de interferência. Dessa forma, ao ligar-se ao receptor da célula-alvo, o aptâmero quimérico contendo o RNAi pode ser internalizado e então exercer atividade sobre um alvo molecular para desencadear efeito biológico. No trabalho pioneiro descrito pelo grupo da Dra. Giangrande (McNamara et al. 2006), foi desenvolvido um aptâmero quimérico para inibição de alvos como PLK-1 e BCL-2, associados a sobrevivência de células tumorais. Estes aptâmeros evidenciaram a potencialidade de sua utilização no desenvolvimento de abordagens antitumorais. A eficiência de aptâmeros quiméricos para veiculação de siRNA é modulada por diversos parâmetros, tal como atividade da molécula de siRNA e sua estabilidade termodinâmica. Nosso grupo tem experiência na manipulação de aptâmeros quiméricos contendo moléculas de siRNA (Bereznoy et al. 2012).

Em nosso grupo, temos experiência prévia com o desenvolvimento de estratégias para imunomodulação antitumoral baseada no desenvolvimento de vacinas terapêuticas em modelos animais imunocompetentes (Manrique-Rincon et al. 2017, Manrique-Rincon et al. 2018). Neste projeto, planejamos construir aptâmeros quiméricos dirigidos aos receptores CD4, constitutivamente expresso em células T regulatórias humanas. Estes aptâmeros serão fundidos à moléculas de siRNA para inibição de alvos moleculares. A inibição de células T regulatórias contribuirá para estimular a imunovigilância e potencialização da resposta imune antitumoral.

Objetivos

O Alvo central deste projeto consiste em desenvolver um aptâmero quimérico, dirigido para células CD4+ humanas, contendo uma molécula de siRNA para o silenciamento de expressão gênica de alvos moleculares de Treg de humano. A inibição do fenótipo imunossupressor de Treg poderá potencializar a atividade de imunoterapias antitumorais.

Objetivos específicos

- Síntese do aptâmero CD4 parental (sem siRNA)
- Ensaio de ligação do aptâmero CD4 parental em células CD4+
- Síntese de três candidatos de aptâmero quimérico com siRNAs (apt-siRNA)
- Ensaios in vitro para verificar inibição de alvos moleculares em células MCF7-CD4
- Ensaios in vitro para verificar inibição de alvos moleculares em células primárias humanas.
- Ensaios in vitro para verificar inibição de imunossupressão

Plano de pesquisa e metodologias

1. Síntese química do aptâmero CD4 parental.

Escolhemos um candidato de aptâmero de RNA cujo template já é descrito na literatura (Davis et al. 1998), com sequência indicada, GUGACGUCCUGAUCGAUUGUGAAUUCGGUGUGACGAUCU

Esta sequência e a sequência complementar serão sintetizadas como óligo nucleotídeos, aneladas e então utilizadas como template para transcrição de RNA. A reação é descrita em (McNamara et al. 2006),

2. Ensaio de ligação do aptâmero CD4 parental em células CD4 positivas

Inicialmente transfectaremos células HEK293 com vetor pCDNA-CD4, já disponível em nosso laboratório. As células serão semeadas em placas de 35mm, sendo $2,5 \times 10^5$ cells HEK293/placa p35, 24 horas antes da transfecção. Para transfecção, utilizaremos 2 μ g de DNA e 4 μ l de lipofectamina 2000, seguindo-se protocolo do fabricante. Após 48 horas de incubação, a expressão de CD4 será verificada com um anticorpo anti CD4 humano marcado com o fluoróforo fitc (BD), que possibilita analisar as células por citometria de fluxo. A citometria será realizada no laboratório de vetores virais do LNBio – CNPEM, utilizando citômetro Novocyte 2000 Acea. Utilizaremos 10^5 cells em 500 μ l, adicionando-se 500ng de anticorpo por reação.

Confirmada a expressão de CD4, poderemos agora adicionar aptâmero CD4-marcado com fluoróforos. A reação será efetuada incubando-se as 10^5 células CD4+ com o aptâmeros-fluorescente em diferentes quantidades: 100nM, 250nM e 500nM.

3. Síntese de aptâmeros quiméricos contendo 3 candidatos diferentes de siRNA.

Em trabalhos prévios de nosso grupo, ainda não publicados e em fase de preparação de patente, geramos candidatos de siRNA com alta eficiência para silenciamento de alvos moleculares de Treg. Estes siRNAs foram testados em aptâmeros quiméricos dirigidos ao receptor 4-1BB murino, obtendo knockdown destes alvos. Como desenhamos os candidatos de siRNA para regiões bem conservadas entre camundongo e humano, também verificamos inibição destes

alvos em células tumorais humanas, como a MCF-7. Assim, planejamos, agora, gerar aptâmeros dirigidos ao CD4 humano, contendo os candidatos de siRNA já desenhados e cujas sequencias serão patenteadas. Aqui representaremos estes candidatos por siRNA1, siRNA2 e siRNA3. As sequencias de siRNA serão incorporadas na porção 3' dos aptâmeros CD4. Após síntese do aptâmero, conforme descrito no item 1 desta metodologia, faremos o anelamento com sequências de siRNA complementar para gerar um dúplex de siRNA. Utilizaremos o Bioanalyzer, agilent, disponível em nosso laboratório para verificar anelamento, comparando corridas do aptâmero-siRNA não anelado, fita de siRNA complementar e aptâmero-siRNA dúplex. O RNA será concentrado e purificado em colunas Amicon 30kd.

4. Ensaio in vitro para verificar inibição de alvos moleculares em células MCF7-CD4

Para verificar a atividade do aptâmero quimérico na inibição de alvos intracelulares, utilizaremos inicialmente uma linhagem celular MCF-7 que expressa alvos humanos intracelulares de forma constitutiva. Esta linhagem deriva de câncer de mama. Já temos primers de qPCR padronizados para verificar expressão dos alvos. A linhagem MCF-7 será transfectada com um vetor de expressão CD4 disponível em nosso laboratório. A expressão de CD4 será verificada com anticorpo e citometria, conforme descrito anteriormente no item 2. Após estabelecimento de células MCF7-CD4, poderemos semear 5×10^3 células por poço de placas 96w e adicionar aptâmeros quiméricos (a 100, 250 e 500nM). Após 48h, as células serão coletadas para avaliar a expressão de alvos moleculares por qPCR. Utilizaremos o Apt-parental, apt-siRNA1, 2 e 3, além de poço mock. Também poderemos utilizar aptâmeros siRNA-controle, com sequências disponíveis em nosso laboratório.

5. Ensaio in vitro para verificar inibição de alvos moleculares em células primárias humanas.

O Ensaio com células humanas depende do isolamento de linfócitos a partir de sangue humano. Nosso grupo já tem projetos aprovado na Comissão de ética (plataforma Brasil) para o manuseio destas células. Também contamos com estrutura laboratorial nível 2, treinamento e expertise nestas técnicas. Após

verificar o funcionamento dos aptâmeros na célula MCF7-CD4, escolheremos o melhor candidato para teste na células primárias. Isolaremos células CD4 positivas humanas a partir de sangue total coletado com dispositivo Vacuete, de voluntários sadios. As células CD4 serão isoladas com kit de separação imunomagnética da StemCell-USA e caracterizadas por citometria de fluxo. Estas células serão ativadas e cultivadas na presença de um cocktail de TGF beta, IL2 e ácido retinóico para conversão de fenótipo T regulatório. Estas células T regulatórias induzidas (iTREG) humanas serão então semeadas em placas de 96 poços, como descrito no item 5 e incubadas com o aptâmero-siRNA escolhido nas concentrações de 100, 250 e 500nM por 48h. Após 48h as células serão coletadas para análise de expressão dos alvos moleculares por qPCR.

6. Ensaios in vitro para verificar inibição de imunossupressão

O silenciamento de alvos moleculares em células T regulatórias deve inibir o potencial de imunossupressão. Assim, efetuaremos um ensaio de proliferação celular com células CD8 humanas primárias, marcadas com o fluoróforo CFSE. Ao incubar CD8-CFSE com iTREG, devemos observar redução na proliferação. A Adição do apt-siRNA deve inibir a atividade das iTREGs e resgatar a proliferação de CD8-Fitc. Este ensaio já se encontra padronizado por nosso grupo e todos os reagentes já estão disponíveis.

Perspectivas

Este projeto tem como fundamentação os resultados obtidos em experimentos in vivo com modelos animais, em que observamos que a utilização de aptâmeros quiméricos para inibição de alvos moleculares induziu redução na atividade de células T regulatórias e ocasionou a potencialização da imunomodulação mediada pela vacina antitumoral GVAX. Como as sequencias de siRNA foram desenhadas para regiões conservadas destes alvos e verificamos inibição de alvos moleculares humano em experimentos preliminares na linhagem MCF7, planejamos gerar candidatos de aptâmeros quiméricos para inibição destes alvos humano em células T CD4 humanas. Para isso, iremos utilizar um template de aptâmero dirigido ao CD4 humano, já descrito na literatura e modifica-lo para o carregamento de candidatos de siRNA já verificados em ensaios in vitro e

escolhidos por apresentarem alta atividade inibitória. Estes ensaios in vitro possibilitarão validar o conceito desta estratégia com células humanas. Este projeto de iniciação abre novas oportunidades para o desenvolvimento de projetos de pós-graduação, como a otimização de aptâmeros quiméricos por meio de estudos estruturais in silico, em colaboração com o grupos de biologia computacional e biologia estrutural do CNPEM. Também precisaremos realizar ensaios biofísicos para determinação de parâmetros como a constante de afinidade. A seleção de novos aptâmeros dirigidos ao CD4 ou mesmo a outros alvos também pode ser facilitada com recursos disponíveis em nossa estrutura do LNBio – CNPEM. Um próximo passo, também consistirá em utilizar modelos animais xenográficos que poderão ser desafiados com tumores humanos. O sucesso desta estratégia de inibição de Treg com aptâmeros quiméricos poderá contribuir para futuros empreendimentos terapêuticos voltados ao tratamento do câncer humano.

Bibliografia

- Bennett, C. L., J. Christie, F. Ramsdell, M. E. Brunkow, P. J. Ferguson, L. Whitesell, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-21.
- Berezhnoy, A., R. Brenneman, M. Bajgelman, D. Seales and E. Gilboa (2012). "Thermal Stability of siRNA Modulates Aptamer- conjugated siRNA Inhibition." *Mol Ther Nucleic Acids* **1**: e51.
- Betts, G., E. Jones, S. Junaid, T. El-Shanawany, M. Scurr, P. Mizen, et al. (2011). "Suppression of tumour-specific CD4+ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer." *Gut*.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepers, L. B. Clark, S. A. Yasayko, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.
- Cao, X. (2010). "Regulatory T cells and immune tolerance to tumors." *Immunol Res* **46**(1-3): 79-93.
- Chen, K. J., S. Z. Lin, L. Zhou, H. Y. Xie, W. H. Zhou, A. Taki-Eldin, et al. (2011). "Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis." *PLoS One* **6**(9): e24671.
- Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-949.
- Curtin, J. F., M. Candolfi, T. M. Fakhouri, C. Liu, A. Alden, M. Edwards, et al. (2008). "Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials." *PLoS One* **3**(4): e1983.
- Dassie, J. P., X. Y. Liu, G. S. Thomas, R. M. Whitaker, K. W. Thiel, K. R. Stockdale, et al. (2009). "Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors." *Nat Biotechnol* **27**(9): 839-849.

Davis, K. A., Y. Lin, B. Abrams and S. D. Jayasena (1998). "Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry." Nucleic Acids Res **26**(17): 3915-3924.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-336.

Ghiringhelli, F., C. Menard, P. E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, et al. (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." Cancer Immunol Immunother **56**(5): 641-648.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.

Knutson, K. L., Y. Dang, H. Lu, J. Lukas, B. Almand, E. Gad, et al. (2006). "IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice." J Immunol **177**(1): 84-91.

Kuwahara, M. and N. Sugimoto (2010). "Molecular evolution of functional nucleic acids with chemical modifications." Molecules **15**(8): 5423-5444.

Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, et al. (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med **204**(1): 57-63.

Li, X., E. Kostareli, J. Suffner, N. Garbi and G. J. Hammerling (2010). "Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors." Eur J Immunol **40**(12): 3325-3335.

Liotta, F., M. Gacci, F. Frosali, V. Querci, G. Vittori, A. Lapini, et al. (2011). "Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma." BJU Int **107**(9): 1500-1506.

Liyanage, U. K., T. T. Moore, H. G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-2761.

Manrique-Rincon, A. J., C. M. Beraldo, J. M. Toscaro and M. C. Bajgelman (2017). "Exploring Synergy in Combinations of Tumor-Derived Vaccines That Harbor 4-1BBL, OX40L, and GM-CSF." Front Immunol **8**: 1150.

Manrique-Rincon, A. J., A. C. de Carvalho, M. E. Ribeiro de Camargo, K. G. Franchini and M. C. Bajgelman (2018). "Development of a flow cytometry assay which allows to evaluate the efficiency of immunomodulatory vaccines to enhance T cell-mediated antitumor response." J Biotechnol **284**: 11-16.

Marabelle, A., H. Kohrt, I. Sagiv-Barfi, B. Ajami, R. C. Axtell, G. Zhou, et al. (2013). "Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors." J Clin Invest **123**(6): 2447-2463.

McNamara, J. O., 2nd, E. R. Andrechek, Y. Wang, K. D. Viles, R. E. Rempel, E. Gilboa, et al. (2006). "Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras." Nat Biotechnol **24**(8): 1005-1015.

Morita, Y., M. Leslie, H. Kameyama, D. E. Volk and T. Tanaka (2018). "Aptamer Therapeutics in Cancer: Current and Future." Cancers (Basel) **10**(3).

Morse, M. A., A. C. Hobeika, T. Osada, D. Serra, D. Niedzwiecki, H. K. Lyster, et al. (2008). "Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines." Blood **112**(3): 610-618.

Ni, X., M. Castanares, A. Mukherjee and S. E. Lupold (2011). "Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons." Curr Med Chem **18**(27): 4206-4214.

Onda, M., K. Kobayashi and I. Pastan (2019). "Depletion of regulatory T cells in tumors with an anti-CD25 immunotoxin induces CD8 T cell-mediated systemic antitumor immunity." Proc Natl Acad Sci U S A.

Santulli-Marotto, S., S. K. Nair, C. Rusconi, B. Sullenger and E. Gilboa (2003). "Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity." Cancer Res **63**(21): 7483-7489.

Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." Science **249**(4968): 505-510.

Waters, C. A., P. A. Schimke, C. E. Snider, K. Itoh, K. A. Smith, J. C. Nichols, et al. (1990). "Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Receptor binding requirements for entry of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein into cells." Eur J Immunol **20**(4): 785-791.

Wolf, A. M., D. Wolf, M. Steurer, G. Gastl, E. Gunsilius and B. Grubeck-Loebenstien (2003). "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients." Clin Cancer Res **9**(2): 606-612.

Wolf, D., A. M. Wolf, H. Rumpold, H. Fiegl, A. G. Zeimet, E. Muller-Holzner, et al. (2005). "The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer." Clin Cancer Res **11**(23): 8326-8331.