

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

HELOISA BRAND

**Caracterização funcional de linfócitos T-CAR anti-CD19 polarizados para o
fenótipo Th17 através da superexpressão de ROR γ t**

Ribeirão Preto
2022

HELOISA BRAND

Caracterização funcional de linfócitos T-CAR anti-CD19 polarizados para o fenótipo Th17 através da superexpressão de ROR γ t

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular.

Programa: Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular

Opção: Células-tronco e Terapia Celular

Orientador: Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Brand, Heloisa

Caracterização funcional de linfócitos T-CAR anti-CD19 polarizados para o fenótipo Th17 através da superexpressão de ROR γ t.

Ribeirão Preto, 2022.

p. 10.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Células-tronco e terapia celular.

Orientador: de Souza, Lucas Eduardo Botelho.

Versão original

1.Receptor de antígeno quimérico. 2. ROR γ t. 3. T *helper* 17. 4. IL-17. 5. CD19.

Nome: Heloisa Brand

Título: Caracterização funcional de linfócitos T-CAR anti-CD19 polarizados para o fenótipo Th17 através da superexpressão de RORyt

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Hélio e Ana, por todo suporte e apoio. Agradeço também por todo carinho, amor e dedicação.

Agradeço à minha irmã Heliana, minha maior parceira. Obrigada por estar sempre presente, por me ensinar tanto e por nossas histórias, que guardo com muito carinho.

Agradeço ao meu noivo, Henrique, por ser tão paciente e por me motivar. Obrigada por ser meu maior incentivador durante todo o mestrado e por me dar força nos momentos que mais preciso.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza pela dedicação e paciência. Por todo aprendizado, pela confiança, oportunidades e por me ajudar a crescer profissionalmente e pessoalmente.

À todos os meus professores, que foram fundamentais para minha formação e por todos os ensinamentos que carrego. Ao meu orientador da iniciação científica João Tadeu Ribeiro Paes e aos colegas do laboratório, Marna, Marcela, Vinícius, Natália, Caetano e Rafael que me ensinaram pacientemente as técnicas básicas da cultura celular e me motivaram a realizar o mestrado.

Às minhas queridas colegas do laboratório de Transferência Gênica, Daianne Fantacini, Laís de Castro, Sarah Lima, Rafaela Rossetti e Roberta Maraninchi, pela convivência agradável e por estarem sempre dispostas a enriquecer e contribuir com meu trabalho. E, em especial, a Izadora Furtado pela amizade e companheirismo.

Obrigada à minha amiga Maria Gabriela, pela parceria, pelas palavras de apoio e por me ajudar com o que eu precisasse.

À Renata Nacasaki Silvestre, que, com toda paciência e bondade, me incentivou e me inspirou ao longo do mestrado.

À Júlia Teixeira por trazer leveza para o trabalho e pelo apoio e motivação.

Agradeço ao laboratório de citometria de fluxo, à Patrícia Bonini, e, em especial à Camila Menezes que realizou as análises de citometria e sempre esteve disposta a ajudar.

Agradeço ao Laboratório de Experimentação Animal, à Cleide Silva, à Beatriz e à Laís que me auxiliaram durante os ensaios in vivo, por serem sempre prestativas e garantirem as melhores condições para a realização dos experimentos.

À Julianne Vargas, que fez as análises no IVIS e sempre foi muito solícita e atenciosa.

À Carmen, Dalva, Renata e Gisele, agradeço por toda atenção ao me auxiliar com as questões burocráticas durante o mestrado.

À Sílvia e a Rosana, secretárias da pós-graduação, pela disponibilidade e auxílio durante o mestrado.

Aos professores Virgínia Picanço e Castro, Simone Haddad, Kelen de Farias e Thiago Cunha, pelas críticas e sugestões que fizeram ao trabalho que certamente contribuíram para o melhor desenvolvimento do projeto.

Agradeço à Instituição Hemocentro de Ribeirão Preto por permitir a realização deste projeto através da utilização da infraestrutura e do auxílio de seus funcionários. E aos funcionários do Hemocentro por fornecerem as melhores condições para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Gustavo Mostoslavsky, da Universidade de Boston, que forneceu o vetor que foi utilizado neste projeto e ao professor Adalberto Rosa, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto por fornecer os plasmídeos empacotadores utilizados para produção viral.

Agradeço à Fundação de Amparo à pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro cedido através da bolsa de estudos pelo processo nº 2019/18702-8.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

Brand, H. **Caracterização funcional de linfócitos T-CAR anti-CD19 polarizados para o fenótipo Th17 através da superexpressão de ROR γ t** [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2022.

A transferência adotiva de linfócitos T modificados para expressar receptores de antígeno quiméricos (CAR) anti-CD19 tem resultado em taxas de remissão completa superiores a 80% em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B. Entretanto, a resposta clínica é inferior (~30%) mesmo em outras neoplasias de células B, como a leucemia linfocítica crônica. Em tumores sólidos, o desafio é ainda maior, pois as células T-CAR apresentam-se ineficientes devido à baixa persistência, dificuldade de infiltração e exaustão funcional. Como alternativa para elevar a eficácia das células T-CAR, evidências pré-clínicas indicam que linfócitos polarizados para o fenótipo T *helper* 17 (Th17) são mais eficientes na erradicação de tumores do que células Th1. A polarização para Th17 *in vitro* envolve o cultivo das células com coquetel de citocinas e anticorpos neutralizantes, que é um processo dispendioso para a manufatura de células T-CAR. Em resposta às citocinas, o fator de transcrição receptor órfão relacionado ao ácido retinoico gama 2 (ROR γ t) orchestra a polarização para Th17. Assim, hipotetizamos que a coexpressão do CAR e de ROR γ t em células T humanas geraria células T-CAR com fenótipo Th17. Para testar nossa hipótese, produzimos vetores lentivirais contendo os genes codificantes do CAR anti-CD19 e/ou ROR γ t (para produção das rTh17-CAR). Para fins de comparação, também estabelecemos o método de polarização em Th17 por cultivo com citocinas e anticorpos (cTh17). Após a transdução, avaliamos a citotoxicidade das células T-CAR *in vitro* e *in vivo* contra células Raji modificadas para expressar luciferase. A citotoxicidade *in vitro* foi monitorada durante cocultivo com células Raji pela quantificação da bioluminescência e a liberação de IL-17 e IFN- γ foi mensurada por ELISA. Durante o estabelecimento da polarização em Th17 por citocinas, observamos que o uso do agonista de ROR γ t aumentou em ~45% a transcrição de *IL-17A*, sem alterar a transcrição de *RORC2*. Portanto, adicionamos o agonista de ROR γ t ao protocolo de produção das cTh17. Após transdução para expressar CAR e/ou ROR γ t, células cTh17-CAR, rTh17-CAR e CD4-CAR misturadas com células CD8-CAR na proporção 1:1 apresentaram citotoxicidade *in vitro*

semelhante contra células de linfoma CD19⁺. Observamos também que as células CD4-CAR e cTh17-CAR exibem citotoxicidade na ausência de células CD8. Ainda, a coexpressão de CAR e ROR γ t gerou células T-CAR com perfil Th17, definido pela secreção de IL-17 (~1000 pg/mL/24h). A secreção de IL-17 por células cTh17 foi de ~2000 pg/mL/24h e células não polarizadas apresentaram secreção insignificante. Em um modelo *in vivo* de linfoma disseminado, as populações rTh17-CAR/CD8-CAR e cTh17-CAR/CD8-CAR apresentaram uma capacidade antitumoral inferior às CD4-CAR/CD8-CAR convencionais, indicando que a atividade superior das Th17 antitumorais pode depender do tipo de neoplasia. Compreender essas particularidades é essencial para aproveitar ao máximo o potencial terapêutico das células Th17. Concluímos que a superexpressão de ROR γ t gera células com perfil Th17, cuja eficácia tem sido demonstrada em modelos pré-clínicos de neoplasias sólidas. Nossos dados estabelecem uma estratégia simplificada para manufatura de células T-CAR com fenótipo Th17, que pode ser aplicada para avaliação da eficácia terapêutica desta população em outras neoplasias.

Palavras-chave: Receptor de antígeno quimérico. ROR γ t. T *helper* 17. IL-17. CD19.

ABSTRACT

Brand, H. **Functional characterization of anti-CD19 CAR-T lymphocytes polarized for the Th17 phenotype through ROR γ t overexpression** [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Medical School of Ribeirão Preto; 2022.

Adoptive transfer of T cells engineered to express anti-CD19 chimeric antigen receptors (CAR) has resulted in complete remission rates above 80% in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia. However, the clinical response is poor (~30 %) even in other B-cell neoplasms, such as chronic lymphocytic leukemia. Solid tumors have been even more challenging, as CAR-T cells face obstacles such as low persistence, low infiltration and functional exhaustion. As an alternative to increase the effectiveness of CAR-T cells, preclinical evidence indicates that lymphocytes polarized to the T helper 17 phenotype (Th17) are more efficient in eradicating tumors than Th1 cells. Polarization to Th17 *in vitro* involves culturing the cells with a cocktail of cytokines and neutralizing antibodies, which increases the complexity and the cost of manufacturing. In response to cytokines, the transcription factor retinoic acid gamma 2-related orphan receptor (ROR γ t) orchestrates the polarization to Th17. Thus, we hypothesized that the co-expression of a CAR and ROR γ t in human T cells would generate CAR-T cells with a Th17 phenotype. To test our hypothesis, we produced lentiviral vectors containing the genes encoding the anti-CD19 CAR and/or ROR γ t (for the production of rTh17-CAR). For comparison purposes, we also established a Th17 polarization method through culture with cytokines and antibodies (cTh17). After transduction, we evaluated the cytotoxicity of CAR-T cells *in vitro* and *in vivo* against Raji cells modified to express luciferase. *In vitro* cytotoxicity was monitored during co-culture with Raji cells by bioluminescence quantification, and IL-17 and IFN- γ release was measured by ELISA. During the establishment of Th17 polarization with cytokines, we observed that the use of the ROR γ t agonist increased the transcription of *IL-17A* by ~45%, without changing the transcription of *RORC2*. Therefore, we included the ROR γ t agonist to the cTh17 production protocol. After transduction to express CAR and/or ROR γ t, cTh17-CAR, rTh17-CAR and CD4-CAR cells mixed with CD8-CAR cells in a 1:1 ratio showed similar *in vitro* cytotoxicity against CD19⁺ lymphoma cells. We also observed that CD4-CAR and cTh17-CAR cells exhibited cytotoxicity in the absence of CD8⁺ cells. Furthermore, the co-expression of CAR and ROR γ t generated CAR-T cells with a Th17 profile, defined by

IL-17 secretion (~1000 pg/mL/24h). IL-17 secretion by cTh17 cells was ~2000 pg/mL/24h and non-polarized cells showed negligible secretion. In an *in vivo* model of disseminated lymphoma, rTh17-CAR/CD8-CAR and cTh17-CAR/CD8-CAR populations had a lower antitumor capacity than conventional CD4-CAR/CD8-CAR, indicating that the superior antitumor Th17 activity reported by previous studies may depend on the tumor type. Understanding these particularities is essential to benefit from the therapeutic potential of Th17 cells. We conclude that ROR γ t overexpression generates cells with a Th17 profile, whose efficacy has been demonstrated in preclinical models of solid neoplasms. Our data establish a simplified strategy for the manufacture of CAR-T cells with Th17 phenotype that can be used to evaluate the therapeutic efficacy of this population in other neoplasms.

Keywords: Chimeric antigen receptor. ROR γ t. T helper 17. IL-17. CD19.