

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA**

**Novo receptor quimérico de antígeno (CAR) anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 tem ação  
citotóxica contra células de Mieloma Múltiplo expressando MAGE-A4**

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

**ROBERTA MARANINCHI SILVEIRA**

**Novo receptor quimérico de antígeno (CAR) anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 tem ação citotóxica contra células de Mieloma Múltiplo expressando MAGE-A4**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular

Orientador: Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza

RIBEIRÃO PRETO

2023

Silveira, Roberta Maraninchi

Novo receptor quimérico de antígeno (CAR) anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 tem ação citotóxica contra células de Mieloma Múltiplo expressando MAGE-A4.

89 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular. Opção: Terapia celular

Orientador: Souza, Lucas Eduardo Botelho de

1. Células CAR-T. 2. Imunoterapia. 3. Mieloma Múltiplo. 4. MAGE-A4. 5. Terapia Celular

**Nome:** SILVEIRA, Roberta Maraninchi

**Título:** Novo receptor quimérico de antígeno (CAR) anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 tem ação citotóxica contra células de Mieloma Múltiplo expressando MAGE-A4.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

**Aprovada em:** \_\_\_\_\_

**Banca examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha família, Stela, Ricardo, Luciana e Renata, por todo amor, infinito apoio, pelos desabafos mesmo que muitas vezes de longe. Obrigada por sempre torcerem por mim, eu sou extremamente grata por ter vocês como família. AMO MUITO VOCÊS!

Agradeço imensamente o meu orientador, Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza por aceitar me orientar nesses quase 4 anos, por me acolher no laboratório em um momento muito importante para mim. Além disso, agradeço muito por todos os ensinamentos, aprendizados, paciência e ótima parceria, foi maravilhoso trabalhar com você, muito obrigada!!!

Agradeço também ao Dr. Svetoslav Nanev Slavov por me orientar por um ano de estágio e no início do meu doutorado. Muito obrigada pelos ensinamentos e pelas experiências que tive no laboratório de Biologia Molecular.

Agradeço à Dra. Simone Kashima que me concedeu a grande oportunidade de fazer estágio no laboratório de Biologia Molecular. Muito obrigada.

Agradeço a todo laboratório de Transferência Gênica, onde fiz meu doutorado, Izadora, Caio, Daianne, Millena, Jéssica, Matias, Sarah, Karol, Rafaela e Andreza, por todo apoio, trocas de experiências, ajudas em experimentos, cafés e convivência leve e acolhedor no ambiente de trabalho. Foi muito agradável trabalhar com vocês, muito obrigada.

À Juliane Carvalho por me ajudar nos experimentos *in vivo* e no IVIS.

À Cleide Silva, pelos ensinamentos sobre experimentação animal que foram importantíssimos para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório para Estudos Experimentais em Animais, Bia, Lais e Henrico, por serem sempre muito prestativos durante todos os ensaios envolvendo experimentação animal.

À Patrícia Vianna e Camila Menezes, pela paciência, ensinamentos e pelo suporte essencial e ótima convivência durante as análises de citometria de fluxo.

À Carmen por resolver inúmeros problemas burocráticos e sempre muito prestativa e agradável.

À Nayara pelas ajudas prestadas na histologia, ao Mário pelos serviços de teste de micoplasma.

Agradeço aos meus amigos e colegas, Débora, Jonathan e Péricles, obrigada por sempre estarem presentes nesses anos de doutorado, isso foi muito importante. Obrigada por todos os nossos “hot doguinhos” e momentos de descontrações.

Agradeço a todos os amigos do departamento que me acompanharam nessa jornada. Dayane, Mariane Tirapelli, Saira, Anyelli, João, pela amizade e parceria e por fazer desse tempo muito mais leve e divertido, obrigada pelas ajudas, conselhos e convivência.

Um agradecimento especial à minha amiga Mariana Fronza, pela nossa ótima convivência morando juntas, obrigada pelos ótimos conselhos, por tornar o ambiente mais leve e por ser minha amiga. Também agradeço em especial à Izadora Peter Furtado que além de ser minha colega de trabalho, também se tornou uma ótima amiga nesses anos em que fiz o meu doutorado no Lab TG, obrigada por todos os desabafos, ajudas, ensinamentos e pela nossa amizade.

## RESUMO

SILVEIRA, R. M. **Novo receptor quimérico de antígeno (CAR) anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 tem ação citotóxica contra células de Mieloma Múltiplo expressando MAGE-A4.** 2023. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A transferência adotiva de células T expressando receptores de antígeno quiméricos (CAR) tem resultado em excelentes taxas de remissão contra algumas neoplasias hematológicas. No entanto, os CAR convencionais reconhecem apenas proteínas em sua forma nativa na superfície celular, e isso limita a quantidade de alvos moleculares disponíveis. O uso de linfócitos com receptores de células T (TCR) específicos para antígenos intracelulares também é limitado pela baixa afinidade dos TCR naturais, e o aumento artificial da afinidade dos TCR pode resultar no reconhecimento cruzado de antígenos próprios. Por isso, foi desenvolvido recentemente uma estrutura CAR cujo domínio de reconhecimento é proveniente de anticorpos monoclonais que são capazes de reconhecer o complexo peptídeo/HLA. Assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um novo processo de imunoterapia celular baseado na transferência adotiva de células T expressando um CAR contra o complexo formado pelo antígeno associado à melanoma-A4 (MAGE-A4) e HLA-A\*02, que é o sorotipo mais frequente no Brasil. MAGE-A4 é um antígeno câncer/testículo fortemente imunogênico expresso em uma ampla gama de neoplasias, chegando a 50% dos casos em alguns tipos de tumores, inclusive em Mieloma Múltiplo (MM). Em tecidos saudáveis, MAGE-A4 é restrito aos testículos e à placenta, dois sítios imunoprivilegiados. A sequência codificante do CAR anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 usada neste estudo foi desenvolvida como fruto de uma colaboração internacional recente com a Universidade de Mie (Japão). Nosso trabalho teve o foco no MM, um tipo de câncer hematológico que acomete plasmócito tornando-os defeituosos, para isso foram utilizadas células da linhagem de MM humano U266 que é positiva para o nosso alvo MAGE-A4, e como controle negativo, utilizamos a linhagem de câncer colorretal HCT116 negativas para o MAGE-A4. Em nossos resultados *in vitro* foi possível notar que as células CAR-T anti-MAGE-A4 demonstraram atividade citotóxica contra as células alvo de MM em comparação com os controles. Além disso, conseguimos demonstrar através de ensaio de ELISA que as células CAR-T tiveram maior liberação de IFN- $\gamma$  quando em cocultivo com células alvo, em comparação com as células controle que não expressam MAGE-A4, demonstrando especificidade das nossas células CAR-T. Nos nossos experimentos *in vivo* foi possível observar efeito citotóxico nos animais com MM tratados com células CAR-T quando comparado aos animais controle que não foram tratados, porém ainda são necessários mais estudos *in vivo* para corroborar este dado. Com todos os resultados desse trabalho, nós podemos concluir que este estudo pode contribuir a nucleação de recursos humanos na área de imunoterapia celular avançada e poderá expandir a aplicação desta modalidade terapêutica no Brasil para outras neoplasias que expressem MAGE-A4<sup>+</sup>.

**Palavras-chave:** Imunoterapia, células T-CAR, MAGE-A4, Mieloma Múltiplo, linfócitos T, HLA-A\*02, antígeno, terapia celular.



## ABSTRACT

SILVEIRA, R. M. **New anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 chimeric antigen receptor (CAR) receptor has cytotoxic action against multiple myeloma cells expressing MAGE-A4.** 2023. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Adoptive transfer of T cells expressing chimeric antigen receptors (CARs) has resulted in excellent remission rates against certain hematologic malignancies. However, conventional CARs only recognize proteins in their native form on the cell surface, limiting the number of available molecular targets. The use of lymphocytes with T-cell receptors (TCRs) specific for intracellular antigens is also limited by the low affinity of natural TCRs, and artificially increasing TCR affinity can lead to cross-reactivity with self-antigens. Therefore, a CAR structure has recently been developed with a recognition domain derived from monoclonal antibodies capable of recognizing the peptide/HLA complex. The aim of this work was to establish a new cellular immunotherapy process based on the adoptive transfer of T cells expressing a CAR against the complex formed by melanoma-associated antigen-A4 (MAGE-A4) and HLA-A\*02, the most common serotype in Brazil. MAGE-A4 is a strongly immunogenic cancer/testis antigen expressed in a wide range of neoplasms, reaching 50% of cases in some tumor types, including Multiple Myeloma (MM). In healthy tissues, MAGE-A4 is restricted to the testes and placenta, two immunoprivileged sites. The coding sequence of the anti-MAGE-A4:HLA-A\*02 CAR used in this study was developed as a result of a recent international collaboration with the University of Mie (Japan). Our work focused on MM, a hematologic cancer that affects plasma cells, using the human MM cell line U266, which is positive for our target MAGE-A4. As a negative control, we used the colorectal cancer cell line HCT116, which is negative for MAGE-A4. In our *in vitro* results, we observed that anti-MAGE-A4 CAR-T cells demonstrated cytotoxic activity against the MM target cells compared to the control cells. Additionally, we were able to demonstrate through an ELISA assay that CAR-T cells exhibited higher IFN- $\gamma$  release when co-cultured with target cells compared to control cells that did not express MAGE-A4, demonstrating the specificity of our CAR-T cells. In our *in vivo* experiments, we observed a cytotoxic effect in MM-treated animals with CAR-T cells compared to untreated control animals. However, further *in vivo* studies are needed to confirm this data. With all the results from this work, we can conclude that this study may contribute to the development of human resources in the field of advanced cellular immunotherapy and may expand the application of this therapeutic modality in Brazil for other neoplasms that express MAGE-A4+.

Keywords: Immunotherapy, CAR-T cells, MAGE-A4, Multiple Myeloma, lymphocytes T, HLA-A\*02, antigen, cancer.