

**Subprojeto 18:** Identification of anti-CD20 antibodies for the production of human monoclonal antibodies.

**Investigator:** *Dimas Covas*

## **Abstract**

Cancer patients may produce antibodies against antigens on the surface of malignant cells due to their basically two mechanisms: 1) expression of modified antigens or 2) immune response against self antigens. Patients with B cell malignancy often produce autoantibodies and hence can be a source of immunoglobulin genes to produce antibodies directed against tumor-associated antigens libraries.

The antibodies against the B cell antigen, CD20 is a potential therapeutic agents for malignant diseases of B (1 and 2) cells. Currently, chimeric and humanized monoclonal antibodies are used in the treatment of lymphomas and B-cell leukemias. Monoclonal antibodies (mAbs) are effective therapeutic agents. However, the use of mAbs in clinical settings have been complicated by some technical difficulties, including the display of immunogenic responses. Immunogenic responses to therapeutic antibodies may affect both the safety and pharmacokinetics that may impact the usefulness and effectiveness of medicines. Chimeric antibodies are the first engineering improvement, where the murine constant regions were substituted by human constant regions. However, these antibodies also have adverse reactions. The next development was the process of humanization in which the amino acid sequence is totally human in an attempt to eliminate immunological reactions. In addition to the humanized antibodies, human antibodies have a lower risk to induce immune responses in humans.

B-cell malignancies, especially chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells often involves family B1, with a tendency to self-reactive antibodies, including antibodies against surface antigens of leucocytes. This project is to determine if patients with B-cell tumors may provide a good source of material for the isolation of human antibodies directed against the CD20 antigen of B cells screening serum and plasma of patients with non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, CLL and patients with Sjogren's syndrome will be performed to detect anti-CD20 antibodies. If anti-CD20, a partnership with Prof. Dr. Michael C. Nussenzweig of Rockefeller University, New York high affinity antibodies are detected, USA is scheduled for the sequencing of clones of B cells that produce antibodies to CD20 and subsequent cloning and production in vitro human antibodies.



## Researchers

Júlio Cesar Lorenzi

Michael Nussenzweig

Virgínia Picanço Castro

Maristela Delgado Orellana

Simone Kashima Haddad

## References

O.W. Press, J.F. Eary, F.R. Appelbaum, P.J. Martin, W.B. Nelp, S. Glenn, *et al.* **Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas** *Lancet*, 346 (1995), pp. 336–340

M.E. Reff, K. Carner, K.S. Chambers, P.C. Chinn, *et al.* **Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20**. *Blood*, 83 (1994), pp. 435–445

**Subprojeto 18:** Identificação de anticorpos anti-CD20 para produção de anticorpos monoclonais humanos.

**Pesquisador Responsável:** *Dimas Covas*

## **Introdução**

Pacientes com câncer podem produzir anticorpos contra antígenos na superfície de suas células malignas devido a basicamente dois mecanismos: 1) expressão de antígenos modificados ou 2) resposta imune contra antígenos próprios. Os doentes com malignidade de células B produzem frequentemente auto-anticorpos e, portanto, pode ser uma fonte de genes de imunoglobulina para a produção de bibliotecas de anticorpos dirigidos contra antígenos associados a tumores.

Os anticorpos contra o antígeno de células B, o CD20 são agentes terapêuticos potenciais para doenças malignas de células B (1 e 2). Atualmente, anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados são utilizados no tratamento de linfomas e leucemias de células-B. Os anticorpos monoclonais (mAbs) representam agentes terapêuticos eficazes. No entanto, a utilização de mAb em cenários clínicos tem sido complicada por algumas dificuldades técnicas, incluindo a demonstração de respostas imunogênicas. Respostas imunogênicas aos anticorpos terapêuticos pode afetar ambas as propriedades de segurança e farmacocinética que podem impactar a utilidade e eficácia dos medicamentos. Os anticorpos quiméricos representam o primeiro melhoramento da engenharia, onde as regiões constantes murinas foram substituídas por regiões constantes humanas. No entanto, estes anticorpos ainda apresentam reações adversas. O próximo desenvolvimento foi o processo de humanização, na qual a sequência de aminoácidos é totalmente humana, na tentativa de eliminar reações imunológicas. Além dos anticorpos humanizados, os anticorpos humanos apresentam menor risco para induzir respostas imunes em humanos.

Doenças malignas de células B, particularmente leucemia linfocítica crônica (LLC), frequentemente envolve células da família B1, com uma tendência a fazer anticorpos auto-reativos, incluindo anticorpos contra antígenos de superfície de leucócitos. Este projeto visa determinar se os pacientes com tumores de células B podem proporcionar uma boa fonte de material para o isolamento de anticorpos humanos dirigidos contra o antígeno CD20 de células B. A triagem de soro e plasma de pacientes com linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, CLL e de pacientes com Síndrome de Sjogren será realizada para detectar anticorpos anti-CD20. Caso sejam detectados anticorpos anti-CD20 de alta afinidade, uma pareceria com Prof Dr. Michael C. Nussenzweig da Universidade de Rockefeller, Nova Iorque, EUA está prevista para o sequenciamento dos clones de células B que produzem anticorpos anti CD20 e posterior clonagem e produção dos anticorpos humanos *in vitro*.

## Objetivo:

Detectar anticorpos anti CD20 em pacientes com doenças autoimunes, isolar clones produtores, sequenciar e produzir de forma recombinante os anticorpos anti-CD20 humanos.

## Metas:

- 1) Separar grupos de pacientes que propensos a produzir autoanticorpos;
- 2) Detectar anticorpos anti-CD20 em pacientes;
- 3) Avaliar a afinidade dos anticorpos detectados;
- 4) Dos pacientes que produzirem anti-CD20 de alta afinidade, clones de células B serão isoladas e expandidas *in vitro*;
- 5) Os clones de células B serão sequenciados;
- 6) Os genes das imunoglobulinas (anti CD20) serão sequenciados;
- 7) Clonagem das regiões variáveis e constantes das imunoglobulinas em plasmídeos de expressão.
- 8) Produção de imunoglobulinas em células 293T.

## Cronograma de execução referente a 6 anos de projeto

Metas	Semestres											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	■											
2		■	■	■	■							
3					■	■	■					
4								■	■			
5									■	■		
6									■	■		
7										■	■	
8											■	■

## Pesquisadoras

Júlio Cesar Lorenzi

Michael Nussenzweig

Virgínia Picanço Castro

Maristela Delgado Orellana

Simone Kashima Haddad

## Referências:

O.W. Press, J.F. Eary, F.R. Appelbaum, P.J. Martin, W.B. Nelp, S. Glenn, *et al.* **Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas** *Lancet*, 346 (1995), pp. 336–340

M.E. Reff, K. Carner, K.S. Chambers, P.C. Chinn, *et al.* **Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20.** *Blood*, 83 (1994), pp. 435–445