

Subproject 15: Generation of CAR (chimeric antigenic receptor) anti-CD20

Investigator: *Dimas Tadeu Covas*

Abstract

Lymphocytes have the ability to recognize certain specific substances of tumor cells. This process allows these lymphocytes recognize and eliminate tumor cells. However, this process does not happen spontaneously with great efficiency, which limits the natural immune response against tumors. The CD20 antigen is a B cell specific surface molecule which expression includes the pre-B cell to the mature B cell stage. Approximately 95% of B cell lymphoma and non-Hodgking on B cells in cases of recurrence of lymphoma express CD20, despite repeated exposure to anti-CD20 monoclonal antibody. All these features make CD20 is an excellent tumor-associated target for T cell-based therapy Cell therapy using genetically modified T cells to express the chimeric antigen receptor (CAR) against a tumor associated antigen is an emerging immunotherapeutic approach for variety of malignancies including leukemias and lymphomas. This technology genetically modified lymphocytes by adding a surface molecule (CAR) allowing the lymphocytes to recognize molecules on the surface of cells independent of MHC tumor, making the most effective anti-tumor response. The CARs are composed of an extracellular recognition unit, a transmembrane region and an intracellular signaling domain. The CARs recognize the target antigen on tumor-surface with high affinity, activating lymphocytes through endodomains signaling, as the ζ chain and co-stimulatory domains. The CAR may be introduced into lymphocytes by lentiviral vectors to promote continuous expression of the construct.

Goals

This project aims to build anti CD20 CAR that can be used in therapies against malignancies of B cell

Specific Goals

- 1. To assess the efficiency of transduction with lentiviral vectors derived T lymphocytes and T lymphocytes pluripotent cells.*
- 2 . To Draw primers for amplification.*
- 3. The overlap Amplification (overlap extension PCR multistep) for mounting the CAR.*

4. *The Generation of T lymphocytes expressing anti-CD20 CARs*
5. *The Evaluation of activation of T cells transduced with CARs*
6. *The specificity assays of the generated CAR.*

Implementation schedule

Specific Goals	Semesters												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1													
2													
3													
4													
5													
6													

Researches:

Maristela Delgado Orellana

Simone Kashima

Virgínia Picanço

References:

Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*(2013)

Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* (2004) 5:410–710.

Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* (2002) 17:749–5610.

Subprojeto 15: Geração de CAR (chimeric antigenic receptor) anti-CD20

Pesquisador Responsável: *Dimas Covas*

Introdução

Os linfócitos possuem a capacidade de reconhecer certas substâncias específicas das células do tumor. Este processo permite a estes linfócitos reconhecer e eliminar células tumorais. No entanto, este processo não acontece espontaneamente com grande eficiência, o que limita a resposta imunológica natural contra tumores. O antígeno CD20 de células B é uma molécula de superfície específica cuja expressão abrange as células pré-B até os estágios de células B maduras. Cerca de 95% de células B de linfoma não-Hodgking e nas células B nos casos de reincidência de linfoma, expressam CD20, apesar da exposição repetitiva ao anticorpo monoclonal anti-CD20. Todas essas características fazem CD20 um excelente alvo associado ao tumor para a terapia baseada em células T. A terapia celular utilizando células T geneticamente modificadas para expressar um receptor de antígeno quimérico (CAR) contra um antígeno associado a tumor é uma abordagem imunoterapêutica emergente para uma variedade de doenças malignas, incluindo linfomas e leucemias. Esta tecnologia que modifica geneticamente os linfócitos, adicionando uma molécula de superfície (CAR) que permite que os linfócitos reconheçam moléculas presentes na superfície das células do tumor independente de MHC, tornando a resposta anti-tumoral mais efetiva. Os CARs são compostos de uma unidade extracelular de reconhecimento, uma região transmembrana e um domínio intracelular de sinalização. Os CARs reconhecem o antígeno-alvo na superfície tumoral com alta afinidade, ativando os linfócitos através de endodomínios de sinalização, como a cadeia ζ e de domínios coestimulatórios. Os CAR podem ser introduzidos nos linfócitos por vetores lentivirais para promover a expressão permanente da construção.

Objetivo Geral

Este projeto visa a construção de CAR anti CD20 que poderá ser utilizados em terapias contra doenças malignas de células B.

Metas

1- *Avaliar a eficiência de transdução com vetores lentivirais de linfócitos T e linfócitos T derivados de células pluripotentes.*

- 2- *Desenho de primers para amplificação.*
- 3- *Amplificação por sobreposição (PCR multistep overlap extension) para montagem do CAR.*
- 4- *Geração de linfócitos T expressando CARs anti-CD20*
- 5- *Avaliação da ativação de células T transduzidas com os CARs*
- 6- *Ensaio de especificidade do CAR*

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												

Pesquisadores:

Maristela Orellano Delgado

Simone Kashima Haddad

Virgínia Picanço Castro

Referências

Jensen MC, Cooper LJ, Wu AM, Forman SJ, Raubitschek A (2003) Engineered CD20-specific primary human cytotoxic T lymphocytes for targeting B-cell malignancy. *Cytotherapy* 5(2): 131–138.

W Mansoor, D E Gilham, F C Thistlethwaite and R E Hawkins (2005). Engineering T cells for cancer therapy. *British Journal of Cancer* 93, 1085–1091.