

1 não recebeu a bolsa positiva. Todos os 4 pacientes receberam antibiótico profilático pós infusão, conforme o teste de sensibilidade aos antimicrobianos e não apresentaram intercorrências infecciosas associadas aos microrganismos presentes nas bolsas, durante ou após os procedimentos. **Discussão:** A prevalência de contaminação bacteriana em nosso serviço foi baixa, de 3,1% e está dentro dos valores descritos na literatura, entre 0,23% e 5,7%. Os microorganismos identificados foram as bactérias gram positivas anaeróbicas *Cutibacterium acnes* e aeróbica *Staphylococcus warneri*, ambas largamente encontradas na microbiota normal da pele, indo novamente de acordo com o que está descrito na literatura. A decisão de administrar profilaticamente os antimicrobianos difere dentre os serviços, sendo inclusive considerada desnecessária por alguns autores, baseados em estudos que demonstram a baixa incidência de bacteremia ou septicemia pós infusão de produtos contaminados. **Conclusão:** Os achados desse trabalho confirmam o descrito na literatura, que a contaminação microbiana dos produtos de CPHSP é baixa, causada principalmente por microbiota normal da pele e, na maioria dos casos, não compromete o sucesso do transplante.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.453>

PROCÉLULA – CENTRO DE PROCESSAMENTO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS: EXPERIÊNCIA DE NOVE ANOS E SETE MESES NA CLÍNICA DE HEMOTERAPIA LTDA, NITERÓI RJ, BRASIL

GCMTD Prado, CHC Ribeiro, JJ Saldanha, GAC Veranio-Silva, CMB Finkel, MM Lisboa, JPR Azevedo

Procélula - Terapia Celular, Niterói, RJ, Brasil

Desde a sua implantação, o Procélula colabora para o crescente número de transplantes autólogos realizados no setor privado do Estado do RJ. Demonstraremos, a seguir, nossa experiência. Para a coleta das CPH, os pacientes foram mobilizados com diferentes protocolos. As aféreses foram iniciadas no primeiro dia em que estes pacientes apresentaram mais de 10 células CD34+/mm³ no sangue periférico. Foram colhidas, em média, 4 volemiás por aférese para células mononucleares em Cobe Spectra ou Óptia. A quantificação de leucócitos foi realizada em contador automático ABX Micros ES60. Os produtos foram criopreservados usando solução composta de hidroxietilamido em concentração a 5,83%, albumina humana a 4% e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% do volume final, divididos em frações de 60 a 115 mL, com concentração celular alvo de 2-3x10⁸ leucócitos totais/mL. Estas frações foram acondicionadas em freezer - 80°C e mantidas à temperatura constante até a data do transplante. A viabilidade celular foi definida por microscopia óptica e exclusão por azul de trypan. Para quantificação de CPH utilizamos citometria de fluxo para células CD34+/CD45low, segundo metodologia definida pela ISHAGE, em citômetro FACScalibur (B&D). Realizamos ensaio clonogênico com sistema MACSMedia (MiltenyiBiotech) de cultura em



metilcelulose com fatores recombinantes para crescimento de unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos (UFC-GM) que foram observadas em microscopia óptica invertida 14 a 16 dias após a incubação a 37°C. De dezembro de 2011 a junho de 2021, foram atendidos 967 pacientes (542 mielomas, 389 linfomas e 36 outras doenças) com mediana de idade de 55 anos (17 pediátricos entre 0,6 a 14 anos; 950 adultos entre 15 a 74 anos), que realizaram 1055 mobilizações com G-CSF (53 associadas à quimioterapia, 314 ao Plerixafor e 13 à quimioterapia e Plerixafor; 994 com coleta e 61 falhas de mobilização sem coleta) e um total de 1.486 aféreses. A média de CPH circulantes antes da primeira aférese foi de 23 CD34+/mm³ (0-410), com média de 4,01 x 10⁶ CD34+/Kg (0,11-50,5) colhidas por aférese. Os produtos congelados apresentaram concentração celular média de 2,60 x 10⁸/mL (0,35-6,61) com recuperação de 116,41% no descongelamento (36,4-283,3). Apresentaram viabilidade celular >99% antes da criopreservação, e recuperaram em média 92,9% (68-99,8) da viabilidade e 80,4% (5,5-830,5) das UFC-GM no descongelamento. Foram realizados 2.972 ensaios funcionais, e a relação entre elas (CD34/UFC-GM) foi de 2,5 (0,7-88,9) na amostra fresca e 3,3 (0,7-91,1) na amostra descongelada. Foram realizados transplantes em 915 destes pacientes, com médias de 3,63 x 10⁶ CD34+/kg (1,20-19,79) e 1,68 x 10⁶ UFC-GM/kg (0,04-10,60) infundidas em cada paciente. O tempo para pega de granulócitos teve média de 10 (8-17) dias. Estes dados demonstram, com ampla amostragem, que a criopreservação mecânica em freezer - 80°C com baixa concentração de DMSO resulta em excelentes desfechos clínicos para o transplante autólogo de CPH. **Palavras-chave:** Células progenitoras hematopoéticas (CPH); Criopreservação e Transplante Autólogo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.454>

PROMOTER CHOICE: THE IDEAL PROMOTER TO DRIVE CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) EXPRESSION IN NK CELLS

RN Silvestre^a, J Eitler^b, JTC Azevedo^a, KCR Malmegrim^c, K Swiech^c, DT Covas^a, T Tonn^b, V Picanço-Castro^a

^a Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Experimental Transfusion Medicine, Medical Faculty 'Carl Gustav Carus', Technical University Dresden, Dresden, Germany

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Aims: Natural Killer (NK) cells have gained much recent attention as a promising alternative platform for CAR engineering owing to their unique biological attributes, their specialized cytotoxicity against tumors, their safety profile, and their potential use as an off-the-shelf cellular therapy.





However, NK transgene expression level is a major technical obstacle to the development of NK cell immunotherapy. Promoters, present in vectors, are responsible for maintaining the expression of CAR in host cells. Furthermore, promoters may differ in their ability to produce lentiviral particles and in their transduction efficiency. The present study aimed to evaluate whether different internal promoters result in a different percentage of transduced cells and transgene expression level in NK cells and thus to be able to choose an ideal promoter to drive the expression of CAR.CD19 increasing the antitumor potency of NK cells. **Methods:** Lentiviral particles with EF1a and SFFV promoters driving GFP gene expression or CAR.CD19 were produced, and the virus titer was measured by flow cytometry. Lentiviral particles were used for transduction of NK-92, NK from peripheral blood and NK from cord blood. CAR positive cells were detected by flow cytometry using anti F(ab)2 antibody. CAR-NK cell cytotoxic potential and specificity were assessed using established human Raji and NALM-6 lymphoblastoid cell lines (CD19+) as targets, which express varying antigen levels and MDA-MB-453 (CD19-) cells were used as negative control. **Results and discussion:** First, we explored the potential EF1a and SFFV promoters to drive GFP gene expression. SFFV promoter produced high lentiviral titers and achieved the best transduction efficacy in NK cells. The major difference between the promoters was the ability of SFFV to maintain longer and more robust GFP expression in NK cells. Therefore, we chose this promoter to drive CAR.CD19 expression and interleukin (IL)-15 co-expression in NK cells. There was a transduction efficiency of 13% (+/- 13.7) for NK-92 cells, assessed 48h after transduction. NK cells from Peripheral Blood (NK-PB) and Cord Blood (NK-CB) were also transduced with an efficiency of 27% and 49%, respectively. After 3 weeks in culture, the percentage of CAR-NK cells progressively decreased in primary cells. Cell growth of transduced cells from both sources was not statistically different; despite wild type NK-CB cells had a higher fold-change expansion than wild type NK-PB. CAR-NK-92 cells modified with SFFV were enriched with magnetic beads to 98% of NK cells positive for CAR expression and showed efficient and stable transgene expression during *ex vivo* expansion. The enriched CAR.CD19-NK-92 cells showed a higher killing potential against Raji CD19+ cells, compared with non-transduced NK-92 cells. Further, we evaluated the CAR-NK primary cells *in vitro* cytotoxic potential. CAR-NKs both from PB and CB had a higher killing potential against Raji and NALM-6 CD19+ cell lines than non-transduced NK cells. **Conclusions:** Taken together, these results indicate that the developed vector is functional and able to transduce NK cells from different sources, enhancing their antitumoral activity against tumoral CD19+ cells. Our results highlight that the promoter choice is essential to generate CAR-NK cells suitable for therapeutic applications. **Funding:** Supported by FAPESP 2019/25309-0, 2013/08135-2, 2008/578773; CNPq 573754-2008-0; Capes (88887.140966/2017-00 and 88881.199630/2018-01).

RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS CD34+ E UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS PARA ANÁLISE DA QUALIDADE EM PRODUTOS DE AFÉRESE CRIOPRESERVADOS PARA TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA AUTÓLOGO

SMF Alencar^{a,b}, TSD Santos^{a,b}, GC Silva^{a,b}, TL Pereira^{a,b}, TS Lima^{a,b}, R Shaffel^{a,b}, TL Pereira^{a,b}, ASC Cypriano^{a,b}, A Maiolino^{a,b}, HDS Dutra^{a,b}

^a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

A quantificação de células progenitoras hematopoéticas pelo fenótipo (CD34+/CD45+) ou por cultivo celular (Ensaio Clonogênico – que mede as Unidades de Formação de Colônias - UFC) é usada para determinar a qualidade de produtos de leucáfereze aplicados ao transplante de medula óssea. A razão entre os progenitores CD34+ e unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos – UFC-GM apresentam grandes variações, mas pode expressar os prejuízos decorrentes da criopreservação destas células. Nosso objetivo foi avaliar a perda de qualidade destes produtos pós criopreservação tendo como referências a relação entre CD34 e UFC pré criopreservação. **Material e métodos:** Esta análise compreendeu 177 amostras pré-criopreservação e 169 amostras pós-criopreservação. 36 amostras pós-criopreservação foram submetidas a novo cultivo para confirmação de redução da perda de capacidade proliferativa. Para avaliar a quantidade de progenitores por citometria de fluxo, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-CD45 e anti-CD34 e analisadas conforme método indicado pela ISHAGE/ISCT. O ensaio clonogênico foi realizado pela cultura de células nucleadas do produto de leucáfereze, em meio de cultura semi-sólido contendo ágar, soro fetal bovino e meio condicionado de linhagem 5637, como fonte de fatores de crescimento. As placas foram incubadas por 12-14 dias. Após o término da incubação, as amostras foram fixadas com vapor de formol até a data de contagem das colônias. A relação entre células CD34+ e UFC foi determinada pelo quociente entre o número de células CD34+ e o número de UFC no produto da aférese. O método de criopreservação foi automatizado e os produtos foram mantidos em nitrogênio líquido. A análise estatística dos valores foi feita pelo teste de Mann-Whitney e t-paired. **Resultados:** A mediana da relação CD34/UFC em amostras pré criopreservação foi de 36 (3-2143) e em amostras pós criopreservação foi de 102 (2-19171). A perda de capacidade proliferativa pós-criopreservação foi significativa $p < 0,0001$ (Main-Whitney U). Amostras que pós criopreservação apresentavam perdas fora dos níveis de tolerância foram repetidas e apresentaram resultados semelhantes (R CD34/CFU com mediana 425 e pós repetição 473). **Discussão:** A perda de capacidade proliferativa pós congelamento é muito variável entre pacientes, é necessário identificar os fatores de risco associados para prever coleta satisfatória aos pacientes com