

Chagas). Para a execução plena da proposta, foi realizado credenciamento de Laboratório para Coleta das amostras. O protocolo de produção do colírio foi validado pelo Laboratório de Biologia Celular de Botucatu (Laboratório de Biotecnologia Aplicada - LBA) desde 2007. Todos os lotes são liberados após aprovação no Controle de Qualidade, envolvendo análise de conteúdo com teste microbiológico e de rotulagem com todas informações necessárias. Neste período de implantação da terapia para novos pacientes, foram registradas apenas duas observações/queixa, uma não foi justificada e o tratamento foi mantido e outra, na qual houve suspensão do tratamento. Quando aplicado questionário de satisfação para médicos, notou-se total satisfação em recomendar a terapia e significativa melhora do quadro clínico dos pacientes. Já a pesquisa de satisfação dos pacientes aponta que há uma boa adesão ao tratamento, efetivo e imediato alívio dos sintomas causados pela Síndrome do Olho Seco. As perspectivas futuras do tratamento com colírio de soro autólogo envolvem melhoria do produto e uma expansão de mercado para diversas regiões do país.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.531>

ALL-IN-ONE VIRUS-FREE MANUFACTURING PROCESS OF ALLOGENEIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) T CELLS USING CRISPR/CAS9

SCG Lima^a, D Cappabianca^b, MH Forsberg^b, C Capitini^b, DT Covas^a, K Saha^b, LEB Souza^a

^a Centro de Terapia Celular (CTC), Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b University of Wisconsin-Madison, Madison, United States

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has emerged as a promising therapeutic opportunity against blood cancers, leading to the six FDA-approved CAR T cell products. All commercially available products are produced following an autologous strategy, which represents a bottleneck for the widespread adoption of this technology due to the poor quality and quantity of patients' T cells. Allogeneic T cells from healthy donors are an excellent alternative over the autologous ones, allowing the production of a ready-to-use therapy besides additional benefits, such as standardization of the final product, cost reduction through manufacturing scale-up, and the possibility of multiple genetic modifications. Safety concerns related to the use of cells from third-party donors can be easily eliminated through T cell receptor (TCR) knock-out with the demonstrated prevention of graft-versus-host disease development. Here we describe CRISPR/Cas9 editing for TRAC (T Cell Receptor Alpha Constant)-targeted genomic integration of the CAR transgene and the consequent TCR knock-out in a fast and efficient virus-free manufacturing process. For the CRISPR/Cas9-mediated knock-in, we designed a plasmid containing the second-generation anti-CD19 CAR flanked by arms homologous to the desired cut site. This sequence was PCR amplified and purified, resulting in a highly concentrated double-stranded DNA (dsDNA)

template for the homology-directed repair (HDR). Human T cells isolated from healthy donors were electroporated with the dsDNA-HDR templates (dsDNA-HDRT) and Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) targeting the human TRAC locus. Cells were assayed on days 5 and 11 post-electroporation for CAR expression and killing efficiency, respectively. A mCherry transgene flanked by the same homology arms was also included as a control. Preliminary studies using the mCherry dsDNA-HDRT indicated a 1.2-fold improvement in the editing efficiency by adding the positively charged polymer poly-L-glutamic acid (40 µg) that binds to RNPs and reduces aggregates. Additionally, by culturing the electroporated cells with varying concentrations of an NHEJ inhibitor, we observed a 1.4 to 2-fold increase in mCherry knock-in, suggesting a favorable condition for the HDR. Based on the established optimized conditions, we electroporated T cells with the CAR dsDNA-HDRT (3.1 kb length, 6 µg) and got 88% of CAR+ cells five days after electroporation. The viability was 27% on day 3 and reached about 60% on day 7. On-target CAR gene integration was confirmed through an "in-out" PCR assay on the genomic DNA using primers specific to the TRAC locus and CAR transmembrane domain. We then analyzed the in vitro cytotoxicity of CAR T cells by coculturing them with GFP-expressing tumor cell lines. Complete growth inhibition of the RS4-11 cells (CD19⁺) was achieved at the 5:1, 10:1, and 50:1 effector-to-target ratios. For the K562 cells (CD19⁻), conversely, the killing activity was related to the T cells themselves since CAR expression did not further decrease the tumor cell number. These results demonstrate robust cytotoxic function and target specificity of the CAR T cell products. Combined, the data provide a proof-of-concept for the virus-free manufacturing process of allogeneic anti-CD19 CAR T cells, enabling CAR knock-in and TCR knock-out in an all-in-one strategy.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.532>

FATORES ASSOCIADOS À MOBILIZAÇÃO POBRE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS PARA TRANSPLANTE AUTÓLOGO EM PACIENTES COM LINFOMAS E MIELOMA MÚLTIPLO

AA Barroso^a, PB Martins^a, RMA Passos^{a,b}, LLM Perobelli^a, V Calsavara^a, CA Neto^{b,c}

^a Hospital de Transplantes Eurýclides de Jesus Zerbini - Hospital Brigadeiro, São Paulo, SP, Brasil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^c Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A contagem de células CD34+ no sangue periférico (SP) pré-leucafêrese é um parâmetro para prever o sucesso na mobilização e coleta de células tronco hematopoéticas (CTH). Para uma coleta bem-sucedida, mínima de 2×10^6 CD34+/kg, geralmente é necessária uma contagem de CD34+ no SP do quarto dia (D4) $\geq 10/\mu\text{L}$. **Objetivo:** Analisar

possíveis fatores associados à mobilização pobre de CTH definida como contagem de células CD34+ no SP do D4 < 10/ μ L durante a mobilização de CTH com G-CSF em pacientes com linfomas e mieloma múltiplo. **Material e métodos:** Foram analisados 285 prontuários de pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo, linfoma de Hodgkin e linfoma Não-Hodgkin candidatos à transplante de CTH autólogo, submetidos à mobilização de CTH com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF) na dose entre 15-20 mcg/kg/dia, em um hospital público em São Paulo, entre dezembro de 2016 a agosto de 2021. Para avaliar os fatores associados à mobilização pobre (contagem de células CD34+ SP no D4 <10/ μ L), os seguintes potenciais preditores foram incluídos: sexo; idade; etnia; peso; estatura; índice de massa corpórea; diagnóstico; status da doença pré-mobilização; radioterapia prévia; número de ciclos de quimioterapia pré-mobilização; número de linhas de tratamento pré-mobilização; dosagem de G-CSF; contagem de leucócitos pré-mobilização; contagem de plaquetas pré-mobilização ($\leq 150.000/\text{mm}^3$ ou $>150.000/\text{mm}^3$); intervalo entre última quimioterapia e início da mobilização. Para avaliar a associação entre as variáveis independentes com a ocorrência do desfecho, os modelos de regressão logística uni e multivariada foram ajustados aos dados. A odds ratio (OR) juntamente com intervalos de confiança de 95% (IC95%) foram relatados. A qualidade do ajuste dos modelos foi avaliada usando o teste de Hosmer-Lemeshow e o R quadrado de Nagelkerke. O nível de significância foi fixado em 5% (valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo). A análise dos dados foi realizada usando o software R versão 4.0 (R Core Team, 2020). **Resultados:** Na análise multivariada apenas dois fatores apresentaram associação estatisticamente significativa com a contagem de células CD34+ no D4 no SP: doença refratária ou em progressão apresentou OR = 3,259 (95%IC; 1,138-9,337) e contagem plaquetária $>150.000/\text{mm}^3$ OR = 0,473 (95%IC; 0,24-0,881). **Discussão:** Contagem plaquetária pré-mobilização $>150.000/\text{mm}^3$ está associada a diminuição de 53% de chance de o paciente não vir a ser mobilizador pobre. Doença refratária ou em progressão está associada a um aumento de 3,5 vezes de chance do paciente ser mobilizador pobre quando comparados aos pacientes com doença com resposta completa ou parcial muito boa. **Conclusão:** A contagem plaquetária pré-mobilização é um fator associado ao sucesso na mobilização de CTH com G-CSF. Estratégias de mobilização adicionais como quimiomobilização e plerixafor devem ser reservadas para pacientes com doença em progressão ou refratária que necessitem de mobilização de CTH para realização do transplante autólogo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.533>

UMA NOVA CONSTRUÇÃO DE CAR CONTRA O ANTÍGENO INTRACELULAR MAGE-A4 É CAPAZ DE LISAR CÉLULAS DE MIELOMA MÚLTIPLO

RM Silveira^a, IP Furtado^a, H Brand^a,
R Rossetti^a, DMC Fantacini^b, DT Covas^b,
LEB Souza^a

^a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP),
Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP,
Bras

^b Núcleo de Biotecnologia, Instituto Butantan,
Ribeirão Preto, SP, Brazil

Objetivo: Os receptores de antígenos quiméricos (CARs) convencionais podem reconhecer apenas antígenos de superfície celular em sua conformação nativa. Isso limita o número de alvos moleculares, pois a maioria dos antígenos associados a tumores são intracelulares. O uso de linfócitos T expressando receptores de células T (TCRs) nativos contra antígenos intracelulares é limitado pela baixa afinidade de TCRs naturais, e o aumento artificial na afinidade de TCR pode resultar em reconhecimento cruzado de antígenos próprios. Neste trabalho, relatamos o desenvolvimento de células CAR-T expressando um novo CAR capaz de reconhecer o antígeno intracelular associado ao tumor MAGE-A4 apresentado pelas moléculas HLA-A*02, que é o sorotipo mais frequente no mundo ocidental. MAGE-A4 é um antígeno câncer/testículo expresso por diferentes neoplasias, como mieloma múltiplo (MM), melanoma e outros. **Métodos:** Construímos um vetor lentiviral de terceira geração que codifica o CAR anti-MAGE-A4:HLA-A*02 (pLV-EF1a-MAGEA4_CAR) por clonagem molecular. Em seguida, o vetor foi transfectado em células Lenti-X 293T com dois outros vetores acessórios para produção das partículas virais. Em seguida, os vírus foram usados na transdução de linfócitos T humanos. Para a avaliação da atividade citotóxica e especificidade, as células CAR-T resultantes foram cocultivadas com as linhagens U266 (mieloma múltiplo, MAGE-A4+) e HCT116 (carcinoma colorretal, MAGE-A4-) previamente modificadas para expressar luciferase. O cocultivo foi realizado nas proporções 1:1 e 1:2 (células-alvo: células CAR-T). **Resultados:** Obtivemos sucesso na construção e clonagem do vetor pLV-EF1a-MAGEA4_CAR. A transfecção para montagem do vírus em células Lenti-X também ocorreu corretamente, resultando em um título viral de $8,7 \times 10^6$ UI/mL. Após a transdução lentiviral, as células CAR-T foram cultivadas por 15 dias e constatamos que não houve alterações no crescimento, viabilidade e níveis de expressão do CAR. Durante o cocultivo com células tumorais, as células CAR-T anti-MAGE-A4 lisaram 50% e 20% das células U266 nas proporções 1:1 e 1:2, respectivamente. Ao contrário, as células HCT116 não foram lisadas, confirmando a citotoxicidade e especificidade das células CAR-T anti-MAGE-A4. **Discussão:** Estudos já demonstraram a eficácia TCR artificiais contra MAGE-A4. No entanto, o uso de TCRs artificiais é limitado devido ao risco de recombinação com as cadeias do TCR nativo. Ainda, o aumento artificial na afinidade de TCR pode resultar em reconhecimento cruzado de antígenos próprios. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a eficácia de um CAR contra um antígeno intracelular (MAGE-A4) em modelo de MM. **Conclusões:** Demonstramos a geração de um novo vetor lentiviral que codifica um CAR totalmente funcional capaz de redirecionar a atividade citotóxica de células T contra células de MM MAGE-A4+HLA-A*02+. Esses resultados estabelecem as bases para o desenvolvimento de uma nova terapia celular avançada contra o MM e outras neoplasias MAGE-A4+.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.534>