

After twelve days of culture, cells were counted and labelled with anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4, anti-V δ 2, anti-PD1, anti-CD69, and anti-NKG2D antibodies for flow cytometry analysis. Our results demonstrated that although TexMACS medium is capable of supporting T-cell activation and expansion, it was not optimal for maximal expansion of V δ 2T cells (fold expansion 5.99 ± 1.61). However, the fold expansion was similar in OpTmizer and X-vivo10 media (fold expansion 21.38 ± 5.13 and 18.37 ± 5.42 , respectively). Among the medium supplementation strategies, cultivation in OpTmizer combined with 100 U/mL IL-2 + 12.5 ng/mL IL-15 led to highest expansion index (32.4-fold). As for the activation markers of V δ 2T cells, the frequency of NKG2D+ cells was similar for all conditions tested (above 85%). However, the percentage of CD69+ cells was higher in cells cultured in TexMACS medium compared to OpTmizer and X-vivo10 media (81.6 ± 5.3 , 69 ± 9.9 , 60.2 ± 7.2 , respectively). It is known that the Programmed Cell Death-1 receptor (PD-1) plays an important role in regulating immune cell function. We examined the expression of PD-1 after twelve days of expansion. We observed lower levels of PD-1 in cells expanded in X-vivo10 medium supplemented with 1,000 U/mL IL-2 + 100 ng/mL IL-15, whereas levels of expression were up-regulated significantly when cells were cultivated in the same conditions without IL-15 (28.7% versus 70.6%). Cells expanded in either OpTmizer or TexMACS demonstrated a similar frequency to PD-1 positive cells ($41 \pm 13\%$ and 49.7 ± 9.5). In conclusion, we reported an optimized protocol to improve the expansion and the quality of V δ 2 T cells. These findings set the groundwork for the establishment of an off-the-shelf advanced cellular immunotherapy using this alternative population of T cells.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.536>

ENSAIOS CLÍNICOS UTILIZANDO TERAPIA GÊNICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇA FALCIFORME

FA Rós^a, SCF Couto^b, LRC Barros^c, KT Maio^d, V Picanço-Castro^e, V Rocha^{a,b,d,f,g}

^a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

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

^c Centro de Pesquisa Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^d Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^f Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa, São Paulo, SP, Brasil

^g Churchill Hospital, Department of Hematology, Churchill Hospital, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

A Doença Falciforme (DF) é um grupo de anemias hemolíticas hereditárias causadas por mutações no gene da β -globina. A proteína mutante, conhecida como β S-globina, tende a polimerizar em baixas tensões de oxigênio e a este fenômeno estão associados a hemólise e a vasoclusão que são os dois processos fisiopatológicos que sintetizam a doença. O único tratamento curativo eficiente e disponível é o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, limitado à existência de doador HLA idêntico. Neste cenário, a terapia gênica figura como opção de tratamento curativo para os cerca de 80% dos pacientes que não possuem doador compatível. Por isso, este trabalho avaliou as abordagens, estratégias, evolução e localização dos testes clínicos atualmente cadastrados. Os dados foram obtidos na plataforma clinicaltrials.org em 01/07/2022 por meio de três buscas. Estas buscas combinaram o termo “sickle cell” à “gene therapy”, “autologous hematopoietic stem cell transplantation” e “CRISPR” e encontraram 40, 15 e 6 testes clínicos, respectivamente. Após exclusão dos testes duplicados e não relacionados a protocolos intervencionistas utilizando células autólogas modificadas, 16 testes foram incluídos nas análises posteriores. A maioria dos ensaios são multicêntricos ($n = 9$), patrocinados pela indústria ($n = 12$) e seguem recrutando pacientes ($n = 9$). Os EUA é o país com maior número de testes clínicos ($n = 14$) e de centros ($n = 54$) cadastrados, seguido pela França que possui 3 testes e 3 centros. Outros 6 países do hemisfério norte possuem testes clínicos cadastrados. A indução de hemoglobina fetal é a estratégia terapêutica utilizada pela maioria dos testes ($n = 9$) e o BCL11A ($n = 6$) é o principal alvo utilizado para este fim, seguido pelo gene da γ -globina ($n = 3$). A inserção gênica de β -globinas terapêuticas ($n = 5$) e a correção da mutação falciforme ($n = 2$) são as outras estratégias terapêuticas encontradas. As técnicas utilizadas são: edição gênica ($n = 7$); adição gênica ($n = 6$); inibição pós-transcricional com shRNA ($n = 2$); e uso combinado de adição gênica e shRNA ($n = 1$). As drogas mais relatadas para mobilização de células CD34+ e mieloablação são o Plerixafor ($n = 10$) e o Bussulfano ($n = 11$), respectivamente. Resultados preliminares têm demonstrado que as diferentes estratégias são capazes de eliminar as crises vaso-oclusivas graves e demais eventos clínicos dos pacientes após o tratamento. Entretanto, o acompanhamento dos pacientes a longo prazo é necessário para determinar se existe uma abordagem terapêutica mais eficiente ou segura, sobretudo após os dois casos de Síndrome Mielodisplásica/Leucemia Mieloide Aguda relatados em pacientes tratados com LentiGlobin. Por fim, o desenvolvimento de métodos alternativos focados na redução de custos e riscos devem ser encorajados. Tais métodos podem viabilizar a terapia gênica como opção de tratamento em países em desenvolvimento que possuem alta prevalência de DF (como Brasil, Índia e países da África Sub-Saariana) nos quais não existe nenhum estudo clínico sendo desenvolvido. CAPES, CTC (2013/08135-2), CNPq (442676/2020-4).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.537>