

48 hours, the cells were evaluated by flow cytometry for CAR expression. Subsequently, anti-MAGE-A4 CAR NK-92 positive cells were enriched using magnetic beads. Meanwhile, target cell lines A375-Luc (MAGE-A4+), and HCT116-Luc (MAGE-A4-) were evaluated for MAGE-A4 expression by flow cytometry. To measure the specificity and cytotoxicity of anti-MAGE-A4 CAR NK-92, these cells were co-cultured with target cell lines expressing luciferase at different effector to target ratios. Cytotoxicity-mediated killing was assessed using bioluminescence-imaging systems (IVIS), quantifying the decrease of luminescence from baseline. **Results:** We conducted NK cell transduction using MOIs of 10, 5, and 3. Our observations revealed transduction efficiencies of 52%, 49.1%, and 48.7% respectively. Next, CAR positive cells were selected and the percentage of anti-MAGE-A4 CAR-NK-92 cells increased to 99.4% and these cells were used for co-culture with target cell lines. The results of MAGE-A4 expression in A375 cell line was 68.6%, and 2.54% in HCT116. The cytotoxicity of anti-MAGE-A4 CAR-NK-92 effector cells against A375 target cell line is around 80% in the ratio of 1:1 and 5:1. MAGE-A4-CAR-NK cells demonstrated enhanced effectiveness in killing A375 cells when compared to NK92-WT cells ( $p < 0.05$ ), underscoring the specificity of the CAR vector. **Discussion:** Previous Studies done by Dr. Shiku team have already demonstrated the effectiveness of TCR-like CAR-T cells against MAGE-A4+ tumors. Our study is the first to demonstrate the effectiveness of this anti-MAGE-A4 CAR incorporating GITR as a costimulatory domain in NK cells. **Conclusion:** This study has the potential to create a new off-the-shelf advanced cell therapy approach against MAGE-A4+ malignancies.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.984>

#### CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL IN VITRO DE CÉLULAS NK-92-CAR ANTI-GD2 COM EXPRESSÃO DE GITRL

MC Tirapelle, D Tadeu, VP Castro

Hemocentro de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

O desenvolvimento de terapias alogênicas (*off-the-shelf*) utilizando o Receptor Quimérico de Antígeno (CAR) visa reduzir limitações das terapias autólogas, como a necessidade de compatibilidade HLA e aumento do tempo de espera do paciente em razão do tempo de manufatura. Nesse contexto, as células NK podem ser utilizadas como uma fonte alogênica, visto que não dependem de compatibilidade HLA, possuem alta capacidade citotóxica exercendo atividade antitumoral por meio de seus mecanismos fisiológicos e produzem menos efeitos colaterais. As células NK podem ser utilizadas como um produto de uso clínico imediato para atender maior demanda de pacientes. Apesar do grande sucesso das imunoterapias utilizando CAR, o tratamento de tumores sólidos ainda é um grande desafio. O microambiente tumoral contém barreiras físicas e metabólicas que dificultam a entrada e sobrevivência das células do sistema imune, uma

das razões é a presença de células imunossupressoras, como as células T reguladoras (Treg). Estas células possuem o receptor GITR e a interação com seu ligante GITRL pode inibir a ação supressora das Treg e fornecer um sinal co-estimulatório para células T e NK. Assim, o presente estudo visa avaliar um CAR anti o antígeno GD2, o qual tem sido amplamente estudado devido à sua alta expressão em tumores sólidos como neuroblastoma e melanoma. No entanto, os ensaios clínicos apresentam resultados insatisfatórios, devido a falta de persistência e potência das células T e um microambiente tumoral imunossupressor. Partimos da hipótese de que a combinação de um CAR anti GD2 com a expressão de GITRL pode aumentar o potencial citotóxico em tumores sólidos e inibir Treg. As células NK-CAR foram geradas, caracterizadas e os ensaios de citotoxicidade in vitro por meio de co-cultivo com as células GD2+ foram realizados pelos métodos de citometria de fluxo e bioluminescência. Ambas as NK-CAR obtiveram pureza de 96% sem perda de expressão com o tempo. A cinética de crescimento mostrou que ambas as células CAR obtiveram resultados superiores em relação à NK-92, que obteve fator de expansão de 225 vezes, enquanto as CARs de 600 (antiGD2) e 800 (antiGD2-GITRL). O ensaio de citotoxicidade com a linhagem de neuroblastoma SH-SY5Y (GD2+) foi realizado durante 12 e 24 horas e analisadas por citometria de fluxo. Tanto na proporção 1:1 quanto 3:1 (alvo:efetora) as células CAR tiveram maior citotoxicidade em relação ao controle (30%–40%) mesmo com a presença de mais células alvo do que efetoras. Pelo método de bioluminescência foi utilizada a linhagem de melanoma SK-MEL28-S6 (GD2+). Neste ensaio, observou-se que as células NK-92 não apresentaram capacidade citotóxica. Por outro lado, as células CAR-antiGD2 manifestaram níveis de citotoxicidade de 15% (após 24 horas) e 60% (após 48 horas), enquanto as células CAR-antiGD2-GITRL exibiram taxas de citotoxicidade de 40% (após 24 horas) e 80% (após 48 horas). Os resultados obtidos até o momento mostraram que após a expansão as células NK-CAR alcançaram melhores parâmetros cinéticos mantendo elevado grau de pureza. Além disso, as células NK-CAR antiGD2 demonstraram habilidade em induzir citotoxicidade em duas linhagens tumorais distintas GD2+. As próximas etapas do presente estudo têm como objetivo avaliar a citotoxicidade das células NK-CAR em linhagens provenientes de glioblastoma multiforme e avaliar o efeito da molécula GITRL no bloqueio de células Treg.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.985>

#### TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS: RESULTADOS OBTIDOS EM ONZE ANOS DE EXPERIÊNCIA NO PROCÉLULA – TERAPIA CELULAR, RJ, BRASIL

CHC Ribeiro, MP Santos, DR Vidal, CMB Finkel, JPR Azevedo

Procélula – Terapia Celular – Grupo Vita, Belo Horizonte, MG, Brasil