

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

A demanda de transplantes autólogos de CPH tem se apresentado crescente ao longo do período de onze anos no estado do Rio de Janeiro. O Procélula vem colaborando para atendê-la no setor privado, incrementando investimentos técnicos e de infraestrutura. Apresentamos os resultados e as características técnicas utilizadas para o seu desenvolvimento. Dezembro de 2011 a maio de 2023 foram atendidos 1172 pacientes (668 mielomas, 457 linfomas e 47 outras doenças) com mediana de idade de 56 anos (22 pediátricos – 7 meses a 14 anos; 1150 adultos – 15 a 76 anos). Para a coleta, as aféreses foram iniciadas no primeiro dia em que os pacientes apresentaram ≥ 10 células CD34+/mm³ circulantes. Foram colhidas, em média, 4 volemias para células mononucleares em CobeSpectra ou Óptia e a quantificação de leucócitos foi realizada em Contador Automático ABXMicrosES60. Os produtos foram criopreservados em Solução de Hidroxietilamido (HES) em concentração a 5,83%, albumina humana a 4% e dimetilsulfóxido a 5% do volume final, divididos em frações de 60 a 115 mL, com concentração celular alvo de 2–3×10⁸ 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+/CD45^{low}, segundo metodologia definida pela ISHAGE, em citômetro FACScalibur (B&D). Realizamos ensaio clonogênico com sistema MACSTM HSC-CFU Media (Miltenyi Biotec) 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. Dos 1172 pacientes analisados, 1242 realizaram mobilizações com G-CSF (53 associadas à quimioterapia, 400 ao Plerixafor e 14 à quimioterapia e Plerixafor; 1209 com coleta e 63 falhas de mobilização sem coleta) e 1750 aféreses. A média de CPH circulantes antes da aférese foi de 31 CD34+/mm³ (0–410), com média de 4,09×10⁶CD34+/Kg (0,11–50,50) colhidas. Os produtos congelados apresentaram concentração celular média de 2,63×10⁸/mL (0,23–6,61) com recuperação de 109,44% no descongelamento (52,40–283,33). Apresentaram viabilidade celular > 99% antes da criopreservação, e recuperaram em média 91,88% (68,05–99,90) da viabilidade e 76,1% (5,5–830,5) das UFC-GM no descongelamento. Foram realizados 3371 ensaios funcionais, e a relação entre eles (CD34/UFC-GM) foi de 2,60 (0,7–88,9) na amostra fresca e 3,38 (0,7–91,1) na descongelada. 1110 pacientes realizaram o transplante com média de 3,69×10⁶ CD34+/Kg (1,20–19,79) e 1,67×10⁶ UFC-GM/Kg (0,04–10,60) infundidas. A média foi de 10 dias da pega de granulócitos (8–18). Estes dados corroboram com os apresentados anteriormente, reforçando que a criopreservação a -80°C com HES e baixa concentração de DMSO resulta em excelentes desfechos clínicos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.986>

PRODUCTION OF “UNIVERSAL” CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) T CELLS THROUGH A HIGHLY EFFICIENT CRISPR/CAS9-INDUCED KNOCKOUT OF THE ENDOGENOUS TRAC GENE

SCG Lima^a, R Rossetti^a, AU Quadros^b, KS Esteves^a, IP Furtado^a, DMC Fantacini^b, RM Silveira^a, DT Covas^a, LEB Souza^a

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

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

Allogeneic Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell therapy represents a promising approach to overcome the accessibility limitations of conventional autologous treatment. Some advantages of such allogeneic therapy include the availability of an off-the-shelf product, cost reduction associated with production scalability, and the selection potential of fitter third-party T cells as long as immune incompatibility restrictions are addressed. Genome editing technologies are applied to overcome HLA-incompatibility barriers, giving rise to a universal product, mainly by depleting the T Cell Receptor (TCR) to prevent graft-versus-host disease development. Here, we describe a refined platform for universal anti-CD19 CAR T cell production by disrupting the TCR alpha-chain constant region (TRAC gene) through a high-fidelity CRISPR/Cas9 system. Activated human T cells from three healthy donors were modified in a two-step engineering process: transduction with a lentiviral vector coding the anti-CD19 CAR, followed by Ribonucleoprotein (RNP) electroporation. RNPs were produced prior to electroporation through the complexation of the high-fidelity Cas9 protein with the single guide RNA (sgRNA) and poly-L-glutamic acid polymer association to prevent protein aggregates. We followed the viability and growth kinetics over twelve days of manufacturing and assayed the produced cells on days nine and twelve for CAR/TCR expressions and antitumor efficiency, respectively. Cell viability was consistent between non-transduced (UTD), transduced (CAR), and transduced+electroporated (uCAR) T cells, with the frequency of live cells reaching 85% after two days of transduction and 63% three days post-electroporation. Despite that, CAR T cells exhibited slightly higher expansion compared to UTD and uCAR T cells (11.13 ± 7.18 vs. 5.93 ± 3.72 and 8.23 ± 4.21-fold expansion on day twelve, respectively), which was also affected by donor-to-donor variability. We observed similar transduction efficiency between CAR (48.7±8.6%) and uCAR T cells (43.4±9.4%). Within the latter group, we got 39.2% (±4.9%) of CAR+/TCR– cells and an overall 86.1% (± 3.4%) TCR– cells, highlighting the high efficiency of TCR disruption in our genome editing platform. We then analyzed the in vitro antitumor potential of CAR and uCAR T cells by coculturing them with luciferase-expressing tumor cell lines (1:1 effector-to-target ratio) for 48h. CAR and uCAR T cells exhibited potent cytotoxic activity against CD19+ Nalm6 cells, with uCAR T cells displaying superior performance (72.36 ± 1.41% of cell lysis vs. 54.21 ± 2.45% for CAR T cells; p≤0.05). Enhanced