

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

antitumor activity of uCAR T cells was associated with an increased release of IFN- γ in coculture supernatant (217.29 ± 14.58 pg/mL) compared to unedited CAR T cells (125.67 ± 1.2 pg/mL; $p \leq 0.01$). Both CAR and uCAR T cells spared CD19–K562 cells, demonstrating the robust cytotoxic function and target specificity of the CAR T cell products. Collectively, these findings validate our manufacturing platform for generating universal anti-CD19 CAR T cells with high genome editing efficiency. These results lay the groundwork to consolidate an off-the-shelf allogeneic CAR-T cell therapy for B-cell malignancies and potentially for any other tumor type.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.987>

CISTITE HEMORRÁGICA POR POLIOMAVÍRUS APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS: UMA PERSPECTIVA ATUALIZADA

FZ Piazero^a, LHA Ramos^a, RS Vasconcelos^a,
GO Borges^b, PDA Freixo^b, VMP Sousa^b,
LM Castellano^b, FCB Silva^b, JVP Neto^a

^a CETTRO-Oncoclínicas, Brasília, DF, Brasil

^b Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

Introdução: O poliomavírus é um DNA vírus da família Papovaviridae são conhecidos dois vírus com potencial patogênico humano, JC e BK vírus. A reativação viral é relatada em 50% a 60% dos pacientes submetidos ao Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoéticas (TACTH), sendo a cistite hemorrágica a infecção mais prevalente, ocorrendo na fase de aplasia do TACTH, com resolução após pega da enxertia. **Objetivos:** Descrever um caso incomum de reativação do poliomavírus após enxertia do TACTH. **Resultados:** Paciente feminina, 30 anos, portadora de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) de alto risco (cariótipo complexo, +8), submetida TACTH aparentado 10 10 com irmã. O condicionamento foi ciclofosfamida e bussulfano. A imunoprofilaxia foi com metotrexate e tacrolimus. Apresentou de intercorrências durante TACTH: neutropenia febril, mucosite grau 3, Doença de Enxerto Contra Hospedeiro (DECH) de pele grau 3 e intestino grau 2, com melhora após uso de corticoide. Apresentou pega da enxertia no D+25 e alta hospitalar no D+30. Na avaliação do quimerismo misto no D+30: 100% de células do doador, Doença Residual Mínima (DRM) negativa e cariótipo normal. No D+80, paciente apresentou sinais de pancitopenia, sendo verificado presença de 5% de blastos na medula óssea com características idênticas ao diagnóstico e 80% de quimerismo. Iniciou com protocolo de infusão de linfócitos do doador e uso de azacitidina para controle da doença de base. A reavaliação da DRM evoluindo com 20% de blastos e quimerismo de 60% de células do doador, associada reativação da DECH aguda de pele grau 3, onde iniciou-se corticóide 1 mg/kg. O paciente evolui com disúria intensa e hematúria macroscópica com coágulos associada espessamento vesical moderado, sendo identificado poliomavírus na urina pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) associado início do protocolo de reindução de LMA pós recaída de TACTH. Iniciou-se ciprofloxacina associada imunoglobulina com melhora parcial dos

sintomas. Após importação, iniciamos com cidofovir associado probenecide, com resolução completa da infecção após 3 dias do tratamento e negatização do PCR urinário para poliomavírus. A paciente evolui a óbito por candidemia disseminada e refratariedade a quimioterapia para LMA. **Conclusão:** Apesar da alta prevalência da soropositividade para vírus BK nos indivíduos imunossuprimidos, não há relatos descritos na literatura de cistite hemorrágica em fase tardia do TACTH durante protocolo de infusão de linfócitos do doador em paciente com perda da enxertia e recaída da doença de base.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.988>

INFECÇÃO POR SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS EM PACIENTE COM TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS: UM AGENTE INFECCIOSO EMERGENTE ASSOCIADO À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

FZ Piazero^a, LHA Ramos^a, RS Vasconcelos^a,
EKV Grigório^b, LF Benedito^b, ML Rocha^b,
HA Aquino^b, JG Melo^b, JVP Neto^a

^a CETTRO-Oncoclínicas, Brasília, DF, Brasil

^b Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

Introdução: A *Sphingomonas paucimobilis* (cepa ATCC 29837) é um Bacilo Gram-Negativo Não Fermentador (BGNF) oportunista, única espécie do gênero com relevância clínica. Geralmente, apresenta baixa virulência. As unidades hematológicas têm as maiores taxas de infecções nosocomiais, devido aos tratamentos intensivos e imunossupressão severa. Dentre as condições mais associadas a infecção, bacteremia e septicemia são as mais comuns. A taxa de mortalidade associada às complicações é de 5,5%. **Objetivos:** Descrever um relato de caso de infecção por *S. paucimobilis* em paciente portadora de Mieloma Múltiplo de Cadeia Leve (LCMM) sujeita a Transplante autólogo de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH). **Resultados:** E.M.P., sexo feminino, 56 anos, portadora de Mieloma Múltiplo de Cadeia Leve (LCMM) kappa [R-ISS = 2, ISS = 2, DS = 1] submetida a TCTH em condicionamento com melfalano 200 mg/m² (MEL200). Evoluiu do transplante com mucosite oral, febre e colite neutropênica necessitando de intervenção com antimicrobianos. Já estava em uso de antifúngicos profiláticos. Iniciou-se a terapêutica com cefepima, porém houve persistência da febre e decidiu-se escalar o tratamento para meropenem e anidulafungina. Bactérias *S. paucimobilis* foram encontradas em hemocultura e o tratamento com carbapenêmicos foi mantido até melhora clínica. **Conclusão:** Apesar da baixa virulência, a *S. paucimobilis* pode infectar tanto indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos e levar ao choque séptico. Logo, encorajamos vigilância ambiental, avaliação de dispositivos invasivos, cultura e terapia antimicrobiana apropriada especialmente em pacientes neutropênicos e com comorbidades. Incluindo aqueles submetidos a TCTH.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.989>