

Palavras-chave: Células-tronco; Metodologia; Cultivo; Imunofenotipagem; Citometria de fluxo; Diferenciação.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.702>

701

ENGINEERED CD19-CAR NK CELLS AS AN OFF-THE-SHELF ALTERNATIVE TO B CELL LEUKEMIA AND LYMPHOMA TREATMENT



R.N. Silvestre^a, J. Eitler^b, D.M.C. Fantacini^a, K.C.R. Malmegrim^c, K. Swiech^c, D.T. Covas^a, T. Tonn^b, V. Picanço-Castro^a

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

^b Experimental Transfusion Medicine, Medical Faculty 'Carl Gustav Carus', Technical University Dresden, Dresden, Germany

^c Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Aims: Chimeric antigen receptor-modified T (CAR-T) cells have been successfully used worldwide for the treatment of hematological tumors. In 2019, our group successfully treated the first patient in Brazil. However, their wide application is limited by inherent risks such as graft-versus-host disease and the amount of time it takes to produce CAR-T cells. Allogeneic CAR-Natural Killer (NK) cells can be used as universal products and may be easily available off-the-shelf for clinical application. Considering the importance of CAR-NK for clinical use, the aim of this study is to develop novel therapy to harness the potential of NK cells against leukemia and lymphoma, and to further enhance their effector function by both redefining their specificity and enhancing their potency. For that, we developed a procedure for the transduction and *ex vivo* expansion of NK cells from three different sources: NK-92 lineage, peripheral blood (NK-PB) and cord blood (NK-CB). In addition, we evaluated if the cytotoxicity of NK cells can be augmented by the expression of a 4th-generation CD19-CAR developed in our laboratory. **Methods:** NK-cell resistance to transduction is a major technical hurdle for developing NK-cell immunotherapy. So, we tested two different backbones to improve the transduction rates and developed lentiviral vectors expressing anti-CD19 CAR and IL-15 or IL-27. The transducing efficiency was measured by flow cytometry using anti-F(ab')₂ antibody. To assess NK cytotoxicity, we compared *in vitro* potential of CAR-NKs to kill Raji and NALM-6 CD19+ cancer cell lines at multiple E:T ratios by using two methods: Europium Solution assay and the Incucyte Live-Cell analysis assay. **Results and discussion:** NK cells were successfully and stably transduced with two lentiviral backbones. However, the backbone with the promoter SFFV presented better results, and it was used to build our CAR-constructions. The transduction efficiency was assessed 48h after transduction, and it was 28% for CAR.19-IL-15 and 39% for CAR.19-IL-27 in NK-92 cells and for NK-PB and NK-CB cells, the transduction efficiency was around 20% for CAR.19-IL-15. After 21 days in culture, the percentage of

CAR-NK cells progressively decreased. Further, we evaluated the CAR-NK cells *in vitro* cytotoxicity potential. CAR-NKs had a higher killing potential against Raji and NALM-6 CD19+ cell lines than non-transduced NK cells. To better evaluate the expansion potential of transduced NK cells, CAR-NK-92 cells were enriched, by using magnetic beads, to 98% of NK cell positive for CAR expression. The sorted CAR-NK-92 cells were able to expand and maintained a stable CAR expression (96%–98% of CAR-NK) during 74 days. The enriched CAR-NK cells showed a higher killing potential against CD19+ cell lines, compared with non-transduced cells. **Conclusions:** We developed two new functional CAR vectors. In addition, we generated CAR-NKs from three different sources with their anti-tumor activity increased against CD19+ cells. Next, we intend to use cytokines to improve *ex vivo* CAR-NK cell expansion, and to test their *in vivo* therapeutic potential. These results are the foundation for the establishment of a platform to produce effective CAR-NK cells for cancer immunotherapy. **Support:** FAPESP 2019/25309-0, 2013/08135-2, 2008/578773, CNPq 573754-2008-0; Capes (88887.140966/2017-00 and 88881.199630/2018-01).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.703>

702

ESTABELECIMENTO DE UM BIOPROCESSO PARA PROLIFERAÇÃO EM LARGA ESCALA DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO



V.A. Simão^a, J.A.R. Fracasso^b, M.J. Malagutti-Ferreira^c, A. Tonso^d, J.T. Ribeiro-Paes^a

^a Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), Assis, SP, Brasil

^c Departamento de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Assis, SP, Brasil

^d Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

O emprego de células estromais mesenquimais (MSC) tem sido considerado uma alternativa terapêutica promissora em estudos pré-clínicos e clínicos. Neste contexto, o tecido adiposo destaca-se como uma importante fonte para isolamento e cultivo de MSC. Para emprego de MSC em triagens clínicas é necessário um grande número de células da ordem de $1,0 \times 10^8$ células/paciente. Para que se atinja tal concentração é necessária a proliferação celular *in vitro*, no entanto, o processo de proliferação implica na manutenção das células em um microambiente artificial que pode induzir efeitos genotóxicos e afetar a viabilidade celular, interferindo diretamente na segurança e eficácia da terapia celular. Em função destes aspectos, objetivou-se com este estudo o estabelecimento de um bioprocesso para proliferação de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hADSC) em biorreator tipo tanque agitado, visando estabelecer um sis-

tema robusto que permita um maior rendimento celular em menor período de tempo e, consequentemente, minimizar os efeitos deletérios do cultivo celular prolongado, mantendo os atributos celulares das hADSC. Para tanto, foram conduzidos experimentos em cultura estática e de suspensão em escala ampliada (frasco spinner de 125 mL) ou larga escala (biorreator de 1L). Os resultados não mostraram diferença ($p < 0,05$) quanto à influência do volume de meio de cultura (5, 10 ou 15 mL) sobre o rendimento celular em cultura estática. No desenvolvimento de um protocolo de cultivo em frasco spinner os resultados permitiram definir a concentração celular inicial de 30 células/microcarregador (30:1) equivalente a $2,4 \times 10^4$ células/mL, regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e renovação de 50% a cada 72 h, empregando-se o microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1g/L e velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa. A seguir foi otimizado o cultivo em larga escala em biorreator por meio de uma avaliação gradual de cada variável do bioprocessamento, definindo-se como a melhor condição de cultivo: concentração celular inicial de $1,2 \times 10^4$ células/mL, regime de adesão celular intermitente a 70 rpm, meio de cultura com 10% de SFB e 25% de renovação a cada 48h, velocidade de agitação de 50 rpm na fase proliferativa, microcarregador gelatinoso macroporoso Cultispher-S em 1g/L e concentração de oxigênio dissolvido de 20% a 40% (ajustes a cada 72h). O cultivo celular em biorreator também foi avaliado quanto à integridade genômica por meio do ensaio cometa que demonstrou uma fragmentação progressiva do DNA em função do tempo das células em cultivo e do teste do micronúcleo que não diferenciou na frequência de células micronucleadas comparativamente a situação pré-cultivo em biorreator. Os resultados obtidos permitem concluir que a adequação de diferentes parâmetros das condições de cultivo de hADSC em biorreator aumenta o rendimento do processo em menor tempo de cultivo, minimizando os efeitos de instabilidade genética e mantendo a viabilidade celular. Deve-se enfatizar, como proposição deste estudo, a necessidade de incorporar os testes de análise de integridade do material genético e de viabilidade nos processos de proliferação celular em biorreator.

Palavras-chave: Células-tronco; Tecido adiposo; Biorreator; Proliferação; Frasco spinner; Genotoxicidade.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.704>

703

HYPOXIA AND 3D COMBINED PRIMING IMPROVES IN VITRO PARACRINE ANGIOGENIC POTENTIAL OF UC-MSC

N.C. Noronha^{a,b}, A. Mizukami^b, M.D. Orellana^b, D.T. Covas^{b,c}, K. Swiech^{b,d}, K.C.R. Malmegrim^{b,e}

^a Programa de Biociências e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Background: Mesenchymal Stromal Cells (MSC) possess diverse immunomodulatory and regenerative properties, and play an essential role in tissue homeostasis, surveillance and repair, mainly mediated via paracrine signaling. MSC have been largely studied regarding therapeutic potential for a variety of immunological and degenerative diseases. Clinical applications of MSC-based therapy require scalable expansion process and Good Manufacturing Practice (GMP) compliant production. Inconsistency of the therapeutic potential and low survival of transplanted cells require search for priming/preconditioning strategies and new approaches GMP-compliant expansion to produce robust and functional MSC products. **Aim:** Establishment of a GMP and scalable bioprocess for hypoxia-primed UC-MSC expansion and analysis of in vitro paracrine potential of primed cells. **Methods:** MSC from umbilical cord (UC-MSC) were expanded for 5 days under xenoantigen-free conditions primed with hypoxia (oxygen concentration of 5%) in a three-dimensional culture using microcarriers and stirred-tank bioreactor system. Harvested cells were characterized by immunophenotyping and differentiation potential. The paracrine angiogenic potential of expanded/primed UC-MSC upon human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was evaluated by the capillary-like structure assay performed in Matrigel-Growth Factor Reduced Membrane and scratch/gap closure assay, using conditioned medium (CM) from stirred cultures. **Results:** UC-MSC exhibited efficient and similar expansion in stirred system under both conditions $1.69 (\pm 0.29) \times 10^5$ cells/mL in hypoxic and $1.74 (\pm 0.23) \times 10^5$ cells/mL in normoxic culture, a fold increase of 6.98 (± 1.08) and 7.46 (± 2.0), respectively. Cells retained their immunophenotype and differentiation ability. CM from hypoxia primed-MSC promoted higher HUVEC migration rates compared to normoxic cultures 64.9% (± 0.04) vs. 45.7% (± 0.08), and higher formation of capillary-like structures in Matrigel. **Conclusions:** These results represent an important step toward the establishment of a GMP-compliant large-scale production system for functional hypoxia primed UC-MSC, and confirm higher angiogenic capacity of these cells in vitro. New experiments are needed to evaluate the effect of priming with hypoxia to immunomodulatory and angiogenic in vivo potential.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.705>

