

704

NON-VIRAL ENGINEERING OF CAR-NK CELLS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY



K.R.S. Gomes^a, R.N. Silvestre^a, J.T.C. Azevedo^a, K. Swiech^{a,b}, K.C.R. Malmegrim^a, D.T. Covas^{a,c}, V.P.E. Castro^a

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular, Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), 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

Introduction: In recent years, enormous advances have been made in genetic engineering of effector immune cells for cancer therapy. Although chimeric antigen receptors (CARs) have been widely used to redirect autologous T-cell specificity against hematological malignancies, yielding impressive clinical results, studies with CAR-modified natural killer (NK) cells are still restricted to pre-clinical and some clinical studies. Genetic engineering is an important tool for redirecting the function of various types of immune cells and their use for therapeutic purposes. One of the major obstacles for NK cell immunotherapy is the lack of an efficient method for gene transfer. Lentiviral vectors have been proven to be a safe tool for genetic engineering, however, lentiviral transduction is inefficient for NK cells. This study aims to develop a non-viral episomal vector for genetic modification of NK cells. **Methods:** The S/MAR-based episomal vector pEPI-eGFP supplied the basic functional architecture for the reprogramming of our target cells. The system contains transcriptional units optimized for mammalian expression such as the replication-Initiation Region (IR) from the β -globin locus (for plasmid replication), a scaffold/matrix attachment region sequence (S/MARS) for persistent transcription, and an SFFV promoter to drive the expression of our CAR component. Based on this vector, we have cloned a second-generation anti-CD19 CAR (41BB-CD3z) and two fourth-generation anti-CD19 CARs (41BB-CD3z-IL15 and 2B4-CD3z-IL15). **Results and discussion:** Firstly, we evaluated the functionality of our episomal pEPI vector. We observed a transfection efficiency of about 47% with our vector when transfected in HEK cells. Further, we assessed the stability of our construct using the same cell lineage, as the HEK cell line has a high replication rate. Our results show a stable expression (45.2%) for 90 days of culture and no cell growth disturbance due to the presence of the plasmid. These results prove that the sequences included in this vector, such as S/MAR and IR, allow it to replicate autonomously within the host cells, without loss of expression during cell passages. These results are very promising, as the expression of a common episomal vector lasts only about 1–2 weeks. Also, we have cloned the CAR molecules

into this vector, resulting in the following constructs: pepIR-CD19.CAR-41BB-CD3z-GFP, pepIR-CD19.CAR-41BB-CD3z-IL-15 and pepIR-CD19.CAR-2B4-CD3z-IL-15. **Conclusions:** Our episomal vector supported stable transfections and the IR element together with S/MAR contribute to the formation of autonomously replicating genetic elements. The next steps include the evaluation of the transfection efficiency of NK cells and the expression stability within them, as well as to test the in vitro and in vivo function of non-viral CAR-NK cells. Financially supported by CAPES, FAPESP 2019/25309-0, CTC-Center for Cell-based Therapy (FAPESP 2013/08135-2) and National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy (CNPq 573754-2008-0 and FAPESP 2008/578773).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.706>

705

O USO DE CAR-T CELL NO TRATAMENTO DE LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA: REVISÃO SISTEMÁTICA



B.M.S. Gomes, J.F. Carneiro, M.S. Castro, T.C.A. Gomes, C.A. Martins, C. Puton, P.P.R. Macêdo, R.Q. Alcântara, P.P. Katopodis, A.M.T.C. Silva

Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Objetivo: Analisar o uso células-T dos receptores de antígenos quiméricos (CAR-T cells) no tratamento de leucemia mieloide aguda (LMA). **Metodologia:** Trata-se de revisão sistemática da literatura, com seleção de artigos científicos na base de dados PubMed, com a utilização dos descritores: “CAR-T cell AND acute myeloid leukemia”, tendo como critérios de inclusão artigos publicados no último ano. Foi encontrado um total de 18 artigos. Destes, 10 artigos foram incluídos por se adequarem melhor ao tema.

Resultados: Os estudos sugerem que a utilização de CAR-T cell tem grande potencial no tratamento da LMA. Um estudo, em específico, relatou a eficácia da combinação de células com CAR-T em uma menina de 6 anos, que apresentava LMA. Por outro lado, todos os estudos apontaram os efeitos citotóxicos, como a síndrome de liberação de citocinas (CRS), que dificultamos sucesso do tratamento. Além disso, tendo em vista a complexidade da doença, seu poder de evasão do sistema imunológico e do tratamento é alto. Um dos estudos sugeriu necessidade de encontrar um epítipo específico da leucemia que seja expresso de maneira consistente em nível celular individual. Isso porque o direcionamento multi-gênico aumenta os riscos de toxicidade hematológica, mas com provável redução da chance de fuga do tumor.

Discussão: A LMA é uma neoplasia hematopoiética, caracterizada pelo aumento descontrolado de células blásticas mieloides na medula óssea. O curso clínico, o prognóstico e os padrões de progressão dessa doença variam entre os pacientes, dependendo da idade, do histórico genético, do subtipo/fase da doença, características citogenéticas e moleculares e a resposta do paciente à terapia anti-leucêmica inicial. O uso das células-T dos receptores de antígenos quiméricos (CAR-T cells) é uma nova estratégia que tem sido bem-sucedida no tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda

(LLA), no entanto, ainda há um desafio para tratar a LMA: a CRS. Como resposta à expansão dos blastos, que estimulam a secreção de citocinas anti-inflamatórias, a CRS é limitante da resposta imune à terapia com CAR-T cell, pois tais alterações metabólicas apoiam o crescimento e a sobrevivência das células leucêmicas. Uma alternativa viável para melhorar a eficácia dessa imunoterapia seria encontrar um epítipo específico da leucemia, para reduzir ao máximo os efeitos citotóxicos do tratamento em questão.

Conclusão: O desenho e os ensaios de imunoterapia são emergentes contra a LMA, tendo em vista a complexidade e necessidade de contenção da doença. A terapia celular com CAR-T cell vem demonstrando avanços, apesar dos estudos estarem em estágios iniciais. Dessa forma, deve-se dar prosseguimento a novos estudos, para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade ainda presente no tratamento com CAR-T cell.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.707>

706

OBTENÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)

G.L.S. Martins^{a,b}, M.S. Oliveira^{a,b,c}, B.D. Paredes^{a,d}, B.S.F. Souza^{a,b,d}

^a Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC), Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brasil

^b Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brasil

^c Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, BA, Brasil

^d Instituto D'OR Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A anemia falciforme (AF) é uma doença de herança mendeliana de alta prevalência no Brasil. Contudo, ainda não existem tratamentos eficazes para ela, emergindo a necessidade do estudo de novas terapias. Todavia, a obtenção de grandes quantidades de eritrócitos tem dificultado o progresso de pesquisas nessa área. Uma alternativa a isso seria desenvolvimento de eritrócitos a partir de iPSC.

Objetivo: Estabelecer um protocolo de diferenciação de iPSC obtidas de pacientes com AF e doador saudável, para geração de células progenitoras hematopoiéticas.

Método: Duas linhagens de iPSC foram produzidas previamente: EB8C6 (paciente com AF) e EB4C24 (doador saudável). Elas tiveram sua pluripotência validada por marcação anti-TRA-1-60-APC na Citometria de fluxo e, por fim, foram expandidas. Quando a confluência dos poços chegou a 80%, duas diferentes técnicas de diferenciação se sucederam. A primeira delas foi a *Hanging Drop*, na qual as células ficaram em suspensão, vertidas em gotas na tampa de uma placa de Petri. Isso foi realizado com o objetivo de formar corpos embrioides (CE), o próximo estágio da diferenciação hematopoiética. Outra técnica utilizada para geração dessas mesmas estruturas foi empregando placas de 96 poços de fundo em U não aderente. Assim sendo, as iPSC foram colocadas em suspensão

nessas placas e ela foi então centrifugada. Os CE formados por ambos os protocolos foram dissociados e analisados através da expressão de marcadores de células progenitoras hematopoiéticas (CD34 e CD45) na Citometria de fluxo.

Resultados: A pluripotência das iPSC foi confirmada por Citometria de fluxo. A linhagem EB8C6 foi positiva em 97,6% das células analisadas e a linhagem EB4C24 em 80,1%, o anticorpo utilizado foi o anti-TRA-1-60-APC, principal marcador de pluripotência. Com isso, os CE foram gerados, pela técnica *Hanging Drop*, apenas a linhagem EB8C6 e, pela técnica utilizando a placa de 96 poços de fundo em U não aderente, as linhagens EB8C6 e EB4C24. Assim, foi realizada uma Citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD45-APC e anti-CD34-PE, principais marcadores de progenitores hematopoiéticos. Os CE formados do clone EB8C6 através da placa em U não aderente tiveram marcação CD34+e CD45+ em 17% das células analisadas. Os CE da EB4C24, contudo, tiveram marcação CD34+ e CD45+ em 36,4% das células. Através da técnica *Hanging Drop* para a formação de CE, a linhagem EB8C6 foi analisada e apresentou marcação dupla CD34+/CD45+ em 38,9% das células.

Discussão: Esses resultados podem indicar uma formação mais efetiva de CE CD34+/CD45+ através da técnica *Hanging Drop*. Pois, o mesmo tipo celular (EB8C6), que gerou CE pelas duas técnicas analisadas, demonstrou ser mais duplo positivo através da *Hanging Drop*, com 38,9% CD34+/CD45+ e apenas 17% CD34+/CD45+ através da placa em U não aderente.

Conclusão: Por meio desse projeto foi possível estabelecer um protocolo para a diferenciação de iPSC em células progenitoras hematopoiéticas, através da formação de corpos embrioides, tanto pela técnica de *Hanging Drop*, quanto pela técnica da placa em U não aderente. Mais experimentos, no entanto, precisam ser realizados para validar o protocolo e assim possibilitar a formação de hemácias que podem ser usadas para os mais diversos fins terapêuticos, assim como para o teste de drogas para a AF.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.708>

707

OPTIMIZATION OF A PROCESS FOR HIGH-YIELD LENTIVIRAL VECTOR PRODUCTION APPLIED TO CAR-T CELL GENERATION

D.M.C. Fantacini^a, S.C.G. Lima^a, H. Brand^a, L.C. Batista^a, R. Cunha^{b,c}, D.T. Covas^d, L.E.B. Souza^a

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

^b Centro de Terapia Celular (CTC), Advanced Cellular Therapy Laboratory, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of Medical Images, Hematology, and Medical Oncology, Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy Unit, Faculdade de Medicina