

EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSPLANTES DE MEDULA ÓSSEA ENTRE 2010 E 2019 NO BRASIL

AL Schuster, BFB Bassani, ER Farias

Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brasil

Objetivo: O Transplante de Medula Óssea (TMO) consiste na substituição de uma medula óssea doente por células saudáveis de um doador, sendo utilizada no tratamento de doenças hematológicas. O presente trabalho busca descrever as características dos transplantes de medula óssea no Brasil, quanto à distribuição por regiões e procedimentos utilizados. **Material e métodos:** Foi realizado um estudo transversal utilizando a base de dados do Sistema Nacional de Transplantes, durante o mês de junho de 2021, buscando-se dados do período de janeiro de 2010 a dezembro de 2019 referentes ao Transplante de Medula Óssea. Os registros a respeito dos tipos de procedimentos utilizados (autólogo, alogênico aparentado e alogênico não aparentado) começaram a ser documentados na plataforma a partir do ano de 2013. **Resultados:** Os TMO, no Brasil, variaram de 1.695 em 2010 a 3.490 em 2019, totalizando 22.840 procedimentos. A região brasileira com o maior número de transplantes foi a região Sudeste, com 13.317(50,1%), seguida da Sul, 5.005 (26,3%), Nordeste, 3.580 (16,2%), Centro-Oeste, 936(5,3%) e Norte, com 2 (2,1%). Quanto ao tipo de transplante utilizado, temos, por região, autólogos, alogênicos aparentados e alogênicos não aparentados, respectivamente: Sudeste: 5.739, 4.206, 2.387, Sul: 2.364, 868, 578, Nordeste: 2.078, 703, 180, Centro-Oeste: 637, 142, 38 e Norte: 1, 1, 0. **Discussão:** Os TMO aumentaram durante a última década no Brasil. A região Sudeste foi responsável pela maior parte dos procedimentos realizados no país, o oposto da região Norte, que realizou apenas dois em todo o período estudado. Além disso, os transplantes autólogos foram os mais utilizados. **Conclusão:** O TMO constitui-se de um importante procedimento para manejar certas doenças hematológicas. Logo, é fundamental para o sistema de saúde brasileiro que estes procedimentos aumentem cada vez mais, a fim de contemplar mais indivíduos. Além disso, é importante também a continuação do registro dos TMO realizados na plataforma do Sistema Nacional de Transplantes, para ser possível monitorar a progressão deste procedimento no país.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.437>

ESTABLISHMENT OF A CRISPR/CAS9-BASED GENOME EDITING PLATFORM FOR THE GENERATION OF AN OFF-THE-SHELF ALLOGENEIC CAR-T CELL MODEL

SCG Lima^a, H Brand^a, LC Batista^a, DMC Fantacini^a, MGB Coelho^b, FA Castro^b, DT Covas^a, LEB Souza^a

^a Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP),



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

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

Introduction: Chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy has a remarkable clinical success. However, its autologous nature reduces accessibility to the therapy. Thus, one of the next frontiers in the field is to develop an allogeneic, 'off-the-shelf' therapy. This can be achieved by knocking out the T cell receptor (TCR) from CAR-T cells using genome-editing tools to prevent the development of graft versus host disease. In addition, depletion of the human leukocyte antigen I (HLA-I) on the surface of CAR-T cells would dramatically reduce the chance of CAR-T cell rejection by the host immune system. **Objective:** Establish a methodology to produce TCR⁻ and HLA-I⁻ CAR-T cell models by knocking out the TRAC (T Cell Receptor Alpha Constant) and B2M (Beta-2-Microglobulin) genes, respectively, using CRISPR/Cas9 genome editing. **Methods:** We tested four guide RNAs (gRNAs) sequences, two against the TRAC gene (TRAC1 and TRAC2) and other two against the B2M gene (B2M1 and B2M2). The gRNAs sequences were cloned individually into lentiviral vectors upstream the anti-CD19 CAR gene, and the corresponding lentiviral particles were used to transduce Jurkat cells. We used these cells as a model for TCR and HLA depletion after the electroporation of a plasmid for a high-fidelity Cas9 transient expression. **Results:** After transduction, CAR⁺ Jurkat cells were enriched by magnetic selection to obtain homogeneous expression of CAR and gRNAs. We achieved above to 94% of CAR expressing cells for all populations. Next, TRAC/CAR⁺ cells were electroporated with a plasmid encoding Cas9 and GFP using two different media: Solution V and Opti-MEM. After 24h of electroporation in Solution V, Jurkat cells displayed high viability (90%) regardless of the presence of Cas9-GFP plasmid. In Opti-MEM medium, however, electroporation induced high rates of cell death (12.1-16.0% viability). Furthermore, the frequency of GFP⁺ cells after electroporation in Opti-MEM was 1.6-fold (TRAC1) and 1.9-fold (TRAC2) lower compared to Solution V. To evaluate the efficiency of TRAC gRNAs in depleting the TCR, electroporated cells in Solution V were analyzed after 1, 3 and 8 days for CD3 expression. Notably, TRAC gRNA 1 led to a remarkable reduction in the frequency of CD3⁺ cells (from 91.6 to 7.41%). In contrast, this reduction was less pronounced for TRAC gRNA 2 (decrease of 21.8%). For the B2M gRNAs analysis, we electroporated the corresponding Jurkat cells in Solution V and observed similar transfection efficiency compared to TRAC/CAR⁺ cells in the same media (60% of GFP⁺ cells). In addition, the B2M gRNAs efficiency was evaluated by HLA-I immunolabeling, and we observed a change in the frequency of HLA-I⁺ cells only for the gRNA 2, with a reduction of 51.9% 8 days post electroporation. Finally, we confirmed the superior editing performance of TRAC1 and B2M2 gRNAs through the T7 endonuclease 1 assay. **Conclusion:** These data demonstrate the feasibility of TCR and HLA-I depletion by knocking out the TRAC and B2M genes using CRISPR/Cas9 and establish the best gRNA sequences for this purpose, paving the groundwork for the generation of a platform to produce off-the-shelf allogeneic CAR-T cells. **Funding:**



FAPESP (2013/08135-2, 2019/18672-1, 2019/18702-8 and 2020/02043-2) and CNPq (442484/2020-8).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.438>

ESTRUTURAÇÃO DE UMA PLATAFORMA BRASILEIRA DE MANUFATURA DE PRODUTO CELULAR AVANÇADO PARA USO EM CENÁRIO CLÍNICO

SR Caruso^a, TR Fernandes^a, RMF Bolzoni^a, A Mizukami^a, MSA Neto^a, PVB Palma^a, CCO Bonaldo^a, MD Orellana^a, DT Covas^{a,b}, RLG Cunha^{a,b}, GC Santis^a

^a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

O Hemocentro de Ribeirão Preto possui longa experiência na manufatura de células em Terapia Celular, através de uma infraestrutura com padrão de boas práticas que segue os critérios exigidos pela regulamentação brasileira. Recentemente, o Hemocentro expandiu seu foco para a produção de células T geneticamente modificadas (células CAR-T), através da validação do processo de manufatura de células CAR-T anti-CD19. **Objetivo:** Demonstrar a estruturação e validação de uma plataforma brasileira para a manufatura de células CAR-T anti-CD19 no cenário brasileiro. **Material e métodos:** Para a estruturação da plataforma, uma linha de cuidados foi estabelecida em 04 etapas de acordo com o processo de manufatura. A etapa um, consistiu na coleta de leucócitos totais em sangue periférico por procedimento de aférese seguida de isolamento das células mononucleares (CMN) por meio de Ficoll Hypaque e, posteriormente, congeladas para permanência em estoque até o momento do processamento. Na etapa dois, as CMN foram descongeladas para a depleção de monócitos após o qual, as células-T foram ativadas por meio de Dynabeads CD3/CD28. Na etapa três (24 horas após a etapa dois), as células-T foram transduzidas com vetor lentiviral e expandidas em meio AIMV (com 5% de soro humano AB e IL-2) por aproximadamente 8 a 11 dias. A última etapa, consistiu na execução dos seguintes testes de liberação e controle de qualidade: identidade/pureza, teste funcional/potência, análise microbiológica, análise do nível de endotoxinas bacterianas, teste para detecção de Mycoplasma, análise citogenética, viabilidade e contagem de beads residuais. **Resultados:** Até o momento, foram produzidos 11 lotes de células CAR-T que foram expandidas até atingir a dose mínima de 1,0 x 10⁶ CAR-T/kg de peso do paciente e, após criopreservadas em bolsas. A mediana do perfil imunofenotípico dos 11 lotes de células CAR-T produzidos foi CD3 94,25%, CD4 38,1%, CD8 56,82%, CD16/56 2%, CD45/14 0,2%, CD19 0,2% e a % de CAR-CD19+ 35,8%. Em todos os lotes de células CAR-T produzidas houve lise das células alvos CD19+ evidenciado através de teste de potência. Os ensaios de liberação e do controle de qualidade da etapa 04 mostraram-se todos



adequados para qualificar o produto final como apto para o uso clínico. Os lotes de células CAR-T apresentaram uma mediana de viabilidade de 91,81%. A contagem de beads residuais em todos os lotes foi inferior a 100 beads para cada 3x10⁶ células. **Discussão:** Todos os lotes de células CAR-T CD19+ apresentaram-se com perfil imunofenotípico, atividade funcional, ensaios de controle de qualidade e com critérios de aceitação adequados dentro dos padrões GMP e da RDC ANVISA 508 de 2021. Dentre os 11 lotes produzidos, três foram utilizados em cenário clínico em tratamento passivo de pacientes portadores de linfoma não-hodgkin de células B com níveis aceitáveis de toxicidade pós-infusão. **Conclusão:** A plataforma de manufatura de células CAR-T desenvolvida em Ribeirão Preto mostrou-se viável, segura e adequada para uso clínico em cenário brasileiro. O desenvolvimento de uma estrutura nacional tem o potencial de impactar o avanço científico da terapia celular avançada brasileira e, além disso, permitir maior acesso dos pacientes a esta terapia que é reconhecidamente de altíssimo custo.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.439>

EXPERIÊNCIA COM REGIMES DE CONDICIONAMENTO SUGERIDOS PELO GRUPO DE ESTUDOS DE LEUCEMIA MIELOÍDE AGUDA INFANTIL (GELMAI)

CNM Breviglieri, RV Gouveia, VC Ginani, CMCZ Oliveira, LDS Domingues, MGM Alves, G Zamperlini, PAM Soriano, JF Marques, A Seber

Equipe Onco-TMO em Pediatria, Hospital Samaritano de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A sobrevida das crianças com LMA submetidas a TCTH no Brasil entre 2008 e 2012 foi de 47%. O GELMAI está iniciando protocolo prospectivo com indução com baixas doses de quimioterapia para reduzir a mortalidade precoce. TCTH será indicado segundo características citogenéticas/moleculares e resposta da doença aos dois primeiros ciclos indutórios. **Objetivo:** Descrever a experiência do nosso grupo com as estratégias de TCTH adotadas pelo protocolo GELMAI. **Método:** Os regimes de condicionamento e a profilaxia de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) seguiram orientações do protocolo. A sobrevida foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. **Resultados:** Entre 2016 e 2021, 11 crianças com LMA foram transplantadas com os regimes de condicionamento recomendados no GELMAI, 4 meninas e mediana de idade de 3 anos. A mediana do tempo do diagnóstico da LMA para o TCTH foi de 162 dias, e da indicação do TCTH até sua realização foi de 60 dias. Ao TCTH, 5 tinham doença refratária, 4 estavam em 2ª remissão e 2 em 1ª remissão. A maior parte dos TCTH foram haploidênticos (82%). Cinco foram condicionados com FLAMSA (45%) e 5 com busulfano, fludarabina e melfalano (45%) e um com busulfano, ciclofosfamida e melfalano (9%). Seis pacientes receberam células hematopoiéticas de medula óssea (54%). Todos receberam a profilaxia de DECH prevista pelo protocolo. Todos tiveram enxertia. Cinco crianças (46%) receberam infusão de linfócitos do doador (DLI)

