

a new lentiviral vector by cloning the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene downstream the anti-CD19 CAR gene. Lentiviral particles carrying the new construct were used to transduce primary T cells for CAR-T cell generation. FC analysis after transduction demonstrated that 44.8% of cells expressed CAR on the surface and that all CAR+ cells were also EGFP+, confirming the functionality of the new vector. Notably, the median fluorescence intensity of EGFP was 3.8-fold higher than that of CAR stained with an Alexa 647-conjugated antibody, even though this fluorophore has a high brightness index of 4. Thus, through EGFP fluorescence, this new construct allows direct CAR-T cell tracking by FC with a higher sensitivity compared to antibody staining. We next assessed the cytotoxicity of CAR19/GFP cells by coculturing them with Deep Red stained tumor cell lines either CD19+ (RAJI) or CD19- (K562) at a 1:1 effector to target ratio. After 16h of co-culture, FC data showed that CAR19/GFP cells eradicated 47% of CD19+ tumoral cells while sparing CD19- tumor cells, demonstrating that the CAR codified by this new vector is functional and CD19-specific. Lastly, we developed a CAR detection protocol based on qPCR. To that end, we designed a pair of specific primers and a probe spanning the costimulatory 4-1BB and CD3 ζ domains of our anti-CD19 CAR. This primer/probe set was used to successfully detect CAR copies by qPCR in a plasmid standard curve ranging from 10^{10} to 1 CAR copy. This high sensitivity was accompanied by a high linearity ($R^2=0.99$) and amplification efficiency (99.7%). To simulate a molecular test for CAR-T cell detection, we added 100 ng of genomic DNA to each point of the standard curve. This led to a slight reduction of sensitivity, allowing detection of at least 10^3 CAR copies ($R^2=0.99$; amplification efficiency = 106.8%). Combined, this data demonstrates the generation of a fully functional CAR/EGFP reporter vector and the establishment of a protocol for molecular detection of CAR-T cells with high sensitivity by qPCR. This CAR-T cell-monitoring platform will provide invaluable data in preclinical and clinical studies on CAR-T cell persistence, a parameter intrinsically linked to therapeutic efficacy. **Support:** FAPESP grants 2013/08135-2, 2019/18672-1 and 2019/18702-8.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.701>

700

EMPREGO DE UM SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO PARA O ISOLAMENTO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

M.A.D.S. Souza^a, J.A.R. Fracasso^b, L.F. Marques^c, M.J. Malagutti-Ferreira^a, F. Freddi-Rodriguez^a, J.T. Ribeiro-Paes^c

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

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

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

O emprego de células estromais mesenquimais (MSC) tem sido considerado como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. Neste contexto, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes de MSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de MSC, entre as quais vale ressaltar a abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e diferenciação multipotencial (osteócitos, condrócitos e adipócitos). Em função destes aspectos, as células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) têm adquirido um papel relevante para a medicina regenerativa e translacional. Ao longo dos anos um grande número de variantes metodológicas têm sido propostas para isolamento e proliferação de ADSC. Mais recentemente têm sido testados diversos sistemas automatizados e semiautomatizados de diferentes fabricantes para isolamento da SVF e posterior proliferação das ADSC. Neste contexto, pretendeu-se com este projeto realizar uma análise comparativa quanto à eficiência e capacidade proliferativa de ADSC, empregando-se a metodologia convencional ou clássica e metodologia semiautomatizada usando o aparato Kiso Processor, (Keai Bioresearch Inc., Vancouver, Canadá). Foram, também, realizadas análises comparativas quanto à viabilidade, proliferação celular e manutenção dos atributos celulares das ADSC resultantes dos procedimentos de obtenção por convencional e semiautomatizada. Além disso, foram feitas análises qualitativas quanto à capacidade de diferenciação das ADSC in vitro, bem como, empregou-se, também, citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica, para determinação quantitativa de marcadores antigênicos de superfície (CD) nas células cultivadas até a 5ª passagem. Os resultados permitiram estabelecer um protocolo eficiente e reproduzível para extração e proliferação de ADSC para o método semiautomatizado. Este sistema também apresentou, em relação à metodologia convencional, uma redução significativa no tempo de isolamento da fração estromal vascular, bem como menor manipulação das amostras, por ser um sistema fechado e, consequentemente, apresenta, potencialmente, menos risco de contaminação das amostras. Tanto nos sistemas convencional quanto no semiautomatizado foram mantidos os atributos celulares, como marcadores de superfície característicos de MSC e capacidade de diferenciação in vitro, permitindo a validação da natureza mesenquimal das células obtidas pelos dois métodos de isolamento. Não se obteve, no entanto, diferença quanto à viabilidade e capacidade proliferativa das ADSC entre convencional e semiautomatizado. Apesar das citadas vantagens apresentadas pelo sistema semiautomatizado, a partir dos resultados obtidos não foi possível validar a hipótese formulada e que orientou o desenvolvimento deste projeto, qual seja, que o sistema semiautomatizado (Kiso), representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional no que concerne a maior viabilidade e potencial proliferativo das ADSC.



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-