

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

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

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy is a new approach for treatment of cancer. Production of CAR-T cells requires several carefully performed steps and consistent production of optimal viral vectors is a critical step to ensure efficient gene modification of lymphocytes. Optimizing the production of vectors for CAR-T cell transduction before beginning large-scale manufacturing reduces variability and maximizes efficiency. Here, we demonstrated that an improvement in lentiviral production can be achieved by optimizing parameters such as serum-free media for lentivirus (LV) harvesting, PEI formulations, DNA amount, PEI:DNA ratios and producer cell lines. Initially, we evaluated the LV titers harvesting in different media: TexMACS™, X-VIVO™10, FreeStyle™ and DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Our hypothesis was that collecting LV particles in a medium optimized for T-cell growth, such as TexMACS and X-VIVO 10, would improve transduction efficiencies. In addition, we included DMEM 10% FBS and FreeStyle media which are commonly used for viral production for comparison. For this purpose, HEK293/T17 cells were transfected with lipofectamine and viral titers were measured by flow cytometry. Among the media tested, harvesting in TexMACS and DMEM 10% FBS yielded the highest viral titers (4×10^6 transducing units per mL or TU/mL). Next, we compared the three most used DNA-delivery methods: calcium phosphate precipitation, cationic lipids (Lipofectamine™) and polycations (linear PEI 25 KDa, PEIPro and PEI JetOptimus). The resulting LV titers were compared to that obtained with lipofectamine-based transfection. The infectious titers obtained from calcium phosphate transfection method were the lowest among the tested methods. In addition, viral titers were decreased as the amount of PEI was increased. We found that among the PEI formulations, transfection with PEI JetOptimus resulted in the highest LV titers. The yields were further increased when the DNA amount was reduced to 104 ng/cm^2 and the producer cell line was changed to LentiX-293T ($1.32 \times 10^7 \pm 0.13 \times 10^7$ TU/mL). Viral titer resulting of lipofectamine-based transfection in the same conditions was equivalent ($1.29 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^6$ IU/mL). Finally, we evaluated if these tested variables in producing LV particles would affect transduction efficiency. To that end, we generated CAR-T cells by transducing human T-cells with LV particles harvested in TexMACs medium after transfection with Lipofectamine (L-TEX group) or PEI JetOptimus (PJ-TEX group). LV produced by Lipofectamine transfection and harvested in DMEM 10% FBS (L-DMEM group) were used as controls. Quantification of CAR-T cells by flow cytometry demonstrated that transduction with both LV supernatants produced in serum-free medium (L-TEX and PJ-TEX) more than doubled the frequency of CAR+ cells compared to the L-DMEM condition (L-DMEM = $30.77 \pm 0.04\%$, L-TEX = $76.01 \pm 0.25\%$, PJ-TEX = $73.54 \pm 1.05\%$ CAR+cells). In addition to bringing practical solutions in the improvement of LV vector production, this work serves as a stepping stone for newcomers in the field as it highlights the

critical variables needed to establish a cost-effective production process of LV vectors for research and early clinical studies on CAR-T cells. **Funding:** FAPESP (2013/08135-2, 2019/18672-1, 2019/18702-8 and 2020/02043-2); CNPq (465539/2014-9).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.709>

708

OPTIMIZING INTRACELLULAR SIGNALING DOMAINS FOR CAR-NK CELLS



J.T.C. Azevedo^a, R.N. Silvestre^a, A.M. Personi^b, K.C.R. Malmegrim^{a,c}, D.T. Covas^{a,d}, V. Picanço-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 Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

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

^d Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Immune system cells have been used for cancer treatment in recent years. T-cells genetically modified with a chimeric antigen receptor (CAR) has shown promising clinical results for leukemias and lymphomas. However, some adverse effects associated to CAR-T cells have been described and many efforts have been made to improve alternative strategies for cancer treatment. Studies with natural killer cells (NK) expressing CAR (CAR-NK) have shown exciting results with reduced adverse effects associated. Nevertheless, limitations still exist, such as decreased cell proliferation in vitro and in vivo and low expression of CAR vector. Strategies focusing on the development of specific CAR molecules for NK cells may generate CAR-NK cells with greater capacity for proliferation, activation, cytokine secretion and cytolytic activity, resulting in greater therapeutic efficacy. The aim of this study is to develop a new combinations of CAR intracellular domains and to improve CAR-NK signaling and cytotoxicity functions. **Methods:** Lentiviral vectors containing CARs composed of an extracellular single-chain variable fragment (scFv) anti-CD19 followed by different combination of co-receptors and cytokines involved to activation of NK cells were designed to generate CAR-NK cells. Conformational protein analysis was performed to confirm the potential functionality of CARs. **Results and discussions:** Although CAR-T cells strategies in NK cells are effective, initiation of signal transduction in NK cells can involve different pathways and diverge significantly from T cells. Therefore, the systematic application of CAR-T-cell strategies in NK cells might not

be an optimized strategy for NK cells. For the improvement of CAR-NK cells we developed three new vectors containing CD3z or DAP12 as stimulatory domain and 4-1BB or 2B4 as co-stimulatory domain. In addition, all vectors contain the interleukin 15: 1) CD19.CAR-41BB-DAP12-IL15; 2) CD19.CAR-2B4-CD3z-IL15; 3) CD19.CAR-2B4-DAP12-IL15. **Conclusion:** The results of this work may help to establish a good condition for CAR-NK transduction and expansion, as well the development of strategies to improve the persistence of CAR-NK in vivo, what is extremely important for improvement of protocols for cancer therapy in the future. The next steps include the transduction of primary NK and NK cell line with different vectors and the expansion analysis of each CAR-NK cell in vitro. Lastly, the therapeutic effectiveness of these cells will be evaluated in vitro and in vivo. Financially supported by the FAPESP 2019/25309-0, CTC Center for Cell-based Therapies (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.2020.10.710>

709

REVISÃO DE LITERATURA: USO DE TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DE IAM

E.Y.K. Ueda, A.S.N. Jessourun, F.R. Almeida, L.B.F. Oliveira, M.S.L. Conceição, P.A.D. Nascimento, L.A. Silva

Fundação Técnico Educacional Souza Marques, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Objetivo: Este estudo teve como objetivo analisar a produção científica acerca do uso da Terapia Celular como tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio entre 2014 e 2019, melhor conduta em relação aos possíveis tipos de células a serem usadas, das possíveis limitações desse tipo de tratamento e sua efetividade como alternativa terapêutica. **Materiais e métodos:** Foram reunidos 11 artigos, publicados de 2004 a 2019, em português e inglês. Nesta revisão sistemática da literatura, as base de dados utilizadas foram: Pubmed e Scielo, além de buscas manuais em periódicos da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da utilização do método snow-balling. **Resultados:** Os estudos sobre IAM em relação a terapia celular mostra que há eficácia e segurança. O uso de células-tronco adultas são mais utilizadas por ter um potencial de transformação mais promissora que a células tronco embrionárias. Associando o tratamento convencional ao uso de células mononucleares autólogas da medula óssea, foi verificado que a região infartada reduziu de forma significativa, além de demonstrar melhora no débito cardíaco, no volume sistólico final do ventrículo esquerdo, na contratilidade miocárdica e na perfusão da região infartada. Os demais estudos que receberam células tronco derivadas da medula óssea e células progenitoras circulantes demonstraram surtir efeitos igualmente positivos. As células-tronco mesenquimais (CTM) têm potencial imunomodulatório. As CTMs são consideradas seguras e eficientes para a melhoria da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Os estudos com mioblastos esqueléticos, ajudam a reduzir a fibrose miocárdica, atenuar o remodela-

mento do ventrículo e refinar o desempenho do miocárdio. Porém, aumentam a incidência de arritmias ventriculares. As células tronco cardíacas residentes foram usadas em estudos apresentando a formação de cardiomiócitos e células vasculares, gerando uma melhora na função sistólica. **Discussão:** De acordo com os resultados, encontramos indícios de que as técnicas que utilizam células autólogas de medula óssea, células mononucleares alogênicas e células tronco embrionárias são as mais promissoras e merecem estudos comparativos para elucidar com mais detalhes a eficácia de cada uma. **Conclusão:** As células-tronco se mostram como uma alternativa para restauração do tecido miocárdico danificado, evitando assim comorbidades que poderiam gerar um pior prognóstico para o paciente. Algumas barreiras como: pouca disponibilidade de células, a questão ética e a necessidade de um atendimento multidisciplinar podem dificultar os avanços nessa terapia. Entretanto, há um vislumbre do futuro com o uso das células-tronco, se encaminhando para resultados promissores e benéficos em pacientes com prognósticos reservados.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.711>

710

SUBSTITUIÇÃO DE MEIO DE CULTURA CELULAR POR HIDROXIETILAMIDO NA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA PARA CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS NO TRANSPLANTE AUTÓLOGO

T.S. Lima, G.C. Silva, T.L. Pereira, R.M. Melo, F.L. Costa, A.S.C.P. Campos, A. Maiolino, R. Schaffel, H.S. Dutra

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Objetivo: O transplante autólogo de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico (CPHSP) requer, na maioria das vezes, uma etapa de criopreservação celular. Diversas soluções crioprotetoras foram definidas para uso neste processo. O protocolo usado em nossa instituição foi padronizado com meio de cultura celular e DMSO (MC-D), entretanto, com a disponibilidade de soluções substitutivas para o meio de cultura e aprovadas para uso em humanos, estabelecemos novo protocolo de preparo da solução crioprotetora. O hidroxietilamido (HES – hidroxyethyl starch) em mistura com o DMSO (HES-D) foi utilizado para atender a substituição do meio de cultura celular com DMSO. Este trabalho teve como objetivo comparar e avaliar as variáveis dos testes de qualidade das CPHSP (viabilidade celular e ensaio de proliferação) criopreservadas com duas soluções crioprotetoras a fim de atestar a mudança de protocolo com garantia de qualidade. **Metodologia:** Realizou-se o levantamento no histórico de 36 pacientes, que tiveram seu congelamento de CPHSP entre 2018 e 2020. Foram criopreservados 20 produtos de leucáfêreses com 50% do volume final usando a solução crioprotetora MC-D e 23 produtos com 50% de HES-D. A estocagem dos produtos foi em nitrogênio líquido. Após o descongelamento analisamos a viabilidade celular, por microscopia ótica usando o corante Trypan-Blue e o crescimento celular dos progenitores hematopoéticos através do ensaio clonogênico. A taxa