

realizada com o equipamento de aférese Spectra Optia. Cinco desses pacientes alcançaram o alvo de 2×10^6 CD34+ células/kg em apenas um dia de coleta, sendo que a média infundida de células CD34+ foi $3,5 \times 10^6$ /kg ($2,4 - 5,6 \times 10^6$ /kg). Três pacientes utilizaram o protocolo de condicionamento com Melfalano 200 mg/m², enquanto o restante utilizou 140 mg/m², devido à idade. A infusão a fresco ocorreu dentro 48h da coleta das CTH em cinco dos oito pacientes. O tempo médio de internação foi de 16,5 dias e a pega da medula ocorreu em 10,1 dias, em média. As complicações mais frequentes decorrentes do procedimento foram a mucosite (grau 1, n = 2; grau 2, n = 4; grau 3, n = 1; CTCAE v5.0), neutropenia febril (grau 3, n = 8; CTCAE v5.0) e diarreia (grau 1, n = 5, grau 2, n = 3; CTCAE v5.0). Um paciente apresentou choque séptico, sendo transferido à unidade de terapia intensiva, com recuperação e retorno à unidade de internação em 4 dias. **Discussão:** Os dados dos primeiros oito pacientes que realizaram TCTH autólogo até o momento demonstram que o procedimento foi bem sucedido, com resultados similares aos demonstrados na literatura. **Conclusão:** O protocolo de TCTH autólogo utilizado no HNSC apresenta bons resultados, com baixa morbidade e sem nenhum caso de morte relacionada, auxiliando pacientes com mieloma múltiplo usuários do SUS.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.529>

USO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULA TRONCO NA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

JM Azanha, SSA Nishio, PL Silva, ALV Rocha, CA Carnetta, TS Pinto, MA Golim, E Deffune

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

O uso de meio condicionado, secretoma, de células tronco tem se consolidado como uma ferramenta promissora e eficaz para uma gama importante de aplicações. A produção de anticorpos monoclonais murino baseado na tecnologia hibridoma, utiliza na fase inicial, camadas de células alimentadoras, as denominadas *feeders cells* como adjuvante na produção de um meio promotor da cicatrização da membrana celular e promotora de crescimento dos híbridos recém-criados. A limitação deste tipo de técnica, tem sido cada vez mais, o número de animais de baixa idade (15-20 dias) de vida, sacrificados para se obter o timo. Diante disto, e do alto custo de meios xeno-free no mercado, este projeto se propôs a avaliar a contribuição de meio condicionado obtido de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo murino (MC-CT_{tam}) na efetividade da fusão celular comparando com método clássico (*feeder cells*). A obtenção do MC-CT_{tam} foi realizada a partir da obtenção de fragmento de tecido adiposo (1 g) da prega inguinal de camundongos Balb-C (3 animais). A amostra de tecido foi digerida por collagenase tipo I e procedido o plaqueamento e cultura na presença de DMEM-F12 aditivado. As células foram expandidas até se obter 2×10^7 células/mL entre segunda e quarta passagens. As CTM foram caracterizadas por citometria de fluxo utilizando FACS Calibur e software Cell Quest Pro com painel de CD11b, CD45, CD34, CD73 e CD90.

Foi procedida a diferenciação em trilhaagem (adipocítica, osteogênica e condrogênica) para comprovação do perfil de CTM. Após a caracterização, CTM_{tam} foram expandidas em cultura, tendo sido realizado wash out para remoção de resquícios de vermelho fenol e de soro fetal bovino. Após isto, 2×10^7 células foram plaqueadas em frascos T-25 cm² e mantidos em condições ótimas de cultura por 48 horas, a partir do qual o MC-CTM_{tam} foi coletado e submetido à dupla centrifugação: baixa rotação e ultra centrifugação a 100.00 g. As *feeders cells* controle (timócitos de camundongos recém-nascidos) foram obtidos após timectomia e dissociação mecânica do timo. Após 48 horas da fusão celular, os protocolos foram executados com cada um dos aditivos e observado o aspecto da cultura e a identificação de híbridos secretores de imunoglobulinas. No protocolo clássico (controle) foram gerados 1300 híbridos com uma eficiência de fusão de 33, 61% e naquele usando MCCT_{tam} outras 1400 células com uma taxa de 69,71%. O meio condicionado obtido de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo murino (MC-CT_{tam}) se mostrou efetivo como aditivo de fusão celular quando comparado com método clássico (*feeder cells*). O MC-CT_{tam} deve despontar como produto de base tecnológica, como substituto de células do timo de camundongos recém-nascidos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.530>

COLÍRIO DE SORO AUTÓLOGO E OS NOVOS HORIZONTES DA TERAPIA

ALV Rocha, PL Silva, CA Carnetta, PC Frizarini, AM Prudenciatti, AI Shiguematsu, E Deffune

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

A Síndrome do Olho Seco é uma doença multifatorial das lágrimas e da superfície ocular que resulta em desconforto, distúrbios visuais e instabilidade do filme lacrimal e pode ter grande impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. A abordagem terapêutica com soro autólogo tem sido preconizada desde 1986, deste modo, com respaldo em nota técnica sobre produção de colírio liberada pela Anvisa, o reconhecimento da terapia no Conselho Federal de Medicina, foi realizado estudo de logística de implantação de negócio e viabilização da terapia com soro autólogo para a produção de alta qualidade em parceria com startup já estabelecida. A primeira etapa para validação de mercado para a terapia consistiu em um mapeamento de mercado para implantação de Mínimo Produto Viável (MVP) já validado por pesquisa científica, produtos com atividade biológica para a saúde humana. Foram identificados 177 serviços/clínicas/consultórios de oftalmologia na região de Botucatu, sendo que 90 clínicas/profissionais entrevistados, 27 estabeleceram contrato para futura prestação de serviços, correspondendo a 30% dos visitados e 15,2% do total de clínicas. O paciente com indicação para uso da terapia é orientado pelo médico oftalmologista que preenche o Formulário de Solicitação (carta de intenção) e protocolo de utilização do colírio de soro autólogo com as devidas exigências da análise sorológica para doenças transmissíveis pelo sangue (Hepatites B e C, HIV, HTLV/II e

Chagas). Para a execução plena da proposta, foi realizado credenciamento de Laboratório para Coleta das amostras. O protocolo de produção do colírio foi validado pelo Laboratório de Biologia Celular de Botucatu (Laboratório de Biotecnologia Aplicada - LBA) desde 2007. Todos os lotes são liberados após aprovação no Controle de Qualidade, envolvendo análise de conteúdo com teste microbiológico e de rotulagem com todas informações necessárias. Neste período de implantação da terapia para novos pacientes, foram registradas apenas duas observações/queixa, uma não foi justificada e o tratamento foi mantido e outra, na qual houve suspensão do tratamento. Quando aplicado questionário de satisfação para médicos, notou-se total satisfação em recomendar a terapia e significativa melhora do quadro clínico dos pacientes. Já a pesquisa de satisfação dos pacientes aponta que há uma boa adesão ao tratamento, efetivo e imediato alívio dos sintomas causados pela Síndrome do Olho Seco. As perspectivas futuras do tratamento com colírio de soro autólogo envolvem melhoria do produto e uma expansão de mercado para diversas regiões do país.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.531>

ALL-IN-ONE VIRUS-FREE MANUFACTURING PROCESS OF ALLOGENEIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) T CELLS USING CRISPR/CAS9

SCG Lima^a, D Cappabianca^b, MH Forsberg^b, C Capitini^b, DT Covas^a, K Saha^b, LEB Souza^a

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

^b University of Wisconsin-Madison, Madison, United States

Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy has emerged as a promising therapeutic opportunity against blood cancers, leading to the six FDA-approved CAR T cell products. All commercially available products are produced following an autologous strategy, which represents a bottleneck for the widespread adoption of this technology due to the poor quality and quantity of patients' T cells. Allogeneic T cells from healthy donors are an excellent alternative over the autologous ones, allowing the production of a ready-to-use therapy besides additional benefits, such as standardization of the final product, cost reduction through manufacturing scale-up, and the possibility of multiple genetic modifications. Safety concerns related to the use of cells from third-party donors can be easily eliminated through T cell receptor (TCR) knock-out with the demonstrated prevention of graft-versus-host disease development. Here we describe CRISPR/Cas9 editing for TRAC (T Cell Receptor Alpha Constant)-targeted genomic integration of the CAR transgene and the consequent TCR knock-out in a fast and efficient virus-free manufacturing process. For the CRISPR/Cas9-mediated knock-in, we designed a plasmid containing the second-generation anti-CD19 CAR flanked by arms homologous to the desired cut site. This sequence was PCR amplified and purified, resulting in a highly concentrated double-stranded DNA (dsDNA)

template for the homology-directed repair (HDR). Human T cells isolated from healthy donors were electroporated with the dsDNA-HDR templates (dsDNA-HDRT) and Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) targeting the human TRAC locus. Cells were assayed on days 5 and 11 post-electroporation for CAR expression and killing efficiency, respectively. A mCherry transgene flanked by the same homology arms was also included as a control. Preliminary studies using the mCherry dsDNA-HDRT indicated a 1.2-fold improvement in the editing efficiency by adding the positively charged polymer poly-L-glutamic acid (40 µg) that binds to RNPs and reduces aggregates. Additionally, by culturing the electroporated cells with varying concentrations of an NHEJ inhibitor, we observed a 1.4 to 2-fold increase in mCherry knock-in, suggesting a favorable condition for the HDR. Based on the established optimized conditions, we electroporated T cells with the CAR dsDNA-HDRT (3.1 kb length, 6 µg) and got 88% of CAR+ cells five days after electroporation. The viability was 27% on day 3 and reached about 60% on day 7. On-target CAR gene integration was confirmed through an "in-out" PCR assay on the genomic DNA using primers specific to the TRAC locus and CAR transmembrane domain. We then analyzed the in vitro cytotoxicity of CAR T cells by coculturing them with GFP-expressing tumor cell lines. Complete growth inhibition of the RS4-11 cells (CD19+) was achieved at the 5:1, 10:1, and 50:1 effector-to-target ratios. For the K562 cells (CD19-), conversely, the killing activity was related to the T cells themselves since CAR expression did not further decrease the tumor cell number. These results demonstrate robust cytotoxic function and target specificity of the CAR T cell products. Combined, the data provide a proof-of-concept for the virus-free manufacturing process of allogeneic anti-CD19 CAR T cells, enabling CAR knock-in and TCR knock-out in an all-in-one strategy.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.532>

FATORES ASSOCIADOS À MOBILIZAÇÃO POBRE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS PARA TRANSPLANTE AUTÓLOGO EM PACIENTES COM LINFOMAS E MIELOMA MÚLTIPLO

AA Barroso^a, PB Martins^a, RMA Passos^{a,b}, LLM Perobelli^a, V Calsavara^a, CA Neto^{b,c}

^a Hospital de Transplantes Eurýclides de Jesus Zerbini - Hospital Brigadeiro, São Paulo, SP, Brasil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

^c Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução: A contagem de células CD34+ no sangue periférico (SP) pré-leucafêrese é um parâmetro para prever o sucesso na mobilização e coleta de células tronco hematopoéticas (CTH). Para uma coleta bem-sucedida, mínima de 2×10^6 CD34+/kg, geralmente é necessária uma contagem de CD34+ no SP do quarto dia (D4) $\geq 10/\mu\text{L}$. **Objetivo:** Analisar