

CPHSP via CVC. No dia da coleta, o doador é internado no Hospital DFSTAR em Brasília para passagem do dispositivo à beira leito, em acesso femoral guiado por ultrassonografia pela equipe médica radiointervencionista. A coleta de CPHSP é realizada conforme o protocolo do GSH, objetivando o alvo de CD34+ determinado pelo centro de transplante solicitante e após o resultado do produto coletado, o CVC é retirado e o doador recebe alta. O acompanhamento pós-coleta é realizado pelo REDOME. **Resultados:** No período estudado foram realizadas 25 coletas em 25 doadores via CVC. A média de idade dos doadores foi de 32,08 anos, sendo 13 doadores do sexo feminino (54,16%). A média de volemia de sangue total processada foi de 3,4 e tempo máximo de procedimento de 330 minutos. A dose média coletada de CD34 foi de $16,45 \times 106/\text{Kg}$ do receptor e não foi necessário 2º dia de coleta em nenhum doador. Quanto as reações adversas, um doador apresentou sintomas de hipocalcemia e sinal de Trousseau revertido com redução do fluxo de extração e aumento da velocidade de reposição do cálcio. Não ocorreram reações adversas graves. O acompanhamento pós-doação foi realizado com 23 doadores por contato telefônico para avaliação clínica geral e estudo de hemograma do 7º e 30º dia pós-coleta. Neste acompanhamento, um dos doadores relatou hematoma no local do cateter com resolução espontânea e uma doadora apresentou cefaléia de média intensidade e dor em MMII prolongada sendo encaminhada para acompanhamento médico na UBS, não sendo possível associação com a doação. Não houveram outras queixas. **Discussão:** A passagem do CVC amplia a elegibilidade do doador para coleta CPHSP subtraindo barreiras que, frente a necessidade do receptor, gera grande impacto no atendimento. A participação da equipe especializada para a implantação do dispositivo em ambiente apropriado, com estrutura e suporte necessário são diferenciais para garantia da segurança do procedimento. **Conclusão:** A coleta de CPH alogênica por aférese via CVC apresentou boa eficácia e baixo risco de eventos adversos graves.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.941>

PRODUCTION OF ANTI-CD19 CAR T CELLS USING DNA-LOADED IONIZABLE LIPID NANOPARTICLES

PHDM Prazere^a, HAS Ferreira^b, PAC Costa^b, AK Santos^c, WN Silva^a, AP Sabino^d, PPG Guimarães^a

^a Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Yale School of Medicine, New Haven, Estados Unidos

^d Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Introduction: CAR T cell immunotherapy represents a major breakthrough in treatment of hematological tumors. Its manufacture is based on the *ex vivo* manipulation of human lymphocytes, which are later reinfused to the patient. New methodologies for the generation of CAR T cells are needed, with a focus on reducing the *ex vivo* manipulation period as well as preventing adverse effects. Here, we produced CAR T cells using DNA-loaded Lipid Nanoparticles (LNPs), assessing the expression anti-CD19 CAR as well as activation of effector cells and specific killing of tumor cells. **Methods:** To assess the transfection efficiency of LNPs, Jurkat cells were transfected with an LNP encapsulating a pDNA for a second-generation CAR targeting CD19 (LNP-CAR). Activation of transfected Jurkat cells was evaluated by coplating CAR expressing cells with Raji cells for 24 hours at a 1:1 ratio or at different ratios and measuring the expression levels of CD69 in CAR+ cells. Primary human T-cells isolated from healthy donors were transfected with the optimized LNP and coplated with Raji cells to evaluate specific killing by flow cytometry. **Results:** A peak of CAR+ cells was observed 3 days after transfection, which diminished overtime, indicating the transient expression of CAR in these cells. A screening of LNP-CAR using Jurkat as a model identified an optimized formulation for the transfection of T-cells (LNP-9-CAR). We observed, by evaluating the expression of CD69 in CAR+ cells, that the activation of Jurkat cells transfected with LNP-9-CAR was dependent on the effector-to-target ratio. Primary T lymphocytes transfected with our optimized LNP-9-CAR were effective in killing CD19+ Raji cells also in a ratio-dependent manner. **Conclusion:** We developed an LNP platform for the delivery of pDNA to produce anti-CD19 CAR T cells *ex vivo*. This transfection method showed low toxicity to transfected cells even when compared to standard methods. Primary CAR T cells produced using LNP-9-CAR were activated and induced specific killing of CD19+ tumor cells. As a non-viral delivery method, LNPs open an alternative to produce CAR T-cells in less time than viral vectors, thus reducing the associated costs and improving the effectiveness of the adoptive cells. This method can also be applied using other CAR constructs, opening possibilities for the personalized treatment of different tumors, as well as to treat autoimmune diseases and other B-cell related illnesses.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.942>

ABO INCOMPATIBILITY IN ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION: THE IMPACT OF INFUSED RED BLOOD CELLS

AB Araújo, T Schmalfluss, JM Furlan, DMR Speransa, MH Angeli, L Sekine, JPM Franz

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil

ABO incompatibility does not hinder Bone Marrow Transplantation (BMT), but it has been associated with worse outcomes and additional adverse events. Many studies described effects of ABO incompatibility on allogeneic BMT, including delayed engraftment of Red Blood Cells (RBC), platelets and/or

neutrophils; Pure Red Cell aplasia (PRCA); hemolytic reaction; reduced overall survival, beside others. However, there is no standard recommendation regarding the maximum safe value of RBC allowed in an ABO-incompatible transplant. We compared major and bidirectional ABO incompatible (iABO) BMT (n=42) with ABO compatible BMT (n=44) and evaluated the impact of the value of incompatible Red Blood Cells (iRBC) in outcomes and adverse events, to determine a safe iRBC value to be infused. The impact of infused RBC was evaluated using two dose parameters: volume of infused RBC/Kg and number of infused RBC/Kg. Characteristics regarding patients/transplantation of ABO-compatible and -incompatible were similar in age, weight, donor type, disease, conditioning regimen, dose of TNC/Kg and dose of CD34+ cells/Kg. The iABO patients presented a delayed time of transfusion independence in 30/60 days, increased requirement for RBC transfusion, more hemolysis signals, and incidence of PRCA. Neutrophils/platelets engraftment, length of hospitalization post-transplant, platelet units requirement, graft-versus-host-disease occurrence, and overall survival were similar in both groups. Patients of the iABO group received 0.93 mL RBC/Kg (range 0.31–3.50) and 1.03×10^{10} RBC/Kg (range 0.36–3.88). The infusion of iRBC > 1.0 mL/Kg or > 1.0×10^{10} RBC/Kg was related with graft failure or death before neutrophil and/or platelet engraftment, increased fresh frozen plasma requirement, and increased creatinine. Our results also suggest that antibodies titers impact the transplantation scenario. In this study, the high antibodies titers were related with hemolysis, PRCA, delayed RBC engraftment and adverse reactions Grade at infusion. Additionally, we propose the use of the number of RBC (RBC/Kg) as a more appropriate dose parameter of infused iRBC. Comparing volume of RBC/Kg and number of RBC/Kg, the Spearman correlation was 0.994 and the outcomes were similar when used one or other parameter. The number of RBC is a direct measure of hemocytometer and disregards the size of cells, while the volume of RBC is estimated using a relative parameter of hemocytometer. Moreover, all other dose cell-related parameters are used in function of the number of cells. Finally, further studies involving larger cohorts, with a larger range of infused RBC values, and addressing more factors, are necessary to clarify the maximum safe value of RBC to be infused in iABO transplants.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.943>

EXPERIÊNCIA NO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS PERIFÉRICAS EM PACIENTES COM PESO IGUAL OU INFERIOR A 25 KG

OMWO Félix^a, ACL Alves^a, MRA Gomes^a, AS Ramos^a, PGG Granja^a, G Zamperlini^a, RV Gouvea^a, VC Ginani^a, CMV Alferi^a, A Seber^b

^a Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer (GRAACC), São Paulo, SP, Brasil

^b SBTMO – Grupo de TMO Pediátrico SBTMO/SOBOPE, São Paulo, SP, Brasil

Em vinte e quatro anos de atividade, uma unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) Pediátrico realizou transplantes autólogos com Células Tronco Hematopoéticas Periféricas (CTHP) em crianças com doenças onco-hematológicas. O objetivo deste estudo é relatar a experiência desses TMOs posterior à coletas de leucoaférese realizadas em pacientes com peso igual ou inferior a 25 kg. Pacientes e métodos: Foi realizada revisão dos formulários e do prontuário eletrônico no período de dezembro de 1999 a maio de 2023. As CTHP foram coletadas por aférese através de cateter venoso central rígido utilizando a separadora de células COBE Spectra® com ACD-A na proporção 1:15, processando-se ao redor de seis volemiás. Os procedimentos foram repetidos até coletar 5×10^6 CD34+/kg. A partir de 2012 o alvo passou para 15×10^6 CD34+/kg para os TMOs em Tandem. O *priming* da máquina foi realizado com hemácias irradiadas, filtradas e ressuspensas em solução fisiológica. Durante a aférese, os pacientes receberam cálcio, sódio, magnésio e potássio endovenoso. A partir de 2016 as CTHP foram coletadas pela Spectra Optia®, a proporção de ACD-A variou de 1:12 a 1:15 a depender o tempo de procedimento, contagem plaquetária do paciente e velocidade do fluxo de coleta. O número de volemiás foi calculado com base no CD34+ alvo e do sangue periférico do dia. As células foram criopreservadas com solução final de HAES 6%, Albumina 4% e DMSO 5% e armazenadas em ultrafreezers. No dia da infusão, foi realizado o degelo em banho maria à 37°C e realizado o controle de qualidade. A remoção do DMSO foi indicada para os pacientes com ≤ 25 kg, insuficiência renal ou cardíaca e infusões acima de 1 g/DMSO/kg. A remoção foi realizada segundo protocolo de Rubinstein: degelo com diluição 1:1 em dextrano-albumina 5% a 4°C. Realizado o controle de qualidade, centrifugação a 400 g, 4°C por 20 min. O buffy coat também foi ressuspensão na mesma solução e encaminhado para infusão com equipo simples. O sobrenadante final foi novamente centrifugado até restarem $< 0,1 \times 10^8$ CNT/kg. Em 2018 o critério peso reduziu para 15 kg e a partir de outubro de 2021 o peso não foi mais um critério. Resultados: Foram realizados 136 TMOs em 109 pacientes. Foram realizados o degelo simples em 37 transplantes e 99 com remoção do DMSO. Foram realizadas 109 aférese, 15 pacientes realizaram duas aférese e 04 realizaram três. A mediana de volume coletado foi de 166 mL (35–825), a celularidade foi de 12×10^8 CNT/kg (2–66) e o CD34 foi $9,1 \times 10^6$ /kg (2,6–239). Foram realizados 136 transplantes, 109 pacientes foram submetidos a apenas um TMO, quinze a dois, onze a três e apenas um paciente realizou quatro TMOs. A mediana de idade foi de 2 anos (0,7 a 3) e peso foi de 11 kg (6 a 18) e, 61% do sexo feminino. Os diagnósticos foram: 54 com Sistema Nervoso Central, 18 Retinoblastoma, 6 Tumor de células germinativas e 01 com Tumor teratóide. O condicionamento foi: 21 pacientes receberam Bu-Mel, 30 Carbo-TT, 3 Carbo-VP-TT, 16 CEM, 64 CEM-TT, 1 CTX-Mel, 1 Tenodal-TT-Carbo. Nenhum paciente teve falha de enxertia e 72% estão vivos. **Conclusão:** A leucoaférese em nosso serviço foi realizada com segurança, inclusive quando realizado em grandes volumes. O protocolo que propomos para crianças com menos de 25 Kg deve incluir *priming* da máquina com concentrado