

GENERATION OF CD34+ DERIVED HUMAN MACROPHAGE EXPRESSING CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS FOR CANCER TREATMENT

Ian-Costa ^a, Livia-Furquin ^a, Viviane-Jennifer ^a,
Théo-Gremen ^b, Samuel-Campanelli ^b,
Rafael-Almeida ^a, Vanderson-Rocha ^a,
Rodrigo-Nalio ^c

^a Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

^b Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino, São Paulo, SP, Brazil

Objective: T lymphocytes expressing Chimeric Antigen Receptor (CAR) has proven to be an auspicious strategy in treatment of hematological malignancies, but with low efficacy in solid tumors due to their complex microenvironment. From this perspective, macrophages become promising cells for CAR insertion (CAR^{Mac}) due to their ability to infiltrate the dense tumor matrix, promote phagocytosis and antigen presentation and to secrete pro-inflammatory cytokines. However, sources for obtaining macrophages are limited due to their low proliferative capacity. Knowing that umbilical cord blood CD34⁺ cells are potential progenitors for macrophages, our main aim here is to generate off-the-shelf CAR^{Mac} from umbilical cord blood CD34⁺ cells to treat solid tumors. **Methods:** We use cryopreserved umbilical cord blood CD34⁺ cells to first expand in vitro and to insert a reporter protein (GFP) using the piggyBAC transposon system (pB) prior the differentiation into CD34⁺ derived human macrophages (Mac^{CD34}). Subsequently, Mac^{CD34} were generated using distinct protocols combining the use of growth factors and cytokines: Protocol 1 = SCF, GM-CSF, TNF- α + M-CSF; Protocol 2 = GM-CSF, M-CSF, IL-3 + M-CSF in vitro. Then, Mac^{CD34} were tested morphology, phenotype characterization and phagocytosis capabilities. **Results:** We obtained around 12.9% of GFP-expressing cells within 24 hours after electroporation with a viability of 63.4%. Subsequently for Mac^{CD34} phenotyping using flow cytometry, in protocol 1 about 85% and 53.9% of CD14⁺CD64⁺ Mac^{CD34} were obtained using two distinct culture media (RPMI 1640 (RP) and StemSpan SFEN II (SS)), respectively. Those cells presented CD34^{neg} CD1c^{neg} HLA-DR^{high} CD163^{low} CD16⁺CD86^{low} and showed a typical morphology of macrophage when compared to monocytes derived macrophages (Mac^{Mono}). In protocol 2 about 75% and 36.4% of CD14⁺CD64⁺ Mac^{CD34} were obtained using RP and SS, respectively. Those cells presented CD34^{neg} CD1c^{low} HLA-DR^{high} CD163^{neg} CD16^{high} CD86⁺. During differentiation, cells showed a considerable expansion fold, evidenced by the dilution of Cell Trace Violet dye. In addition, the polarization of CD14⁺CD34^{neg} cells with M-CSF and IL-4 induced high expression of CD64, HLA-DR, CD86 and CD1c, showing a mixed morphologic Mac^{Mono}/DC phenotype. For functional assays, Mac^{CD34} from protocol 2 showed a reduced percentage of phagocytosis of SKBR3 tumor cells and a higher percentage for Nalm6 tumor cell phagocytosis, when compared to blood monocytes and Mac^{Mono}.

Beside that, Mac^{CD34} can efficiently phagocyte pHrodoTM Zymosan microbeads and produce TNF- α (RP = 33.2%; SS = 24.0%) and IL-1 β (RP = 21.9%; SS = 10.4%) in response to LPS activation. **Discussion and conclusion:** Our data indicate that pB is not an effective protocol for insertion of CAR molecules in CD34⁺ cells. In addition, differentiated Mac^{CD34} showed phenotypic and functional similarities with classical macrophages differentiated from blood monocytes. Our ongoing steps are A) the generation of CAR-expressing CD34⁺ cells using lentiviral vectors and B) the differentiation into CAR^{Mac} for their functional characterization.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2024.09.1692>

IMPACTO DA CRIOPRESERVAÇÃO E DO DESCONGELAMENTO NA QUALIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

MH Angeli, MDS Lobo, GD Salton, JM Furlan,
AB Araújo, LM Rohsig

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

Introdução: O transplante autólogo de Células-Tronco Hematopoéticas (CTH) faz parte da estratégia de tratamento da maior parte dos pacientes com mieloma múltiplo. A infusão das CTH pode ser realizada dias ou meses após a coleta e, nesta situação, faz-se necessária a criopreservação das células a fim de manter sua viabilidade. Durante a criopreservação e o descongelamento, a morte celular pode estar associada ao impacto da variação de temperatura durante todo o processo e ao armazenamento a longo prazo em baixas temperaturas. **Objetivo:** Avaliar o impacto da criopreservação e do descongelamento na qualidade das CTH criopreservadas de pacientes com mieloma múltiplo. **Metodologia:** Foram analisadas 69 coletas de CTH por aférese de pacientes com mieloma múltiplo realizadas entre 2020 a 2024, criopreservadas em solução contendo hidroxietilamido 6%, albumina humana 3% e dimetilsulfóxido 5%, armazenadas em freezer mecânico a -80°C e infundidas entre 2021 e 2024. Os parâmetros avaliados comparando os dados pré e pós criopreservação foram: tempo entre a data da coleta e a data da infusão das CTH, recuperação de células nucleadas totais, recuperação de células CD34⁺ viáveis e perda de viabilidade celular por 7AAD. As quantificações celulares foram realizadas em contador hematológico e citômetro de fluxo. O descongelamento foi realizado a 37°C em banho-maria. Os critérios utilizados para considerar as CTH com qualidade adequada foram: média da recuperação de Células Nucleadas Totais (CNT) $\geq 70\%$, média da recuperação de células CD34⁺ $\geq 60\%$, média da perda de viabilidade celular por 7AAD $\leq 30\%$. O tempo de armazenamento (em dias) das CTH foi apresentado como média (mínimo-máximo) e os demais resultados como média $\pm$ desvio padrão. **Resultados:** O tempo médio de armazenamento das CTH foi de 121 dias (5–331). A comparação entre os dados pré e pós-criopreservação resultou nos seguintes valores médios: recuperação de CNT: $94,05 \pm 8,8\%$; recuperação de células CD34⁺: $69,3 \pm 25,1\%$ e perda de