

(LLA), no entanto, ainda há um desafio para tratar a LMA: a CRS. Como resposta à expansão dos blastos, que estimulam a secreção de citocinas anti-inflamatórias, a CRS é limitante da resposta imune à terapia com CAR-T cell, pois tais alterações metabólicas apoiam o crescimento e a sobrevivência das células leucêmicas. Uma alternativa viável para melhorar a eficácia dessa imunoterapia seria encontrar um epítipo específico da leucemia, para reduzir ao máximo os efeitos citotóxicos do tratamento em questão.

Conclusão: O desenho e os ensaios de imunoterapia são emergentes contra a LMA, tendo em vista a complexidade e necessidade de contenção da doença. A terapia celular com CAR-T cell vem demonstrando avanços, apesar dos estudos estarem em estágios iniciais. Dessa forma, deve-se dar prosseguimento a novos estudos, para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade ainda presente no tratamento com CAR-T cell.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.707>

706

OBTENÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)

G.L.S. Martins^{a,b}, M.S. Oliveira^{a,b,c}, B.D. Paredes^{a,d}, B.S.F. Souza^{a,b,d}

^a Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC), Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brasil

^b Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA, Brasil

^c Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, BA, Brasil

^d Instituto D'OR Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Introdução: A anemia falciforme (AF) é uma doença de herança mendeliana de alta prevalência no Brasil. Contudo, ainda não existem tratamentos eficazes para ela, emergindo a necessidade do estudo de novas terapias. Todavia, a obtenção de grandes quantidades de eritrócitos tem dificultado o progresso de pesquisas nessa área. Uma alternativa a isso seria desenvolvimento de eritrócitos a partir de iPSC.

Objetivo: Estabelecer um protocolo de diferenciação de iPSC obtidas de pacientes com AF e doador saudável, para geração de células progenitoras hematopoiéticas.

Método: Duas linhagens de iPSC foram produzidas previamente: EB8C6 (paciente com AF) e EB4C24 (doador saudável). Elas tiveram sua pluripotência validada por marcação anti-TRA-1-60-APC na Citometria de fluxo e, por fim, foram expandidas. Quando a confluência dos poços chegou a 80%, duas diferentes técnicas de diferenciação se sucederam. A primeira delas foi a *Hanging Drop*, na qual as células ficaram em suspensão, vertidas em gotas na tampa de uma placa de Petri. Isso foi realizado com o objetivo de formar corpos embrioides (CE), o próximo estágio da diferenciação hematopoiética. Outra técnica utilizada para geração dessas mesmas estruturas foi empregando placas de 96 poços de fundo em U não aderente. Assim sendo, as iPSC foram colocadas em suspensão

nessas placas e ela foi então centrifugada. Os CE formados por ambos os protocolos foram dissociados e analisados através da expressão de marcadores de células progenitoras hematopoiéticas (CD34 e CD45) na Citometria de fluxo.

Resultados: A pluripotência das iPSC foi confirmada por Citometria de fluxo. A linhagem EB8C6 foi positiva em 97,6% das células analisadas e a linhagem EB4C24 em 80,1%, o anticorpo utilizado foi o anti-TRA-1-60-APC, principal marcador de pluripotência. Com isso, os CE foram gerados, pela técnica *Hanging Drop*, apenas a linhagem EB8C6 e, pela técnica utilizando a placa de 96 poços de fundo em U não aderente, as linhagens EB8C6 e EB4C24. Assim, foi realizada uma Citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD45-APC e anti-CD34-PE, principais marcadores de progenitores hematopoiéticos. Os CE formados do clone EB8C6 através da placa em U não aderente tiveram marcação CD34+e CD45+ em 17% das células analisadas. Os CE da EB4C24, contudo, tiveram marcação CD34+ e CD45+ em 36,4% das células. Através da técnica *Hanging Drop* para a formação de CE, a linhagem EB8C6 foi analisada e apresentou marcação dupla CD34+/CD45+ em 38,9% das células.

Discussão: Esses resultados podem indicar uma formação mais efetiva de CE CD34+/CD45+ através da técnica *Hanging Drop*. Pois, o mesmo tipo celular (EB8C6), que gerou CE pelas duas técnicas analisadas, demonstrou ser mais duplo positivo através da *Hanging Drop*, com 38,9% CD34+/CD45+ e apenas 17% CD34+/CD45+ através da placa em U não aderente.

Conclusão: Por meio desse projeto foi possível estabelecer um protocolo para a diferenciação de iPSC em células progenitoras hematopoiéticas, através da formação de corpos embrioides, tanto pela técnica de *Hanging Drop*, quanto pela técnica da placa em U não aderente. Mais experimentos, no entanto, precisam ser realizados para validar o protocolo e assim possibilitar a formação de hemácias que podem ser usadas para os mais diversos fins terapêuticos, assim como para o teste de drogas para a AF.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.708>

707

OPTIMIZATION OF A PROCESS FOR HIGH-YIELD LENTIVIRAL VECTOR PRODUCTION APPLIED TO CAR-T CELL GENERATION

D.M.C. Fantacini^a, S.C.G. Lima^a, H. Brand^a, L.C. Batista^a, R. Cunha^{b,c}, D.T. Covas^d, L.E.B. Souza^a

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

^b Centro de Terapia Celular (CTC), Advanced Cellular Therapy Laboratory, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Department of Medical Images, Hematology, and Medical Oncology, Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy Unit, Faculdade de Medicina

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