



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LUIZA DE MACEDO ABDO

**Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem
*point of care***

Orientador: Prof. Dr. Martin Héran Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2019**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LUIZA DE MACEDO ABDO

**Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem
*point of care***

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de
Câncer como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Martin Héran Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2019**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LUIZA DE MACEDO ABDO

**Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem
*point of care***

ORIENTADOR: Prof. Dr. Martin Héryan Bonamino

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fábio Eudes Leal - Instituto Nacional de Câncer

Prof. Dr. Alberto Felix Antonio da Nobrega - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Angelo Maiolino - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Renata Binato Gomes - Suplente I - Instituto Nacional de Câncer

Profa. Dra. Adriana Cesar Bonomo – Suplente II - Fundação Oswaldo Cruz

**RIO DE JANEIRO
2019**

**“...Uma criança, um professor, um livro e uma caneta
podem mudar o mundo.”**

Malala Yousafzai

Dedicatória

Ninguém se transforma no que é sozinho. Durante nossa vida toda, diversos acontecimentos nos constroem, e na maioria das vezes nem percebemos. Gostaria de dedicar a esse espaço às pessoas que sempre serão importantes e principalmente, desejaram o meu melhor.

A minha base foi construída pelos meus pais, Marivânia e José Roberto, junto ao meu querido irmão Lucas Abdo. O mundo já deu várias voltas, mas a gente sempre permaneceu unido. Há coisas na vida que a gente não troca por nada, e para mim são vocês. Obrigada por tudo e por me apoiarem a todo momento.

Também gostaria de dedicar aos meus avós, Wanyr e Olga, que apesar da discrepância de gerações, sempre foram presentes e tiveram papéis importantes na minha vida.

Inúmeras amizades passam por nossas vidas, porém poucas permanecem. Compartilho a minha história com minhas amigas de infância, Larissa e Paula, e amigas de faculdade, Tamires, Lígia, Camilla e Michelle. Sou muito grata a vocês.

Agradeço também meu orientador Martin, que me deu a oportunidade de trabalhar no grupo e sempre se esforçou pra que eu mostrasse o meu melhor. Em conjunto, a participação da Luciana e o Léo para minha formação foi essencial, não tenho palavras pra dizer o quanto eu sou grata a vocês!

De uma forma muito carinhosa, queria dizer meu obrigado para May, foi a primeira pessoa no laboratório e no Rio a ser minha amiga e companheira. Me auxiliou em tudo com muita boa vontade. A gente se conheceu no momento certo. E pra completar o Trio, não poderia me esquecer da Cíntia, pessoa maravilhosa que possui um coração enorme e que sempre foi minha amiga. Amo vocês.

Também sou grata ao grupo Martinlab e, galera maravilhosa e animada no qual eu adoro fazer parte: Maxi-Pri, Mini-Pri, Tonho, Brennoide e as meninas que assumiram a guarda dos camundongos nessa reta final, Luísa e Mari. Adoro vocês!!

Um agradecimento especial para a Alice, que sempre me incentivou a me soltar e ser desinibida! Por fim, queria agradecer com amor ao Gustavo. Cada dia que passa nosso relacionamento amadurece e o companheirismo se torna sólido.

Amo vocês

Luiza Abdo



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem
*point of care***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUIZA DE MACEDO ABDO

RESUMO

O último levantamento global realizado sobre câncer divulgado pelo banco de dados GLOBOCAN em 2018, estimou-se 18,3 milhões de novos casos. Dentre estes, 440,00 casos correspondem a leucemia, doença que necessita novas modalidades terapêuticas. Recentemente, imunoterapia utilizando células T CAR+ foi aprovada para o tratamento de Leucemia Linfóide Aguda de células B (LLA-B) e alguns tipos de linfoma, mostrando resultados promissores. Porém, um dos maiores desafios para o acesso a essa terapia, é o alto custo devido a modificação ser feita por vetores virais, impossibilitando o tratamento para vários pacientes. Utilizamos alternativa para diminuir o custo da produção com o sistema Sleeping Beauty (SB) e eletroporação para modificar células T para expressar o CAR. Além disso demonstramos a eficiência das células T CAR+ ativadas e expandidas por co-cultura com o linfócito alogênico transformado do vírus Epstein-Barr LAZ 388 (L388) ou a estratégia de não ativar e nem expandir as células chamadas de point-of-care (POC). Ambas estratégias se mostraram eficazes no tratamento de camundongos NSG enxertados com 5×10^6 da linhagem LLA-B RS4;11. Células mononucleares do sangue periférico foram isoladas por Ficoll e eletroporadas no Nucleofector II combinado ao plasmídeo codificando o CAR 19BBz (no backbone do transposon SB pT3) e ao plasmídeo transposase SB100x. A expressão do CAR no primeiro dia varia de 5%-15%. Após 12 dias de co-cultura com células L388, a expressão pode variar de 30%-60%. As células T CAR+ são capazes de ter ação citotóxica tanto in vitro (ensaio de lise realizado contra RS4;11 e Nalm-6), tanto in vivo, em animais enxertados com RS4;11, quando comparado com o grupo controle e mock (células eletroporadas sem transferência gênica). O grupo mock tem a capacidade de eliminar células de leucemia do sangue periférico e mostrou melhor sobrevida em comparação com o grupo controle não tratado. Entretanto, a estratégia POC também se mostrou eficaz, além de fornecer maior acessibilidade e simplicidade na produção. Na abordagem POC, as células T CAR+ não demonstrou potencial de eliminar as células alvo RS4;11 e Nalm-6 em ensaio de lise in vivo. Porém, animais tratados com 10^7 células T CAR+ (expressão de aproximadamente 10% de 19BBz) forneceram 100% de sobrevivência ao comparar o controle e mock. Mesmo com doses reduzidas de linfócitos, como 10^5 ou 10^6 , apresentou uma melhora na sobrevida. Também é possível notar variação entre diferentes doadores. Além disso, comparamos o mesmo doador utilizando a abordagem POC e a expansão de células T CAR com anti-CD3/ 8 por 12 dias (metodologia clínica atual), e os resultados se mostraram similares, indicando que a abordagem POC é intercambiável com o trabalho e custo protocolo de expansão. Porém, nos casos de animais enxertados com Nalm-6, houve melhora na sobrevida de animais tratados com 19BBz, demonstrando a necessidade de aperfeiçoamento para abordagens mais amplas. Contudo, esta metodologia mostrou-se potencialmente eficaz no modelo de animais enxertados com RS4;11 e possui menor custo quando comparada à abordagem clínica aprovada para o uso de células T CAR. Esse aspecto poderia conceder maior acesso dos pacientes a essa estratégia de tratamento muito promissora.

Palavras-chave: Células T CAR, Imunoterapia, Point-of-care, Sleeping Beauty.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

Development of CAR T therapy for ALL-B using the point of care approach

ABSTRACT

The global cancer data released by the GLOBOCAN database showed 18.3 million new cancer cases in 2018. About 440,000 of these cases correspond to leukemia, a cancer that urges for treatment modalities. Recently, CAR T-cell immunotherapy was approved for the treatment of acute B cell leukemias (B-ALL) and some lymphomas with promising results. However, the major drawbacks of CAR-T treatments are the high costs, being prohibitive for many of the patients. We developed an alternative low-cost approach to gene modify T cells to express CAR using the Sleeping Beauty (SB) system and electroporation. In addition, we show the expansion by co-culture with the Epstein-Bar virus transformed allogeneic lymphoblast cell LAZ388 (L388) and in another hand, that it is not necessary to activate or expand T cells *ex vivo* when using this system, an aspect that renders this approach a point-of-care (POC) strategy. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using Ficoll and electroporated using the Nucleofector II combined with plasmids encoding 19BBz CAR (in the pT3 SB transposon backbone) and the SB100x transposase. The phenotype was assessed by flow cytometry. The *in vitro* cytotoxicity assay was performed using Calcein-AM dye on target cells incubated with different ratios of effector cells. The expression of CAR on the first day ranges from 5% -15%. After 12 days co-cultivation with L388 cells, the expression may range from 30% -60%. CAR + T cells are able to have cytotoxic action both *in vitro* (lysis assay against RS4; 11 and Nalm-6) and *in vivo*, in animals grafted with RS4;11, when compared to the control and mock electroporation without gene transfer). The mock group has the ability to eliminate peripheral blood leukemia cells and showed better survival compared to the untreated control group. In the POC approach RS4;11 GFP were injected and after 3 days were treated with different doses of recently electroporated CAR-T cells. The expression of CAR on the first day (d+1) was about 5% -15%. In addition, cell lysis assays against RS4;11 and Nalm-6 on d+1 showed no potential to eliminate the target cells *in vitro*, as expected. The *in vivo* experiments were performed with NSG mice engrafted with RS4;11 B-ALL cells followed by T cell injection 3 days later. Animals treated with 10^7 CAR-T cells (expression of approximately 10% of 19BBz) provided 100% survival when comparing the control and mock (electroporated without plasmids) groups. The mock treated group has the ability to eliminate leukemia cells from the peripheral blood and showed better survival as compared to untreated control group. We were able to show a survival improvement even using reduced doses of lymphocytes, such as 10^5 or 10^6 . Furthermore, we compared the same donor using the POC approach and expansion of CAR-T cells with anti-CD3/28 for 12 days (current standard), and the results showed similar, indicating that the POC approach is interchangeable with the labor and cost-intensive expansion protocol. This methodology proved effective in the animal model and is much cheaper when compared to the approved clinical approach for the use of CAR T cells. This aspect could grant greater access of patients to this very promising treatment strategy.

Keywords: CAR T cells, Immunotherapy, Point-of-care, Sleeping Beauty

A135d Abdo, Luiza de Macedo.

Desenvolvimento de terapia CAR T para LLA-B usando a abordagem point of care / Luiza de Macedo Abdo. – Rio de Janeiro, 2019.

112 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientador: Martin Héran Bonamino.

1. Leucemia de Células B. 2. Imunoterapia. 3. Receptores Quiméricos de Antígenos. 4. Sleeping Beauty
I. Bonamino, Martin Héran (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99419

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 4.1. Lista de anticorpos usados nos experimentos.....	26
Quadro 4.2. Painéis de caracterização dos linfócitos.....	27
Tabela 4.1. Resumo dos experimentos <i>in vivo</i> apresentados na dissertação.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Razões das principais entradas no PubMed por ano.....	3
Figura 1.2. Expressão de diferentes proteínas no desenvolvimento da célula B.....	4
Figura 1.3. Hipótese dos três Es da imunoeedição do câncer.....	9
Figura 1.4. Mecanismos de escape do sistema imune.....	11
Figura 1.5. Comparação entre anticorpo e TCR.....	15
Figura 1.6. Diferentes gerações e estrutura dos Receptores Quiméricos de Antígenos.....	17
Figura 1.7. Mecanismo de integração sistema <i>Sleeping Beauty</i>	22
Figura 5.1. Linha do tempo do <i>in vivo</i> 1.....	33
Figura 5.2. Subpopulações de linfócitos e ensaios de lise tumoral.....	35
Figura 5.3. Monitoramento de células GFP+ no sangue ao longo do experimento do <i>in vivo</i> 1.....	37
Figura 5.4. Carga de células GFP+ nos órgãos dos animais.....	38
Figura 5.5. Curva de sobrevida dos animais tratados com células T expandidas através de co-cultivo com a linhagem L388.....	39
Figura 5.6. Linha do tempo do <i>in vivo</i> 2.....	40
Figura 5.7. Caracterização do fenótipo das células do experimento <i>in vivo</i> 2.....	42
Figura 5.8 Monitoramento de células GFP+ no sangue ao longo do experimento do <i>in vivo</i> 2.....	44
Figura 5.9. Análise da carga de células GFP+ nos órgãos.....	46
Figura 5.10. Curva de sobrevida do experimento <i>in vivo</i> 2.....	47
Figura 5.11 Avaliação por citometria de fluxo dos tumores sólidos encontrado nos animais do grupo 19BBζ.....	48
Figura 5.12. Presença de linfócitos T nos órgãos após 60 dias.....	49

Figura 5.13. Linha do tempo do <i>in vivo</i> 3.....	50
Figura 5.14. Perfil das células injetadas nos camundongos do experimento <i>in vivo</i> 3.....	51
Figura 5.15. Porcentagem de células GFP+ no sangue ao longo do experimento <i>in vivo</i> 3.....	52
Figura 5.16. Porcentagem de células GFP+ nos órgãos dos animais do experimento <i>in vivo</i> 3.....	53
Figura 5.17. Curva de sobrevida do experimento <i>in vivo</i> 3.....	54
Figura 5.18. Linha do tempo dos experimentos e randomização.....	56
Figura 5.19. Porcentagem de células T CAR+ após a eletroporação.....	58
Figura 5.20. Fenótipo e perfil de memória das células utilizadas no experimento <i>in vivo</i> 4.....	59
Figura 5.21. Avaliação da expressão dos marcadores de exaustão	60
Figura 5.22. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	61
Figura 5.23. Carga tumoral ao longo do experimento avaliada segundo o percentual de células GFP+ circulantes.....	62
Figura 5.24. Análise da sobrevida do experimento <i>in vivo</i> 4A.....	63
Figura 5.25. Carga tumoral ao longo do experimento.....	64
Figura 5.26. Análise do percentual de células GFP+ dos órgãos do experimento <i>in vivo</i> 4B.....	65
Figura 5.27. Análise de sobrevivência do experimento <i>in vivo</i> 4B.....	66
Figura 5.28. Representação do experimento <i>in vivo</i> 5.....	67
Figura 5.29. Porcentagem de células CAR+ no experimento <i>in vivo</i> 5.....	69
Figura 5.30. Perfil das células inoculadas no experimento <i>in vivo</i> 5.....	70
Figura 5.31. Caracterização do perfil de exaustão das células no d+1 no experimento <i>in vivo</i> 5.....	71

Figura 5.32. Análise do percentual de células GFP+ do sangue ao longo do experimento.....	72
Figura 5.33. Análise da carga tumoral dos órgãos dos animais do experimento <i>in vivo</i> 5.....	73
Figura 5.34. Análise da sobrevida do experimento <i>in vivo</i> 5.....	74
Figura 5.35: Linha do tempo do experimento <i>in vivo</i> 6.....	75
Figura 5.36: Avaliação fenotípica da população CAR+, CD4+ e CD8+ nos d+1 e d+12.....	76
Figura 5.37. Perfil de sub-populações de memória das células no d+1 e no d+12...	77
Figura 5.38: Porcentagem de células GFP+ no sangue no decorrer do experimento.....	79
Figura 5.39: Curva de sobrevida do experimento <i>in vivo</i> 6.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Activation induced cytidine deaminase
APC	Células apresentadoras de antígenos; Antigen-presenting cell
BCRs	Receptores de células B; B-cell receptor
BiTE	Bispecific T-cell engager
CAR	Receptor quimérico de antígeno; Chimeric Receptor Antigen
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
ETV6	Translocation variant 6
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallizable
FR- α	Receptor alfa de folato
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITRs	Inverted terminal repeat
L388	LAZ 388
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LCP	Leucemia de células pilosas
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LF	Linfoma folicular
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoide Aguda de células B
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
MDSC	Células Supressoras Derivadas Mielóides Myeloid-derived suppressor cells
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade; major histocompatibility complex

MM	Mieloma Múltiplo
mRNA	RNA mensageiro
MW	Macroglobulinemia de Waldenstrom
NSG	NOD-scid IL2Rgammanull
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico; Peripheral Blood Mononuclear Cells
PD-1	Programmed cell death protein 1
POC	Point-of-care
Ph + RAG	Cromossomo Philadelphia positivo Recombination Activation Gene
RECIST	Critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos Response Evaluation Criteria In Solid Tumours
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SB	Sleeping Beauty
scFv	single-chain variable fragment
TAMs	Macrófagos associados a tumor; Tumor-associated macrophages
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptores de células T; T Cell Receptor
TGF β	Transformação do Crescimento- β ; Transforming Growth Factor- β
TILs	Linfócitos infiltrantes tumorais
Tregs T	Células T regulatórias

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer.....	1
1.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda de células B	3
1.1.2 Imunologia tumoral.....	7
1.2 Imunoterapia.....	11
1.2.1 Transferência adotiva de células.....	12
1.2.2 Receptores quiméricos de antígenos.....	15
1.2.3 <i>Sleeping beauty</i>	21
3. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Plasmídeos.....	26
4.2 Cultura de células.....	26
4.3 Eletroporação e expansão de PBMC.....	27
4.4 Citometria e anticorpos.....	28
4.5 Ensaio de citotoxicidade.....	29
4.6 Modelo <i>in vivo</i>	30

4.7 Análise estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 <i>In vivo</i> 1 - Avaliação da função antitumoral de células T expandidas com a linhagem LCL LAZ388.....	33
5.2 <i>In vivo</i> 2 - Avaliação <i>in vivo</i> da estratégia POC para gerar linfócitos T CAR+.....	40
5.3 <i>In vivo</i> 3 Avaliação do efeito de diferentes doses de células CAR-T em modelo <i>in vivo</i>	50
5.4 <i>In vivo</i> 4 - Avaliação da efetividade das células CAR-T em modelo <i>in vivo</i> de alta e baixa carga tumoral.....	55
5.5 <i>In vivo</i> 5 - Avaliação da efetividade das células CAR-T em modelo <i>in vivo</i> de leucemia Nalm-6.....	67
5.6 <i>In vivo</i> 6 – Comparação da técnica POC com abordagem de expansão de células T com beads anti CD3/CD28.....	74
6. DISCUSSÃO.....	82
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
9. ANEXOS.....	106
I. Artigo aceito na Human Gene Therapy.....	106
II. Revisão publicada na CLINICS.....	109
III. Capítulo de livro em revisão.....	110
IV. Cartas de aprovação comitê de ética.....	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A revolução no avanço da ciência que ocorreu no século XX nos permitiu explorar diversos campos da medicina moderna e proporcionou a compreensão de áreas como genética, biologia molecular e celular, imunologia e, mais recentemente, engenharia genética. Estes entendimentos revelaram detalhes sobre as funções moleculares das células e até a capacidade destas de formarem tecidos a organismos complexos (WEINBERG, 2014). Como já descrito, as células são unidades fundamentais da vida e seus mecanismos são extremamente sofisticados e organizados. Com a compreensão mais profunda sobre as suas funções e conjuntos de sinalizações celulares, também foi possível entender alterações moleculares que podem interromper essa harmonia e levar o surgimento de algumas doenças, como o câncer (ALBERT *et al.*, 2014).

Basicamente, as células cancerígenas obedecem a dois princípios: (1) multiplicam-se desordenadamente de forma distinta às leis normais de divisão celular e (2) invadem e destroem tecidos saudáveis devido a sua capacidade metastática. Sua classificação é derivada do tecido ao qual pertencem: tumores de tecidos epiteliais são denominados carcinomas e são responsáveis por cerca de 80% dos casos, tumores de tecidos conectivos ou musculares são chamados de sarcomas, tumores derivados de leucócitos e seus precursores são chamados de leucemia e linfomas e, por fim, tumores do sistema nervoso não se enquadram em nenhuma dessas categorias (ALBERT *et al.*, 2014).

Devido à diversidade de causas, tipos e prognósticos, o câncer é considerado um conjunto de doenças e vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública do Brasil e do mundo. Segundo o estudo da estimativa da incidência de câncer do Brasil realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018) estima-se cerca de 420 mil novos casos a cada ano no biênio 2018-2019 e, de acordo com *International Agency for Research on Cancer* (IARC), 17 milhões de novos casos no mundo referente ao ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018), com ambas as estimativas excluindo o câncer de pele não-melanoma. Além disso, ocorre a tendência de aumento nos números de novos casos com o passar dos anos e estima-se que em 2040

aproximadamente 30 milhões de pessoas no mundo desenvolvam algum tipo de câncer.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer estão relacionados com fatores ambientais como a utilização do tabaco, obesidade, vírus e exposição ao sol (LEON *et al.*, 2015; CALLE *et al.*, 2003; MARTEL *et al.*, 2012; BRASH *et al.*, 1991), fatores hereditários (CAMPACCI *et al.*, 2014) e, principalmente, relacionados com o envelhecimento populacional (GERSTEN; WILMOTH, 2002). É possível também avaliar padrões de tipo de câncer relacionados ao Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) das regiões; em países com baixo IDH há predominância de cânceres relacionados com infecções, como os tumores de colo do útero, fígado e linfoma não-Hodgkin, e em países desenvolvidos, as neoplasias estão relacionadas ao chamado estilo de vida ocidental, ou ocidentalização, que predispõe para cânceres como de pulmão, mama, próstata e colorretal (MAULE; MERLETTI, 2012).

Devido a todos esses indícios, como aumento de incidência e a amplitude dos fatores de riscos, pesquisas relacionadas ao câncer são as mais prevalentes de acordo com a base de dados PubMed quando comparadas a outras doenças (Figura 1.1). Este fato pode estar associado à necessidade de um entendimento abrangente sobre neoplasias para conduzir o desenvolvimento de novas drogas, terapias e imunoterapias (REYES-ALDASORO, 2017). Um exemplo deste esforço é a aprovação das primeiras células geneticamente modificadas para uso clínico comercial, sendo aplicadas no tratamento de leucemias e linfomas de células B. Esta nova modalidade terapêutica representou uma revolução no tratamento do câncer (BACH; GIRALT; SALTZ, 2017).

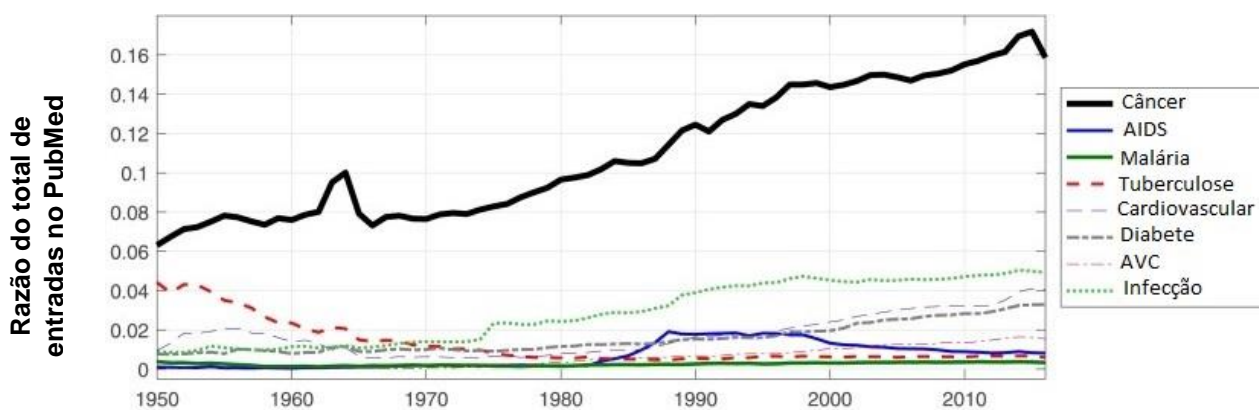


Figura 1.1: Razões das principais entradas no PubMed por ano. A figura mostra as razões das palavras mais encontradas nas publicações da database do PubMed ao decorrer dos anos. Adaptado de Reyes-Aldasoro (2017).

1.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda de células B

A Leucemia é um conjunto de neoplasias hematológicas malignas que acometem o sangue e a medula óssea do indivíduo. A caracterização da leucemia é designada basicamente por dois fatores: origem celular e velocidade de progressão. Essas neoplasias podem ser derivadas de células linfóides ou mielóides, denominadas leucemia linfóide ou leucemia mielóide, respectivamente, e também são designadas como crônicas, que acometem células maduras e a progressão da doença geralmente é lenta, ou como leucemias agudas, que acometem precursores e a progressão da doença ocorre rapidamente (JULIUSSON; HOUGH, 2016).

A estimativa de incidência mundial de leucemia para o ano de 2018 de acordo com o GLOBOCAN foi de quase 440 mil casos, isto é, aproximadamente 2,4% de todos os casos correspondendo o 14º tipo de câncer mais frequente (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se em torno de 11 mil casos a cada ano no biênio de 2018-2019 e este é o tipo mais frequente nas neoplasias infanto-juvenil, correspondendo a 29% de todos os casos de câncer dentro da faixa etária de 0-19 anos, sendo que a maioria é formada por neoplasias de células B (INCA,2018).

A ontogenia das células B ocorre na medula óssea e estas células são derivadas das células-tronco hematopoiéticas (HSCs, do inglês *Hematopoietic stem cells*) pluripotentes. Diversos marcadores de superfícies e os status do rearranjo gênico da imunoglobulina podem definir diferentes estágios do desenvolvimento das células B (CARSETTI; ROSADO; WARDMANN, 2004). As neoplasias que acometem

esses diferentes estágios da ontogenia possuem diferentes classificações (Figura 1.2).

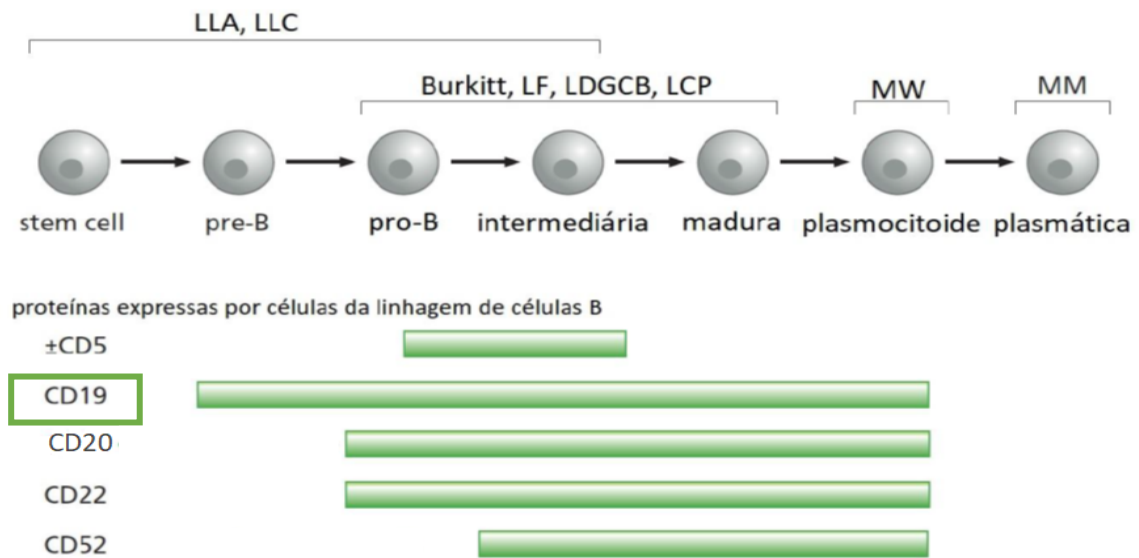


Figura 1.2: Expressão de diferentes proteínas no desenvolvimento da célula B. Diferentes proteínas são expressas em diferentes estágios devido as suas funções específicas. Essas proteínas também são utilizadas para detectar estágios de maturação das células B e classificar neoplasias. Leucemia linfóide aguda (LLA), Leucemia linfóide crônica (LLC), Linfoma de Burkitt (Burkitt), Linfoma folicular (LF), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), leucemia de células pilosas (LCP), macroglobulinemia de Waldenstrom (MW) e mieloma múltiplo (MM). Adaptado de Weinberg (2018).

O sucesso do rearranjo gênico somático nos loci das imunoglobulinas, é uma das principais condições para o desenvolvimento das células B madura e isso garante um repertório amplamente diversificado de receptores de reconhecimento de antígeno de células B (BCRs, do inglês *B-cell receptor*). Conforme descrito por MURPHY (2012), essa maquinaria de recombinação inclui diversas proteínas que caracterizam cada fase do amadurecimento, inclusive as proteínas RAG (do inglês *Recombination Activation Gene*), que são responsáveis pela quebra de dupla-fita de DNA para a recombinação V(D)J, além de existirem pontos de verificações para o amadurecimento das células B. As células que sobreviveram à diferenciação migram para os órgãos linfóides periféricos, como células B maduras. Quando essas células são ativadas, são capazes de formar centros germinativos nos folículos linfóides, onde ocorre a expansão clonal e produzem mutações pontuais com o auxílio da enzima AID (do inglês *activation induced cytidine deaminase*), que diferem um único ou poucos

aminoácidos na região de reconhecimento do BCR resultante, mecanismo denominado de hipermutação somática, produzindo clones semelhantes com diferentes afinidades de interação a proteína reconhecida. Ademais, ocorre a troca de classe, que permite a versatilidade do anticorpo como molécula efetora. Essa ampla capacidade de edição do DNA pode estar relacionada com a prevalência dos tumores de células B entre as leucemias.

As possíveis causas para o desenvolvimento dessa doença ainda são desconhecidas. Fatores de risco como predisposição genética, ambientais e infecções estão fracamente relacionados ou são inconsistentes. Apenas um fator de risco, a radiação ionizante está fortemente associada ao surgimento dessa neoplasia (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007). Porém, recentemente Greaves (2018) apresentou fundamentos que suportam a evidência do aumento de leucemia linfóide aguda de células B (LLA-B) em crianças, como uma “consequência paradoxal do progresso das sociedades modernas”, ou seja, crianças que tem pouco contato com microrganismos e infecções estariam mais sujeitas a esta neoplasia. Primeiro, ele descreve a ocorrência de mutações aleatórias pré-leucêmicas ainda no útero da mãe, como a fusão de genes comum na LLA, ETV6–RUNX1 (do inglês *ETS translocation variant 6* (ETV6) – *Runt-related transcription factor 1* (RUNX1)). A variante ETV6–RUNX1 pré-LLA-B tem vantagens sobre a expansão clonal quando na presença da citocina inflamatória Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF β , do inglês Transforming Growth Factor- β) e, ainda, eventos inflamatórios podem levar a ativação da RAG junto com a AID, que durante o desenvolvimento de células saudáveis B, ocorrem apenas em células germinativas e ativadas respectivamente. A falta de exposição a microrganismos nos primeiros anos de vida de uma criança pode levar ao não desenvolvimento e não amadurecimento do sistema imune corretamente, e uma infecção muitas vezes não patogênica pode desencadear uma cascata de falhas, levando ao desenvolvimento da leucemia e/ou afetando a persistência de um clone pré-leucêmico.

As características clínicas de pacientes com LLA-B geralmente são definidas por citopenia do sangue periférico, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Como definição morfológica, os blastos possuem diversos tamanhos e podem ser vacuolados. Utilizando como base a classificação de 2017 da Organização Mundial de Saúde (OMS), para a distinção da linhagem B de outros linfócitos é feita a análise

por citometria de fluxo ou imuno-histoquímica usando marcações das proteínas CD19, CD79a, PAX-5, TdT, CD10 e CD22, expressão variável de CD20, CD34 e D24 e pouca ou quase nenhuma expressão de CD45. Além dessa distinção, marcadores podem diferenciar subgrupos de LLA-B relacionando as etapas do amadurecimento da linhagem B: pro-LLA-B (CD19+, cCD79a+, cCD22+, TdT+), comum LLA-B (CD10+) e pre-LLA-B (cµ cadeia+) (WENZINGER; WILLIAMS; GRU, 2018).

Para realizar a distinção molecular das leucemias, é importante a realização da citogenética. De acordo com a classificação de 2017 da OMS, a LLA-B pode ser estratificada por nove diferentes tipos de alterações genéticas: translocações como t(9;22)(q34.1;q11.2), t(v;11q23), t(12;21)(p13.2;q22.q), t(15;14)(q31.1;q32.1), t(1;19)(q23;p13.3); hiperploídia com mais de 50 cromossomos; hipodiploidia devido a presença de menos de 46 cromossomos; tipo-BCR-ABL1 que tem perfil de expressão gênica que mimetiza LLA-B positiva para BCR-ABL1 porém não possui o cromossomo Philadelphia e iAMP21, caracterizada pela amplificação de parte do cromossomo 21 (WENZINGER; WILLIAMS; GRU, 2018).

O tratamento padrão para LLA-B foi estabelecido no final dos anos 80 por pesquisadores de Berlim, Frankfurt e Munique, grupo denominado de ALL-BFM. O protocolo para o tratamento original foi realizado por Hoelzer *et al.* (1988) e várias adaptações foram feitas durante os anos seguintes em diferentes centros de tratamentos (SEIBEL, 2008). Esse protocolo de tratamento consiste basicamente em três etapas: (1) indução da remissão, ou seja, reduzir o número de células leucêmicas encontradas na medula óssea a níveis indetectáveis e restaurar a hematopoese normal. Geralmente utilizam-se combinações de drogas como prednisona, vincristina, daunorrubicina e L-asparaginase durante quatro a seis semanas. (2) Reindução ou consolidação é a fase mais intensa, com a utilização de dexametasona, vincristina, doxorubicina, ciclofosfamida, citosina arabinoside, tioguanina e 6-mercaptopurina durante 5 a 9 semanas. Por fim, a última etapa é de (3) manutenção, e são utilizados 6-mercaptopurina e metotrexato por 9 semanas. Nos anos 2000, imatinibe foi incorporado ao tratamento para pacientes com cromossomo Philadelphia positivo (LLA-Ph +) (CHANG *et al.*, 2008).

Ademais o tradicional tratamento ALL-BFM, recentemente diversos pequenos inibidores vêm sendo aprovados para o tratamento de LLA-B, como imatinibe e dasatinibe para LLA-B BCR-ABL+, além de anticorpos, como o BiTE (do inglês

bispecific *T cell engager*) que possui extremidades derivadas do scFv (do inglês single-chain variable fragment) de anticorpos com afinidades para o CD3 e CD19 unidas por um link. Essa construção capaz de induzir a ativação das células T por meio da ligação com células B (MAN; MORRIS; KENG, 2017). Apesar do aumento do desenvolvimento de novas drogas, o sucesso de cura no câncer pediátrico LLA-B não se estende quando este é desenvolvido em adultos (GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

A sobrevida de pacientes infantis com LLA-B pode chegar a 90% (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013) e em adultos (mediana de 33 anos) a sobrevida global é de 28% (GOKBUGET *et al.*, 2012). Não se sabe ao certo o motivo para esta discrepância, mas existem hipóteses que tentam explicar este fato. Parte da explicação pode estar relacionada ao fato das células linfoides malignas em crianças ainda estarem propensas a potenciais respostas de células imunológicas devido aos poucos mecanismos de inibição das células tumorais. Isso pode estar diretamente ligado ao fato de que leucemias curáveis tem pouca diversidade genética, ou seja, baixa carga de mutações, inclusive no gene *TP53* (que codifica a proteína p53). Esta última evidência pode estar relacionada com a falta de exposição casual a agentes genotóxicos ou alguma pressão seletiva, que tendem a selecionar clones mais agressivos. A complexidade genética da LLA-B em adultos parece ser a maior barreira para o sucesso do tratamento (GREAVES, 2016). Esses indícios levam à necessidade de buscas por terapias alternativas para pacientes que não respondem às terapias convencionais, utilizando, por exemplo, imunoterapias que vem revolucionado o tratamento de diversos tipos de doenças.

1.1.2 Imunologia tumoral

A noção de que o sistema imune poderia ter um papel importante no controle do câncer surgiu no início do século XX com argumentos científicos de Paul Ehrlich, que propôs que o sistema imune tem capacidade de eliminar células neoplásicas (RIBATTI, 2016). Posteriormente, 50 anos mais tarde, Burnet e Thomas desenvolveram independentemente teorias relacionadas à “vigilância imunológica”, na qual o tumor tem capacidade de produzir neo-antígenos que são reconhecidos e eliminados pelo sistema imune (BURNET, 1957; THOMAS, 1959). Evidências foram confirmando essa teoria, como o experimento demonstrado no trabalho de Shankaran

et al. (2001), que revelou que tumores formados em camundongos imunodeficientes eram mais imunogênicos, ou seja, quando inoculados em camundongos com o sistema imune intacto, apenas metade dos tumores se desenvolviam, sendo então denominados tumores “não-editados” do ponto de vista imunológico. Quando esses mesmos tumores foram derivados de camundongos imunocompetentes e, posteriormente, introduzidos em outros camundongos imunocompetentes, todos formavam tumores, sendo então tumores denominados “editados” imunologicamente, isto é, o sistema imune é capaz de promover ou selecionar variantes de células tumorais com menor imunogenicidade e, portanto, mais resistentes ao sistema imune.

Em seguida, Dunn *et al.* (2002) postularam a hipótese dos três Es da imunoedição do câncer: (1) eliminação, (2) equilíbrio e (3) escape. A eliminação corresponde à vigilância imune, ou seja, a capacidade do sistema imune de eliminar as células que são potencialmente reconhecidas. Essa primeira etapa pode induzir variantes pouco imunogênicas ou selecionar clones que adquirem mecanismos de evasão. Durante o período chamado de equilíbrio as células tumorais podem estar estagnadas ou obedecendo a uma dinâmica de crescimento e eliminação na sua interação com o sistema imune. Quando ao menos um clone escapa da vigilância do sistema imune, o tumor se estabelece iniciando a chamada fase do escape, dando início ao câncer (Figura 1.3).

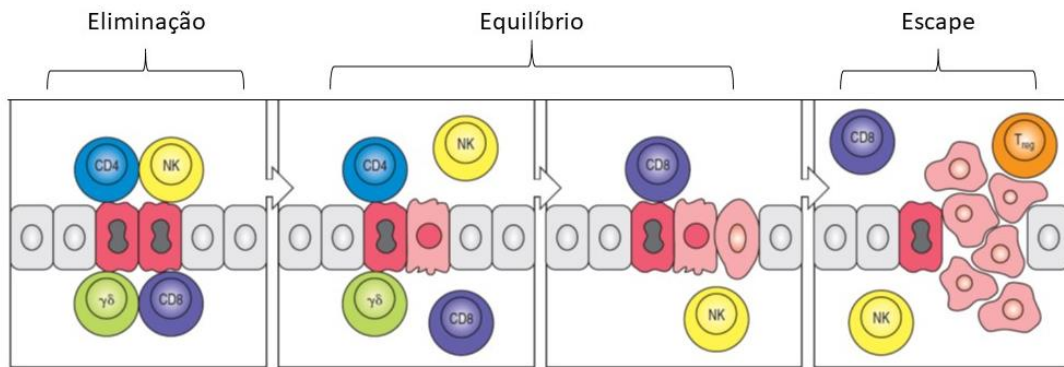


Figura 1.3: Hipótese dos três Es da imunoedição do câncer. Essa hipótese explica a interação das células tumorais com o sistema imune para a formação do tumor. Eliminação representa a etapa que as células do sistema imune são capazes de eliminar células potencialmente tumorais. Fase de equilíbrio representa a permanência células tumorais pouco imunogênicas que podem produzir variantes com diversos mecanismos de escape do sistema imune, sendo representada pela terceira etapa. Adaptado de Murphy (2012).

Há diversos mecanismos conhecidos que tornam o tumor oculto para o sistema imunológico. Os pesquisadores James P. Allison e Tasuku Honjo, laureados pelo Nobel de Fisiologia e Medicina de 2018, descobriram a proteína CTLA-4 (do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) e PD-1 (do inglês *Programmed cell death protein 1*), respectivamente. Apesar dessas proteínas serem naturalmente expressas em algumas células dos organismos, as células tumorais utilizam desses mecanismos para inibir a ativação dos linfócitos T que reconheceram antígenos tumorais. (LEACH; KRUMMEL; ALLISON, 1996; ISHIDA *et al.*, 1992). O CTLA-4 inibe a função das células T, competindo com a molécula co-estimulatória CD28 pelos ligantes CD80 e CD86 das células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *Antigen Presenting Cell*), e o PD-1 inibe a ativação das células T quando as células alvo expressam seus ligantes, PD-L1 e PD-L2 (do inglês *Programmed death-ligand 1/ 2*). Além dessas, existem outras moléculas inibitórias como LAG-3 (do inglês *Lymphocyte-activation gene 3*) e Tim-3 (do inglês *T cell immunoglobulin and mucin domain 3*). O bloqueio do LAG-3 pode restaurar a função das células T citotóxicas e bloquear a ação das células T reguladoras (Tregs) e o bloqueio do Tim-3 pode induzir a apoptose das células T CD4+ e CD8+. Este bloqueio de moléculas inibitórias, principalmente quando utilizadas como tratamento, usualmente é chamado de bloqueio de checkpoint (GRYWALSKA *et al.*, 2018).

Além do tumor possuir mecanismos de síntese e expressão de proteínas inibidoras do checkpoint imunológico eles podem ainda modificar o fenótipo e/ou papel de algumas células do sistema imune. Células conhecidas como células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC, do inglês *Myeloid-derived suppressor cells*) representam um dos maiores componentes do microambiente tumoral. Elas têm capacidade de auxiliar a progressão tumoral, angiogênese e invasão de tecido saudável por células tumorais (KUMAR *et al.*, 2016). Outro componente importante para a manutenção do tumor são os macrófagos associados a tumor (TAMs, do inglês *Tumor-associated macrophages*). Os macrófagos também são um dos maiores componentes das células imunes infiltradas no tumor e expressam várias citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento que induzem a proliferação das células tumorais, capacidade metastáticas, angiogênese além de recrutar células T regulatórias (Tregs) e MDSC para o microambiente tumoral (OKŁA *et al.*, 2016).

Os mesmos mecanismos de evasão tumoral acontecem tanto em tumores sólidos quanto em cânceres hematológicos. Em ambos os casos, essas células podem não expressar o complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I para não apresentar antígenos tumorais, expressar ligantes inibitórios e também recrutamento das células MSDCs, TAMs e Tregs. Porém, em linfomas de Hodgkin, a presença das células Tregs tem impacto prognóstico contrário ao observado em tumores sólidos, sendo associadas a prognósticos favoráveis. Ainda não está claro o mecanismo de ação, mas acredita-se que as Tregs agem diretamente nas células do linfoma. Além dos mecanismos compartilhados já conhecidos, os mecanismos de evasão prevalente principalmente em leucemias são a baixa produção de neo-antígenos devido à baixa carga mutacional, além de impedir o acúmulo de DAMPs (do inglês *danger-associated molecular patterns*) para apresentação de antígenos para a maturação de células dendríticas, gerando tolerância (Figura 1.4) (CURRAN; GODFREY; KLINE, 2017).

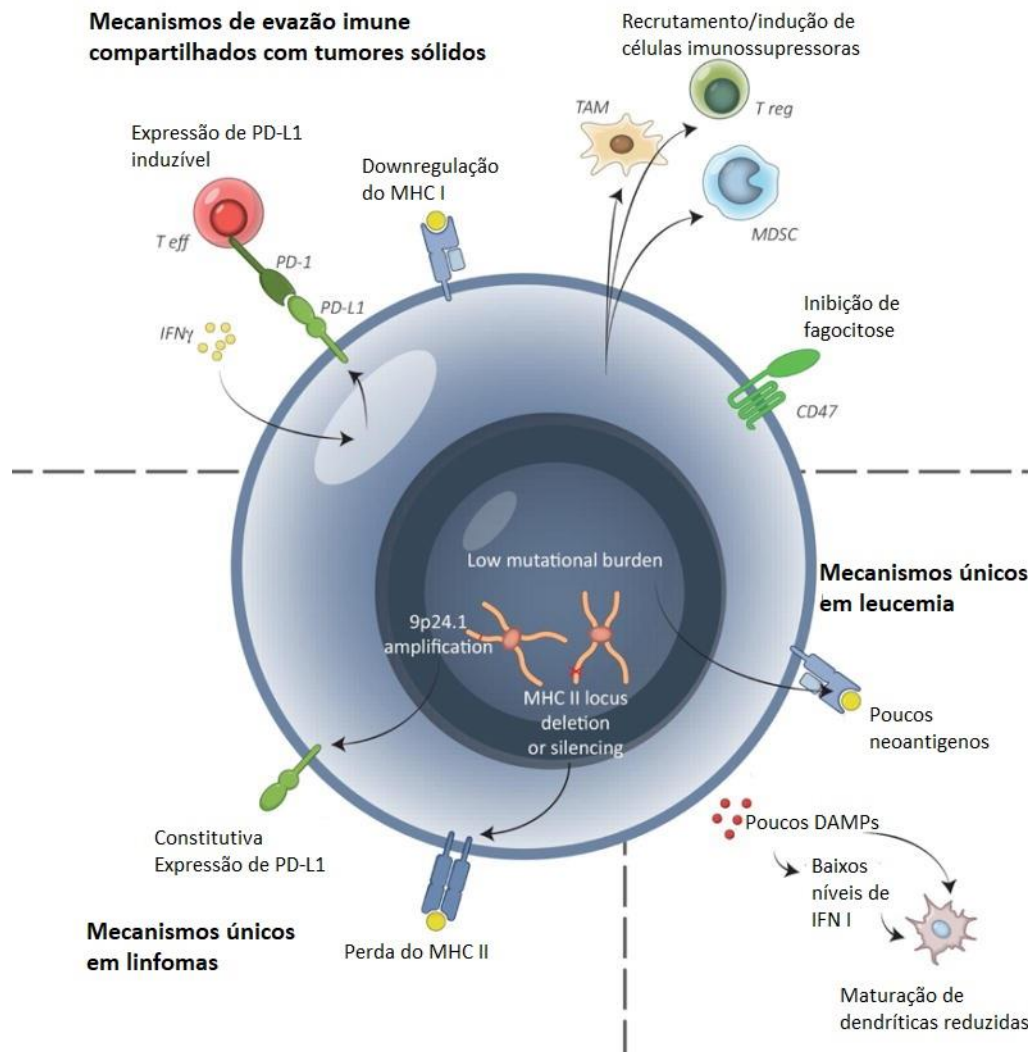


Figura 1.4: Mecanismos de escape do sistema imune. Alguns mecanismos de escape podem ser compartilhados por tumores sólidos e tumores hematopoiéticos. Existem, no entanto, mecanismos que podem prevalecer em certos tipos de câncer como: expressão constitutiva de PD-L1 e perda de MHC II para linfomas e baixa carga mutacional e maturação de células dendríticas reduzidas para leucemias. Adaptado de Curran, Godfrey e Kline (2017).

1.2 Imunoterapia

O pesquisador e médico William Coley ficou conhecido por suas contribuições em uma nova abordagem de terapias contra o câncer, a imunoterapia. Desenvolveu a Toxina de Coley, que consistia em um macerado de bactérias no qual era injetado no tumor dos pacientes e, em alguns casos após um período de tempo, era possível notar uma redução do volume tumoral. Este resultado foi a primeira evidência documentada de que estímulos ao sistema imune podem induzir o reconhecimento e eliminação de células tumorais (YANG, 2015).

A elucidação dos mecanismos que controlam a regulação do sistema imune no tumor foi um importante passo para o sucesso de novas abordagens imunoterapêuticas que visam tirar o “freio” do sistema imune. Recentemente, foram aprovados pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) a utilização de anticorpos monoclonais bloqueadores de checkpoint imunológico. Essas abordagens consistem no bloqueio de moléculas inibitórias como CTLA-4 (ipilimumabe) e PD-1 (nivolumabe), permitindo a ação das células T que têm potencial de reconhecer o tumor. Outros recursos utilizados na clínica são: a injeção de citocinas para estimular às células do sistema imune, a seleção *ex vivo* de células com potencial de reconhecer o tumor - transferência adotiva de células - ou o tratamento de células T modificadas com receptores sintéticos para reconhecimento de células específicas, como é o caso dos receptores quiméricos de antígenos (CAR, do inglês Chimeric Receptor Antigen) (STAMBROOK; MAHER; FARZANEH, 2017).

1.2.1. Transferência Adotiva de Células

O avanço na ciência e o aprimoramento das ferramentas de biologia molecular e celular propiciou a melhora do conhecimento sobre a biologia tumoral. Um dos principais fatos que beneficiou o avanço da imunoterapia de tumores foi a descoberta da existência de células T reativas contra possíveis antígenos tumorais. Isso foi evidente, principalmente, em tumores como melanoma, que contém linfócitos infiltrantes tumorais (TILs, do inglês *tumor infiltrating lymphocytes*) ou linfócitos do sangue periférico capazes de realizar lise celular quando estimulados com células do tumor autólogo através da abordagem *ex vivo* (HÉRIN *et al.*, 1987). O protocolo da transferência adotiva de células no caso dos TILs, consiste basicamente na extração dos TILs da massa tumoral, expansão *in vitro* utilizando células autólogas do tumor em co-cultura e doses de interleucina 2 (IL-2). Ensaios de lise celular comprovaram a citotoxicidade e especificidade dos TILs (MUUL *et al.*, 1987).

O primeiro ensaio clínico utilizando TILs foi relatado por Rosenberg *et al.* (1988) em pacientes com melanoma metastático. Inicialmente, houve uma indução prévia da imunossupressão usando o fármaco ciclofosfamida, e 11 dos 20 pacientes obtiveram resposta, porém apenas 1 paciente obteve remissão completa. Estudos posteriores, revelaram que os pacientes poderiam ter melhores benefícios ao tratamento caso a transferência de TIL fosse realizada após à quimioterapia de linfodepleção e/ou

irradiação corporal (DUDLEY *et al.*, 2005). Além de mudanças no protocolo de expansão de TILs, que consistia em dividir o tumor em vários pequenos pedaços e expandi-los individualmente. Devido à heterogeneidade tumoral, cada fragmento expandido possui uma grande diversidade de clones de linfócitos T, o que torna possível selecionar clones potencialmente reativos (ZHOU *et al.*, 2004).

Essa última abordagem levou a outros ensaios clínicos com taxa de resposta mais elevada. Pacientes foram randomizados em 3 grupos: (1) quimioterapia sozinha, (2) quimioterapia + irradiação corporal de 200cGy e (3) quimioterapia + irradiação corporal de 1200cGy e, após esses tratamentos, todos os grupos receberam infusão dos TILs junto a doses elevadas de IL-2. A quimioterapia era não mieloablativa e consistia na administração de doses de fludarabina e ciclofosfamida. A taxa de resposta de acordo com o critério de avaliação à resposta de tumores sólidos (RECIST, do inglês *Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*) foi de 49%, 52% e 72% respectivamente (ENBERG; DUDLEY, 2009). A resposta antitumoral foi duradoura para vários pacientes, sendo que 19 pacientes de 93 tiveram remissão completa da doença no período de 3 anos. Isso demonstra a eficiência e a resposta duradoura da transferência de TILs para tumores de melanoma metastático (ROSENBERG *et al.*, 2011).

A transferência adotiva dos TILs demonstrou ter uma resposta eficaz principalmente em melanomas metastáticos, levantando a necessidade da utilização de outros recursos para o tratamento de outros tipos de tumores que não possuíram uma boa resposta. Tumores sólidos que possuem elevada carga mutacional, geralmente estão relacionados à maior produção de neo-antígenos, tornando o tumor possivelmente imunogênico, o que leva as melhores respostas às abordagens imunoterapêuticas. (THORSSON *et al.*, 2018).

Em alternativa, pode-se construir células T com um direcionamento alvo-específico. A identificação dos antígenos altamente expressos em tumores levou ao isolamento dos receptores de células T (TCR, do inglês *T Cell Receptor*) com alta afinidade. Os primeiros antígenos descritos em melanoma/melanócitos foram MART-1 e gp100. Estes antígenos foram utilizados como alvo para a construção de células T com TCRs específicos em pacientes com melanoma metastático. A resposta ao tratamento foi relativamente baixa quando comparada com a utilização dos TILs: 30% para MART-1 e 19% para gp100. Além disso, as células T com TCR tiveram

ação “off-target”, ou seja, reconheceram alvos não tumorais, havendo casos de eritema, destruição de melanócitos epidérmicos e infiltrados difusos de células CD8+ na pele, perda auditiva e uveíte (inflamação na camada média dos olhos) (JOHNSON *et al.*, 2009).

Contudo, outros alvos para os TCRs transgênicos que se mostraram eficazes foram os antígenos câncer/testis (CTA, do inglês *Cancer/testis antigens*) que formam um grupo de antígenos derivados de tumores ou linhagens germinativas, como exemplificado pelo antígeno NY-ESO-1. De acordo com o critério do RECIST, a taxa de resposta para pacientes com melanoma metastático foi de 55% e de 61% para sarcoma de células sinoviais em pacientes tratados com células T cujos TCRs reconheciam o NY-ESO-1 (ROBBINS *et al.*, 2014).

Apesar de promissora, a funcionalidade da transferência adotiva de células, ou o direcionamento específico da célula via TCRs transgênicos, podem ser impedidas diretamente pelo microambiente tumoral. Pois, em ambos os casos é necessário a apresentação do antígeno via MHC e a presença de moléculas co-estimulatórias. Um dos diversos mecanismos de escape tumoral e bem esclarecido é a não externalização ou perda da molécula de MHC, e conseqüentemente, a não apresentação de antígenos próprios ou não próprios, impedindo possíveis ativações de células T reativas. Enquanto a apresentação dos antígenos pelas moléculas de MHC de classe I é requisito tanto para a terapia com TCRs transgênicos quanto para TILs, para a terapia com TILs a presença prévia de linfócitos infiltrando o tumor já é um critério que exclui a maioria dos pacientes para essa modalidade terapêutica por não possuir esses linfócitos intratumoral. (CURRAN; GODFREY; KLINE, 2017).

Para contornar estas limitações, foram introduzidos nas células T os Receptores Quiméricos de Antígenos (CAR), que possuem a capacidade de reconhecer uma molécula específica de interesse sem a necessidade do reconhecimento via MHC. Os CARs revolucionaram o tratamento contra o câncer, principalmente em tumores hematológicos de células B (ROHAAN; WILGENHOF; HAANEN, 2018).

1.2.2. Receptores Quiméricos de Antígenos

Os anticorpos são moléculas compostas por dois tipos de cadeias polipeptídicas, denominadas cadeia pesada ou H e a outra cadeia leve ou L, consistindo em domínios constantes (C) de cadeias leves e pesadas (C_L e C_H , respectivamente) e domínios variáveis (V) de cadeias leves e pesadas (V_L e V_H , respectivamente). A região que contém atividade de ligação com o antígeno é conhecida como fragmento Fab (do inglês *fragment antigen binding*) e a porção de interação com moléculas efetoras é denominada fragmento Fc (do inglês *fragment crystallizable*) (MURPHY, 2012).

De forma similar ao fragmento Fab, os TCRs são constituídos por duas cadeias polipeptídicas denominadas receptores de células T α (TCR α) e receptores de células T β (TCR β) em sua maioria. Suas regiões C e V possuem homologia as regiões da imunoglobulina (Figura 1.5). Apenas o reconhecimento do TCR com o antígeno não permite a sinalização, sendo necessário a associação com outras moléculas como CD3 γ , CD3 δ e CD3 ϵ , formando o complexo CD3 e também a cadeia CD3 ζ . A ativação ocorre devido a fosforilação da tirosina chamada de motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM, do inglês *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) (MURPHY, 2012).

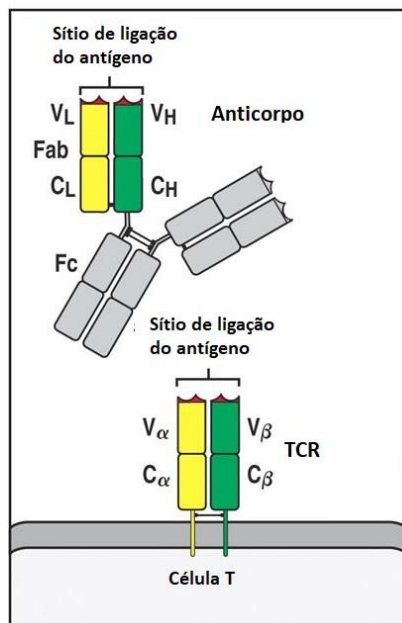


Figura 1.5: Comparação entre anticorpo e TCR. A Figura mostra a similaridade do fragmento Fab do anticorpo com a estrutura do TCR. Adaptado de Murphy (2012).

Essa similaridade permitiu o desenvolvimento de moléculas híbridas ou quiméricas, com regiões derivadas do TCR e dos anticorpos. Com o objetivo de entender o funcionamento da ativação de células T com restrição via MHC, um dos primeiros estudos que construiu moléculas quiméricas substituiu as cadeias α e β do complexo de TCR por V_L e V_H das imunoglobulinas, criando células T capazes de ter ação citotóxica sem apresentação via MHC (GROSS; WAKS; ESHHAR, 1989). A partir daí, para facilitar a inclusão de diferentes tipos de domínios estruturais e o aperfeiçoamento do receptor, desenvolveu-se as chamadas “T-bodies,” que são a junção do fragmento variável de cadeia simples (scFv, do inglês *single-chain variable fragment*) de um determinado anticorpo, com os ITAMs da cadeia ζ dos TCRs (ESHAR *et al.*, 1993).

Atualmente é costume definir T-body como CAR de primeira geração. Porém a eficácia dessas células na terapia pode ser limitada, devido à sua baixa citotoxicidade e persistência das células são curto prazo. Para contornar essa limitação foram criados receptores de segunda geração, que contém na sua parte intracelular domínios derivados dos coestímulos CD28, OX40 ou 4-1BB, por exemplo, melhorando substancialmente a eficácia anti-tumor e a persistência *in vivo* por promover os dois sinais necessários para a ativação das células T; o reconhecimento do antígeno via MHC e sinais de ativação das moléculas coestimulatórias (HOMBACH; RAPPL; ABKEN, 2013). O CAR de terceira geração possui dois sinais de coestímulos, porém as células T CAR anti-CD19 com os domínios CD28,4-1BB e ζ (α CD19-28-BB- ζ) não demonstraram uma melhor eficácia na ação contra o tumor quando comparadas com o CAR de segunda geração α CD19-BB- ζ (MILONE *et al.*, 2009). Por fim, foram criadas as células T CAR de quarta geração ou “TRUNKs” que podem ser programadas para induzir a expressão de ligantes coestimulatórios e/ou secreção de citocinas (Figura 1.6) (PEGRAM *et al.*, 2012).

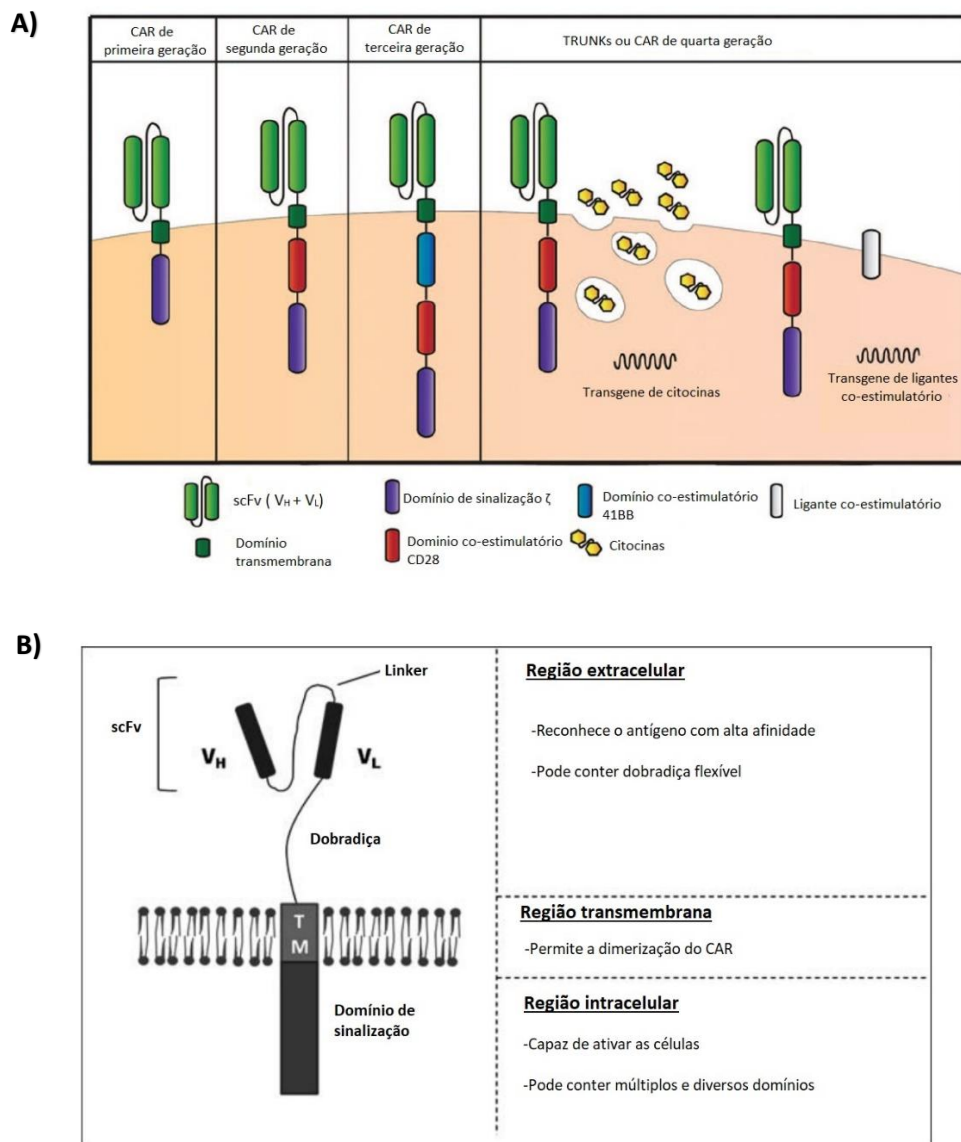


Figura 1.6: Diferentes gerações e estrutura dos Receptores Quiméricos de Antígenos.

A) As diferentes gerações dos CARs estão relacionadas com o número de domínios intracelulares. A quarta geração, a mais recente, geralmente são CARs derivados da segunda geração que aprimoram a eficácia induzindo a produção de citocinas e/ou de moléculas estimulatórias. Adaptado de Brentjens e Curran (2012). **B)** Estrutura do CAR de segunda geração. A porção extracelular é derivado de scFv de anticorpo e tem função de reconhecimento celular. Na região intracelular, estão presentes os domínios para a ativação das células T independente de MHC. Adaptado de Chicaybam, Sodr e e Bonamino (2011)

Em agosto de 2017 ocorreu a aprova o pelo Food and Drug Administration (FDA) das primeiras c lulas T CAR+, CTL019 (tisagenlecleucel, ou nome comercial

Kymriah) desenvolvida pelo grupo farmacêutico Novartis e posteriormente a aprovação do axicabtagene ciloleucel (YESCARTA) do grupo Kite Pharma. Este foi o marco da primeira terapia gênica sancionada nos Estados Unidos. Essa terapia foi indicada para tratar LLA-B e linfoma difuso de grandes células B (DLBCL), respectivamente (NOVARTIS, 2017; FDA, 2017). A estrutura utilizada nestes CARs aprovados pelo FDA é de segunda geração com o scFv que reconhece a proteína CD19 e, no caso do produto da Novartis, 4-1BB como domínio co-estimulatório e CD3 ζ como domínio de sinalização (19BB ζ) (VAIRY *et al.*, 2018) e para o CAR da Kite Pharma, o domínio do CD28 no lugar do 4-1BB (recentemente adquirida pela Gilead). Desde as impressionantes respostas demonstradas em publicações para o tratamento de pacientes com linfoma e LLA-B (KOCHENDERFER *et al.*, 2010; GRUPP *et al.*, 2013), a terapia com células T CAR+ tem demonstrado resultados promissores. Segundo o site da Novartis, a estimativa de sobrevida global em pacientes com LLA-B previamente recidivada após 12 meses do início do tratamento é de 76%.

Contudo, as principais barreiras para o funcionamento extensivo dessa terapia para todos os pacientes com tumores de células B podem ser relacionadas no momento da produção, no qual o paciente não tem células suficientes para realizar a leucaférese ou as células não conseguem se expandir *in vitro* ou *in vivo* (NEELAPU *et al.*, 2017), e também pode estar relacionado quanto à modulação do antígeno, ou seja, quando as células perdem ou deixam de expressar a proteína de interesse, no caso CD19 (SOTILLO *et al.*, 2015). Além disso, após o início do tratamento, alguns pacientes podem apresentar algumas características relacionadas a terapia com células CAR, como a neurotoxicidade e principalmente podem desenvolver a síndrome de liberação de citocinas (CRS, do inglês *cytokine-release syndrome*), que em alguns casos, podem ocorrer em até 100% dos pacientes tratados (MAUDE *et al.*, 2014).

A produção das células T CAR+ envolve processos que demandam diversos cuidados e um alto controle de qualidade a fim de se obter um resultado eficiente. Primeiramente é necessário que o paciente passe por leucoaférese e os linfócitos separados conforme o tamanho e a densidade pela técnica de elutrição (em alguns casos, posterior separação dos subgrupos CD4/CD8 por beads conjugadas a anticorpos específicos). Em seguida, as células são ativadas por beads anti CD3/CD28 (LEVINE *et al.*, 2017) ou, alternativamente, utilizando células apresentadoras de antígenos profissionais (APC, do inglês *antigen-presenting cell*).

Estas células apresentam a proteína específica de reconhecimento do CAR e, simultaneamente, a proteínas virais, como CMV e EBV. As APCs têm capacidade de ativar apenas as células que reconhecem os antígenos, selecionando-as, além de produzir linfócitos reativos a proteínas virais com capacidade de controlar possíveis infecções durante o transplante (MICKLETHWAITE *et al.*, 2010). Ao longo do processo de ativação e expansão, os linfócitos T são transduzidos por vetores lentivirais (no caso da CTL019) e incubados por 9 a 11 dias para posterior re-infusão nos pacientes. Esse processo geralmente é feito em biorreatores que garantem a troca de gás e a mistura necessária da cultura (LEVINE *et al.*, 2017).

As células T CAR+ anti-CD19 reconhecem a proteína intacta da superfície celular (VONDERHEIDE; JUNE, 2013). Os principais mecanismos de resistências tumorais que podem inibir a ativação da citotoxicidade celular são a inibição via bloqueio de checkpoint (LI *et al.*, 2017) e a perda do antígeno escolhido (MAJZNER; MACKALL, 2018). Para leucemias de células B, a proteína CD19 é um excelente alvo pois é um co-receptor exclusivo expresso desde a fase inicial da ontogenia das células B até a diferenciação em células plasmáticas, o que permite o tratamento de leucemia derivadas de células B em diferentes estágios de amadurecimento (BRENTJENS *et al.*, 2011). Vale ressaltar que CD19 não é um antígeno tumoral, mas sim da linhagem de células B. Desta forma, o tratamento com CAR pode resultar na eliminação de todas as células B do indivíduo. Sendo este um dos maiores desafios de utilizar tratamento com células T CAR em tumores sólidos: identificar um antígeno exclusivamente tumoral devido ao compartilhamento das proteínas do tumor com proteínas de tecidos saudáveis. Outro desafio é a heterogeneidade tumoral, que faz com que um alvo não esteja presente em todas as células do tumor.

Apesar do sucesso em tumores hematológicos, os primeiros testes clínicos utilizando a terapia com células T CAR+ foram realizados em tumores sólidos como carcinoma renal (LAMERS *et al.*, 2006) e o neuroblastoma (PARK *et al.*, 2007). No entanto, os resultados foram poucos satisfatórios. Alguns ensaios clínicos para tumores sólidos encontram-se em andamento, como o uso de CAR anti-HER2 para câncer gástricos e sarcoma avançado, anti-EGFR para glioma, anti-CD133 para câncer de mama e carcinoma hepatocelular, entre outros (XIA *et al.*, 2017). Em um estudo para tratar pacientes com sarcoma HER2+ mostram que apenas 3 em 19 pacientes tratados com CAR anti-HER2 obtiveram resposta completa (AHMED *et al.*,

2015) e em outro caso, 1 sobrevivente de 5 pacientes tratados com CAR anti-CEA para câncer de pulmão de pequenas células (KATZ *et al.*, 2015).

Devido à falta de uma resposta satisfatória nos tumores sólidos, uma nova abordagem utilizada para melhorar a eficiência das células T CAR+, é a utilização de combinação de terapias. Como citado anteriormente, as células T CAR+ de quarta geração, ou “TRUNKs”, tem incorporado um cassete induzível de citocina (exemplo IL-12 e IL-15), ou seja, apenas a célula é ativada, ocorre a produção local da citocina, elevando a citotoxicidade (VAN SCHANDEVYL; KERRE, 2018). Outra maneira de aprimorar a terapia é a utilização de bloqueio de checkpoint imunológico simultaneamente (SERGANOVA *et al.*, 2017), ou até a associação de diversas terapias, como apresentado por Wing *et al.* (2018), que demonstraram experimentalmente que a combinação de células T CAR+ anti receptor alfa de folato (FR- α) com adenovírus oncolítico armado com BiTE (do inglês, *bispecific T-cell engager*) anti-HER2 possuem efeito sinérgico em camundongos imunodeficientes com câncer de pâncreas induzido.

Apesar de promissora, o tratamento utilizando transferência adotiva de células T CAR+ possui um preço extremamente elevado. O tratamento com Kymriah (Novartis) custa US\$ 475.000 e Yescarta (Kite Pharma) US\$ 373.000. Este valor cobre apenas a geração do produto celular modificado geneticamente. Além disso, é necessário somar o gasto com internação e possíveis complicações médicas, elevando o custo final de no mínimo US\$ 750.000 (MULCAHY, 2018). Isso aponta a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para reduzir o custo da produção de células T CAR+ afim de disseminar essa terapia extremamente eficaz. A modificação genética utilizando vetores virais é um dos maiores responsáveis pelo alto custo dessa terapia, devido a necessidade de produção desses vetores, necessidade de salas de biossegurança e ainda uma série de validações do produto para liberação para utilização na terapia (HACKETT; A LARGAESPADA; COOPER, 2010). Abordagens como a modificação genética dos linfócitos por métodos não virais (IVICS *et al.*, 1997) e a utilização de APCs para ativação e expansão (CHICAYBAM *et al.*, 2013), e bem como diminuição do tempo em cultura para expansão dos linfócitos (GHASSEMI *et al.*, 2018), podem contribuir para diminuir o custo de produção.

1.2.3. Sleeping Beauty

Embora aprovada em diversos ensaios clínicos, a transferência gênica utilizando vetores virais possui algumas desvantagens e riscos: (i) a produção de vetores virais requer tempo e é dispendiosa, devido a necessidade de altos títulos virais, (ii) alto risco de contaminação na produção de vírus e chance de ocorrer recombinação entre a função do vetor e do empacotamento, produzindo vírus competentes, porém, este aspecto deve ser formalmente descartado de lotes de vetores para uso clínico e (iii) podem induzir resposta imunológica ou neurotoxicidade (HACKETT; A LARGAESPADA; COOPER, 2010). Esses problemas podem ser contornados através da utilização de vetores não virais, como os transposons. Um exemplo desta categoria de vetores são as construções baseadas no transposon chamado Sleeping Beauty (SB), derivado da reconstrução, por engenharia reversa, do gene transposase de peixes salmonídeos adaptados para utilizá-lo como uma ferramenta genética para mutagênese e transgenia em células de mamíferos (IVICS *et al.*, 1997).

O sistema SB possui dois componentes fundamentais – transposon e transposase - para realizar a função chamada de “corta e cola”. O transposon é responsável por levar o transgene de interesse para dentro do núcleo flanqueado por sequências repetidas terminais invertidas (ITRs, do inglês *inverted terminal repeat*) e a transposase é a enzima responsável por reconhecer, clivar a região das ITRs e integrar essa sequência no DNA do hospedeiro (Figura 1.7) (IVICS *et al.*, 1997). Esse sistema possui tropismo para integrar em sítios ricos em dinucleotídeos TA e íntrons. Como mostrado, o sequenciamento de 33 amostras modificadas geneticamente com o transposon SB, mostrou que 96,5% das integrações foram feitos em regiões intrônicas e apenas 3,5% em regiões codificantes e não codificantes (KEBRIAEI *et al.*, 2016).

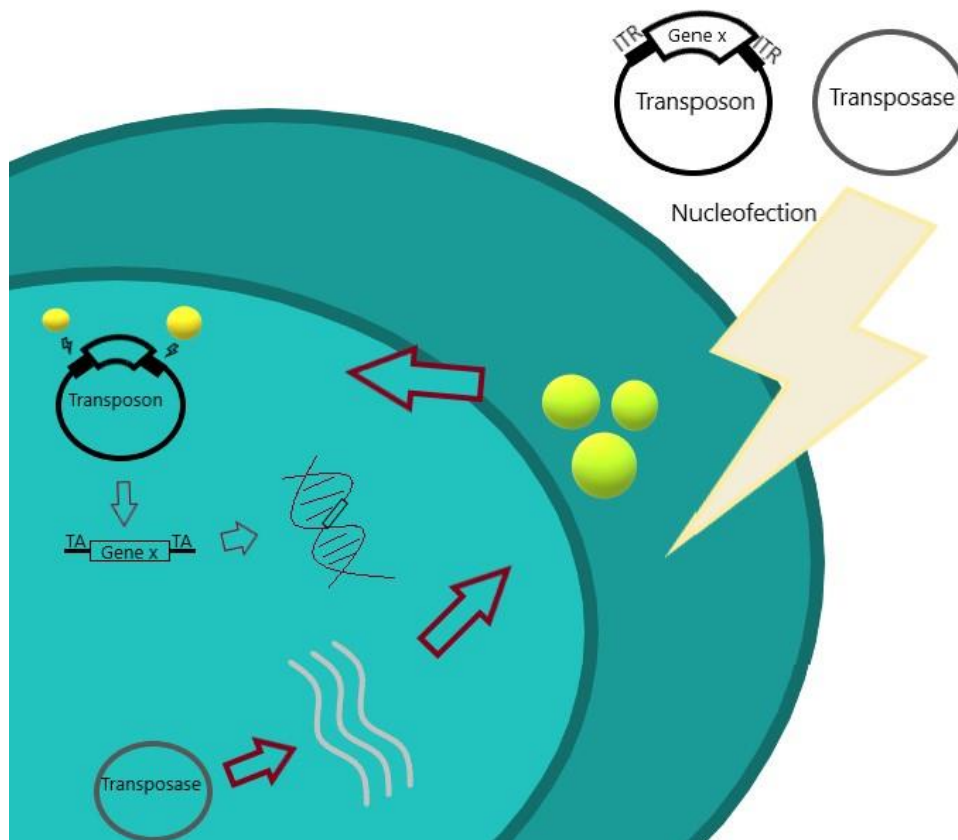


Figura 1.7: Mecanismo de integração do sistema *Sleeping Beauty*. O sistema transposon/transposase é carregado para dentro da célula, geralmente por eletroporação. A enzima transposase reconhece os ITRs do vetor transposon, cliva e insere no DNA hospedeiro. Processo chamado de “corta e cola”.

O primeiro ensaio clínico utilizando SB para integrar o CAR anti-CD19 nas células T foi descrito por Kebriaei *et al.* (2016). Os pacientes foram randomizados em dois grupos experimentais diferindo em relação ao tipo de transferência adotiva de células: transplante autólogo (n = 7, NCT00968760), ou transplante alogênico (n = 19, NCT01497184). Para o grupo que recebeu o transplante autólogo, a porcentagem de pacientes sem progressão de doença e sobrevida global foi de 83.3% e 100% respectivamente durante o período de 30 meses. Já para os pacientes com transplante alogênico, a porcentagem de 12 meses de doença livre de progressão foi de 53% e sobrevida global de 63%.

Um obstáculo para a utilização do sistema SB é a redução da eficiência de transfecção de acordo com o tamanho do transgene inserido no DNA. A eficiência cai significativamente com vetores maiores que 4kb, porém para terapias utilizando células T CAR ou TCR transgênicos, o tamanho geralmente não passa de 2kb, não

representando um empecilho (TORIKAI; MOYES; COOPER, 2017). Outro fator negativo é que método de transfecção por eletroporação junto ao tamanho do vetor, reduz a eficiência técnica. A utilização de vetores menores como minicircle carreando o transposon e RNA mensageiro (mRNA) para transposase, podem melhorar a viabilidade e a eficiência da transdução após a eletroporação (MONJEZI *et al.*, 2016).

Esses dados demonstram o potencial e a eficiência do método Sleeping Beauty como ferramenta gênica para a inserção do DNA de interesse. Investir nessa alternativa, pode promover uma alternativa de baixo custo para os tratamentos de leucemia LLA-B utilizando células T CAR+ de forma eficiente, como já demonstrado, além de auxiliar o aumento de pesquisas e testes clínicos na área de terapia gênica.

2. JUSTIFICATIVA

Nesse trabalho, temos como principal propósito abordar alternativas de baixo custo para a aplicação da imunoterapia com células T CAR modificadas com o sistema Sleeping Beauty para expressar o CAR 19BB ζ (receptor de segunda geração, com o coestímulo 4-1BB e sinalização ζ). Nos nossos experimentos, enfatizamos a técnica Point-of-care (POC), que consiste em uma abordagem de fornecer respostas rápidas, eficazes e objetivas para o paciente (DUBOIS; CLARKE, 2014). Além disso, a proposta de utilização de POC, seria a não necessidade de deslocamento das células utilizadas na terapia para modificação genética para grandes centros laboratoriais, ou seja, a modificação celular poderia ocorrer no próprio hospital. O sistema SB foi adaptado para utilização em células de mamíferos e não necessita de infraestrutura de biosseguranças quando comparado aos vetores virais. Essas características diminuem o tempo de preparo e re-infusão das células nos pacientes.

No contexto do nosso trabalho, o POC visa reduzir o tempo de preparo das células T CAR modificadas, que atualmente é de 10 a 15 dias, para um período de até 24 horas. Isso permitirá o tratamento dos pacientes de forma imediata, e possivelmente auxiliar o ganho de resposta terapêutica de forma menos custosa e mais acessível.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo validar diferentes abordagens para terapia com células T CAR+ com ênfase na técnica *point-of-care* (POC) em modelos *in vivo* de camundongos imunodeficientes enxertados com LLA-B humana.

3.2 Objetivos específicos

- i. Avaliar o modelo de expansão de células T CAR+ em co-cultura com a linhagem celular linfoblástica B L388 *in vitro* e *in vivo*.
- ii. Validar a técnica *point-of-care* para terapia com células T CAR+ em animais NSG enxertados com LLA-B.
- iii. Comparar tratamentos *in vivo* com diferentes doses de células T CAR+.
- iv. Verificar a ação anti-tumoral das células T CAR+ através da abordagem *point-of-care* em animais com tumores avançados.
- v. Validar *in vivo* a diferença de atividade antitumoral de células T CAR+ recém produzidas comparado com 24 horas de incubação.
- vi. Verificar a ação antitumoral das células T CAR+ na abordagem *point-of-care* em modelo de LLA-B agressivo
- vii. Comparar a atividade antitumoral da abordagem *point-of-care in vivo* com células expandidas com beads anti CD3/CD28.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plasmídeos: A construção original do 19BB ζ (Imai *et al.*, 2004) foi cedido pelo Dr Dario Campana (à época no St. Jude Children's Research Hospital, Tennessee, EUA). Esse CAR foi desenhado para mediar atividade anti-leucêmica por reconhecimento da proteína CD19 devido à interação da porção scFv extracelular do receptor e promover a ativação das células T por intermédio da porção intracelular derivada do 4-1BB e cadeia ζ . Para a detecção da presença da proteína CAR 19BB ζ na superfície da membrana por citometria de fluxo, nosso grupo adicionou um tag de Myc na sequência. As sequências do CAR 19BB ζ passaram por otimização de códon por síntese genética no plasmídeo pUC-57(Genscript). O cassete codificando o CAR 19BB ζ foi clonado no vetor transposon do sistema Sleeping Beauty pT3, utilizando as enzimas de restrição AgeI e NotI. O plasmídeo SB100x (Mátés *et al.*, 2009) que contém a sequência da transposase foi gentilmente cedido pelo Dr. Sang Wang Han (UNIFESP, Brazil).

4.2 Cultura de células: As linhagens celulares Nalm-6, RS4;11 e a linhagem celular linfoblástica B humana transformada por EBV, LAZ 388 (L388) (Nowill *et al.*, 1986) foram cultivadas utilizando o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) da Gibco, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de glutamina e 100u/ml de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich) na temperatura de 37°C e 5% de CO₂. A linhagem L388 foi irradiada com 100Gy para utilização em co-cultura com células primárias. As linhagens Nalm-6 e RS4;11 foram modificadas por vetores lentivirais para expressarem a proteína GFP, e as células positivas foram selecionadas por cell sorting (FACS, do inglês fluorescence-activated cell sorting).

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram obtidos filtros de redução de leucócitos (RS-Haemonetics) de bolsa de sangue de doadores saudáveis do INCA. As células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cells) foram retiradas do filtro utilizando 80 ml de Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês Phosphate Buffered Saline) e isoladas por centrifugação por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque-1077, na proporção 40ml de sangue junto a PBS e 10ml de Ficoll e centrifugadas por 890g durante 20 minutos com aceleração mínima desaceleração desligada. Posteriormente as células foram recolhidas e lavadas três vezes com PBS (centrifugações de 1800 RPM por 10 minutos seguida de duas lavagens de 1500 RPM por 10 min). Para o

experimento in vivo 6, antes do procedimento do Ficoll, o sangue foi incubado com RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail (StemCell) na proporção de 30ul por ml de sangue, posteriormente, todos os passos foram iguais aos descritos acima. O uso de PBMC de doadores saudáveis foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA.

4.3 Eletroporação e expansão de PBMC: Para a produção de células T CAR+, foi utilizado o sistema de eletroporação Lonza® Nucleofector® II, como descrito em (Chicaybam *et al.*, 2013). Um total de 10^7 ou 3×10^7 de PBMC foram ressuspensos em 100ul do tampão 1SM junto 20µg de 19BBζ e 1µg de SB100x, transferidos para cubeta de 0.2cm (Mirus Biotech®, Madison, WI, USA) e eletroporadas no programa U-14. A condição mock foi eletroporada apenas com o tampão. Após a eletroporação, a condição de 10^7 células por cubeta foram ressuspensas em 1ml de RPMI com 20% de SFB, 2mM de glutamina, 50U/ml de IL-2 e sem antibiótico e plaqueada em placas de 12 poços. Já para a condição de 3×10^7 , as células foram ressuspensas em 3ml de meio RPMI e colocadas em placa de 6 poços, ambos na temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

Nos casos de ativação dos PBMC, 24 horas depois da eletroporação as células são ativadas e estimuladas com a linhagem L388 irradiada na proporção de 5:1, linfócitos e L388 respectivamente. No caso de ativação com beads, foram utilizadas as beads T Cell TransAct CD3/CD28 (Miltenyi Biotec, MACS) na titulação 1:200 e, após 3 dias, para a retirada das beads, o sobrenadante foi recolhido e resposto com meio de cultura fresco. As células foram mantidas em cultura e utilizadas quando se encontram no final do primeiro ciclo de ativação. Cada ciclo de ativação possui duração de 12-16 dias e é determinado pela morfologia das células: quando as células estão ativadas, são capazes de formar cachos de células e são maiores quando comparado com linfócitos ao final do ciclo de ativação. Para a reativação (segundo ciclo, é necessária a utilizam-se Beads ou células L388 na mesma proporção.

Para a condição denominada POC (do inglês point-of-care), não houve ativação nem expansão das células. Após um período de 4 horas ou de 24 horas em meio de cultivo a 37°C a contar da eletroporação, as células foram utilizadas. Para a contagem celular foi utilizado o método de contagem com câmara de Neubauer com auxílio do corante azul de Trypan.

4.4 Citometria e anticorpos: Para caracterização do fenótipo das células, foram utilizados os citômetros Accuri C6, FACS Canto II ou FACSCalibur (BD Bioscience). As marcações dos fenótipos dos linfócitos ocorreram no dia posterior à eletroporação e ao final do primeiro ciclo de expansão. Para a marcação, são retiradas alíquotas das condições e as células são lavadas com PBS com 2% de soro fetal bovino. Em seguida os anticorpos são incubados com as células em lugares escuros por 15 a 20 minutos e lavadas novamente com PBS a 2% de SFB. As células foram fixadas com paraformaldeído 2%. Os anticorpos monoclonais utilizados e suas combinações para a realização de painéis estão descritos no quadro a seguir:

Quadro 4.1. Lista de anticorpos usados nos experimentos

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marca	$\mu\text{l}/10^6$ células
Anti-hCD3	UCHT1	PerCP-Cy5.5	Biolegend	0,2
Anti-hCD4	8E2	PE	eBioscience	0,5
Anti-hCD4	OKT4	APC	eBioscience	0,5
Anti-hCD4	SK3	PerCP	Biolegend	0,2
Anti-hCD8	SK7	APC	Biolegend	0,2
Anti-hCD8	SK1	APC-Cy7	Biolegend	0,2
Anti-hCD19	H1B19	FITC	eBioscience	1
Anti-hCD19	H1B19	PerCP-Cy5.5	eBioscience	1
Anti-hCD14	61D3	FITC	eBioscience	1
Anti-hCD56	MEM-188	PE	eBioscience	0,2
Anti-hCD62L	DREG-56	PE-Cy7	eBioscience	0,5
Anti-hCD62L	DREG-56	FITC	eBioscience	1
Anti-hCCR7	3D12	PE	eBioscience	1
Anti-hCD45RO	UCHL1	PE-Cy7	eBioscience	1
Anti-hTim3	F38-2E2	PE-Cy7	eBioscience	2
Anti-hLAG3	3DS223H	PE	eBioscience	1
Anti-hPD-1	MIH4	APC	eBioscience	2
Anti-c-Myc (mouse)	9E10	purificado	Santa Cruz	0,2
Anti-mouse IgG	policlonal	Alexa Fluor 488	Life Technologies	0,02 (1:200)
Anti-c-Myc (mouse)	9E10	Alexa Fluor 488	Santa Cruz	1
Anti-c-Myc (mouse)	9E10	Alexa Fluor 647	Santa Cruz	0,5

Quadro 4.2. Painéis de caracterização dos linfócitos.

Painéis de marcação			
Fenótipo	CD14	FITC	
	CD56	PE	
	CD8	APC Cy7	
	CD19	PerCP Cy5.5	
Exaustão	CD4	PerCP	
	CD8	APC Cy7	
	c-myc	Alexa	Fluor
		488	
	Tim3	PE Cy7	
	LAG3	PE	
Memória	PD-1	APC	
	CD4	PerCP	
	CD8	APC Cy7	
	c-myc	Alexa	Fluor
		647	
	CD45RO	PE Cy7	
CD62L	FITC		
CCR7	PE		

Os dados foram analisados pelo programa FlowJo software v10.1 (Tree Star).

4.5 Ensaio de citotoxicidade: Para avaliar o potencial citotóxico das células T CAR+ em diferentes dias, foi realizado ensaio de lise celular utilizando o corante fluorescente Calceína-AM (Thermo Fisher Scientific). As células alvo RS4;11 e Nalm-6 foram ressuspensas em meio completo com 15 μ M de Calceína-AM na concentração de 10^6 células por ml e incubadas por 30 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo agitado regularmente. Após a incubação, as células alvo foram lavadas duas vezes com meio completo, contadas e posteriormente ressuspensas

na concentração de $5 \times 10^3/50\mu\text{l}$. As células efetoras foram distribuídas por diluição seriada na placa de fundo V, abrangendo as razões de 50:1 a 0,75:1 em 100ul de meio completo. Em seguida, foram pipetadas as células efetoras. As condições foram realizadas em triplicata. A placa foi incubada por 4 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Para mensurar a lise total, foi feito meio completo com 2% de Triton X-100 e, a para lise espontânea, as células alvo foram incubadas apenas com meio. Após as 4 horas, 75ul do sobrenadante foi recolhido e transferido para placa preta e a fluorescência foi mensurada usando o equipamento SpectraMax® Gemini™ EM Microplate (filtro de excitação: 485 +/- 9 nm; filtro passa-banda: 530 +/- 9 nm). A lise foi calculada pela fórmula: $[(\text{liberação testada} - \text{liberação espontânea}) / (\text{liberação máxima} - \text{liberação espontânea})] \times 100$. O protocolo utilizado foi baseado na metodologia já descrita (Neri *et al.* 2001).

4.6 Modelo *in vivo*: Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA), com o número do protocolo 013/13, do INCA. Os animais são mantidos em condições ótimas, com gaiola, comida e água estéreis sendo trocadas semanalmente em fluxo laminar. Todas as gaiolas possuem filtros para evitar contato com ambiente externo, além de ar filtrado e monitoramento da umidade e temperatura ambiente (entre 20°C e 26°C).

Para o experimento em modelo animal, foram utilizados animais imunodeficientes NOD-scid IL2Rgammanull (NSG) obtidos do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA). A faixa de idade dos animais utilizado para experimentação foi de 8 a 12 semanas. Fêmeas foram utilizadas para experimentos com a linhagem celular RS4;11 GFP+ e os machos para a linhagem celular Nalm-6 GFP+. As células foram contadas e lavadas uma vez com PBS e ressuspendidas na concentração de $5 \times 10^6/100\text{ul}$ para RS4;11 GFP+ e $10^5/100\text{ul}$ para Nalm-6 GFP+, em PBS estéril. Os animais foram manipulados dentro do fluxo laminar. Para inoculação do tumor intracaudal, os camundongos foram imobilizados por um contensor mecânico e com o auxílio de gaze estéril umedecida com água morna. Para a injeção foi utilizada uma agulha 22G.

Para o tratamento utilizando células T CAR+, o dia após inoculação tumoral e o número de células variaram de acordo com o experimento. Foram separados três grupos: Controle ou PBS (animais que receberam 100ul de PBS no dia do tratamento), mock (animais que receberam células eletroporadas sem CAR) e 19BBζ (animais que

foram tratados com células T CAR+). Camundongos enxertados com RS4;11 GFP+ receberam o tratamento após 3 ou 8 dias da inoculação da leucemia e o número de linfócitos totais para o tratamento variou de 10^5 a 10^7 células (conforme indicado no experimento). Camundongos enxertados com Nalm-6 GFP foram tratados após 3 dias e com 3×10^6 de linfócitos totais.

Tabela 4.1 Resumo dos experimentos *in vivo* apresentados na dissertação

Experimento	Nº de animais	Nº de grupos	Tumor (nº de células)	Técnica	Início do tratamento	Duração
In vivo 1	25	3	RS4;11 (5×10^5)	Co-cultura com L388	3º dia	255 dias
in vivo 2	20	3	RS4;11 (5×10^5)	POC	3º dia	60 dias
In vivo 3	19	4	RS4;11 (5×10^5)	POC	3º dia	70 dias
In vivo 4	34	6	RS4;11 (5×10^5)	POC	3º dia	57/58 dias
In vivo 5	24	3	Nalm-6 (10^5)	POC	3º dia	26 dias
In vivo 6	49	8	RS4;11 (5×10^5)	POC/Expansão com Bead	8º dia	

A cada 10 dias, o sangue dos animais foi retirado pela veia submandibular utilizando lanceta de 5 mm (Goldenrod) e coletado em um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0.5M. O primeiro ponto do grupo enxertado com RS4;11 GFP+ foi avaliado 20 dias após o início do experimento e para o grupo Nalm-6 foi de 10 dias após o início. As hemácias do sangue foram lisadas com o tampão de lise ACK (do inglês Ammonium-Chloride-Potassium) por 20 minutos, centrifugadas por 1500 RPM por 5 minutos, lavadas com PBS e centrifugadas novamente. As amostras foram ressuspensas em PBS e lidas no citômetro para a avaliação da progressão de células GFP+.

Os animais foram monitorados 3 vezes por semana até apresentarem os primeiros sinais de caquexia, dando início ao monitoramento diário. Sinais de bem-estar como perda de peso, postura, mobilidade, diarreia e pelagem foram observados e determinaram o momento da eutanásia. Os animais foram eutanasiados utilizando câmara de CO₂ disponível no biotério. Após os sinais vitais cessarem, o sangue foi retirado por pulsão cardíaca com auxílio de seringa com agulha de 22G com 0,5M EDTA. Cérebro, baço, medula e fígado também foram retirados, macerados

mecanicamente e então ressuspensos em PBS. Todos os órgãos tiveram as hemácias lisadas com ACK e, em seguida, foram analisados por citometria de fluxo.

4.7 Análise estatística: Os resultados foram expressos com erro padrão da média (+- SEM). Os testes estatísticos utilizando para comparações entre médias de três ou mais grupos foram o One-way ANOVA seguido de teste Tukey para as comparações múltiplas. O teste t-student foi aplicado para comparações realizadas entre dois grupos. Para a curva de sobrevivência, o teste de Log-Rank foi empregado. GraphPad Prism 5 ou 8 foram os programas utilizados para o desenho dos gráficos e análises (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

5. RESULTADOS

5.1 *In vivo* 1 - Avaliação da função antitumoral de células T expandidas como linhagem LCL LAZ388

O protocolo de atual de produção de células T CAR+ consiste na ativação das células com beads específicas anti-CD3/CD28 seguido de transdução por vetores virais e subsequentemente expansão. Nossa primeira abordagem avaliada consiste na inserção da molécula 19BBζ por metodologia não-viral, baseada no transposon Sleeping Beauty, seguido de ativação e expansão das células T por mecanismo de co-cultura com linfócito alogênico transformado do vírus Epstein-Barr LAZ 388 (L388), que contém em sua superfície celular a molécula CD19. Foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo* para validar a eficiência desse sistema de expansão celular que tem um potencial baixo custo e a possibilidade de gerar linfócitos T que sejam anti-CD19, devido ao CAR, e anti EBV, uma vez que a linhagem L388 é transformada pelo EBV e atua como uma boa apresentadora de antígeno (Figura 5.1).

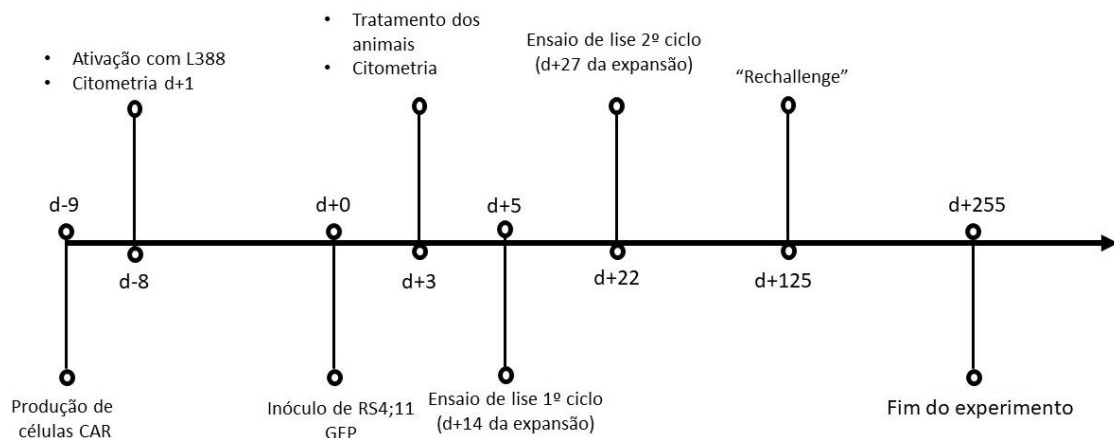


Figura 5.1: Linha do tempo do *in vivo* 1. Esquema mostra as principais etapas do experimento. Esse experimento consiste em expandir os linfócitos com co-cultura com a linhagem L388 por 12 dias. Os camundongos foram tratados após 3 dias do inóculo das células tumorais RS4;11 GFP+. Após 125 dias, RS4;11 foram inoculadas novamente nos animais que sobreviveram. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* também foi realizado nos dias 14 e 27 após o início da expansão dos linfócitos. Nomenclaturas d-9, d+1 por exemplo, significa 9 dias antes ou primeiro dia após a inoculação da leucemia no animal, respectivamente.

A linha do tempo da Figura 5.1 mostra de forma esquemática as principais etapas do experimento. Ensaio de lise foram realizados para validar a citotoxicidade *in vitro* ao final do primeiro ciclo (d+14) e ao final do segundo ciclo (d+27) da expansão das células T. No experimento *in vivo*, os camundongos foram enxertados com 5×10^6 células RS4;11 GFP e então randomizados após 3 dias em três diferentes grupos: (1) PBS, grupo tratado com PBS (n=8), (2) mock, grupo tratado com células eletroporadas sem plasmídeo (n=7) e (3) 19BBζ, grupo tratado com células T CAR+ (n=8). 125 dias após o inóculo das células tumorais os animais 19BBζ sobreviventes foram submetidos ao desafio, ou seja, as células RS4;11 GFP+ foram reintroduzidas e os animais foram então acompanhados até o fim do experimento.

As PBMC de doadores saudáveis foram separadas por método de Ficoll e eletroporadas nas condições sem plasmídeo (mock) e com os plasmídeos transposon/transposase (19BBζ). Após 24 horas da transfecção, as células foram marcadas e avaliadas por citometria de fluxo e estimuladas com células irradiadas L388 na razão 5:1 (respondedora: estimuladora), dando início ao primeiro ciclo de ativação/expansão. Os ciclos são avaliados de acordo com a morfologia das células, pois os cachos se desfazem e as células se tornam menores ao final do processo de ativação dos linfócitos T. O final do primeiro ciclo foi determinado no d+14, sendo então realizado o primeiro ensaio de lise. No mesmo dia, as células foram reestimuladas com a linhagem L388 nas mesmas condições, iniciando o segundo ciclo. Este último ciclo teve o término no d+27, e um novo ensaio de lise foi realizado (Figura 5.2).

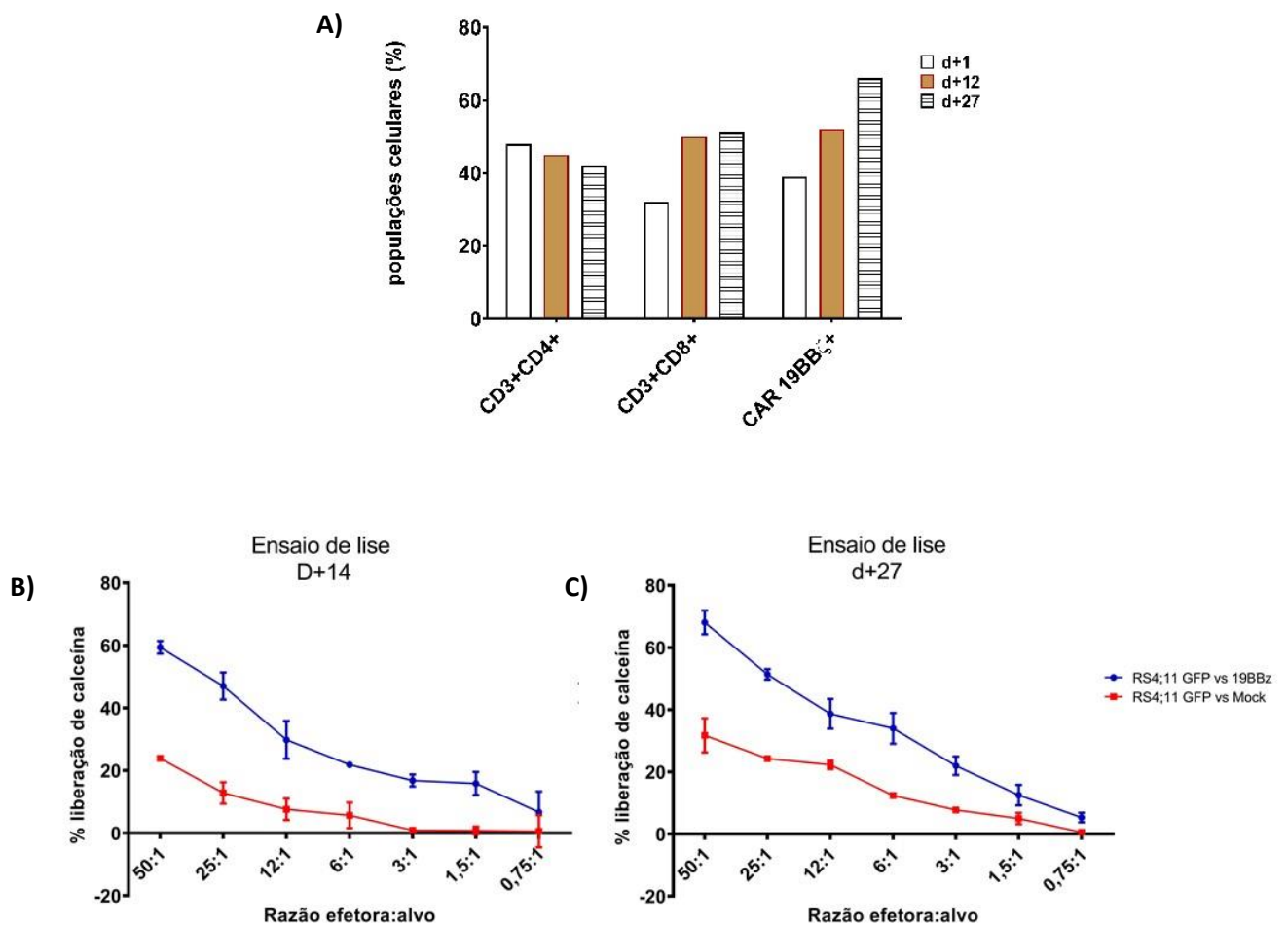


Figura 5.2: Subpopulações de linfócitos e ensaios de lise tumoral. **A)** Subpopulações de CD3+CD4+, CD3+CD8+ e células CAR+ em diferentes dias do doador utilizado nesse experimento determinado por citometria de fluxo. O d+1 é referente ao dia após eletroporação, d+14 referente ao final do primeiro ciclo e d+27, referente ao final do segundo ciclo determinado pela morfologia das células. Ensaio de citotoxicidade celular realizado com Calceína-AM em diferentes razões de linfócito (efetora) contra RS4;11 (alvo) no final do **B)** primeiro ciclo (14 dias após ao início da expansão) e **C)** segundo ciclo (27 dias após ao início da expansão). Anticorpos utilizados: c-myc purificado+ secundário Alexa 488, CD8 PE, CD3 PerCP Cy 5.5 e CD4 APC.

A expansão de PBMC em co-cultura com L388 irradiada é capaz de selecionar clones 19BBζ+ devido à expressão da molécula alvo CD19 na célula estimuladora. Este estímulo justifica o aumento de células T CAR+ ao longo da expansão, como mostra a Figura 5.2A. Há também crescimento da população de células CD3+CD8+ nos diferentes dias enquanto a população CD3+CD4+ tem pequeno decréscimo. O ensaio de lise celular dos dois ciclos apontou que a condição 19BBζ eliminou mais células RS4;11, porém a condição mock também mostra um efeito de reconhecimento das células alvos (Figuras 5.2A e B). Esse efeito também foi observado no modelo animal.

Para avaliar o potencial dessas células de eliminar LLA-B em modelo animal, os camundongos foram tratados após três dias do inóculo do tumor com células T previamente expandidas por 12 dias (um ciclo). Foram injetadas 3×10^6 de células na condição mock e 19BBζ (com aproximadamente $1,65 \times 10^6$ de células T CAR+, uma vez que o percentual de células CAR+ era 55%). Ao longo do experimento, os animais tiveram o sangue retirado a partir do dia 20 e a carga de GFP foi monitorada por citometria de fluxo (Figura 5.3).

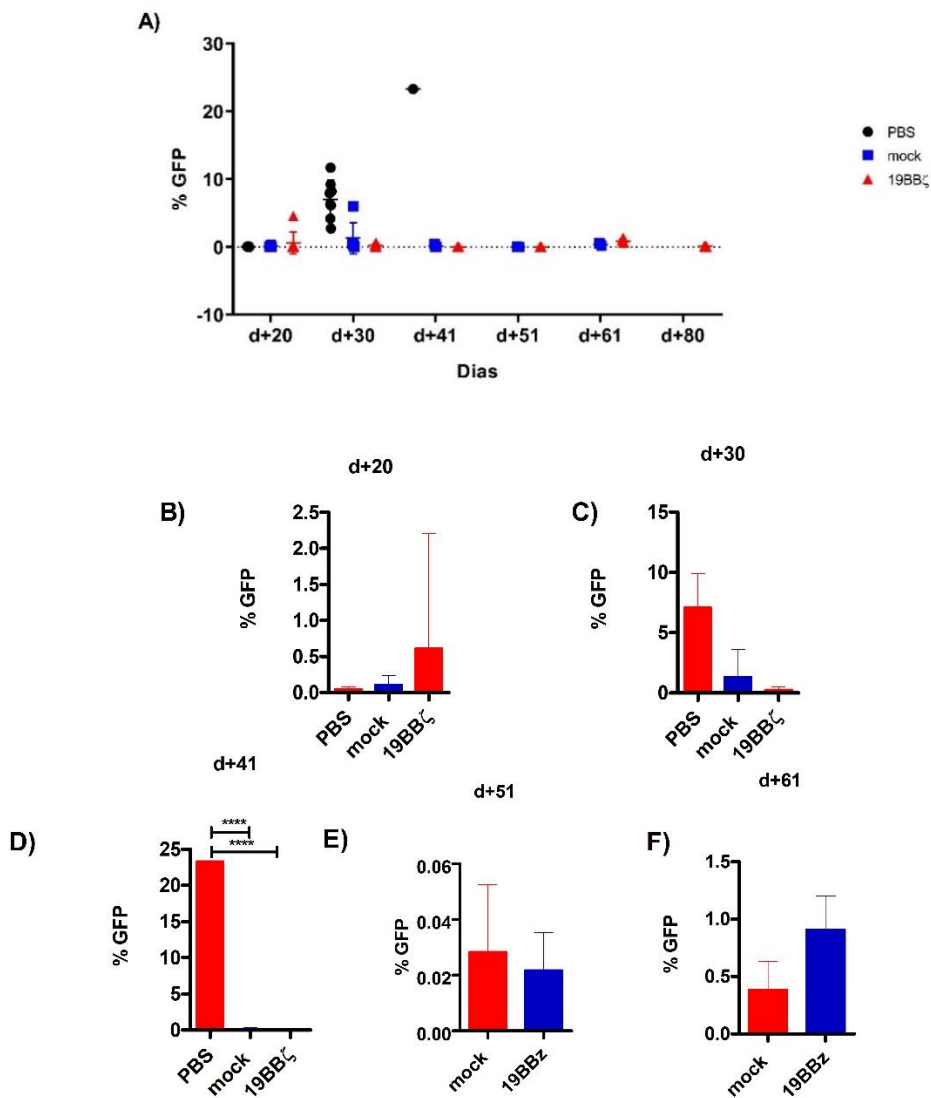


Figura 5.3. Monitoramento de células GFP+ no sangue ao longo do experimento. O sangue foi retirado dos animais a cada 10 dias via veia submandibular. As hemácias foram lisadas e a porcentagem de GFP+ foram aferidas por citometria de fluxo. **A)** Percentual de células GFP+ entre os leucócitos circulantes analisados ao longo dos dias. **B-F)** Comparação entre os grupos em cada dia em que o sangue foi retirado. Grupos: PBS n=8, mock n=7 e 19BBζ n=8. Nas figuras B-D, o teste estatístico utilizado foi o One-way ANOVA e nas figuras E-F o teste utilizado foi t-student. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A Figura 5.3 mostra o percentual de células GFP+ dentre os leucócitos circulantes nos camundongos ao decorrer do experimento. Os gráficos exibem o aumento significativo de células RS4;11 GFP+ no grupo PBS nos dias 30 e 41 quando comparado ao mock e 19BBζ. Em nenhum dos dias avaliados, houve diferença

estatística na carga de células GFP+ entre os grupos mock e 19BBζ no sangue periférico.

Os camundongos foram monitorados três vezes por semana no início do experimento e, quando começaram a apresentar indícios de caquexia, os animais foram monitorados diariamente. O pelo, peso, movimentação, fezes e postura foram avaliados a fim de determinar indícios de doença enxerto contra hospedeiro (DECH) como parâmetros para determinar a eutanásia. Os animais foram eutanasiados com auxílio da câmara de CO₂ e o baço, fígado, sangue, medula e cérebro foram macerados e processados para avaliar a porcentagem de GFP referente a cada órgão, como mostra Figura 5.4.

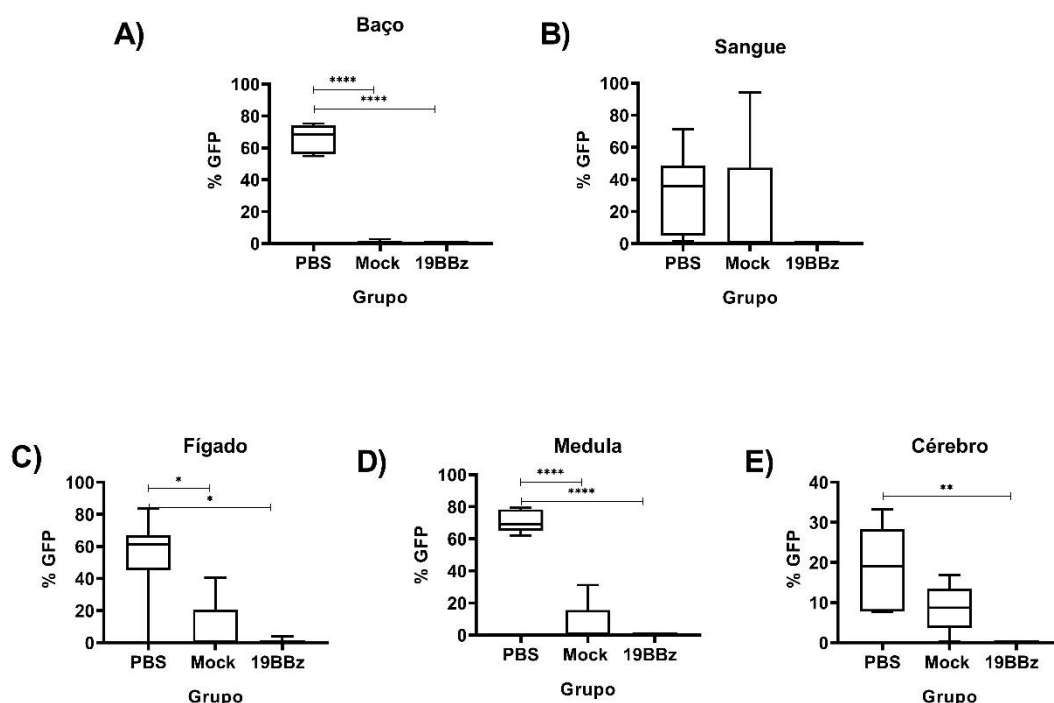


Figura 5.4: Carga de células GFP+ nos órgãos dos animais. As figuras mostram a porcentagem de células RS4;11 GFP+ nos órgãos dos animais após a eutanásia. Os órgãos foram retirados e macerados mecanicamente, as hemácias foram lisadas e as células analisadas por citometria de fluxo. **A)** Baço, **B)** Sangue, **C)** Fígado, **D)** Medula e **E)** Cérebro. Grupos: PBS n=8, mock n=7 e 19BBζ n=8. Teste utilizando foi One-way ANOVA com pós teste de Tukey. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Os camundongos dos grupos PBS e mock mostraram alterações nos movimentos, pelos e pesos e isso foi determinante para eutanásia. Os camundongos

do grupo 19BBζ não apresentavam alterações visíveis, porém o peso foi determinante para eutanásia. A análise dos órgãos mostra que o grupo PBS apresentou diferença de carga tumoral em relação ao mock nos órgãos como baço, fígado e medula. Quando comparado com o 19BBζ, o PBS demonstra diferença de carga tumoral no baço, fígado, medula e cérebro. Os grupos mock e 19BBζ não apresentaram diferença estatísticas.

A curva de sobrevida desse experimento demonstra que a condição mock tem potencial de melhorar a sobrevida dos camundongos enxertados com células RS4;11 GFP+ quando comparado ao controle não tratado PBS. Contudo, o grupo 19BBζ exibiu melhor performance quando relacionados com os outros dois grupos controles (Figura 5.5).

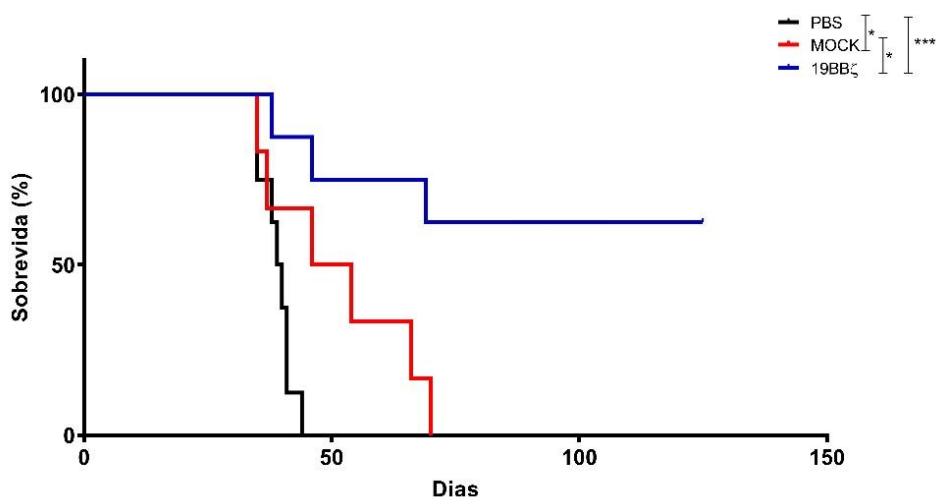


Figura 5.5: Curva de sobrevida dos animais tratados com células T expandidas através de co-cultivo com a linhagem L388. A figura mostra a sobrevida dos animais ao longo do experimento. Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Foram monitorados padrões de bem-estar do animal, o que determinou a eutanásia. Grupos: PBS n=8, mock n=7 e 19BBζ n=8. Teste estatístico utilizado: Log-Rank. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

No 125º dia, 5 camundongos do grupo 19BBζ permaneciam vivos e um animal foi eutanasiado para avaliar quanto a taxa de células tumorais e não foram detectadas células GFP+.

Foi realizado então o desafio destes 4 animais em remissão com uma nova dose de 5×10^6 RS4;11 GFP+. Os animais foram então monitorados três vezes por semana. Ao longo do experimento, dois desses quatro animais apareceram mortos

sem nenhuma razão aparente. Os camundongos restantes foram eutanasiados 255 dias após o início do experimento, e o DNA dos órgãos foi armazenado para avaliação da permanência de cópias de células CAR+ no futuro. Os órgãos também foram avaliados por citometria e não foram encontradas células GFP+.

Essa abordagem de expansão e seleção de células T CAR+ se mostrou eficiente nesse experimento realizado contra a linhagem de LLA-B RS4;11.

5.2 *In vivo* 2 - Avaliação *in vivo* da estratégia POC para gerar linfócitos T CAR+

Para avaliar a eficiência as células T CAR+ utilizando a estratégia POC, realizamos um primeiro experimento (*in vivo* 2) em 20 fêmeas de NSG, inoculadas com 5×10^6 de RS4;11 GFP. A data de inoculação foi definida como o dia 0 (d+0) (Figura 5.6). No dia seguinte, os camundongos foram randomizados de acordo com o peso, para que todos os grupos obtivessem a mesma média do peso corporal. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: (1) grupo PBS (n=6), animais tratados com 100ul de PBS, (2) grupo mock (n=5), animais tratados com 10^7 de células eletroporadas sem plasmídeo e (3) grupo 19BBζ (n=9), animais tratados com 10^7 células que foram eletroporadas com o CAR 19BBζ. O percentual de células CAR positivas neste experimento, avaliado 24 após a eletroporação, foi de 5.84%.

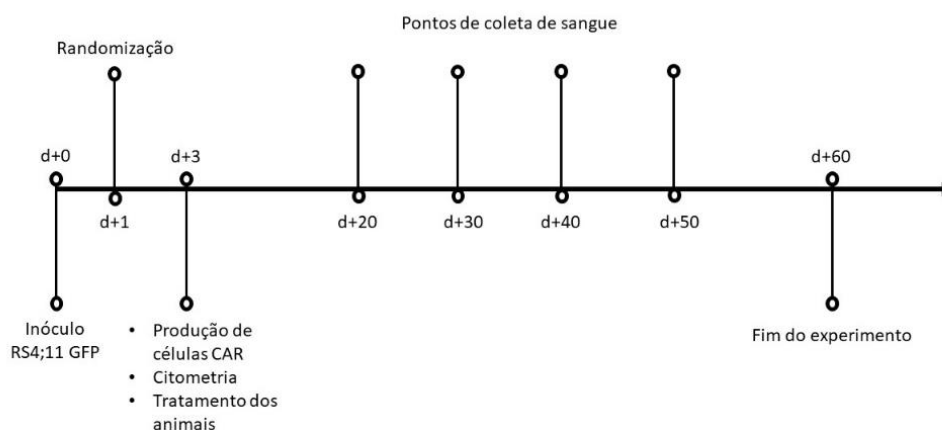


Figura 5.6: Linha do tempo do *in vivo* 2: Linha do tempo que representa os pontos principais do experimento *in vivo* 2. Os linfócitos foram modificados e injetados em camundongos portando o tumor RS4;11 GFP+ por três dias. A cada 10 dias, foram coletados sangue dos camundongos via veia submandibular. 60 dias após o início do experimento, os camundongos que restaram foram eutanasiados.

No terceiro dia, células mononucleadas foram separadas por método de Ficoll de um doador saudável, e foram eletroporadas 10^7 células por cubeta nas condições já descritas anteriormente. As células ficaram em repouso durante 4 horas em meio de cultura e na estufa e, posteriormente, foram contadas, lavadas com PBS e ressuspensas em 100ul de PBS, sendo injetadas 10^7 células por animal nas condições mock e 19BB ζ . Em seguida, as células foram inoculadas nos animais e, para o grupo PBS, foram inoculados 100ul de PBS estéril. No dia seguinte, as células remanescentes foram marcadas para avaliação do fenótipo por citometria de fluxo.

Para a análise de citometria, foi realizada a região de análise (“gate”) na população específica de linfócitos. A expressão do CAR no dia seguinte da eletroporação foi de 5,84%. Utilizamos o marcador de membrana CD3 para especificar linfócitos T e os marcadores CD62L e CCR7 para separar os linfócitos em subpopulações de memória central (CD62L+ CCR7+) e memória efetora (CD62L- CCR7-). Também foi avaliado o fenótipo com CD19 para detectar os linfócitos B e CD56 para células Natural Killer (NK) na mesma amostra (Figura 5.7).

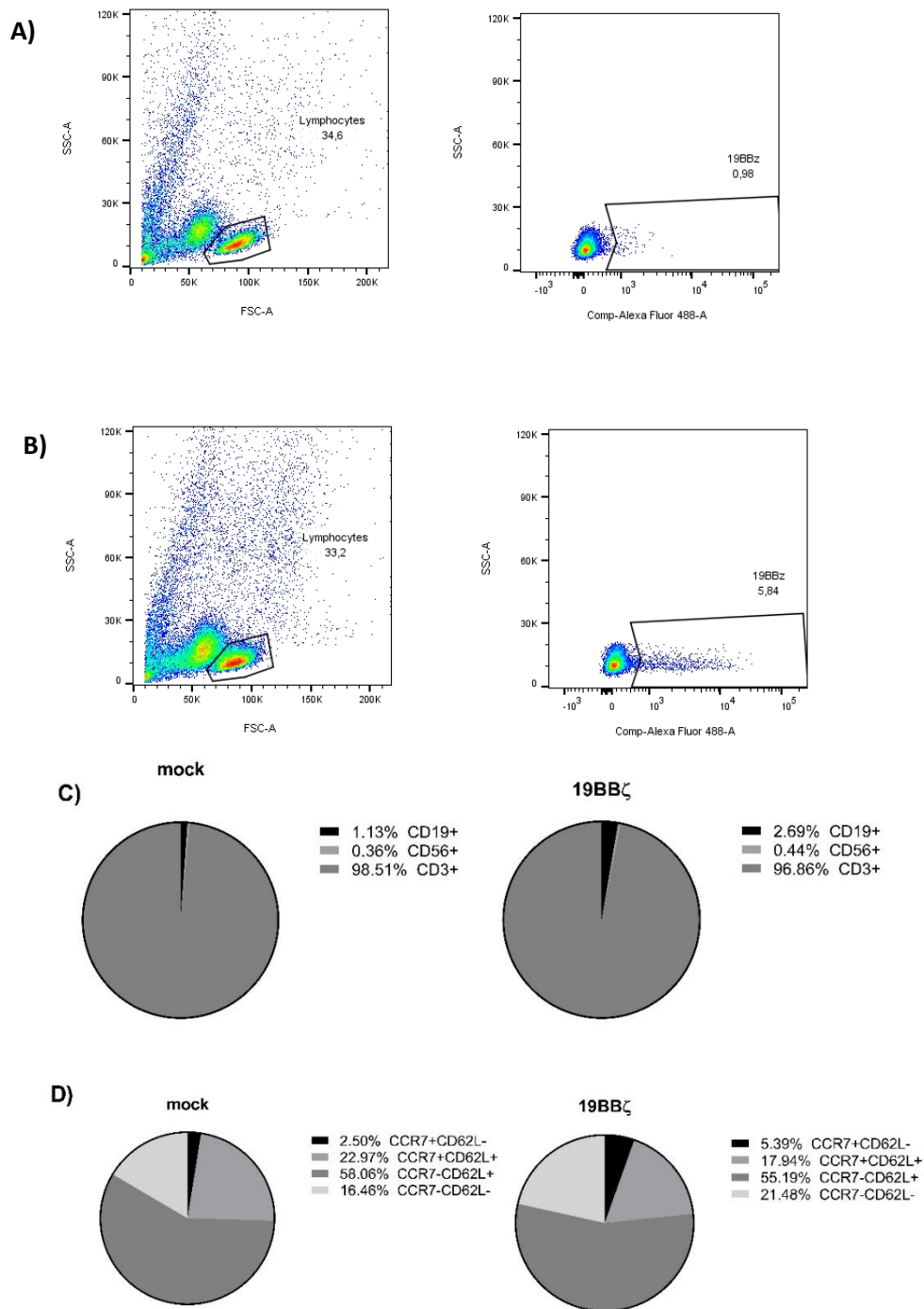


Figura 5.7. Caracterização do fenótipo das células do experimento *in vivo* 2: 24 horas após a eletroporação, o fenótipo das células foi analisado por citometria de fluxo. Para a análise, foi realizado o *gate* na população de linfócitos, como representados nas figuras A e B. **A)** Condição mock; **B)** Condição 19BBζ. A imagem da direita representa a marcação específica para o tag Myc do 19BBζ com o anticorpo anti c-myc purificado e o anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488. **C)** Marcação para CD19 FITC, CD56 PE e CD3 Percep cy5.5. **D)** Caracterização do fenótipo de memória para os linfócitos. Essa caracterização foi realizada na sub-população CD3+, com os marcadores CCR7 PE e CD62L PeCy7.

Podemos observar que 5.84% das células expressaram o CAR quando avaliado por citometria de fluxo (Figuras 5.7A e B) e que as células analisadas eram essencialmente células T (CD3+) (Figura 5.7C). As subpopulações de memórias CD3+ é representada pela maioria sendo populações intermediárias (CCR7- CD62L+ e CCR7+ CD62L-), 23% e 18% de memória central (CCR7+ CD62L+) e 16,5% e 21,5% de memória efetora (CCR7- CD62L-) representados por mock e 19BBζ respectivamente (Figura 5.7D).

No início do experimento, os animais foram acompanhados 3 vezes por semana e avaliados quanto a parâmetros como mobilidade, aspecto do pêlo, peso, presença de diarreia ou qualquer outro tipo de alteração. O sangue foi retirado a cada 10 dias via veia submandibular, iniciando no d+20. As hemácias do sangue foram lisadas e os leucócitos analisados por citometria de fluxo para acompanhar a carga de células GFP+ no sangue periférico dos animais (Figura 5.8). Amostras de sangue em papel filtro também foram coletadas para análises futuras de presença de CAR nos animais ao longo do experimento através de PCR em tempo real.

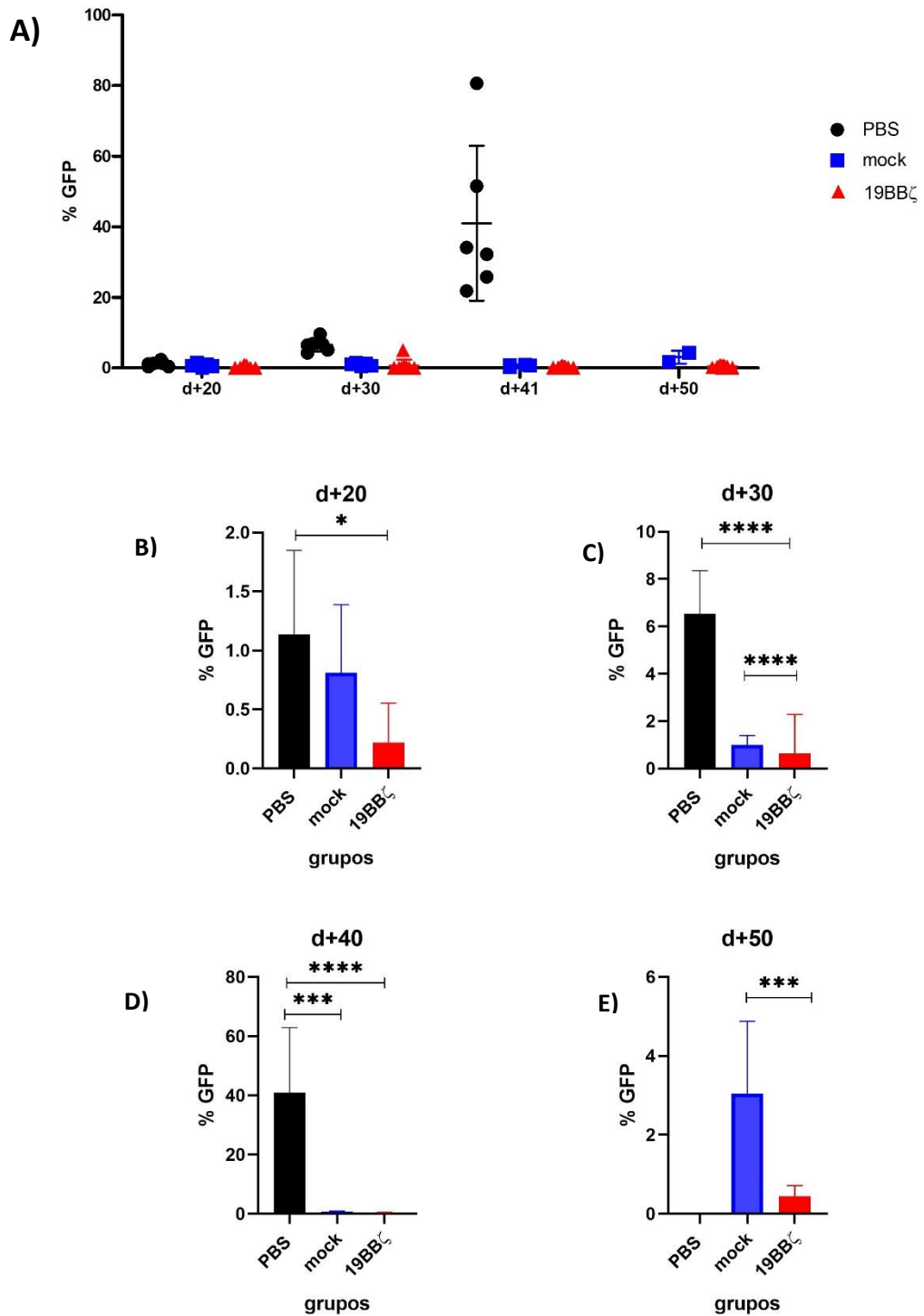


Figura 5.8 Monitoramento de células GFP+ no sangue ao longo do experimento do *in vivo 2* **A)** O sangue dos animais foi retirado via veia sub-mandibular a cada 10 dias, com início no vigésimo dia, para analisar a carga de RS4;11 GFP por citometria de fluxo ao decorrer do experimento de forma representativa. Figuras **B-E)** Os gráficos de barras representam a comparação entre os grupos em diferentes dias. Grupos: PBS n= 6, mock n=5 e 19BB ζ n=9. Análise estatística usada para as Figuras B-D foi one way ANOVA com pós teste Tukey. Na Figura E, foi utilizado o teste t-student (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A Figura 5.8A é representativa para a análise de sangue ao decorrer do experimento de forma ampla. As Figuras 5.8B-E mostram os dias de formas separados e com análises estatísticas cada ponto. As escalas foram adaptadas para uma análise mais detalhada. Destaca-se que o grupo PBS sempre possuiu carga de GFP mais alta que os outros dois grupos. E o grupo mock demonstrou carga mais elevada que o grupo 19BBζ, porém nunca ultrapassou 10%, demonstrando uma resposta em potencial dos linfócitos mock no sangue periférico. A Figura 5.8E representa o d+50. Neste ponto todos os animais tratados com PBS já haviam sido sacrificados, portanto o teste estatístico realizado foi o t-student.

Quando os animais apresentavam sinais de caquexia, como estipulados pelo Comitê de Ética, eram eutanasiados na câmara de CO₂, e foram retirados o baço, fígado, medula e sangue. Esses órgãos foram processados e analisados por citometria de fluxo para avaliar a carga de GFP (Figura 5.9). O DNA e pedaços dos órgãos foram guardados para análises futuras. É importante ressaltar que nenhum animal do grupo 19BBζ apresentou níveis de caquexia, e decidimos encerrar o experimento no dia 60. Portanto os gráficos que comparam o grupo 19BBζ, não representa a necessidade da eutanásia, e sim o fim do experimento determinado empiricamente.

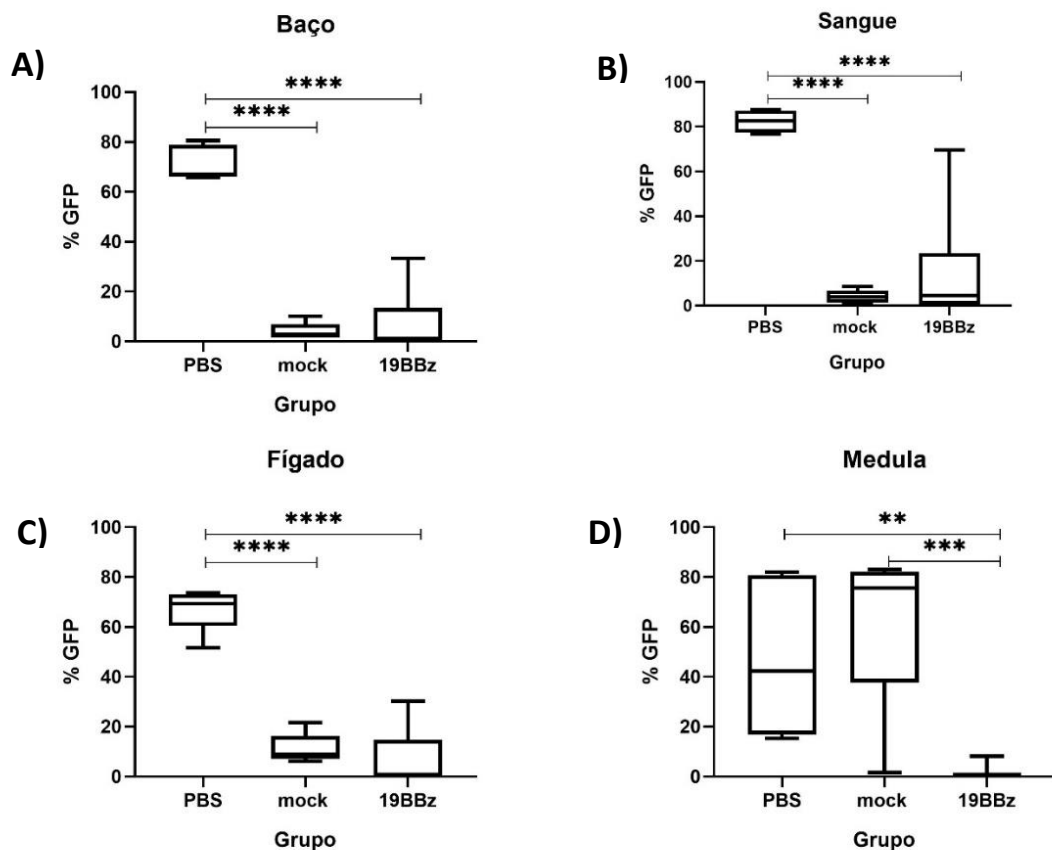


Figura 5.9: Análise da carga de células GFP+ nos órgãos. **A-D)** Baço, sangue, fígado e medula dos animais foram retirados após a eutanásia. Os órgãos foram macerados mecanicamente, as hemácias foram lisadas e a carga de GFP+ foi avaliada por citometria de fluxo. Os grupos PBS e mock apresentaram sinais de alterações no bem-estar dos animais e isso determinou o sacrifício. Os animais do grupo 19BBζ foram eutanasiados no dia 60 mesmo sem apresentar quaisquer alterações. Grupos: PBS n=6, mock n=5 e 19BBζ n=9. Análise estatística foi one way ANOVA com pós teste Tukey (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

É possível observar que o grupo que não recebeu nenhum tratamento (PBS), teve altas taxas de carga tumoral em todos os órgãos, enquanto os animais do mock apresentaram a maior carga de tumor na medula se comparado ao grupo CAR 19BBζ. Apesar de não apresentar nenhum sinal de caquexia, o grupo 19BBζ já exibiu um aumento na média de carga de GFP no baço, sangue e fígado (Figura 5.9).

A curva de sobrevivência demonstra melhora significativa do grupo tratado com células T 19BBζ em relação aos demais grupos (Figura 5.10).

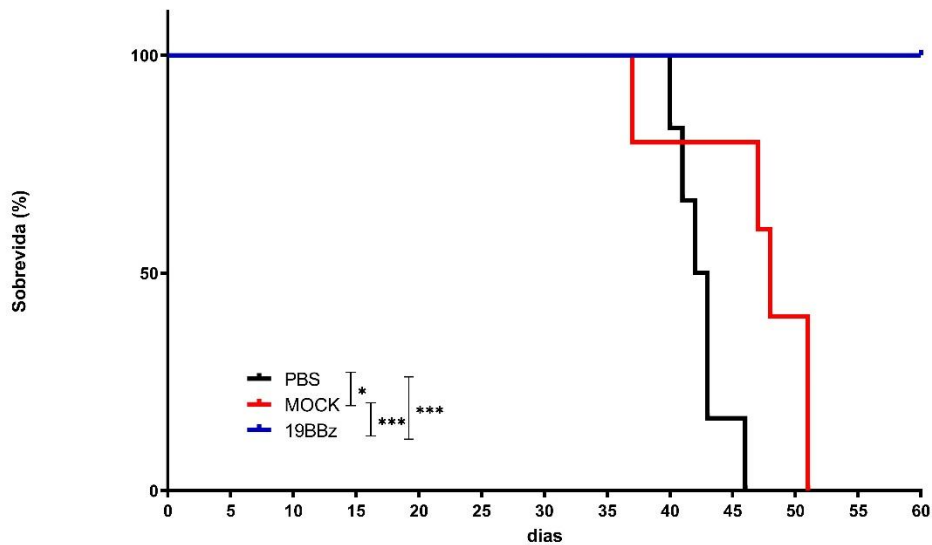


Figura 5.10: Curva de sobrevivência do experimento *in vivo* 2: Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. O grupo 19BBz foi eutanasiado no dia 60 para encerrar o experimento. Grupos: PBS n=6, mock n=5 e 19BBz n=9. Teste utilizado Log-rank. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A sobrevivência indica que o tratamento com células recém eletroporadas foi eficaz para melhorar a sobrevivência dos animais enxertados com RS4;11 GFP. Também se nota uma melhora na sobrevivência do grupo mock em relação ao não tratado PBS, devido ao possível efeito de citotoxicidade de linfócitos que reconheceram as células tumorais.

Alguns dos animais do grupo 19BBz (3 de 9 animais) apresentaram tumores sólidos na região intraperitoneal, área referente ao timo e área referente a possíveis linfonodos (embora esses órgãos não sejam funcionais em animais NSG). Alguns desses tumores foram retirados e analisados por citometria de fluxo (Figura 5.11).

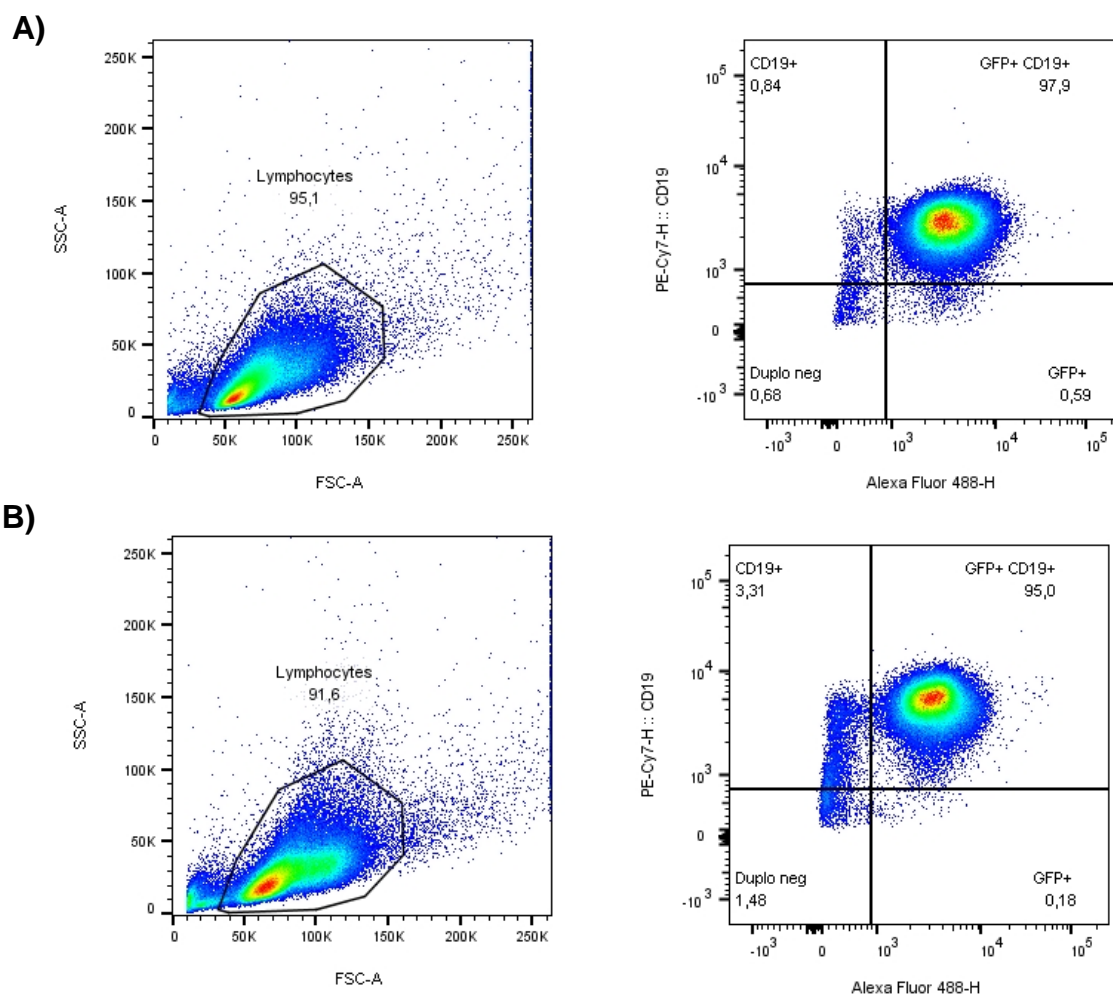


Figura 5.11: Avaliação por citometria de fluxo dos tumores sólidos encontrado nos animais do grupo 19BBζ. Os tumores foram retirados, macerados mecanicamente e tiveram as hemácias lisadas para análise por citometria de fluxo. As figuras 5.11A e B exemplificam dois tumores de animais diferentes retirado do grupo tratado com células T 19BBζ. Para verificar se as células eram CD19+, foi utilizado o anticorpo anti CD19 PeCy7.

A Figura 5.11 demonstra que os tumores sólidos encontrado nos animais eram CD19+ e GFP+, sendo, portanto, resultante da linhagem RS4;11 GFP.

Para avaliar se os linfócitos são capazes de permanecer nos animais após 60 dias, alguns órgãos foram marcados e analisados por citometria de fluxo, como exemplifica a Figura 5.12.

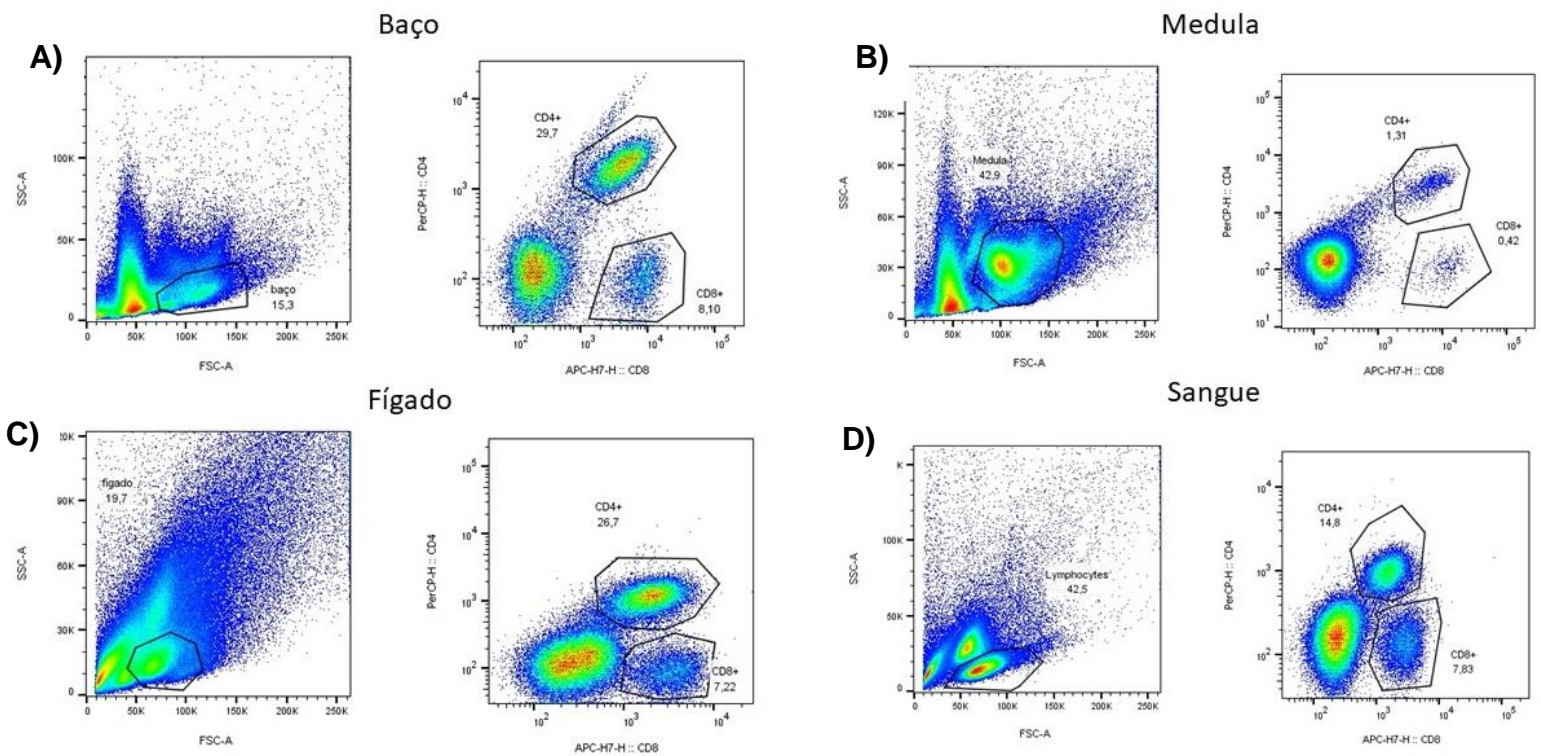


Figura 5.12: Presença de linfócitos T nos órgãos após 60 dias. Os órgãos dos animais foram retirados, macerados mecanicamente, tiveram as hemácias lisadas e posteriormente, foram as células foram marcadas para avaliar quanto a presença de células T CD4+ e CD8+ **A)** Baço, **B)** fígado, **C)** medula e **D)** sangue de um animal representativo foi marcado para verificar a presença de células T CD4+ ou CD8+ nos animais eutanasiados do grupo 19BBζ. É possível notar duas populações bem separadas correspondente aos marcadores em todos os órgãos. Os anticorpos utilizados foram anti-CD4 PerCP e Anti-CD8 APC Cy7.

Mesmo após 60 dias, ainda era possível encontrar linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. Como demonstrado, a população CD4+ prevalece em comparação a população CD8+, e os órgãos como baço e fígado retêm a maior percentagem de ambas as populações. A presença do CAR não foi avaliada neste experimento.

Esse experimento demonstrou que a abordagem *point-of-care* tem capacidade de melhorar a sobrevivência de camundongos enxertados com RS4;11. Mesmos linfócitos que não contém o receptor 19BBζ (mock) foram capazes de melhorar a sobrevivência desses animais em comparação ao grupo não tratado. Além disso, essas células T do grupo 19BBζ permaneceram nos animais até o dia determinado da eutanásia. A partir desse protocolo, alguns aperfeiçoamentos para melhorar a eficiência e entender o sistema foram realizados.

5.3 *In vivo* 3 - Avaliação do efeito de diferentes doses de células CAR-T em modelo *in vivo*

Com finalidade de avaliar se doses menores de células T CAR+ são capazes de exercer atividade antitumoral, elaboramos um novo experimento tratando animais com 10^6 e 10^7 de células T totais na condição CAR+. Aplicamos a abordagem POC, com as células injetadas após 4 horas de sua produção. Esse experimento foi dividido em 4 grupos: (1) PBS, sem tratamento (n=5), (2) mock, 10^6 células eletroporadas sem plasmídeos (n=5), (3) 19BB ζ 10^6 , tratados com 10^6 de células totais (n=5) e (4) 19BB ζ 10^7 , tratados com 10^7 de células totais (n=4). Os animais foram injetados com 5×10^6 de células RS4;11 GFP no d+0 e tratados no d+3 (Figura 5.13).

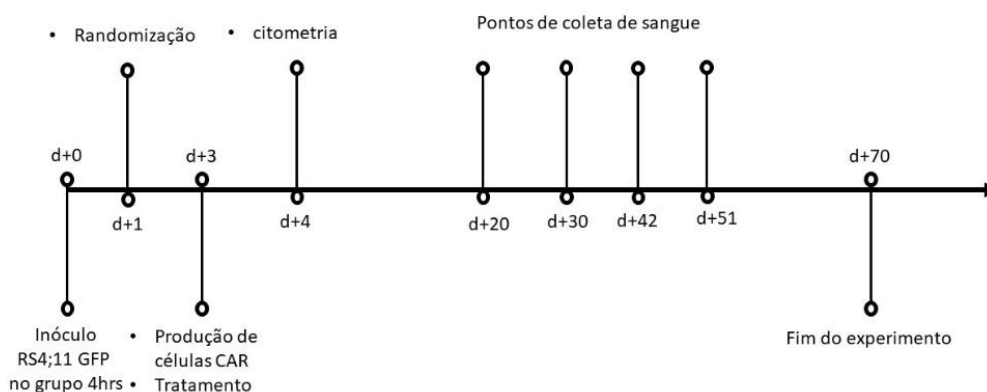


Figura 5.13: Linha do tempo do *in vivo* 3: Esquema do experimento *in vivo* 3 para testar diferentes doses de células T CAR+. Esse resumo do experimento mostra que os animais portando o tumor RS4;11 GFP+ por 3 dias, foram tratados com linfócitos recém eletroporados. Foram testados dois grupos de 19BB ζ com doses diferentes.

Após a separação das células mononucleadas de um doador saudável por Ficoll, as células foram modificadas por eletroporação e após 4 horas inoculadas nos camundongos. A cada 10 dias, com o primeiro ponto do d+20, o sangue foi retirado e avaliado. O último camundongo foi eutanasiado do d+70. O perfil das células e a expressão de CAR foram avaliados por citometria de fluxo no quarto dia do experimento, referente também ao dia seguinte após a eletroporação (Figura 5.14).

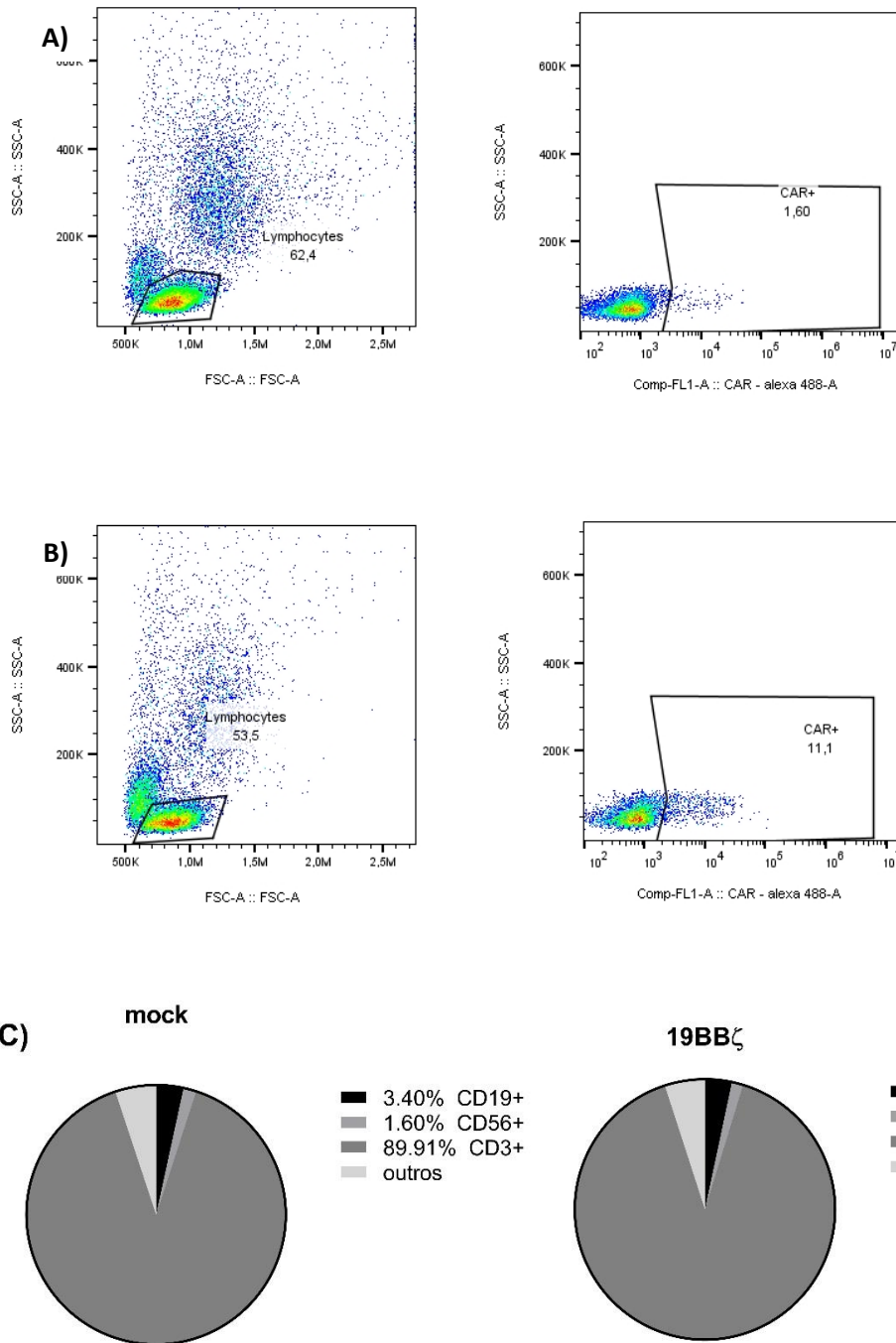


Figura 5.14: Perfil das células injetadas nos camundongos do experimento *in vivo* 3: As células foram eletroporadas e o seu perfil foi avaliado por citometria de fluxo 24 horas depois. Gate realizado na população referente aos linfócitos e expressão de células T CAR+ nas condições **A)** mock e **B)** 19BBζ. Fenótipo das condições **C)** mock e 19BBζ quanto à porcentagem de CD3, CD19 e CD56. Os anticorpos usados foram c-myc purificado com o secundário Alexa 488, CD3 PerCP-Cy5.5, CD19 FITC e CD56 PE.

Na Figura 5.14, podemos observar que houve marcações inespecíficas na condição mock, porém a condição 19BBζ exibe diferente padrão de marcação,

confirmando a presença de células T CAR+. No grupo inoculado com 10^7 de células totais, aproximadamente $1,1 \times 10^6$ eram células T CAR+, e para o grupo inoculado com 10^6 células totais, $1,1 \times 10^5$ células T CAR+. Os fenótipos entre os grupos foram similares, 3,4% CD3, 1,6% CD56 e 89,9% CD3 para mock e 3,3% CD3, 1,4% CD56 e 90,2% CD3 para 19BB ζ .

O sangue foi retirado pela veia submandibular ao longo do experimento e foi analisado quanto à expressão de GFP+ nas células. O sangue também foi colocado em papel filtro para análises futuras sobre a expressão de células T CAR+ ao decorrer do tempo.

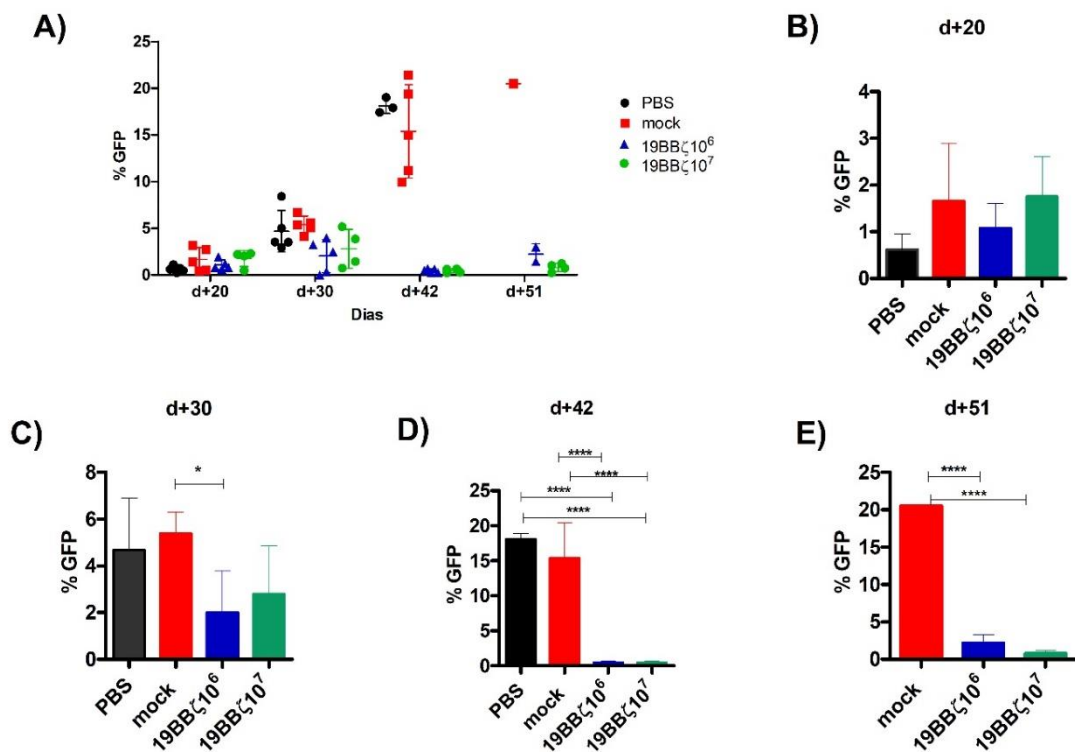


Figura 5.15. Porcentagem de células GFP+ no sangue ao longo do experimento *in vivo* 3: O sangue dos animais foi retirado a cada 10 dias e a carga de GFP foi monitorada por citometria de fluxo. **A)** Comparação da porcentagem de células RS4;11 GFP+ ao longo do experimento e entre os grupos. **B-E)** Figuras representam porcentagem de células GFP+ a cada ponto: d+20, d+30, d+42 e d+51 respectivamente. Grupos: PBS n=5, mock n=5, 19BB ζ 10⁶ n=5 e 19BB ζ 10⁷ n=4. Teste utilizado foi One-way ANOVA com pos teste Tukey. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A Figura acima revela que não houve diferenças entre a porcentagem de células RS4;11 GFP+ entre todos os grupos até o d+30. No D+42, PBS e mock

exibiram diferenças estatísticas entre os dois grupos 19BBζ, mas não entre si. No ponto d+51, todos os animais do grupo PBS já haviam morrido.

Após o acompanhamento dos animais e a avaliação quanto ao seu bem-estar, os animais sofreram eutanásia por câmara de CO₂ quando julgado necessário. O baço, cérebro, medula, sangue e fígado foram retirados e processados para avaliar a carga de leucemia presente nos órgãos (Figura 5.16).

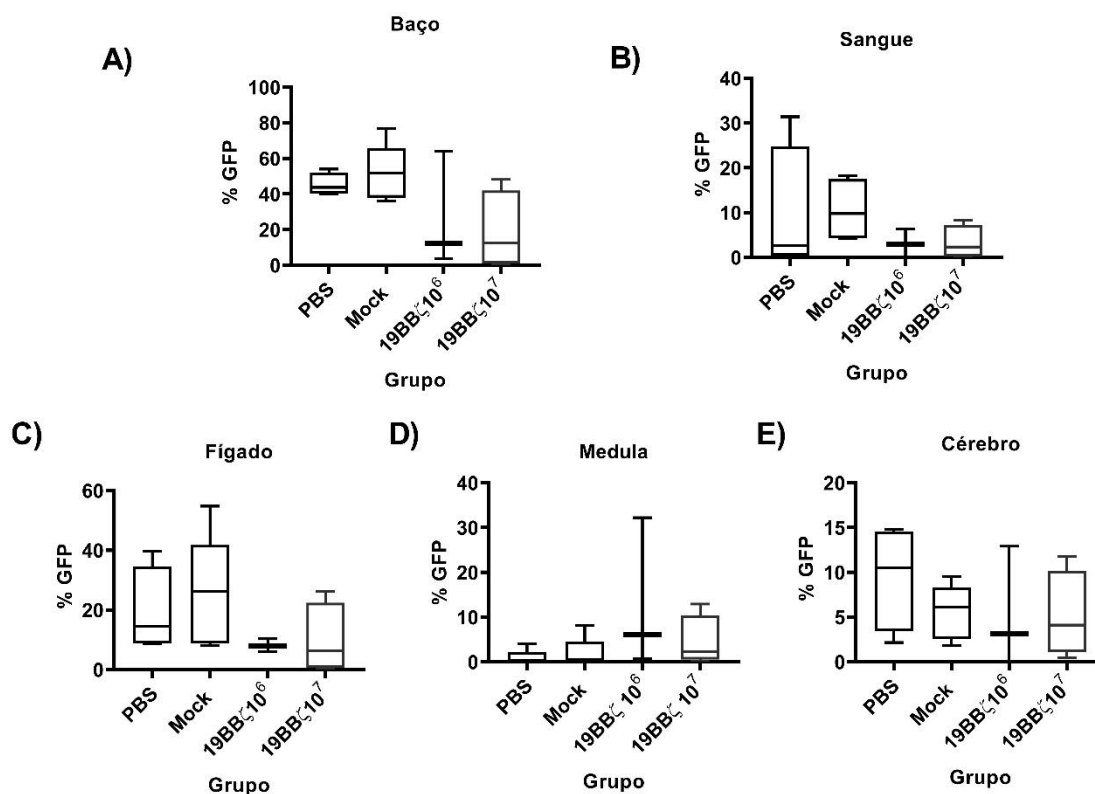


Figura 5.16: Porcentagem de células GFP+ nos órgãos dos animais do experimento *in vivo* 3: Os órgãos foram processados mecanicamente e avaliados quanto a carga de leucemia (células GFP+) por citometria de fluxo. **A)** Baço, **B)** Sangue, **C)** Fígado, **D)** Medula e **E)** Cérebro. Grupos: PBS n=5, mock n=5, 19BBζ 10⁶ n=5 e 19BBζ 10⁷ n=4. Teste utilizado foi o One-way ANOVA com pos teste Tukey. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A carga de leucemia nos órgãos referente ao dia da eutanásia, não apresentou diferença significativa em nenhuma das possíveis comparações. No geral, o baço foi o órgão que apresentou maior número de células RS4;11 GFP enquanto a medula foi a menor. Apesar de não existir diferença nenhuma nos órgãos, a curva de sobrevida demonstrou diferentes padrões (Figura 5.17).

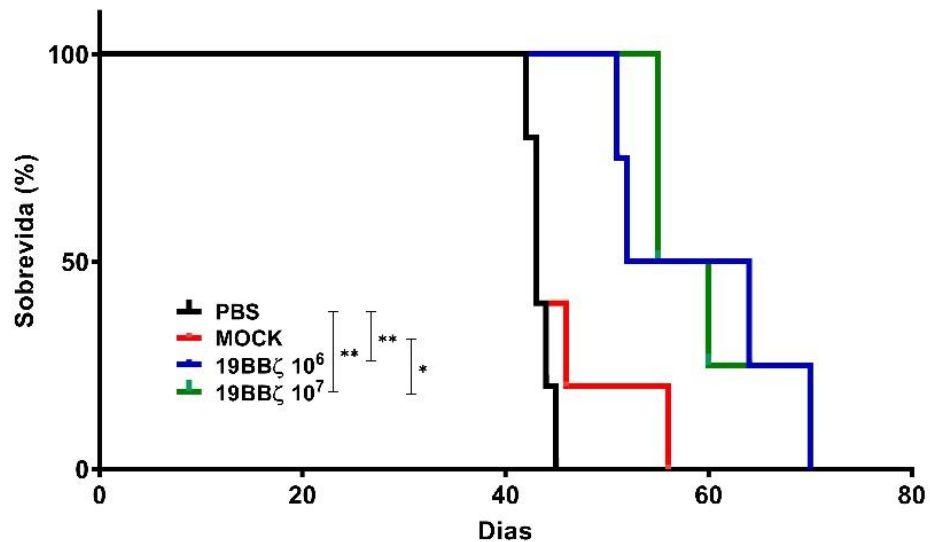


Figura 5.17. Curva de sobrevivência dos animais do experimento *in vivo* 3: Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. Análise das sobrevivências nos animais e diferença estatísticas entre os grupos. Grupos: PBS n=5, mock n=5, 19BBζ 10⁶ n=5 e 19BBζ 10⁷ n=4. Teste utilizado foi o Log-Rank. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A curva de sobrevivência demonstrou que não há diferença significativa entre o grupo 19BBζ 10⁶ e 19BBζ 10⁷. Porém o grupo 19BBζ 10⁶ não mostrou diferença quanto ao mock. Nesse experimento, PBS e mock se mostraram iguais entre eles e o grupo PBS apontou diferença estatística quando comparado a ambos 19BBζ.

Em suma, diferentes doses de células CAR+ não exibiram disparidade entre os resultados. Apesar do grupo 19BBζ 10⁶ não ter apresentado diferença contra mock, podemos avaliar que 19BBζ 10⁶ se comporta de mais semelhante ao grupo 19BBζ 10⁷ do que ao mock. Isso pode ser relacionado à baixa representatividade devido ao pequeno número de animais por grupo.

5.4 *In vivo* 4 - Avaliação da efetividade das células CAR-T em modelo *in vivo* de alta e baixa carga tumoral

O experimento a seguir utilizou algumas propostas para validar o POC em animais enxertados com RS4;11. Para verificar se as células T CAR+ são capazes de eliminar o tumor quando este já é detectado por citometria de fluxo, nós iniciamos o tratamento 30 dias após a inoculação do tumor. Além disso, comparamos se há diferença na capacidade lítica das células T CAR+ quando eletroporadas e inoculadas após 4 horas de incubação ou após 24 horas de incubação em outro grupo, no d+3 do tumor. Este aspecto foi avaliado devido à possibilidade de aguardarmos 24h antes de infusão das células permitir potencialmente uma caracterização mínima do ponto de vista regulatório, tal como testes de esterilidade e de expressão do CAR como critérios de liberação do produto celular. Estes aspectos não podem ser avaliados em pontos mais precoces, como 4h após a eletroporação.

Para esse experimento, foi utilizado um mesmo doador para todas as condições. Para facilitar o entendimento, o experimento será apresentado em duas partes, como mostra as linhas do tempo:

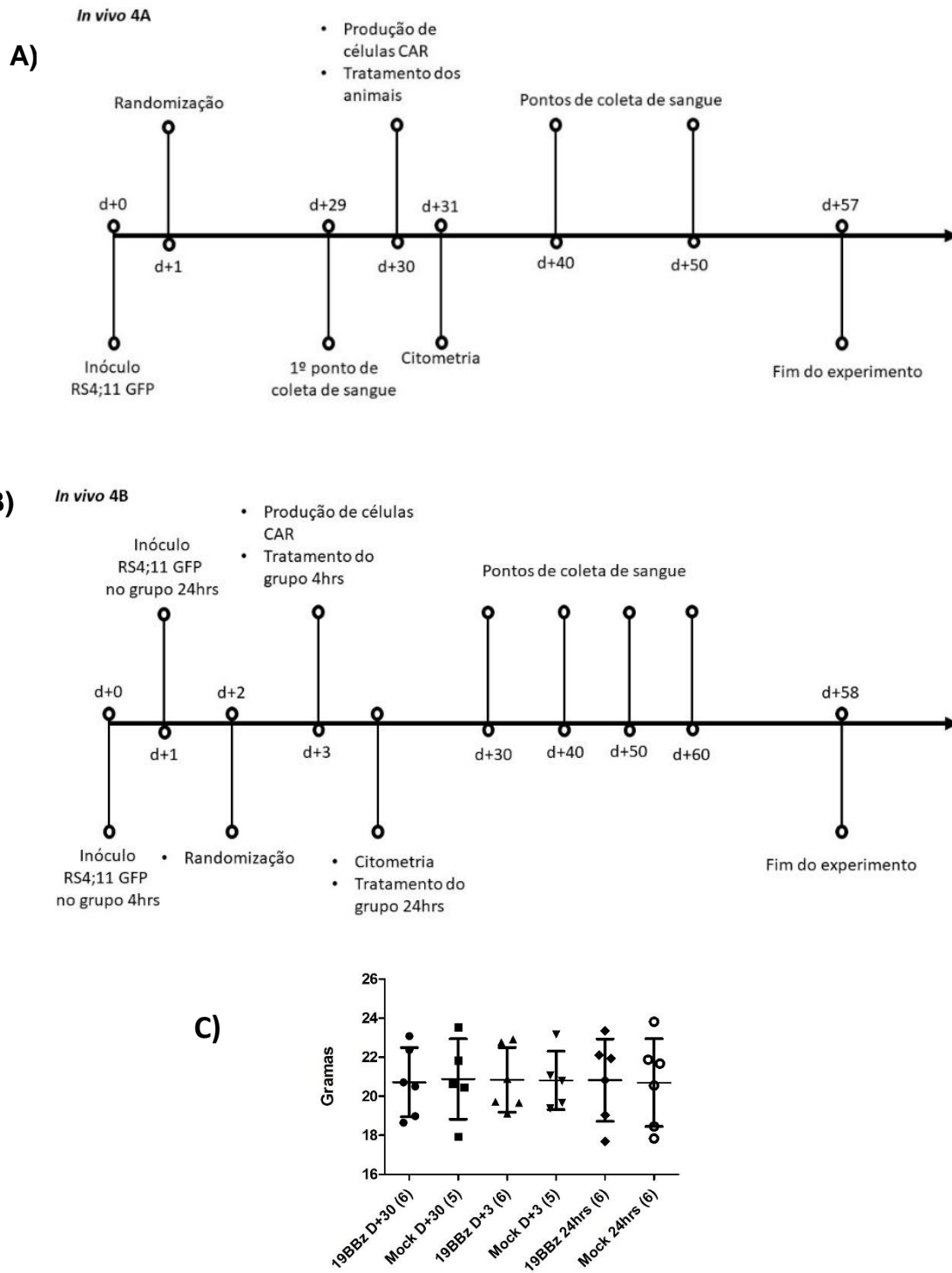


Figura 5.18: Linha do tempo dos experimentos e randomização. O mesmo doador foi utilizado para os ambos os experimentos. As células foram produzidas para avaliar diferentes parâmetros como: **A)** Experimento *in vivo* 4A: As células T CAR⁺ foram injetadas trinta dias após o inóculo das células tumorais RS4;11 GFP. Os camundongos foram tratados 4 horas após a eletroporação dos linfócitos. **B)** Experimento *in vivo* 4B: Os animais foram tratados com células T CAR⁺ incubadas por 4 horas ou 24 horas, três dias após o inóculo do tumor. **C)** Gráfico representativo do dia da randomização.

O experimento 4A foi dividido em dois grupos, mock d+30 (n=5) e 19BBζ d+30 (n=6). E o experimento 4B em 4 grupos: mock d+3 4hrs (n=5) e 19BBζ d+3 4hrs (n=6), ambos referentes a células injetadas 4 horas após a eletroporação e mock d+3 24hrs (n=6) e 19BBζ d+3 24hrs (n=6), referente aos grupos em que as células foram incubadas 24 horas depois de sua produção.

O mesmo doador foi utilizado para todos os grupos, porém no dia da eletroporação as células foram injetadas no experimento 4A e no grupo de 4 horas de incubação. No dia seguinte, as células restantes foram injetadas no grupo de 24 horas e marcadas para a citometria (Figura 5.19).

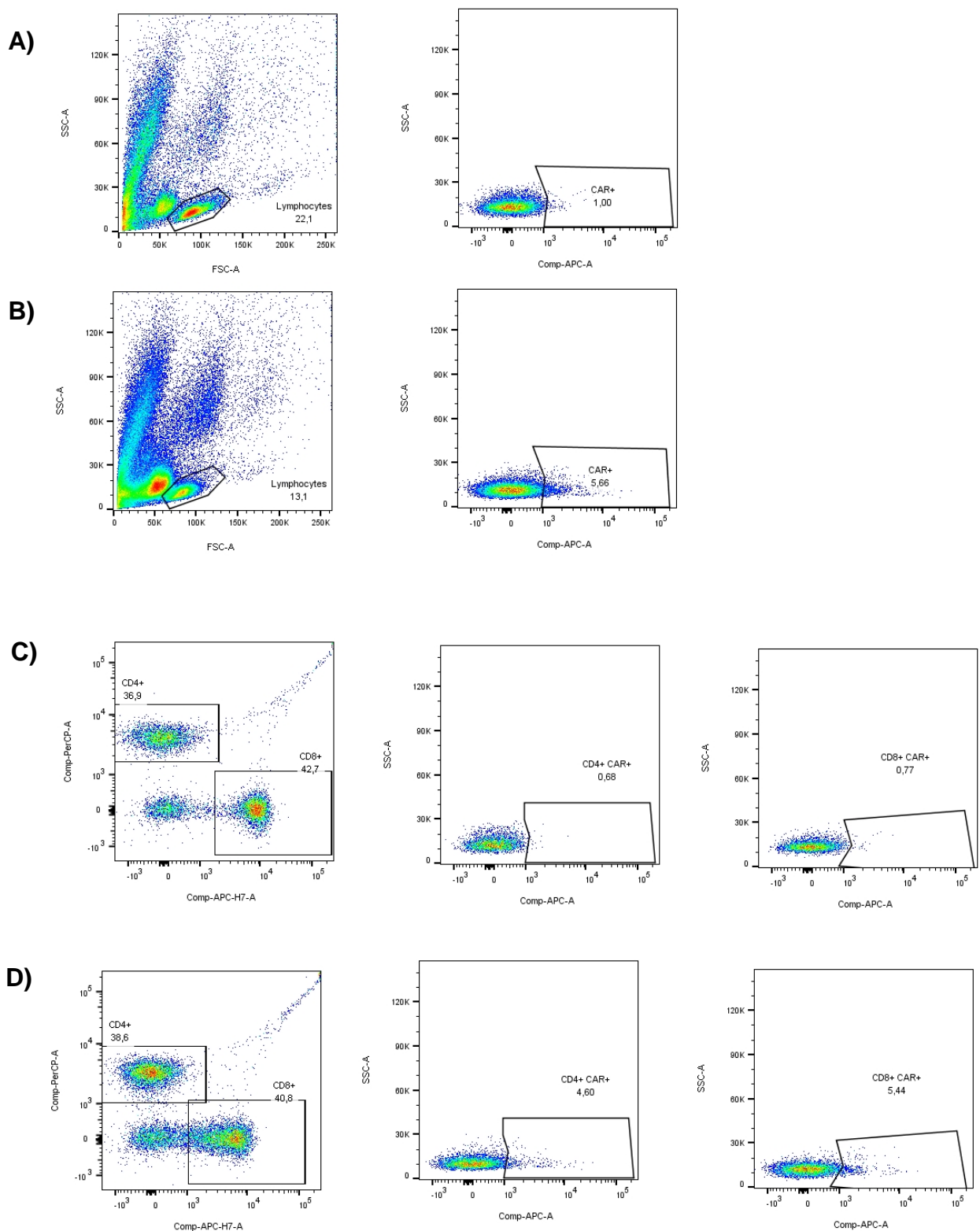


Figura 5.19: Porcentagem de células T CAR+ após a eletroporação. 24 horas após a eletroporação, foram avaliados por citometria de fluxo quanto a: **A)** Porcentagem de células T CAR na Condição mock. **B)** Porcentagem de células T CAR+ na condição 19BBζ. **C)** População CD4+ e CD8+ na condição mock. **D)** População CD4+ e CD8+ e porcentagem de células T CAR+ nessas subpopulações. Anticorpos utilizados c-myc Alexa 647, CD4 percp e CD8 APC Cy7.

A porcentagem de células T CAR+ para esse doador foi de 5,66% dentro da população de linfócitos. Quando subdividas em CD4+ e CD8+, a porcentagem de

19BBζ foi de 4,60% e 5,44% respectivamente. As células também foram avaliadas quanto ao fenótipo e memória (Figura 5.20).

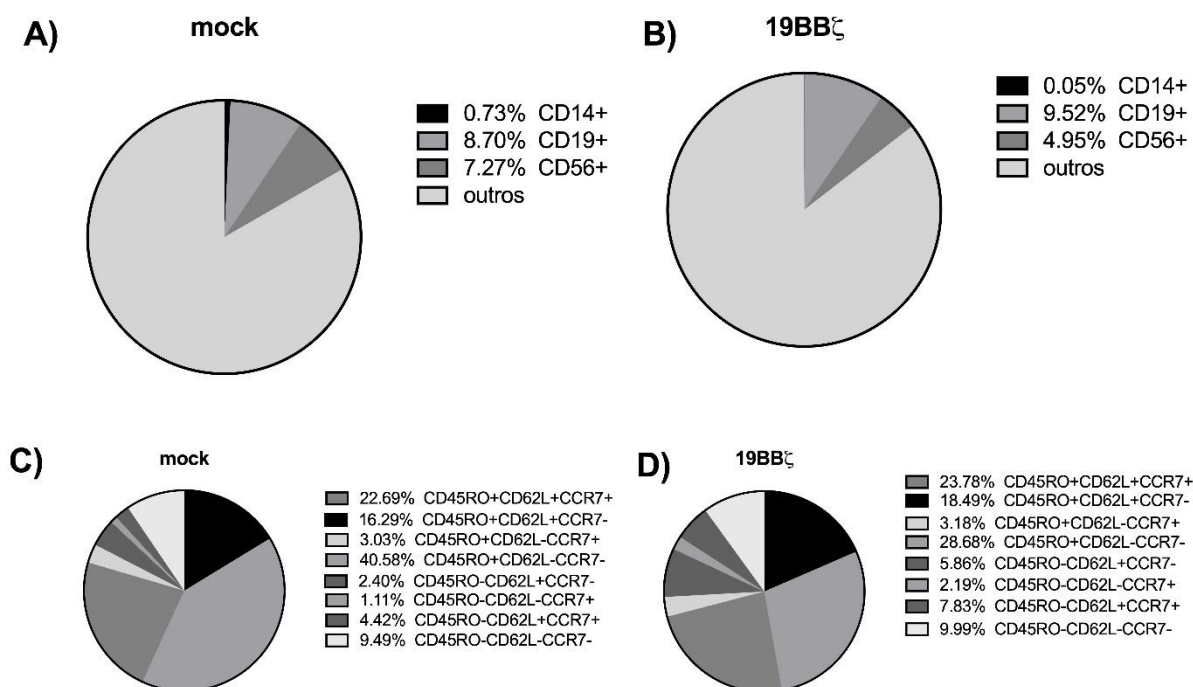


Figura 5.20: Fenótipo e perfil de memória das células utilizadas no experimento *in vivo* 4. 24 horas após a eletroporação, foram avaliados por citometria de fluxo quanto a: **A)** porcentagem de populações CD14, CD19 e CD56 nas condições mock e **B)** 19BBζ. **C)** Caracterização das sub-populações de memória com os marcadores CD45RO, CD62L e CCR7 nas condições mock e **D)** 19BBζ. Os anticorpos utilizados foram: CD14 FITC, CD19 PercpCy 5.5, CD56 PE, CD45RO PECy7, CD62L FITC e CCR7PE.

Nota-se a presença de maior porcentagem nas células marcadas com CD14 (monócitos) e CD56 (NK) na condição mock quando comparada com a condição 19BBζ. A população de linfócitos B é mais abundante na condição com CAR do que na mock. Em relação ao painel de memória, a população que predomina no mock é a de células T de memória efetora (CD45RO+CD62L-CCR7-) representadas por 40,58%, seguida das células T de memória central (CD45RO+CD62L+CCR7+) com 22,69%. O mesmo acontece com a condição 19BBζ, porém com porcentagens de 28,68% e 23,78% respectivamente.

Também foram avaliados os marcadores de exaustão para o doador (Figura 5.21).

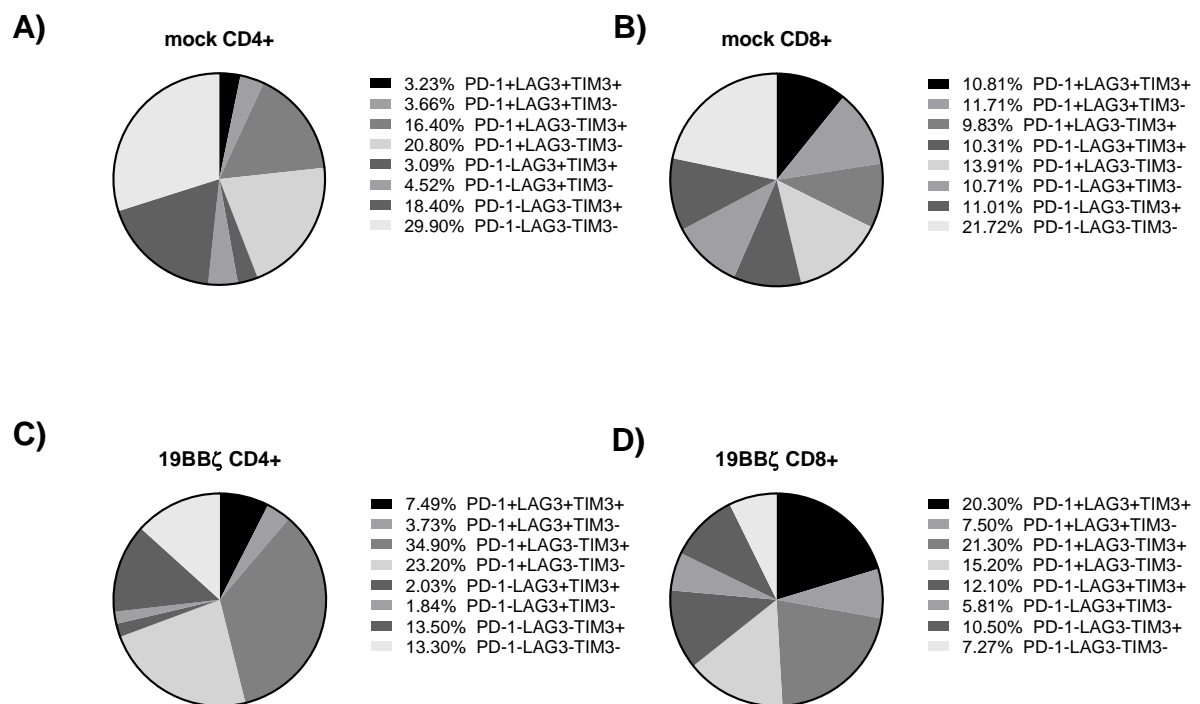


Figura 5.21: Avaliação da expressão dos marcadores de exaustão. 24 horas após a eletroporação, foram utilizados os marcadores PD-1, LAG3 e Tim3 para avaliar o perfil de exaustão. **A)** condição mock CD4+. **B)** condição mock CD8+. **C)** condição 19BBζ CD4+ e **D)** condição 19BBζ CD8+. Os anticorpos utilizados forma CD4 Percp, CD8 APC Cy7 ,PD-1 APC, LAG3 PE e Tim3 PECy 7.

O perfil que predominou na condição mock, tanto para células T CD4+ quanto CD8+, foi o de ausência de marcadores de exaustão (PD-1-LAG3-Tim3-) com 29,9% e 21,72% respectivamente. O segundo perfil mais representativo foi o PD-1+, constando 20,8% e 13,91%. Paralelamente, o perfil que dominou na condição 19BBζ foi PD-1+LAG3-TIM3+, sendo 34,9% para CD4 e 21,3% para CD8. Estes marcadores podem representar tanto o estado de ativação recente do linfócito quanto à exaustão desta população quando há a expressão de combinações destes receptores.

Para avaliar se essas células possuem atividade lítica no dia seguinte a eletroporação, foi realizado ensaio de citotoxicidade *in vitro* (Figura 5.22).

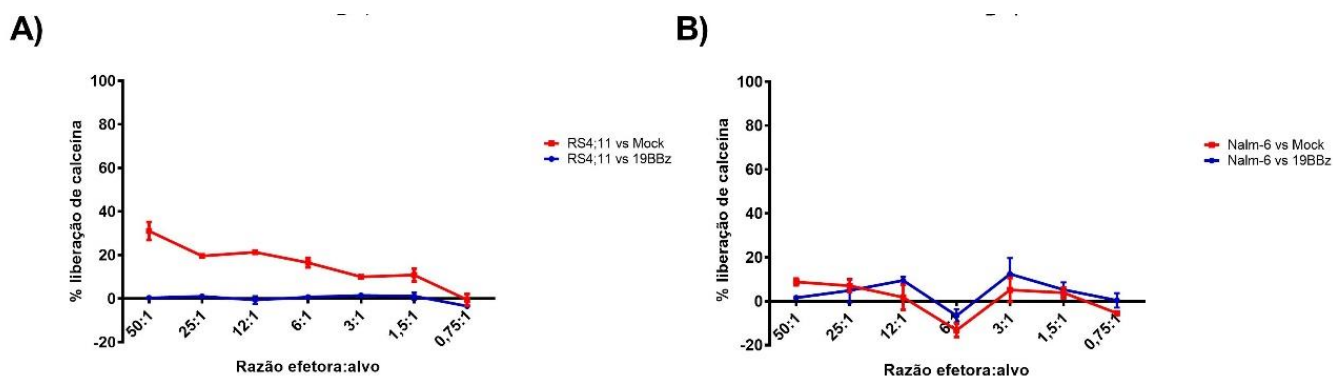


Figura 5.22: Ensaio de citotoxicidade *in vitro*. Ensaio de lise celular realizando com Calceína-AM no primeiro dia após a eletroporação para avaliar a ação lítica das células efetoras contra células alvos **A)** RS4;11 e **B)** Nalm-6. Razão Efetora:Alvo de 50:1 até 0,75:1.

O ensaio de lise *in vitro* revelou que as condições 19BBζ não possuem atividade lítica contra células RS4;11 e Nalm-6 24 horas após a eletroporação (Figura 5.22). A condição mock apresentou uma lise maior das células RS4;11 porém, o mesmo não ocorreu contra a Nalm-6.

Ao decorrer do experimento, foi analisado o sangue dos animais para acompanhar a evolução da carga tumoral através da determinação do percentual de células GFP. Para o experimento 4A, a primeira avaliação do sangue foi realizada no dia 29, dia anterior ao tratamento com terapia CAR. Em seguida, continuou-se com a coleta de sangue a cada 10 dias, como mostra a Figura 5.23.

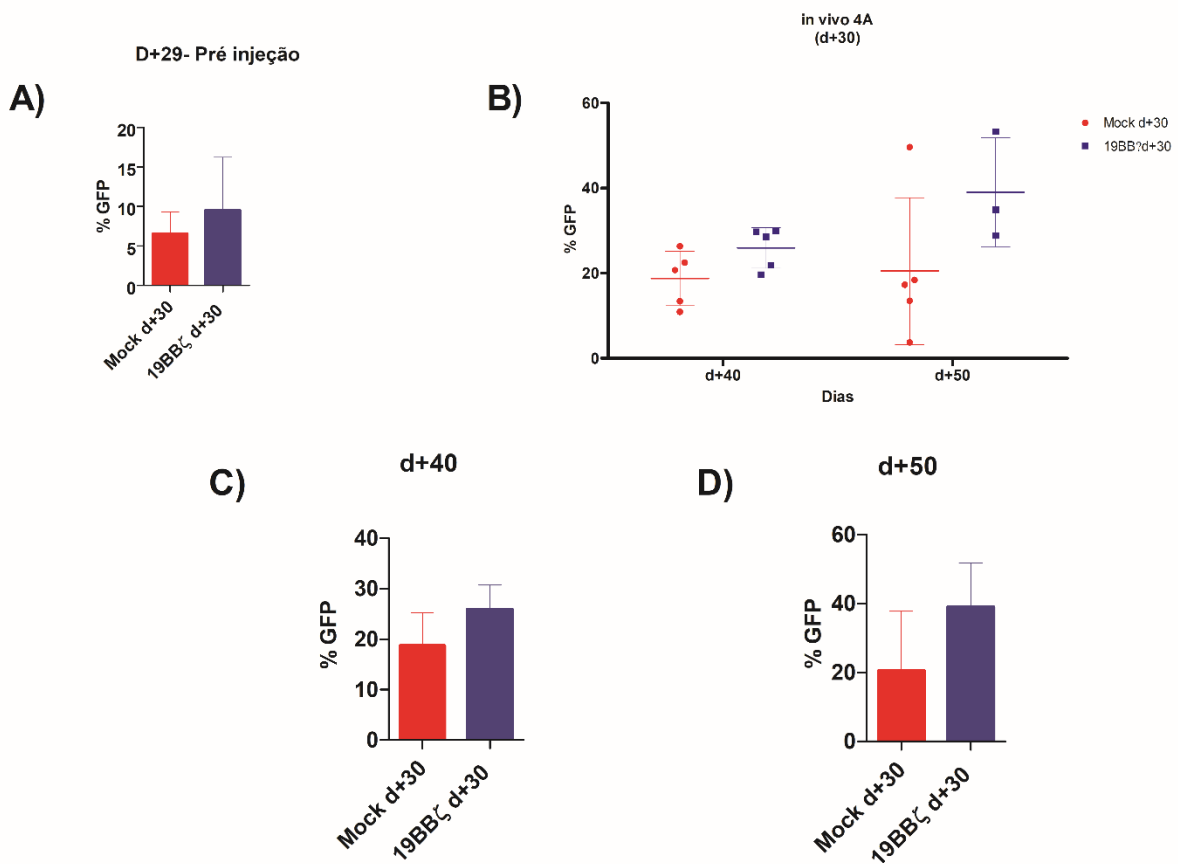


Figura 5.23. Carga tumoral ao longo do experimento avaliada segundo o percentual de células GFP+ circulantes. O sangue dos animais foi retirado pela veia submandibular, as hemácias foram lisadas e a carga tumoral foi avaliada quanto a porcentagem de células GFP+ por citometria de fluxo. **A)** Avaliação da carga tumoral um dia antes ao início do tratamento. **B)** Carga de células GFP+ ao longo do experimento. Comparação da carga tumoral no entre as condições em diferentes momentos **C)** dia 40 e **D)** dia 50. Não houve diferença significativa. Grupos: mock n=5 e 19BB ζ n=6. Teste utilizado One-way ANOVA com pos test Tukey (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

A coleta de sangue do dia anterior ao tratamento referente ao experimento 5A, demonstrou a presença de células GFP+ no dia 29, e sem diferença significativa entre os grupos. Após o tratamento, é possível notar o aumento constante da carga tumoral no sangue dos animais, sem diferença significativa em nenhum dos pontos entre os grupos mock e CAR 19BBz. O tratamento com mock ou 19BBz também não diferiram quando avaliada a sobrevivência desses animais (Figura 5.24).

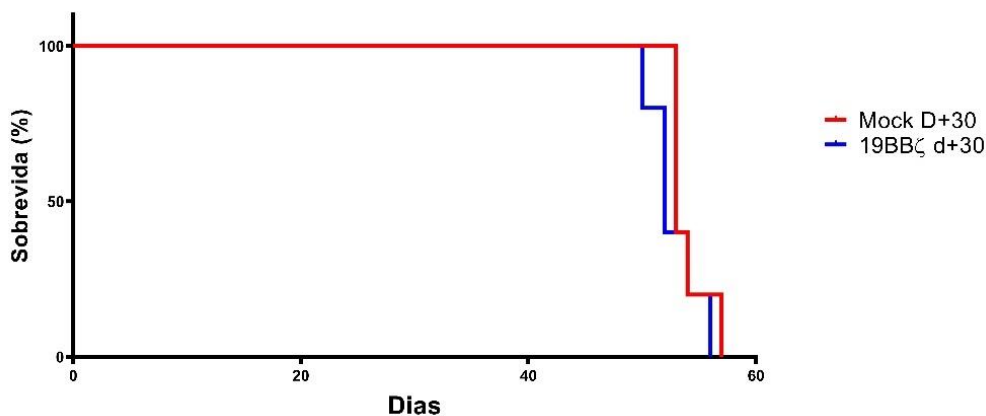


Figura 5.24: Análise da sobrevivência do experimento *in vivo* 4A (injeção das células eletroporadas no d+30 após inoculação do tumor). Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. A figura mostra a curva de sobrevivência dos grupos mock d+30 e 19BBζ d+30. Não houve diferença significativa. Grupos: mock n=5 e 19BBζ n=6. Teste utilizado Log-Rank (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Como demonstrado na Figura 5.24, o tratamento utilizando a abordagem POC em camundongos enxertado 30 dias antes com o tumor não foi capaz de eliminar o tumor ou proporcionar um aumento na sobrevivência dos animais tratados.

Para o experimento *in vivo* 4B, o tratamento com a terapia celular aconteceu 3 dias após a indução tumoral nos animais. A análise de carga de células GFP circulantes teve início no dia 20, sendo realizadas comparações entre as condições mock e 19BBζ, para os animais que receberam células incubadas por 4 horas ou por 24 horas (Figura 5.25).

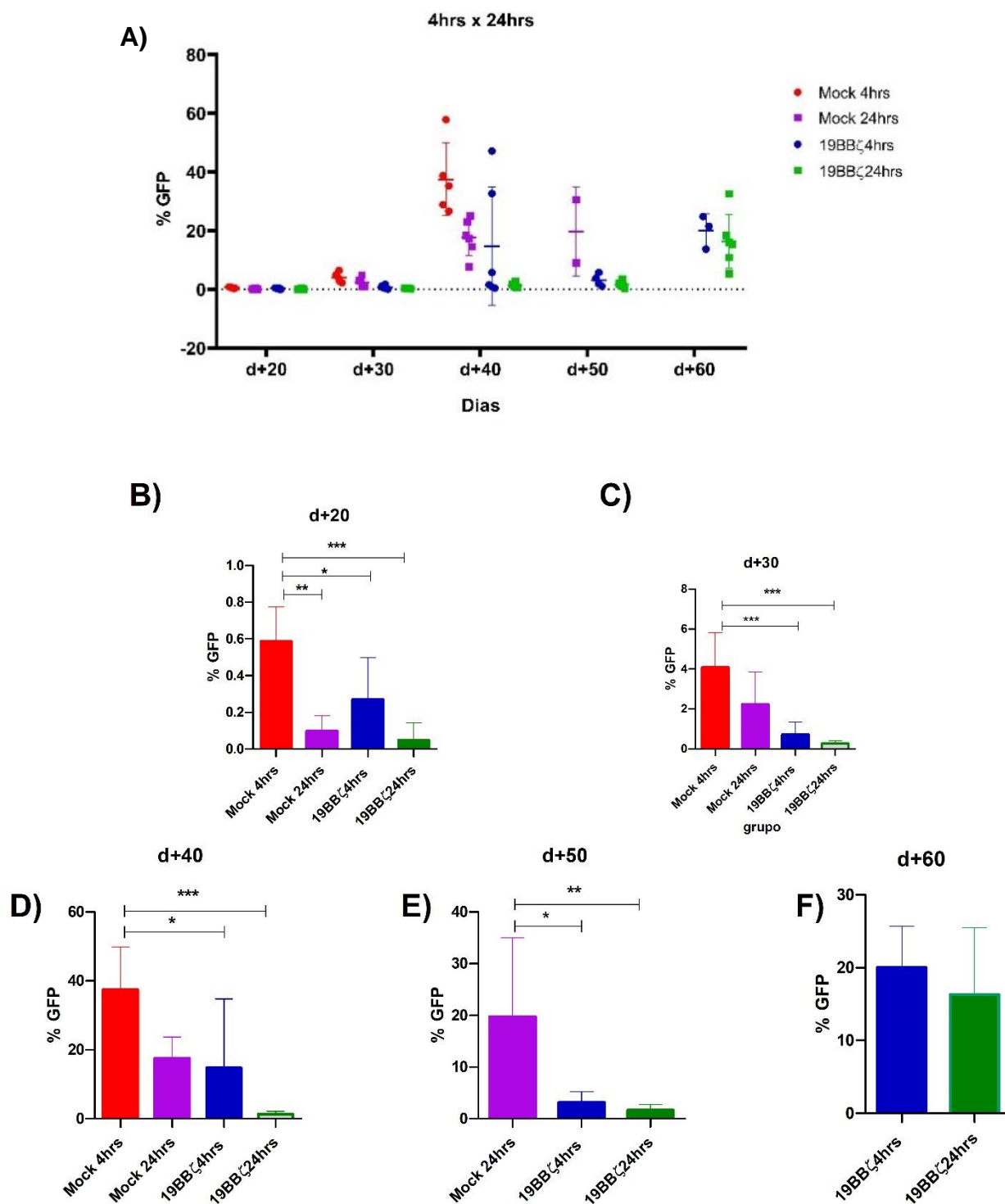


Figura 5.25. Carga tumoral ao longo do experimento. O sangue dos animais foi retirado pela veia submandibular, as hemácias foram lisadas e a carga tumoral foi avaliada quanto a porcentagem de células GFP+ por citometria de fluxo **A)** Representação da variação de carga tumoral de todos os grupos. Comparação entre os grupos com escalas automáticas dos dias **B) 20, C) 30, D) 40, E) 50 e F) 60.** Grupos: mock d+3 4hrs (n=5), 19BBζ d+3 4hrs (n=6), mock d+3 24hrs (n=6) e 19BBζ d+3 24hrs (n=6), Teste utilizando One-way ANOVA com pos teste Tukey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Podemos observar que todas as condições de incubação de 24 horas, quando comparadas com as condições de incubação de 4h, apresentaram maior impacto na carga tumoral. Em todos os pontos, o grupo mock 4hrs apresentou diferença significativa para os grupos de animais tratados com células expressando o 19BBζ. Apenas do dia 50 o mock 24hrs exibiu diferença significativa para os grupos de células T CAR+. Não houve diferença entre cargas tumorais nas condições 19BBζ de 4h ou 24h de incubação.

Os órgãos dos animais foram processados e analisados por citometria após a avaliação do bem-estar dos animais, como mostra a Figura 5.26.

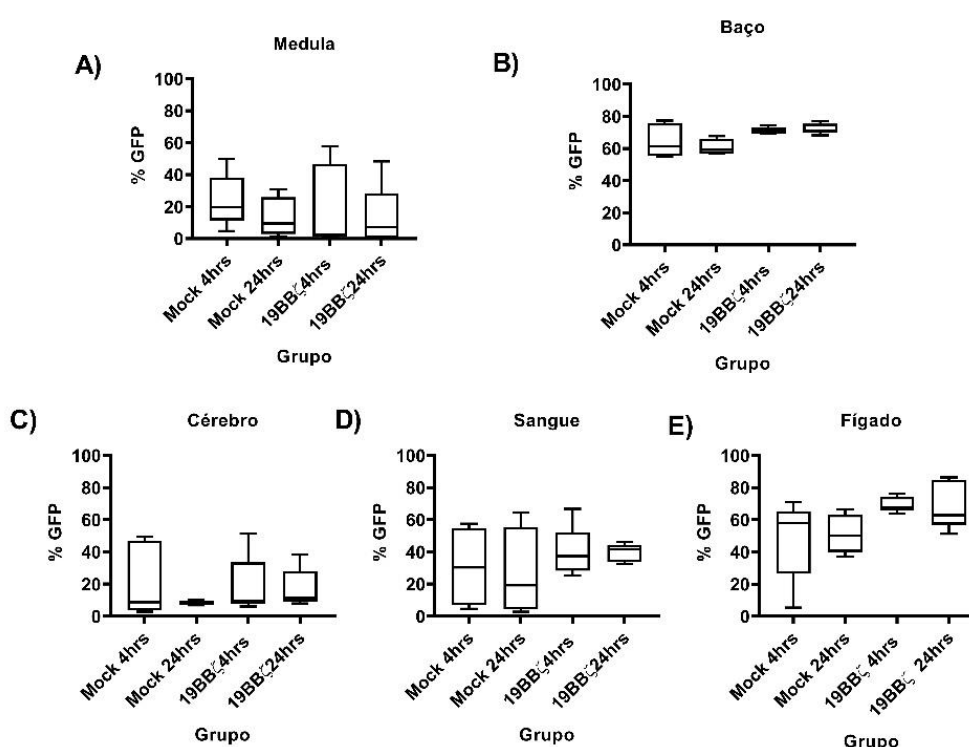


Figura 5.26: Análise do percentual de células GFP+ dos órgãos dos animais eutanasiados no experimento in vivo 4B. Os órgãos foram processados mecanicamente e analisados por citometria de fluxo quanto a carga de células GFP+. **A)** Medula, **B)** Baço, **C)** Cérebro, **D)** Sangue e **E)** Fígado. Não houve diferença significativa. Grupos: mock d+3 4hrs (n=5), 19BBζ d+3 4hrs (n=6), mock d+3 24hrs (n=6) e 19BBζ d+3 24hrs (n=6) Teste utilizando One-way ANOVA (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

O órgão que apresentou maior taxa de tumor em todos os grupos foi o baço, com cargas que variaram entre 60% a 80% de células GFP+. O cérebro apresentou menores taxas, não ultrapassando os 50% de células positivas. Não houve, no entanto, diferença estatística em nenhuma comparação múltipla. Apesar dos órgãos

não exibirem diferenças, houve diferença entre os grupos quanto a sobrevivência dos animais (Figura 5.27).

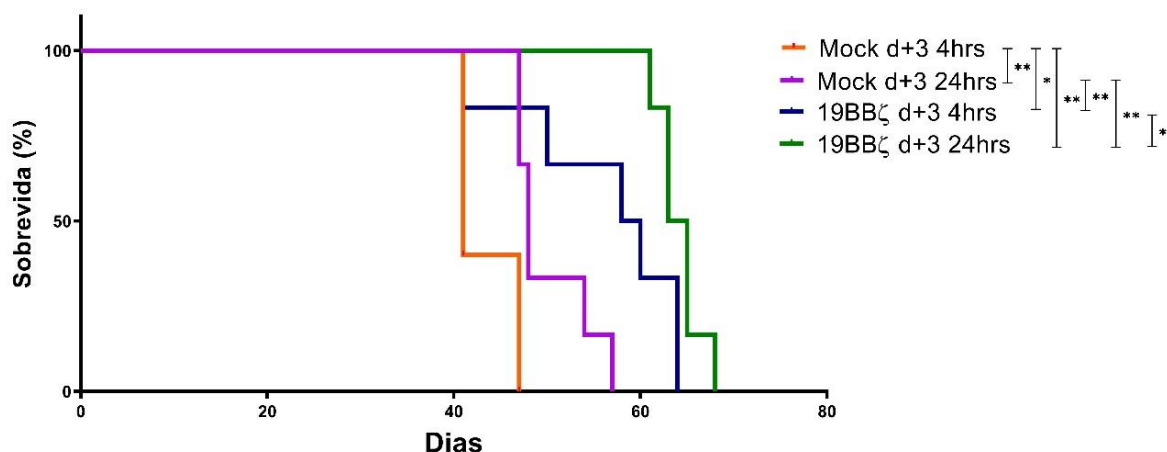


Figura 5.27. Análise de sobrevivência dos animais do experimento *in vivo* 4B. Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. Múltiplas comparações mostram diferenças estatísticas. Teste utilizado Log-Rank (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Constatamos que as condições pertencentes aos grupos tratados com células incubadas por 24 horas exibiram os maiores impactos na sobrevivência dos animais quando comparados às células incubadas por 4 horas. A condição mock 24h mostrou melhores resultados que a condição mock 4h e o grupo 19BBζ 24hrs mostrou melhor perfil de sobrevivência quando comparado ao grupo 19BBζ 4hrs. As duas condições tratadas com 19BBζ apresentaram melhores sobrevivências em comparação às suas respectivas condições mock.

Esse experimento nos permite concluir que a técnica POC utilizando o protocolo atual de produção de células T CAR+, não foi capaz de melhorar a favorecer camundongos que portavam o tumor por 30 dias, como demonstrado no experimento *in vivo* 4A, provavelmente devido à altíssima carga tumoral. Já o experimento *in vivo* 4B exibe diferença na porcentagem de GFP% no sangue durante o experimento e também impacto na análise de sobrevivência, favorecendo o protocolo que aguarda 24h após a eletroporação para realizar a injeção das células nos animais. As condições em que foram utilizadas células T CAR+ resultaram em melhora na sobrevivência dos animais em relação aos seus respectivos grupos mocks.

5.5 *In vivo* 5 - Avaliação da efetividade das células CAR-T em modelo *in vivo* de leucemia Nalm-6

Para investigar se a abordagem POC se mantém funcional em outro modelo de LLA-B mais virulento, utilizou-se a células da linhagem de LLA-B Nalm-6 para induzir a xeno-leucemia em 24 animais NSG machos (10^5 células Nalm-6 por animal) no que denominamos o experimento *in vivo* 5 (esquematizado na Figura 5.28A). Os animais foram randomizados pelo peso (Figura 5.28B) e separados em 3 grupos: PBS (n=8), mock (n=8) e 19BBζ (n=8). Três dias após a indução do tumor, os animais dos grupos tratados com células receberam 5×10^6 leucócitos mock ou modificados com o CAR 19BBζ.

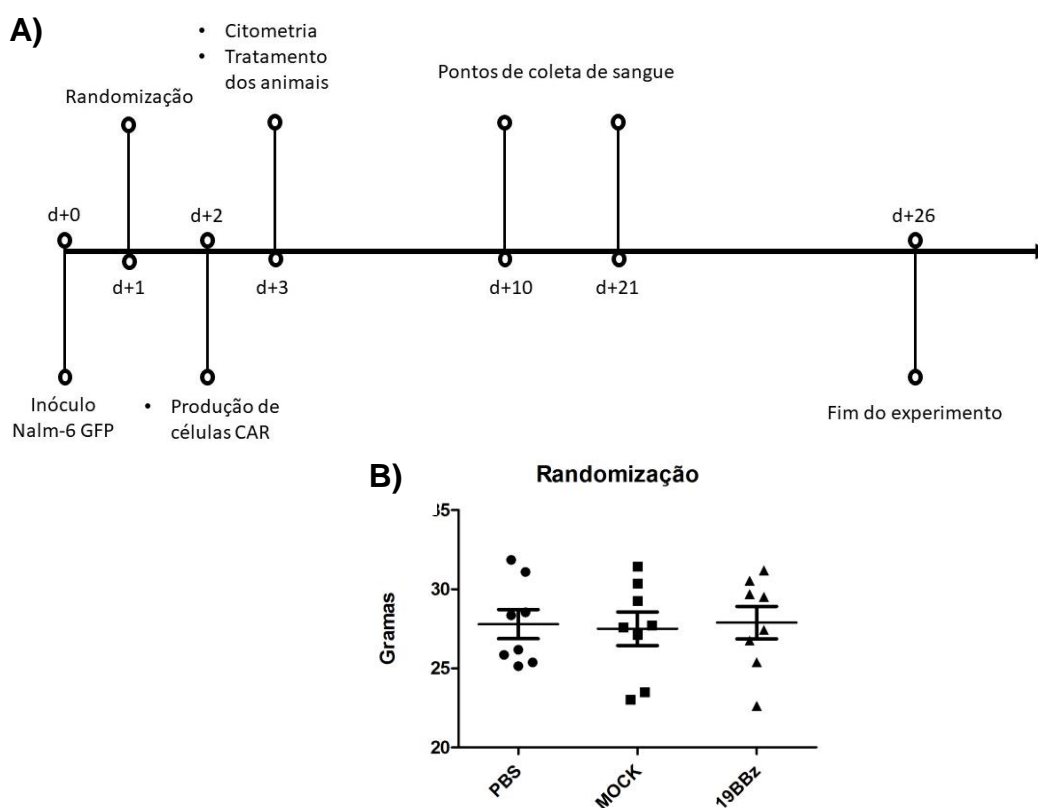


Figura 5.28: Representação do experimento *in vivo* 5. **A)** Modelo esquemático de linha do tempo que mostram as principais etapas do experimento *in vivo* 5, os animais foram inoculados com as células leucêmicas Nalm-6 GFP+ e após três dias foram tratados com linfócitos eletroporados 24 horas antes. Foram coletados dois pontos de coleta de sangue (dia 10 e 21) para avaliar quanto a carga GFP+ **B)** Gráfico da média de peso (g) dos animais utilizado na randomização.

As células mononucleadas foram eletroporadas e dispostas em meio de cultura na estufa a 37°C por 24 horas. Do dia seguinte foram injetadas nos animais 5×10^6 de células totais, tanto para o mock quanto para o 19BBζ. As células também foram marcadas de acordo com a tabela 2 (material e métodos) para análise do fenótipo.

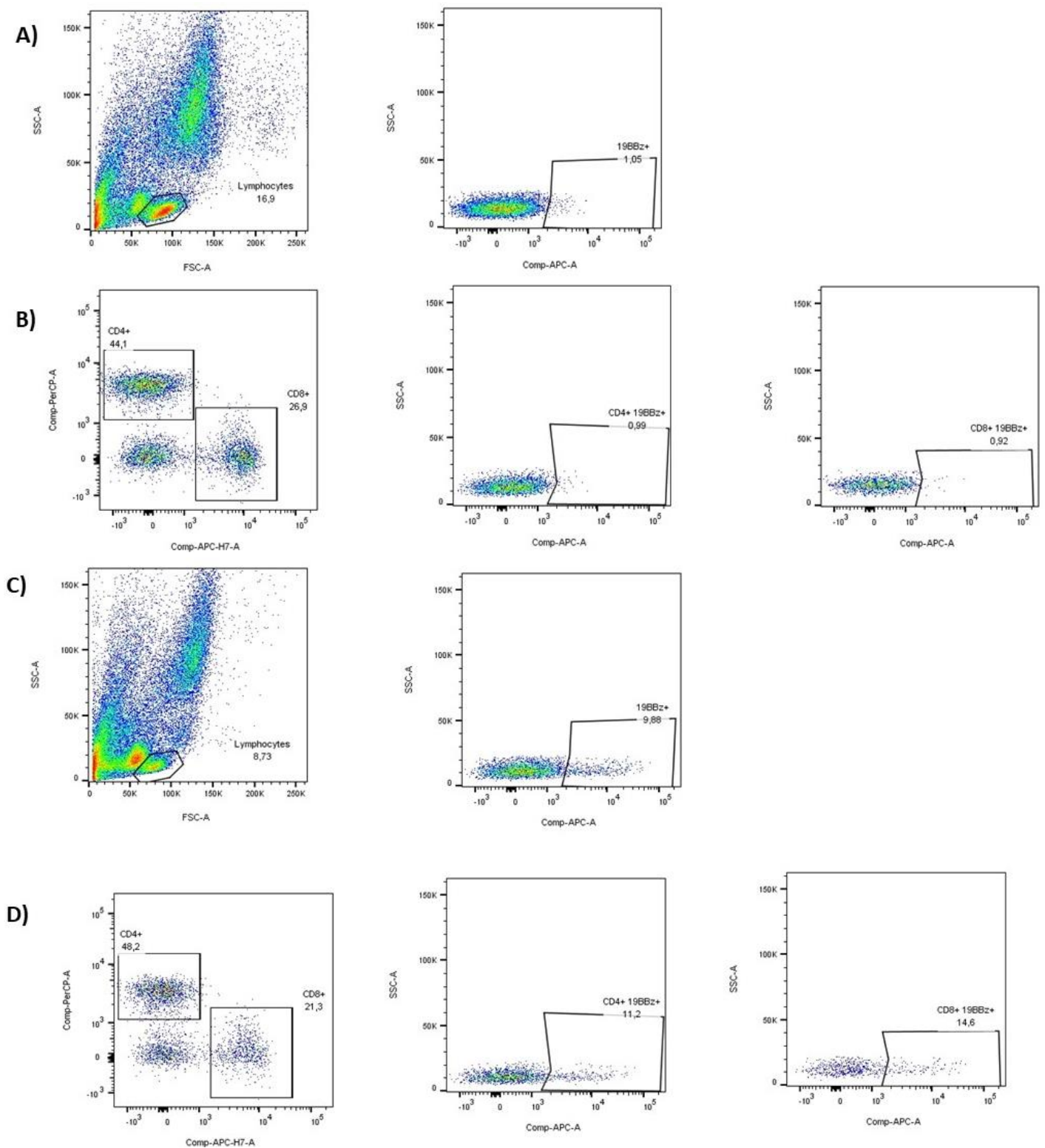


Figura 5.29: Porcentagem de células CAR+ no experimento *in vivo* 5. 24 horas após a eletroporação, foram avaliados por citometria de fluxo quanto a: **A)** Condição mock no gate dos linfócitos marcadas com c-myc. **B)** Avaliação das sub-populações na condição mock, avaliando as subpopulações dentro dos gates CD4+ e CD8+ nos linfócitos. **C)** Avaliação da condição 19BBζ no gate dos linfócitos, marcadas com anti c-myc para avaliar a porcentagem de células T CAR+. **D)** Avaliação do percentual de células CD4+ e CD8+ expressando CAR. Os anticorpos utilizados foram CD4 percp, CD8 APC Cy7 e anti c-myc Alexa 647.

A figura acima mostra que as células geradas a partir deste doador apresentaram em torno de 45% de CD4+ e 25% de CD8+ em ambas as condições. A porcentagem de CAR nos linfócitos totais foram de 9,98%. Quando avaliado separadamente, dentro da população de CD4+, obteve-se 11,2% de células T CAR+ e dentro de CD8+, 14,6% de células T CAR+. Para a avaliação da população total, foram utilizados os anticorpos anti CD19, CD14 e CD56, enquanto para avaliar as subpopulações de memória foram avaliados os marcadores CD45RO, CCR7 e CD62L (Figura 5.30).

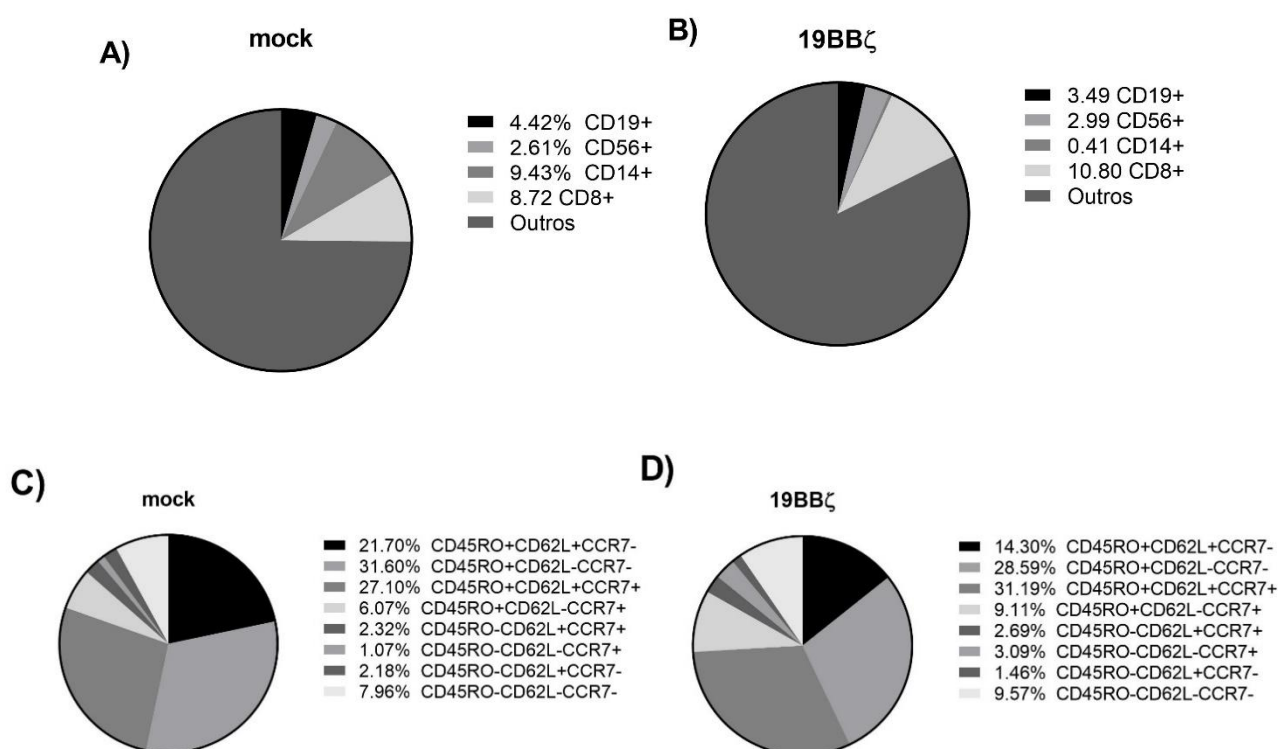


Figura 5.30. Perfil das células inoculadas no experimento *in vivo* 5. Classificação das células quanto a presença de CD19+, CD14+, CD56+ e CD8+ nas condições **A)** mock e **B)** 19BBζ. O gate foi realizado incluindo as populações do sangue: monócitos, linfócitos e neutrófilos. Caracterização das subpopulações de memória dentro da população de linfócitos, nas condições **C)** mock e **D)** 19BBζ respectivamente. Os anticorpos utilizados foram: CD19 percp Cy5.5, CD56 PE, CD14 FITC, CD8 APC Cy7, CD45RO PeCy7, CD62L FITC e CCR7 PE.

As subpopulações de células B (CD19), NK (CD56) e células T CD8 alteram pouco sua representatividade quando comparado ao marcador de monócitos (CD14)

entre as condições mock e 19BBζ. (Figura 5.30 A e B). Possivelmente, a eletroporação combinada com a exposição aos plasmídeos apresenta uma toxicidade maior para essa população.

Nas duas condições, mock e 19BBζ, 3 subpopulações foram mais representativas para caracterizar a população dos linfócitos (Figura 5.30 C e D). Na condição mock 31,6%, 27,10% e 21,8% representam células T de memória efetora (CD45RO+CD62L-CCR7-), células T de memória central (CD45RO+CD62L+CCR7+) e população intermediária entre memória central e efetora (CD45RO+CD62L+CCR7-) respectivamente. De forma similar, a condição 19BBζ possui 28,59%, 31,19% e 14,30% representam células T de memória efetora, células T de memória central e população intermediária entre memória central e efetora, respectivamente.

Também caracterizamos o perfil de exaustão das células no dia da inoculação para a população de linfócitos T CD4 e CD8 (Figura 5.31).

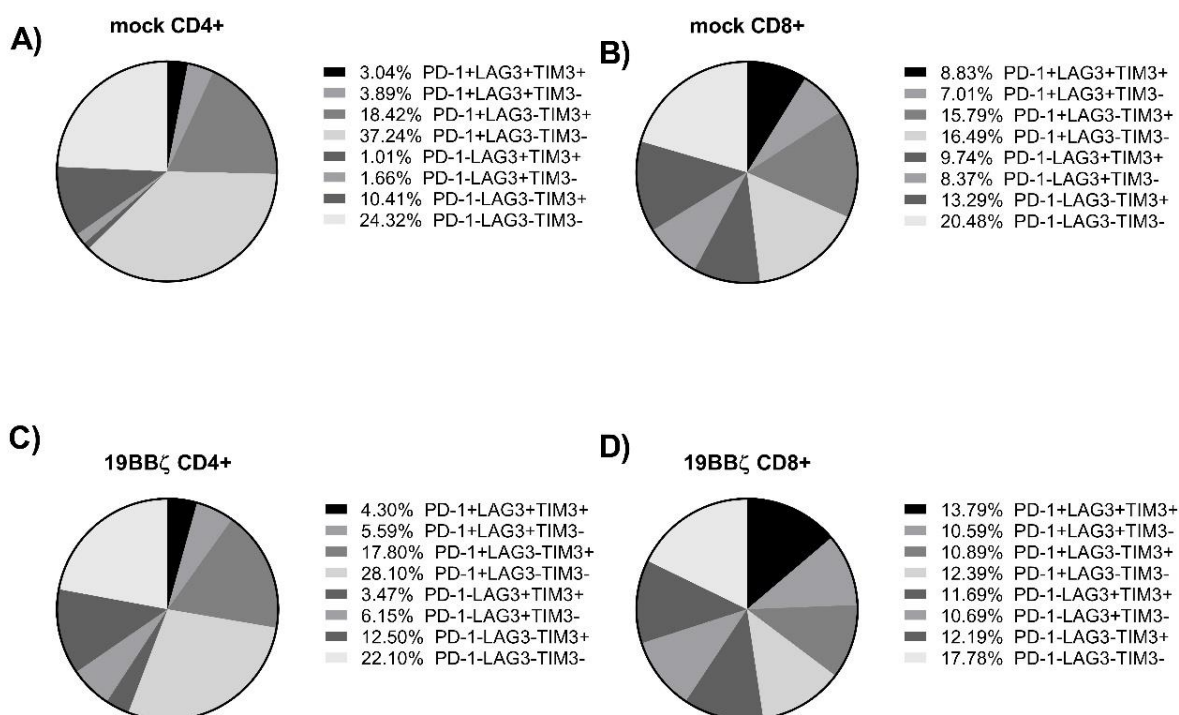


Figura 5.31: Caracterização do perfil de exaustão das células no d+1 no experimento *in vivo* 5. Para o painel de exaustão, foram utilizados os marcadores PD-1, LAG3 e Tim3. As figuras ilustram os perfis de expressão destes marcadores em **A)** linfócitos T CD4+ do grupo mock, **B)** linfócitos T CD8+ do grupo mock, **C)** linfócitos T CD4+ do grupo 19BBζ e **D)** linfócitos T CD8+ do grupo 19BBζ. Os anticorpos utilizados foram PD-1 APC, LAG3 PE e Tim3 PECy7.

Nas populações CD4+ representadas na figura acima (Figuras 5.31 A e C), nota-se o predomínio das células que possuem apenas o marcador PD-1, 37,24% para mock e 28,1% para o grupo 19BBζ. Destaca-se também as populações triplo negativas (PD-1- LAG3- Tim3-). Para as células CD8+ (Figuras 5.31 B e D), ocorre uma distribuição mais homogênea em todas as subpopulações de exaustão em comparação as células CD4+. A prevalência para ambos os grupos CD8+ é da subpopulação triplo negativa seguida da população positiva somente para o PD-1. Em todos os perfis, é possível notar heterogeneidade de marcadores.

Os animais foram acompanhados 3 vezes por semana, e quando sinais de caquexia começaram a surgir, foram acompanhados diariamente. Uma característica bem definida que ocorre em animais enxertados com Nalm-6, é a presença de paralisia nas patas traseiras, sendo este o principal critério para eutanásia dos animais neste experimento. Foi coletado o sangue de todos os animais duas vezes ao longo do experimento, como mostrado na Figura 3.32.

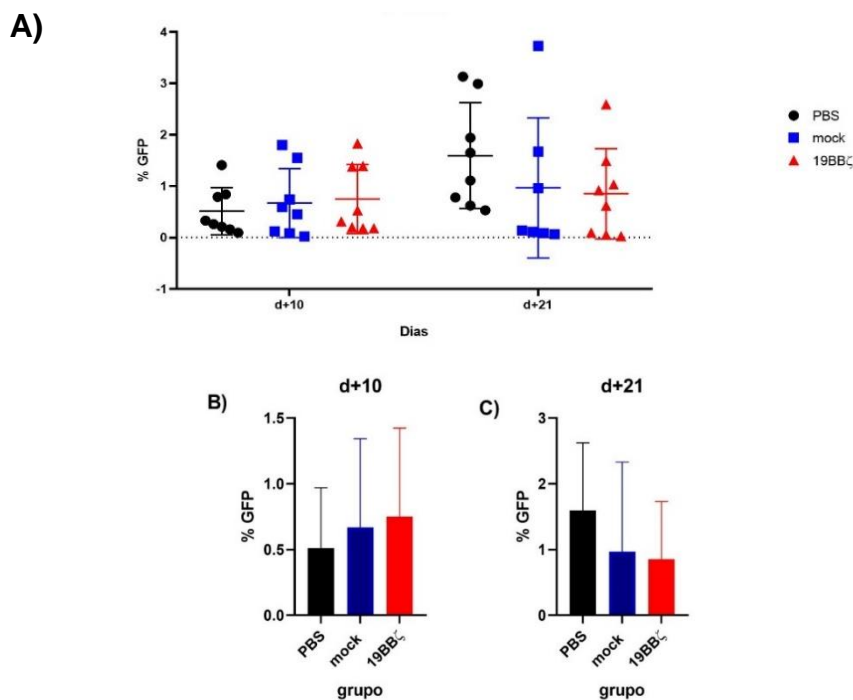


Figura 5.32. Análise do percentual de células GFP+ no sangue dos animais ao longo do experimento. O sangue foi retirado em dois momentos no decorrer do experimento pela veia submandibular. As hemácias foram lisadas e as células foram avaliadas quanto a carga de GFP+ **A)** Representa a carga de células GFP+ ao longo dos dias. **B)** Comparação entre os grupos no d+10 e **C)** no d+21. Não houve diferença estatísticas entre os grupos. Grupos: PBS (n=8), mock (n=8) e 19BBζ (n=8). Teste utilizando One-way ANOVA com pós teste Tukey (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

O sangue não apresentou carga tumoral consistente ao decorrer do experimento em nenhum dos grupos analisados (Figura 5.32).

Os animais que apresentaram paralisia ou qualquer tipo de enfermidade foram eutanasiados e tiveram os seguintes órgãos retirados: baço, fígado, medula, sangue e cérebro. Os órgãos foram processados, dissociados e analisados por citometria de fluxo (Figura 5.33).

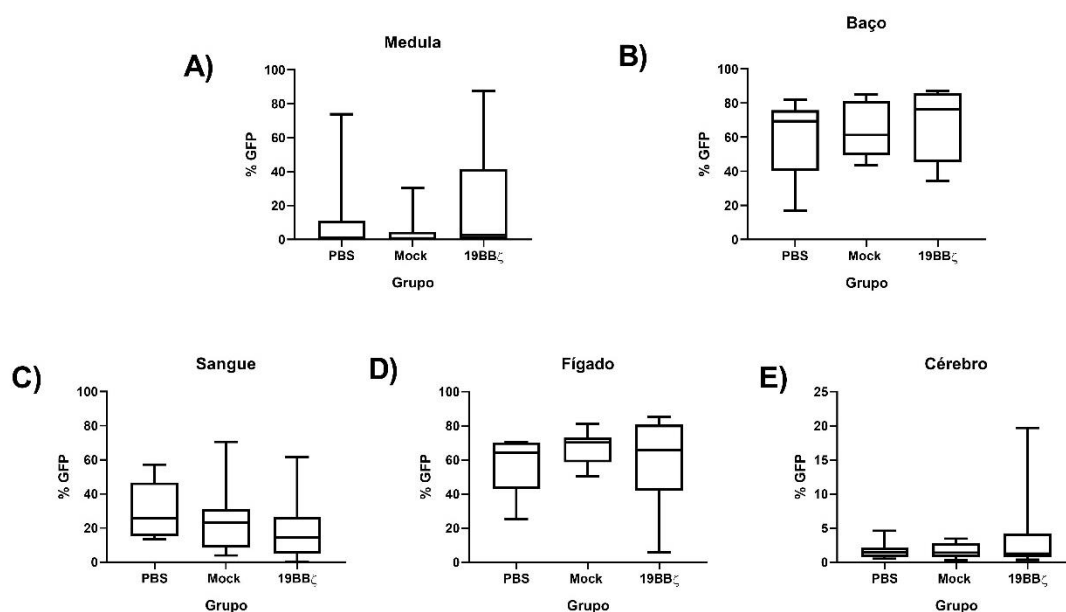


Figura 5.33: Análise da carga tumoral dos órgãos dos animais do experimento *in vivo* 5: As figuras mostram a porcentagem de células GFP+ nos órgãos no dia da eutanásia. Os órgãos foram macerados mecanicamente, as hemácias lisadas e GFP+ foi avaliado por citometria de fluxo em: **A)** Medula, **B)** baço, **C)** sangue, **D)** fígado **E)** cérebro. Não houve diferença significativa em nenhuma comparação entre grupos. Grupos: PBS (n=8), mock (n=8) e 19BBζ (n=8). Teste utilizado One-way ANOVA com pos teste Tukey (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Não houve diferença significativa em nenhum dos órgãos quando comparado entre os grupos (Figura 5.33). Os órgãos que apresentaram maiores taxas tumorais foram o baço e a fígado. O cérebro teve pouca carga de tumor quando comparado aos outros órgãos. Um aspecto a ser destacado é a presença de GFP no sangue no dia da eutanásia, enquanto em tempos mais precoces quase não há carga tumoral circulante (Figura 5.32), indicando uma rápida progressão da doença

Por fim, a curva de sobrevivência do experimento *in vivo* 5 não demonstrou diferença significativa entre os grupos, como representado na Figura 5.34:

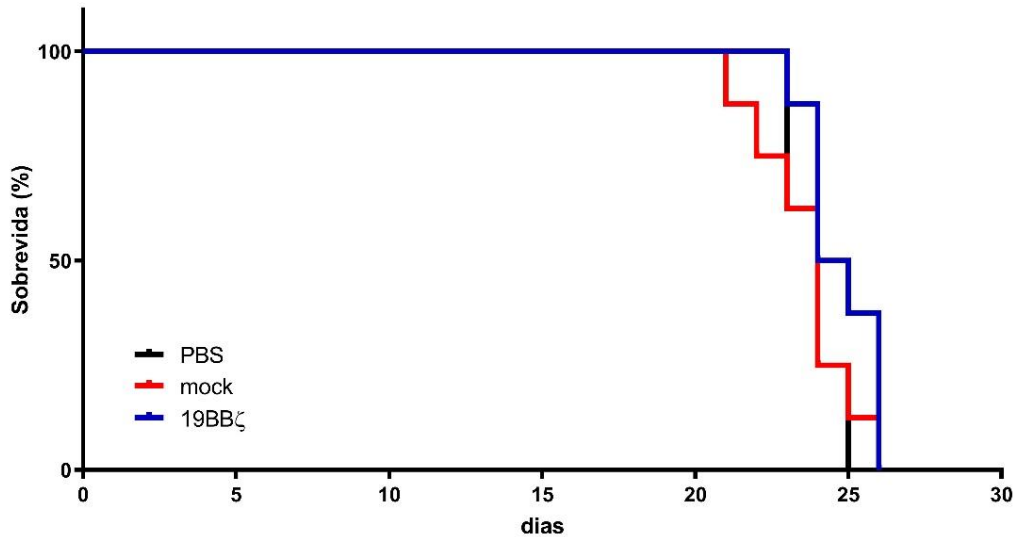


Figura 5.34: Análise da sobrevivência do experimento *in vivo* 5. Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. A figura mostra a sobrevivência do experimento de camundongos enxertados com Nalm-6 GFP. Não houve diferença significativa entre os grupos. Grupos: PBS (n=8), mock (n=8) e 19BBζ (n=8). Teste utilizado foi Log-Rank (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Em conclusão, a técnica POC não obteve sucesso nesse experimento envolvendo a carga tumoral de Nalm-6 e o intervalo utilizado entre o tratamento e a inoculação da leucemia. As células T CAR+ não foram capazes de melhorar a sobrevivência de camundongos enxertados com Nalm-6 nas condições testadas.

5.6 *In vivo* 6 – Comparação da técnica POC com abordagem de expansão de células T com beads anti CD3/CD28

Nesse último experimento, avaliamos a potência de células T CAR+ na abordagem POC comparado com expansão e ativação das células com beads anti-CD3/CD28. Para avaliar este aspecto, testamos doses limitantes de células T CAR+. Para evitar qualquer contribuição de células Nk que possam expandir durante a estimulação das células *in vitro*, neste ensaio purificamos células CD3+ com o RosetteSep Human T Cell Enrichment Cocktail antes da etapa de eletroporação. O desenho experimental para este experimento está representado na Figura 5.35.

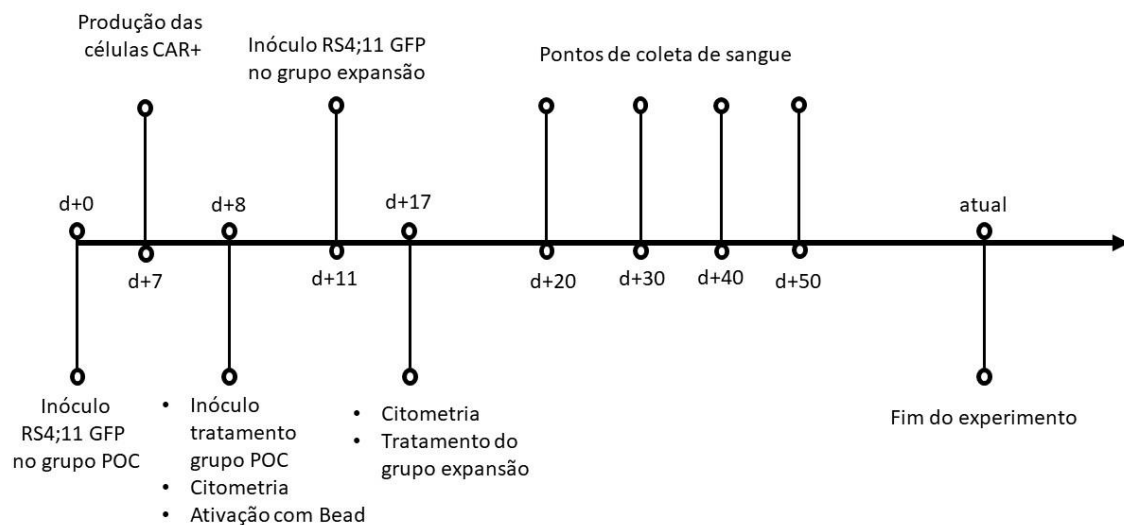


Figura 5.35: Linha do tempo do experimento *in vivo* 6. Esse experimento compara o tratamento dos animais enxertados com RS4;11 em duas metodologias diferentes, a metodologia *point-of-care* (POC) e os linfócitos expandidos com bead anti-CD3/CD26 por 12 dias.

Para facilitar a explicação dos resultados, esse experimento foi separado em dois grupos: grupo POC dividido em PBS (n=7), mock (n=7), 19BBζ 10⁵ (n=8) e 19BBζ 10⁶ (n=6) e grupo expansão dividido em PBS (n=6), mock (n=4), 19BBζ 10⁵ (n=7) e 19BBζ 10⁶ (n=3). O grupo expansão 19BBζ 10⁶ contou com menos animais pois a expansão obtiva dos linfócitos ficou aquém do esperado. Neste experimento o tratamento foi iniciado 8 dias após o inóculo da célula tumoral por questões logísticas, o que representa um modelo com mais carga tumoral potencial se comparado aos experimentos anteriores em que os animais inoculados com a RS4;11 foram tratados no terceiro dia pós inoculação do tumor.

O sangue de doadores saudáveis foi incubado durante 15 minutos com a RosetteSep e posteriormente foi realizado o ficoll. As células foram eletroporadas e no dia seguinte injetadas no grupo referente a técnica POC e marcadas para análise de citometria de fluxo. As células que restaram foram estimuladas com bead anti-CD3/CD28 e expandidas por 12 dias. No d+12 as células foram avaliadas por citometria de fluxo e então injetadas no grupo "expansão", consistindo de animais inoculados com RS4;11 (Figura 3.36).

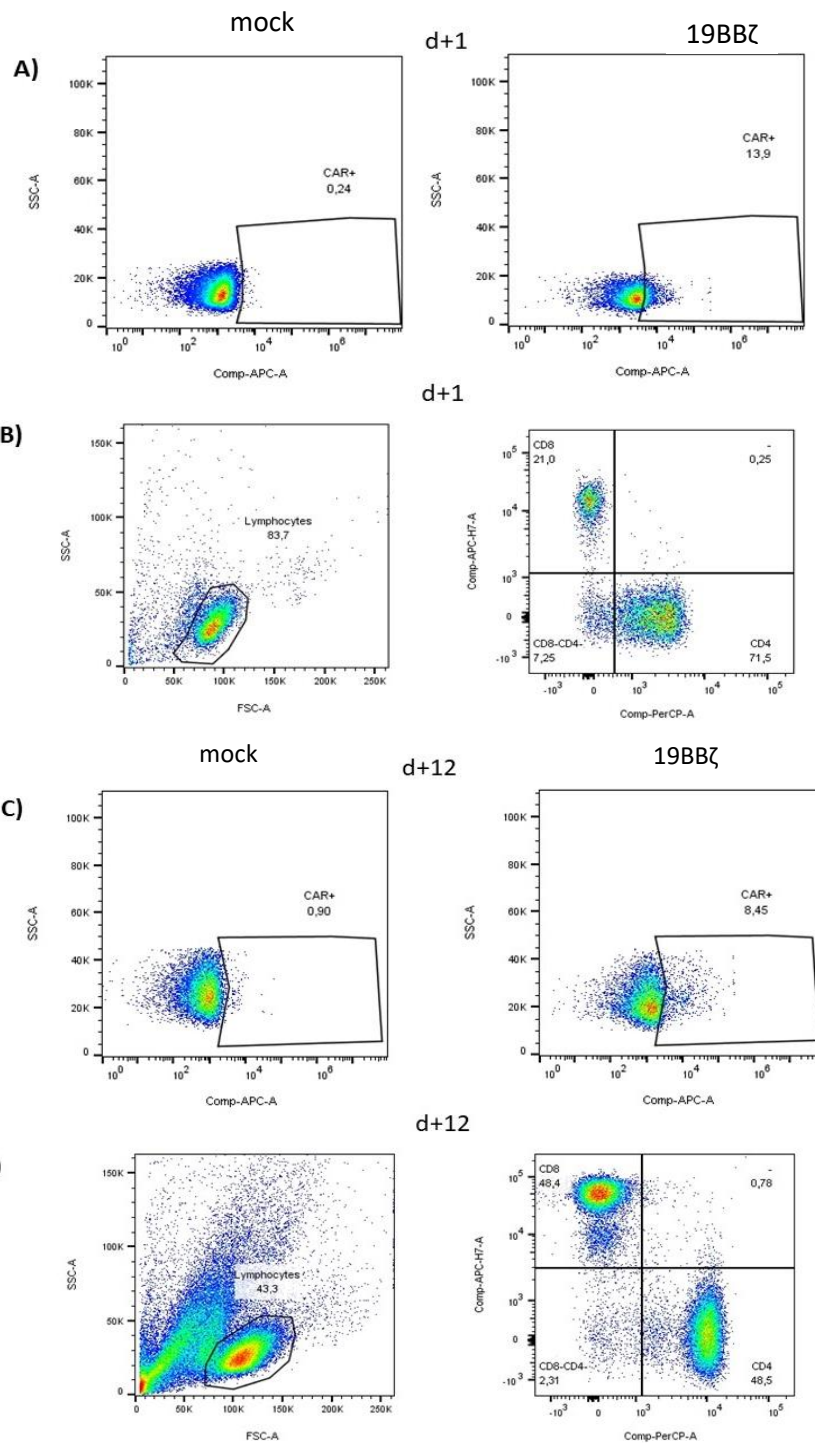


Figura 5.36: Avaliação fenotípica da população CAR+, CD4+ e CD8+ nos d+1 e d+12. As células foram modificadas e avaliadas quanto a expressão de CAR em diferentes dias, no d+1 (dia após eletroporação) e no d+12 (12 dias após a expansão com bead anti CD3/CD28) **A)** Comparação da expressão de CAR nos linfócitos no d+1 nas condições mock e 19BBζ. **B)** População CD4+ e CD8+ após o uso da RosettaSep no d+1. **C)** Comparação da expressão das células T CAR+ no d+12 dentro dos linfócitos entre mock e 19BBζ. **D)** Populações CD4+ e CD8+ no d+12 da expansão. Anticorpos utilizados: anti c-myc Alexa Fluor 488, CD4 PerCP e CD8 APC Cy7.

A expressão de células T CAR+ no d+1 foi de 13,9% dentro da população de linfócitos. Portanto, no grupo POC 19BBζ 10⁵ foram injetadas aproximadamente 1,4x10⁴ células T CAR+ e no POC grupo 19BBζ 10⁶ 1,4x10⁵ de células T CAR+. Já para o dia 12, a expressão do CAR foi de 8,45%, logo o número de células T CAR+ para o grupo da expansão 19BBζ 10⁵ foi de aproximadamente 8,5x10³ células T CAR+ e para 19BBζ 10⁶ foi de 8,5x10⁴ células T CAR+. No grupo mock, foram injetadas 10⁶ células no grupo POC e expansão com o objetivo de avaliar se a população não transduzidas geraria algum efeito antitumoral na sua maior dose. Podemos avaliar também a eficácia da purificação das células CD3+, sendo no d+1 21% de células CD8+ e 71,5% CD4+. No d+12, a razão de células CD8 para células CD4 aumentou, encontrando-se 48,4% de células CD8+ e 48,5% de células CD4+.

Avaliamos também quanto ao perfil de memória no primeiro dia após a eletroporação (d+1) e após 12 dias de expansão (d+12) (Figura 5.37).

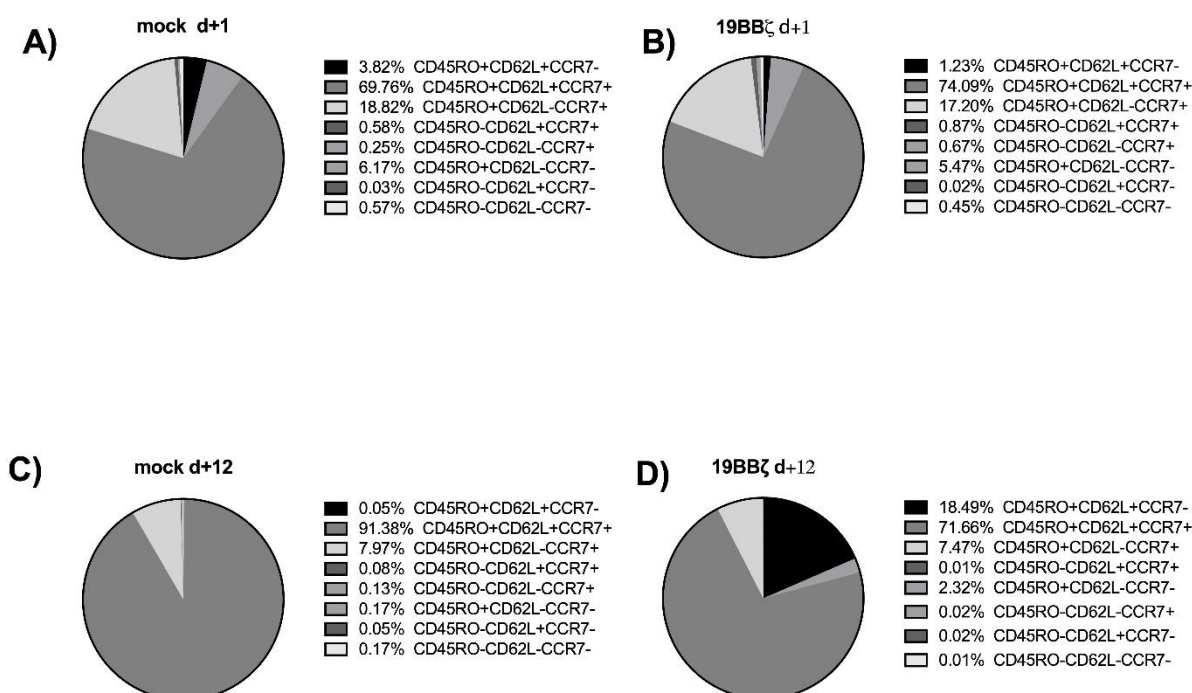


Figura 5.37. Perfil de sub-populações de memória das células no d+1 e no d+12. Gráfico referente ao perfil de memória de acordo com as marcações de CD45RO, CCR7 e CD62L em diferentes dias, no d+1 (dia após eletroporação) e no d+12 (12 dias após a expansão com bead anti CD3/CD28) nas condições **A)** mock no d+1, **B)** 19BBζ no d+1, **C)** mock no d+12 e **D)** 19BBζ no d+12. Os anticorpos utilizados foram CD45RO PE Cy 7, CCR7 PE e CD62L FITC.

No primeiro dia após a eletroporação, praticamente não há diferença no perfil de memória entre as condições mock e 19BBζ, prevalecendo as populações de memória central (CD45RO+CD62L+CCR7+), seguido de populações intermediárias (CD45RO+CD62L-CCR7+) e memória efetora (CD45RO+CD62L-CCR7-). Após 12 dias de expansão, é possível ver o predomínio de população de memória central nos dois grupos, principalmente para o mock que chegou a 91,38%. É possível destacar também a presença de 18,49% CD45RO+CD62L+CCR7- para o grupo do 19BBζ e no grupo mock essa população equivale a 0,05%.

No experimento *in vivo* 6 os animais foram acompanhados 3 vezes por semana até apresentarem sinais de caquexia, que determinou acompanhamento diário. O sangue dos animais foi retirado a cada 10 dias, a partir do vigésimo dia (Figura 5.38).

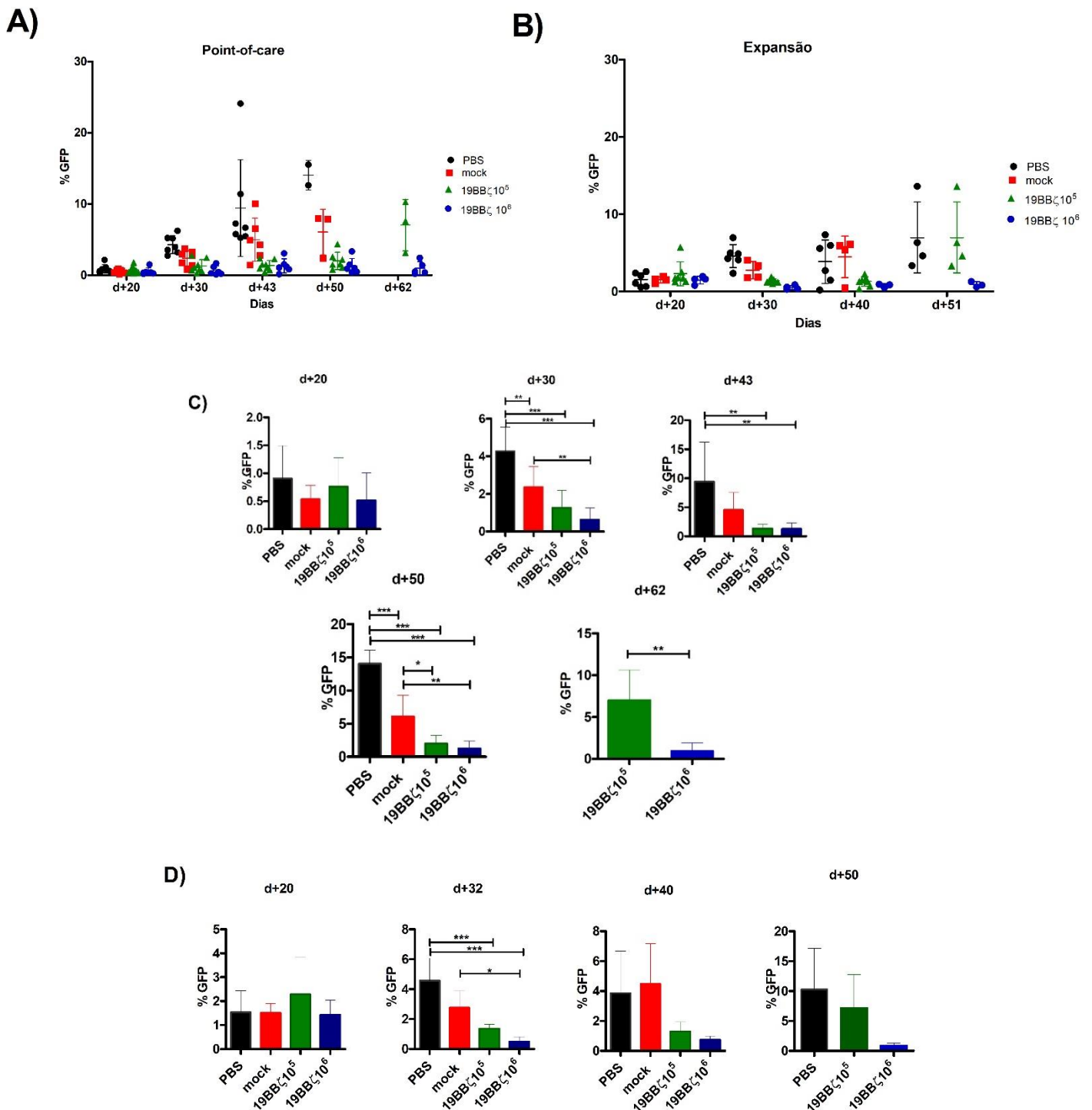


Figura 5.38: Porcentagem de células GFP+ no sangue no decorrer do experimento. O sangue foi retirado ao longo do experimento pela veia submandibular e foi avaliado quanto a presença de células GFP+ nas condições **A)** point-of-care e **B)** expansão. Gráfico em barras que representa cada ponto em que o sangue foi retirado. **C)** point-of-care e **D)** expansão. Grupos: PBS (n=7), mock (n=7), 19BBζ 10⁵ (n=8) e 19BBζ 10⁶ (n=6), PBS (n=6), mock (n=4), 19BBζ 10⁵ (n=7) e 19BBζ 10⁶ (n=3). O teste utilizado foi o One-way ANOVA com pós teste Tukey ou t-student.

O comportamento da carga tumoral nos dois grupos foi similar ao longo do experimento. A porcentagem de células GFP+ nos grupos PBS e mock geralmente se mostrou superior aos grupos 19BBζ. Também podemos observar que a carga tumoral do grupo 19BBζ 10⁵ sempre se demonstrou superior quando comparado a carga do grupo 19BBζ 10⁶.

Até o momento da escrita desse documento, um animal do grupo POC e dois do grupo expansão permaneceram vivos (Figura 5.39).

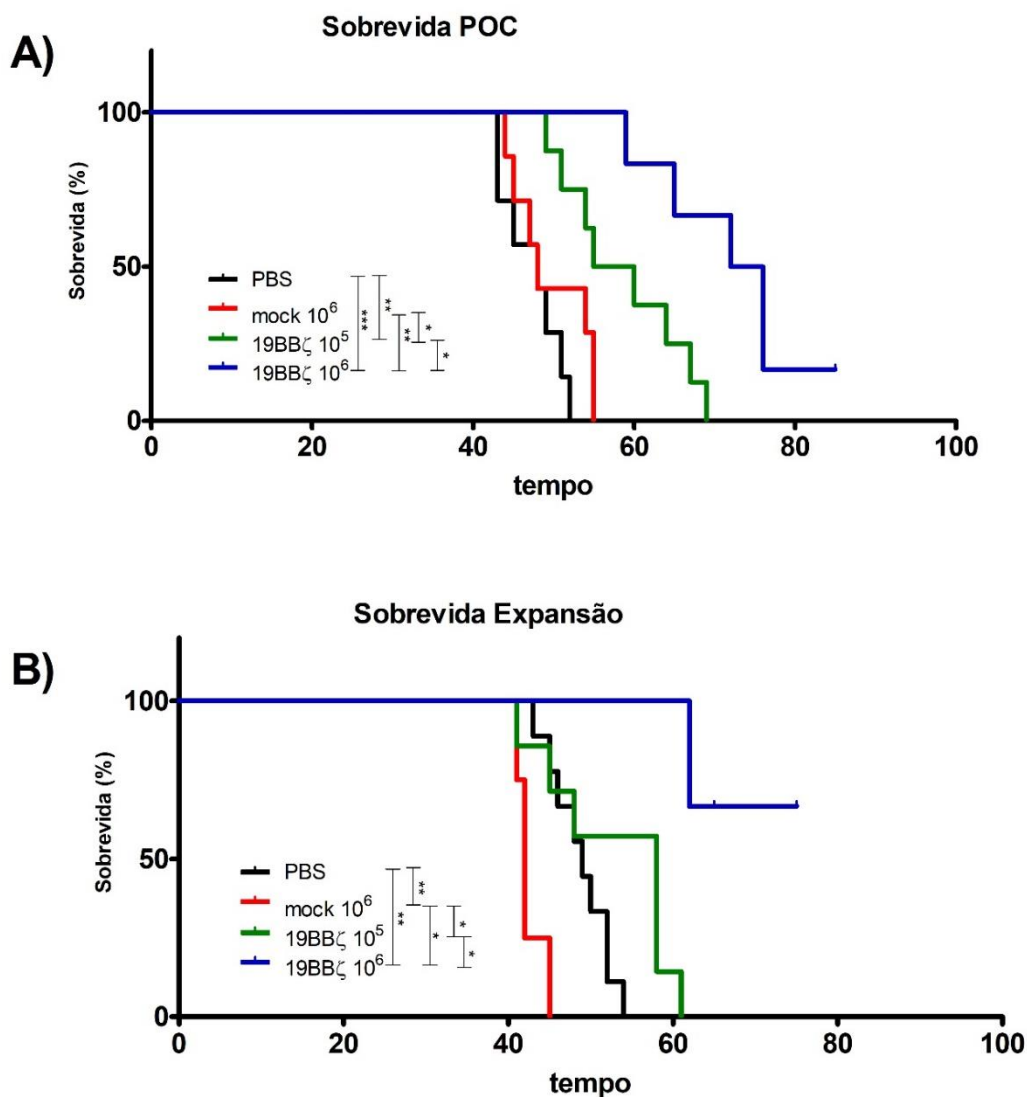


Figura 5.39: Curva de sobrevivência do experimento *in vivo* 6. Os animais foram monitorados 3 vezes por semana no início do experimento e posteriormente, diariamente. Para determinar o momento da eutanásia dos camundongos, foram avaliados o bem-estar desses animais. A figura representa a curva de sobrevivência dos grupos **A)** POC e **B)** expansão. PBS (n=7), mock (n=7), 19BBζ 10⁵ (n=8) e 19BBζ 10⁶ (n=6), PBS (n=6), mock (n=4), 19BBζ 10⁵ (n=7) e 19BBζ 10⁶ (n=3). O teste estatístico utilizado foi Log-Rank.

A curva de sobrevivência do grupo POC mostrou que não houve diferença significativa entre o grupo mock e PBS, porém ambos apresentaram diferença para os dois grupos 19BBζ. Também pode-se aferir a diferença entre doses de células T CAR+, no qual o grupo que recebeu 10^6 células totais teve taxa de sobrevivência melhor do que o grupo que recebeu 10^5 células. O perfil de sobrevivência do experimento de expansão demonstrou ser diferente, os animais do grupo mock apresentaram sinais de caquexia e foram eutanasiados antes do grupo PBS, resultando em diferença entre este grupo. De forma similar ao experimento POC, os grupos de 19BBζ tiveram melhora na sobrevivência em relação aos grupos controles (PBS e mock) e os animais que receberam 10^6 células sobreviveram durante mais tempo que os que receberam 10^5 células totais.

Nesse experimento, não foi possível avaliar a diferença entre o procedimento de purificar células CD3 ou não. Porém, podemos inferir que a técnica point-of-care para tratar animais enxertados com RS4;11 pode ser equiparada com a que utiliza células expandidas com beads, embora o número total de células CAR+ não tenha sido equivalente nos dois grupos. Esta equiparação é uma medida aproximada, uma vez que o percentual de células CAR+ ao d+1 pós eletroporação será sempre subestimado, pois sabemos, a partir de dados coletados no nosso grupo com dezenas de eletroporações, que o percentual de células CAR+ aumenta após o primeiro dia da eletroporação, uma vez que as integrações se consolidam no genoma e os transcritos de CAR se acumulam.

Neste experimento podemos avaliar efeito dose-resposta de número de células T CAR+, uma vez que, independente do braço do experimento (POC ou expansão), doses maiores de células CAR+ resultaram em melhor resposta quando avaliada a sobrevivência dos animais.

6. DISCUSSÃO

A imunoterapia tem se destacado no tratamento de várias doenças. Desde os primeiros passos de Willian Coley de tornar o tumor visível para o sistema imune (YANG, 2015), o entendimento sobre a importância do sistema imune no desenvolvimento do tumor, como descrito por Paul Ehrlich e posteriormente aperfeiçoado como teoria da vigilância imune por Macfarlane Burnet (BURNET, 1957), levantou a possibilidade de voltar o sistema imune para combater o câncer. Devido ao aumento da compreensão a respeito do funcionamento de células e moléculas do sistema imunológico, abordagens têm sido estudadas para combater o câncer, tais como estimular os linfócitos *ex vivo* associando a aplicação de citocinas (CHEN, 2014), tornar o tumor imunogênico com vírus oncolítico (ANDTBACKA *et al.*, 2016), expandir *ex vivo* infiltrados tumorais para reconhecer o tumor (ROSENBERG *et al.*, 1988), utilizar anticorpos monoclonais para bloquear moléculas inibitórias de células T (GRYWALSKA *et al.*, 2018) e modificar geneticamente células para direcioná-las a um alvo específico (VAIRY *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, células T CAR+ tem se mostrado uma potencial terapia para pacientes com LLA-B. Seu alto custo impede, no entanto, que essa terapia seja mais difundida entre os pacientes. Uma das justificativas para os elevados preços é o custo da produção, pois devido à modificação genética ser realizada por vetores virais, implica manutenção de salas de biossegurança além de diversas etapas para produção dos vetores virais, transdução, expansão das células, entre outros aspectos (LEVINE *et al.*, 2017). Como alternativa, a modificação genética utilizando o sistema Sleeping Beauty já se mostrou promissora em testes clínicos com células T CAR+ (KEBRIAEI *et al.* 2016).

Como propósito principal, esse trabalho mostra formas alternativas para combater a LLA-B em abordagens envolvendo menores manipulações celulares e, por consequência, menor complexidade e custo. Nosso processo de modificação genética é realizado pelo sistema SB e eletroporação. Como primeira abordagem, o experimento *in vivo* 1, mostrou o potencial de expansão e ativação de células T CAR+ usando como estratégia a utilização de uma linhagem apresentadora de antígenos, a LCL L388 previamente irradiada. Modelos similares já foram previamente descritos e demonstram a capacidade de APC artificiais expandirem linfócitos em sistema de co-

cultura. Alguns exemplos são as linhagens K562 modificadas (SINGH *et al.*, 2013) e a própria L388 (CHICAYBAM *et al.*, 2013). A linhagem celular L388 apresenta as proteínas CD19 e CD20 em sua superfície e também proteínas virais derivada de EBV, estas últimas podendo ser processadas e apresentadas em moléculas de HLA de classe I e II. Isso gera ativação e expansão de células expressando o CAR 19BBζ (e também pode ser utilizada para expandir células T com CARs anti CD20, como já demonstrado por nosso grupo - CHICAYBAM *et al.*, 2013), além de possíveis células T com TCR reativos para o EBV. Essa reatividade pode ser eficaz para o tratamento com células T CAR+, pois os pacientes são tratados anteriormente com drogas imunossupressoras, e os TCR reativos contra EBV podem ter um efeito protetor para esses pacientes em possíveis infecções ou reativações virais pós transplante (MICKLETHWAITE *et al.*, 2010). Além disso, outras proteínas co-estimuladoras de membrana da L388 podem gerar interações de diferentes receptores de ativação nas células T, além da L388 apresentar uma coleção de peptídeos de origem viral no seu MHC, expandindo distintos clones de células T. Isso pode explicar a capacidade da condição mock se expandir e apresentar capacidade citotóxica, ainda que mediada por um efeito de alorreatividade.

Nesse experimento, podemos avaliar que a expressão do CAR aumentou quando comparadas entre o dia após a eletroporação e ao final dos dois ciclos de estimulação. No d+1, a expressão de células T CAR+ foi de aproximadamente 39%, 12 dias depois a expressão era de 55%, que representa o final do primeiro ciclo. Após 27 dias de cultura, aproximadamente 65% de células eram CAR+. Estes dados indicam a capacidade da L388 de selecionar células positivas para o receptor CAR, suportando o conceito de ativação de longa duração do CAR nos linfócitos T (FRIGAULT *et al.*, 2015).

Nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, a condição 19BBζ foi a que mais eliminou as duas células de LLA-B testadas (RS4;11 e Nalm-6), em comparação ao mock. Porém é possível observar que a condição mock também é capaz de eliminar células tumorais. Esse mesmo efeito pôde ser observado *in vivo*, com a condição mock prologando a sobrevivência dos camundongos de forma estatisticamente significativa em comparação ao grupo não tratado no experimento *in vivo* 1. Essa condição pode ser comparada à imunoterapia em desuso de linfócitos expandidos com IL-2 de forma *ex vivo* e re-infundido em pacientes, as células chamadas de LAKs (do inglês Lymphokine-Activated Killer). Essa imunoterapia possui alta toxicidade e eficácia

modestas para tumores como melanoma e pode também representar um efeito alorreativo (CHEN *et al*, 2014).

Devido ao fato das células da condição mock não possuírem receptores quiméricos, é provável que durante a expansão clones alorreativos ou células NK sejam expandidas. Como observado na Figura 5.4, apesar de existirem células GFP+, nenhum órgão apresentou diferença significativa quanto à porcentagem de células GFP+ quando comparada a condição mock à condição 19BBζ. Deve-se pontuar, no entanto, que estas análises dos órgãos foram realizadas sempre após a eutanásia, representando portanto o fim do acompanhamento do animal e, portanto, uma situação, em geral, de alta carga tumoral. Análises de carga total de tumor utilizando as mesmas linhagens tumorais RS4;11 e Nalm-6 marcadas com luciferase estão planejadas. Nestes ensaios que serão realizados, poderemos avaliar a carga total de células tumorais (não apenas nos órgãos ou sangue isoladamente) com bioluminescência devido à luciferase *in vivo*, nos animais durante o experimento em diferentes pontos. Este ensaio permitirá avaliar diferenças entre os grupos para a carga total de tumor ao longo do tempo, e não somente à eutanásia, como foi avaliado no presente trabalho. Além de diminuir a carga tumoral, os camundongos do grupo mock apresentaram perda de peso, diferença no pelo e na mobilidade. Isso pode ter relação com a doença enxerto contra o hospedeiro (DECH). Transplantes de doadores humanos para camundongos podem acarretar uma potente e letal DECH. (JACOBY *et al.*, 2015).

A condição 19BBζ apresentou aumento na sobrevivência dos camundongos tratados. Três animais foram eutanasiados devido à queda de peso, porém não apresentavam nenhum outro aspecto de caquexia. Não foram encontradas células GFP+ nos órgãos analisados. Esta perda de peso pode estar relacionada à DECH, uma vez que células T CAR+ podem gerar este tipo de resposta contra o hospedeiro (JACOBY *et al.*, 2015). Alguns órgãos foram armazenados para possíveis análises posteriores, como a avaliação da carga de cópias do transgene para o CAR.

No dia 125 após a inoculação original do tumor, introduzimos novamente a linhagem RS4;11 nos animais, em um ensaio de desafio tumoral. Os camundongos não desenvolveram nova carga leucêmica, indicando a permanência de células CAR-T capazes de eliminar as novas células tumorais. Animais que permaneceram vivos até o dia 255 foram eutanasiados e o DNA armazenado para verificar a presença de

células T CAR+, já que a capacidade de prevenir o desenvolvimento da nova leucemia indica a permanência dos linfócitos CAR+ por mais de 120 dias nestes animais.

A abordagem de geração de linfócitos CAR-T estimulados com L388 e atividade anti-viral é uma abordagem com potencial aplicação clínica. Outra abordagem possível baseada na combinação eletroporação-sistema SB é a geração de células CAR-T em uma estratégia POC, que consiste na produção das células T CAR e sua imediata aplicação, sem o processo de ativação e expansão. Essa abordagem pode facilitar a manufatura das células, além de diminuir os custos.

Não há, até o momento, publicação formal de estudos utilizando a abordagem POC para células T CAR+. Um estudo recente mostrou o aumento da eficácia anti-tumoral das células T CAR+ em dias de expansão diferentes, dia 3, dia 5 e dia 9. A condição referente ao dia 3 apresentou melhor desempenho quando comparada com as outras duas. Foram encontradas diferenças quanto ao estado de diferenciação de subpopulações celulares, pois quanto menos tempo em cultura, menos diferenciadas serão as células geradas, resultando em uma melhor função *in vivo*. A expansão tende a gerar, principalmente, células de memória efetora e memória central, mas o trabalho levanta o impacto de outros subtipos celulares, como as células tronco de memória (GHASSEMI *et al.*, 2018). Essa explicação poderia se aplicar também aos resultados encontrados no nosso trabalho na condição POC. Para complementar nosso estudo, uma melhor caracterização destas células deverá ser realizada para atribuir eventuais ganhos de efetividade à composição celular do produto utilizado.

Nos experimentos utilizando a técnica POC (*in vivo* 2-6) a expressão do CAR obtida oscilou entre 5.5 e 11.5% dos linfócitos. Essa porcentagem está de acordo com os dados do experimento *in vivo* 1 (anexo 1), que indica que a expressão do CAR no nosso sistema no primeiro dia após a eletroporação varia de 2,5% a 37%. Como exemplo, no *in vivo* 2, foi utilizada uma dose de 10^7 células totais, ou aproximadamente 6×10^5 células CAR+. A dose utilizada clinicamente em pacientes geralmente abrange de 5×10^6 a 1×10^7 células CAR+ por quilo (PERICA *et al.*, 2018). Se equiparmos o peso de um camundongo (25g) com a dose recebida em humanos, a dose de células T CAR+ utilizadas em camundongos gira em torno de $1,2 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^5$. DEsta forma, podemos inferir que utilizamos doses ligeiramente acima do correntemente utilizado em ensaios clínicos. No experimento *in vivo* 3, buscamos avaliar se existe diferença na sobrevivência dos camundongos em diferentes doses, 10^7 células totais (ou $1,1 \times 10^6$

CAR+) com 10^6 células ou ($1,1 \times 10^5$ CAR+) e, de acordo com o teste de Log-Rank, não houve diferença significativa. Dentre todos os nossos ensaios, o *in vivo* 6 foi o experimento que se utilizou a menor dose de células CAR+, em torno de $1,4 \times 10^4$ células, e, mesmo assim, foi possível observar atividade antitumoral. Contudo, é difícil estabelecer um padrão de dose-resposta, pois as células de cada doador apresentam comportamentos diferentes, estando por vezes a dose mínima já acima do necessário para promover respostas antitumorais *in vivo*. Apesar de ser um evento singular, o artigo de relato de caso descrito por Fraietta *et al.* (2018), apresentou um paciente que obteve remissão completa da Leucemia Linfóide Crônica por ação de apenas um clone de células T CAR+ que foi expandido no paciente devido a uma inserção do transgene no gene tet2. Este relato sustenta a hipótese de que poucas células, desde que capazes de apresentar a boa função *in vivo*, são suficientes para suportar uma resposta antitumoral sustentada.

As células mononucleadas do sangue periférico geralmente são representadas por linfócitos (células T, células B, NK), células dendríticas e monócitos. Os linfócitos geralmente estão entre 70-90%, sendo 25-60% células CD4+, 5-30% células CD8+, 5-20% células B e NKs. Os monócitos representam em torno de 10-30% da população de PBMC (MIYAHIRA, 2012). A análise fenotípica das células dos experimentos foi realizada no dia seguinte à eletroporação. Não foi possível estabelecer um padrão entre as proporções de células NK, células B e monócitos nos doadores, enfatizando a diversidade entre os diferentes doadores. No experimento do *In vivo* 5 é possível notar uma discrepância entre a porcentagem de monócitos (CD14) na condição mock (9,43%) quando comparado com a condição 19BBζ (0,41%). Isso pode ser devido à eletroporação associada aos plasmídeos, o que pode gerar citotoxicidade maior em células não linfóides, aspecto que está contemplado no manuscrito que submetemos recentemente à revista Human Gene Therapy e que se encontra sob revisão.. Da mesma forma, o percentual de expressão de CAR nos linfócitos não atingiu seu pico máximo 24h após a eletroporação, sendo o percentual de células CAR+ obtido nesta leitura um indicativo do percentual máximo de expressão de CAR que será obtido nas horas seguintes.

Foi avaliado também o perfil das populações de memória. As células T *naive* podem ser diferenciadas de células T memória por marcadores que possuem funções específicas. O antígeno CD45 é um antígeno comum de leucócitos e possui um papel importante na regulação da diferenciação celular. Este marcador possui isoformas que

estão presentes em diferentes estágios das células, como a isoforma CD45RA para linfócitos *naïve* e CD45RO para linfócitos de memória. Outros marcadores importantes são CCR7 e CD62L. O CCR7 geralmente é expresso em células T virgens e sua interação com a quimiocina SLC (do inglês *secondary lymphoid-tissue chemokine*) ativa integrinas que promovem a adesão e migração das células T para linfonodos. Já o CD62L é uma molécula de adesão do epitélio (selectina-L) e participa das interações do rolamento com o endotélio dos linfócitos virgens para o tecido linfoide (SALLUSTO *et al.*, 1999). Quando as células deixam de expressar um desses marcadores, são chamadas de população intermediária, podendo ser CD62L- CCR7+ ou CD62L+ CCR7-. Estudos indicam que as células que persistem em pacientes tratados com células T CAR+ pertencem ao fenótipo de memória central e memória efetora, e que no contexto do TCR, a sinalização fornecida pelo 4-1BB induz o direcionamento para o perfil de memória (KALOS *et al.*, 2011). As células de memória central CAR+ geralmente estão relacionadas com a sustentação da remissão em pacientes com LLA-B (VIAUD *et al.*, 2018) e as de memória efetora a uma resposta rápida e robusta antitumoral (KLEBANOFF; GATTINONI; RESTIFO, 2012). Não se sabe ao certo o efeito das populações de memória intermediária, mas possivelmente estão relacionadas ao processo de transição. No experimento *in vivo* 2 não foi possível avaliar o marcador CD45, porém, de acordo com Golubovskaya e Wu (2016), assim como as células T *naïve* podemos determinar as populações CCR7+CD62L+ como memória central e, devido à perda desses marcadores, a subpopulação CCR7-CD62L- representa a subpopulação de memória efetora. Nos experimentos em que o painel de marcação descrito do material e métodos foi aplicado às análises celulares (*in vivo* 4-6), houve predomínio de células CD45RO+, ou seja, células que não são células T *naïve*. As populações de memória central (CD45RO+CCR7+CD62L+) e de memória efetora (CD45RO+CCR7-CD62L-) prevaleceram nos experimentos *in vivo* 4 e *in vivo* 5, porém o mesmo não ocorreu nas análises das células do experimento do *in vivo* 6, em que o fenótipo de memória central prevaleceu tanto um dia após a eletroporação quanto após 12 dias de expansão. A segunda população mais abundante do experimento *in vivo* 6 no grupo 19BBζ foi a intermediária CD45RO+CD62L+CCR7- , indicando que a perda do CCR7 pode levar ao fenótipo mais efetor ao longo dos dias em cultura, um fenômeno que não ocorreu no grupo mock. Devido ao pequeno número de experimentos, é difícil inferir qual fenótipo pode ser relacionado com a melhor taxa de resposta. Além disso, essa variação depende

amplamente dos doadores utilizados. Há necessidade também de caracterizar as células tronco de memória e comparar o efeito antitumoral e o fenótipo de condição POC com diferentes dias de cultura para podermos inferir alguma relação, inclusive se o efeito da cultura pode gerar exaustão nos linfócitos que impedem sua ação citotóxica nas células alvo. Contudo, em um sistema biológico, é difícil ditar regra, pois existe uma enorme variedade de fatores que muitas vezes não se correlacionam. Desta forma, o importante é encontrar tratamentos que se adaptem à maioria dos sistemas em que serão utilizados.

A carga de leucemia no sangue demonstrou oscilar nos diferentes experimentos de camundongos enxertados com RS4;11 GFP. Nos grupos referentes aos animais não tratados (PBS), no dia 40 do *in vivo* 2, a média de carga de GFP no sangue foi de 40% (Figura 5.8D), no *in vivo* 3 foi de 17% no d+42 (Figura 5.15D) e no *in vivo* 6 foi de 10% no grupo exaustão e 14% no grupo POC no dia 50 (Figura 5.38C e D) sendo que em todos os casos, a morte do grupo PBS ocorreu após 45 e 55 dias desde o início do tratamento. A correlação não linear entre a carga de tumor no sangue e a sobrevivência dos animais impede a adoção de um critério claro de eutanásia baseado no percentual de células GFP+ circulantes. Por outro lado, representa um excelente modelo de leucemia CD19+ de alta carga tumoral em que os animais ainda podem sobreviver por algumas semanas com tumor circulante, representando uma oportunidade para estudos imunoterapêuticos. É importante frisar que a mesma quantidade de células foi injetada e a mesma faixa de idade e sexo dos animais foram utilizados. O perfil da carga de GFP no sangue dos camundongos que foram tratados com mock também variou de quase 4% do dia d+50 no *in vivo* 2 (Figura 5.8) até 40% no dia d+40 do *in vivo* 4 (Figura 5.25). Porém esse fato pode ser justificado pela diferença entre doadores e isso também é válido para o grupo dos tratados com células T CAR+. Nos experimentos em que a morte dos camundongos ocorreu por motivos de caquexia, todos os órgãos de todos os grupos estavam acometidos por células GFP+, o único fator que modificou nesses casos foi o momento em que o tumor se estabeleceu, impactando a curva de sobrevivência. Além disso, a abordagem POC para o tratamento com células T CAR+ não foi capaz de eliminar as células RS4;11 em animais que foram enxertados 30 dias antes do tratamento no experimento *in vivo* 4A (Figura 5.24), indicando que a alta carga tumoral foi limitante, e não as células utilizadas, uma vez que as mesmas células que foram usadas nesse experimento, foram utilizadas no experimento *in vivo* 4B (Figura 2.27), no qual ocorreu

resposta anti-tumoral nos dois grupos que receberam 19BBζ, provando que essas células possuíam atividade citotóxica contra RS4;11.

A diferença entre a sobrevivência dos camundongos em que a terapia celular foi realizada 4 horas após a produção das células comparado com o tratamento com 24 horas após a produção das células do *in vivo* 4 (Figura 5.27) é um dado relevante do ponto de vista prático e regulatório para uma eventual terapia baseada no sistema POC. Essas células foram incubadas em meio de cultura por esse período. O fundamento para esse teste foi avaliar se após 24 horas da produção, as células deteriam a mesma capacidade lítica e poderíamos caracterizar às células antes de tratar os animais, ou seja, se saberíamos o perfil das células injetadas, o que não ocorre na condição de 4 horas de incubação, uma vez que o CAR ainda não passou a ser expresso. Como podemos ver na curva de sobrevivência da Figura 2.27, tanto no grupo mock quanto no grupo 19BBζ, a sobrevivência dos camundongos na condição 24 horas após a eletroporação é melhor se comparada às condições de 4 horas de incubação. No momento, não podemos inferir se ocorre mudança no perfil dessas células quanto ao fenótipo nesse período de 20 horas de cultura que favoreça a condição que foi incubada por mais tempo, pois as células foram marcadas somente 24 horas após a eletroporação. Porém, vale ressaltar que notamos a presença de mais células mortas nas condições recém eletroporadas de 4 horas, pela provável circunstância das células terem sofrido descarga elétrica e contato com grandes quantidades de DNA plasmidial (no caso do 19BBζ) e isso pode ter reflexos no tratamento. Outro fator que pode ser levantado é a possível maior expressão do CAR 24 horas após a inserção gênica, mas esse argumento não é válido para mock, que também apresentou melhora na condição em que as células foram injetadas após 24 horas de sua produção. Nas atuais circunstâncias, é difícil levantar hipótese que explique essa diferença entre os grupos, porém, devido aos resultados do experimento *in vivo* 4 nós optamos por utilizar a técnica POC 24 horas após a produção das células. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vitro* contra as linhagens RS4;11 e Nalm-6. Nas condições do grupo 19BBζ, não ocorreu lise tumoral em nenhuma das condições, e as células do grupo mock apresentaram uma pequena capacidade de eliminar apenas as células RS4;11. Este aspecto provavelmente está relacionado às células mock sofrerem menos no processo de eletroporação por não terem contato com DNA plasmidial, notoriamente tóxico para as células.

Para validar a técnica POC para a imunoterapia com células T CAR+, é importante compara-la com a abordagem atual utilizada na clínica, que é a expansão com beads anti CD3/CD28 (LEVINE *et al.*, 2017). Idealmente, seria importante ajustar às células T CAR+ para comparar as duas condições, mas devido às células não terem se expandido conforme o esperado no procedimento do experimento *in vivo* 6, não foi possível ajustar esse parâmetro e optamos por utilizar o mesmo número de células totais. Até o momento da escrita desse documento, 3 animais estavam vivos, não sendo possível finalizar a curva de sobrevivência deste último experimento. Contudo, já neste ponto da análise podemos ver diferenças significativas na curva de sobrevivência dos animais da condição POC em relação à condição expansão. Os grupos 19BBζ 10⁶ tiveram melhora de sobrevivência em relação a todos os outros grupos, mesmo com grupo 19BBζ 10⁶ da condição expansão apresentando apenas 3 animais. O grupo 19BBζ 10⁵ da condição POC aparentou ser melhor do que o grupo 19BBζ 10⁵ da expansão, porém, conforme dito anteriormente, não ocorreu ajuste de células T CAR+, tendo sido inoculadas 1,4x10⁴ para a condição POC e 8,5x10³ para a condição de expansão com beads. Com um padrão atípico, o grupo mock da condição de expansão morreu antes do grupo tratado com PBS, e isso não aconteceu com o mesmo doador utilizando a abordagem POC e nem em experimentos anteriores. Uma hipótese para este explicar este resultado pode ser que alguma sub-população reguladora tenha expandido na condição com depleção de células NK e estímulo com as beads, favorecendo a expansão da leucemia no animal. Este aspecto, no entanto, não foi abordado por nós neste momento. Apesar das implicações, esse experimento teve importância para validar a condição POC nesse modelo animal em uma abordagem dose-resposta, mostrando que a estratégia POC tem resultados equivalentes aos obtidos com a expansão padrão utilizada na prática clínica. A condição POC é muito menos laboriosa, diminui os gastos com o uso de material, além de ser um tratamento rápido, tornando assim a terapia com células CAR+ eventualmente mais acessível.

Para o aprofundamento da comprovação da técnica, utilizamos outro modelo de LLA-B, a linhagem Nalm-6, que é amplamente utilizado em ensaios pré-clínicos com a imunoterapia de células T CAR+ (RODGERS *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2016). A linhagem celular Nalm-6 se demonstra mais agressiva quando comparada com a linhagem celular RS4;11. O inóculo de 10⁵ células da linhagem Nalm-6 é capaz de induzir os camundongos enxertados à morte em torno de 20 dias, já o inóculo de 5x10⁶

da linhagem RS4;11 causa morte dos camundongos após 40 dias no inóculo das células tumorais. Neste experimento preliminar realizado, as células geradas pela abordagem POC não foram eficazes para melhorar a sobrevivência dos animais enxertados com Nalm-6 no *in vivo* 5 (Figura 5.34). Esse experimento foi repetido com um doador diferente e os resultados obtidos foram essencialmente os mesmos (dados não mostrados), indicando que o modelo de imunoterapia em animais NSG inoculados com a linhagem nalm-6 deve sofrer ajustes (como número de células leucêmicas, número de células T CAR+ ou o intervalo entre a inoculação das duas populações) para que possamos observar efeito das células T CAR+ neste contexto.

Eventuais próximos passos do nosso grupo para tentar abranger essa terapia é utilizar a técnica POC com um CAR de quarta geração, ou “TRUNK”. Nós desenhamos um receptor quimérico de antígeno que possui IL-15 de membrana (mIL-15) que auxilia na expansão e não exaustão das células, reduz a expressão de PD-1 e melhora a atividade anti-leucêmica do CAR (CHMIELEWSKI; ABKEN, 2015). Além da mIL-15, esse CAR terá a capacidade de expressar um mini anticorpo anti-PD-L1, para auxiliar na eficácia da resposta antitumoral. Essa abordagem múltipla abrange vários mecanismos que favorecem a expansão do linfócito T e o bloqueio de checkpoint imunológico para burlar a capacidade de evasão tumoral. Dados do nosso grupo mostram que a linhagem RS4;11 expressa o ligante PD-L1, indicando que este mecanismo possa influenciar negativamente a resposta de linfócitos T, um aspecto que será formalmente abordado por nosso grupo no futuro. Devido à diversidade de funções dos TRUNKs, estes também estão sendo estudados para combater tumores sólidos (YONG *et al.*, 2017).

Por fim, esse trabalho tem o intuito de mostrar duas abordagens com menores custos para a imunoterapia com células T CAR+ para LLA-B com ênfase no POC. O método de co-cultura com células “feeding”, ou estimuladoras, permite a ativação, expansão e seleção das células T CAR+ de forma eficiente, além de permanecer com a atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Testamos também a abordagem POC. Essa estratégia evita possíveis contaminações devido à diminuição do número de etapas, reduz o gasto de materiais e não requer salas de biossegurança por não manipular vetores virais. Um dos possíveis fatores que pode estar relacionado com a eficiência dessa técnica pode ser o perfil menos diferenciado das células geradas. Como já se sabe, a cultura de linfócitos tende a favorecer o fenótipo de memória central e memória efetora (GHASSEMI *et al.*, 2018). Esse mesmo direcionamento foi

apresentado por nós no artigo em que está em revisão (Anexo I). Apesar de ainda não demonstrado clinicamente para terapias com células CAR-T, a hipótese de diminuir o tempo de cultura já existe há um tempo, como no ensaio clínico de imunoterapia baseada linfócitos infiltrantes tumorais com pouco tempo de expansão *ex vivo*, descrito por Itzhaki *et al.* (2011), que mostra uma melhora da sobrevida dos pacientes com melanoma metastático tratados com os chamados de “Young-TILs”. Além disso, outro estudo mostra que células T CAR+ cultivadas em apenas 3 dias com IL-2, possui melhor atividade antitumoral do que as células cultivadas por 9 dias, um ganho também atribuído pelos autores à presença de subpopulações de células T menos diferenciadas (ZHANG; LV; SONG, 2018). Apesar da necessidade do desenvolvimento do aperfeiçoamento de novas estratégias para potencializar a resposta antitumoral da metodologia POC, nosso trabalho mostrou a capacidade da abordagem POC de gerar células T CAR+ com ação antitumoral em modelos pré-clínicos de LLA-B.

7. CONCLUSÕES

- O sistema Sleeping Beauty é capaz de modificar geneticamente linfócitos de forma integrativa e eficiente, promovendo a expressão estável do CAR e sua função antitumoral.
- A abordagem de expansão de PBMC em co-cultura com células LCL produz células mock e 19BBζ com atividade antitumoral, com efeito mais pronunciado nas células CAR+ e moderado na população mock. A expansão é capaz de selecionar células T CAR+, com capacidade de eliminar o tumor e evidência de memória, inferida pela resistência ao desafio de re-infusão das células tumorais.
- A técnica POC demonstrou ser eficaz para o aumento de sobrevida em animais NSG enxertados com LLA-B RS4;11.
- Existe um número mínimo de células T CAR+ que garante a máxima eficiência da atividade tumoral. Doses elevadas de células T CAR+ não parecem melhorar a eficácia da resposta nos nossos experimentos preliminares.
- A técnica POC não foi eficaz em combater altas cargas tumorais de RS4;11 ou leucemias derivadas da linhagem Nalm-6 nos desenhos experimentais testados.
- A comparação de células geradas pela abordagem POC com células expandidas com beads antiCD3/CD28 não mostrou diferença nas curvas de sobrevida em animais NSG enxertados com a linhagem RS4;11.
- A abordagem POC para terapias com células T CAR+ se apresentou promissora, indicando que aperfeiçoamentos podem ser realizados para atingir sua eficiência máxima.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, Nabil *et al.* Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 33, n. 15, p.1688-1696, 20 maio 2015. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

ALBERT, Bruce *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 6. ed. New York: Garland Science, 2014. 1464 p.

AN, na *et al.* Construction of a new anti-CD19 chimeric antigen receptor and the anti-leukemia function study of the transduced T cells. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 9, p.10638-10649, 30 jan. 2016. Impact Journals, LLC.

ANDTBACKA, Robert H. I. *et al.* Patterns of Clinical Response with Talimogene Laherparepvec (T-VEC) in Patients with Melanoma Treated in the OPTiM Phase III Clinical Trial. **Annals Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 23, n. 13, p.4169-4177, 24 jun. 2016. Springer Nature.

BACH, Peter B.; GIRALT, Sergio A.; SALTZ, Leonard B.. FDA Approval of Tisagenlecleucel. **Jama**, [s.l.], v. 318, n. 19, p.1861-1892, 21 nov. 2017. American Medical Association (AMA)

BRASH, D. E. *et al.* A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 88, n. 22, p.10124-10128, 15 nov. 1991. Proceedings of the National Academy of Sciences.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.394-424, 12 set. 2018. American Cancer Society.

BRENTJENS, Renier J.; CURRAN, Kevin J.. Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen. **Ash**, [s.l.], v. 2012, n. 1, p.143-151, 08 dez. 2012.

BRENTJENS, R. J. *et al.* Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. **Blood**, [s.l.], v. 118, n. 18, p.4817-4828, 17 ago. 2011. American Society of Hematology.

BURNET, M. "Cancer; a biological approach. I. The processes of control". **British Medical Journal**, [s.l.], vol. 1, n. 5022, p. 779-786, 1957.

BV. GHASSEMI, Saba *et al.* Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 6, n. 9, p.1100-1109, 20 jul. 2018. American Association for Cancer Research (AACR).

CALLE, Eugenia E. *et al.* Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 348, n. 17, p.1625-1638, 24 abr. 2003. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

CAMPACCI, N. *et al.* Knowledge About Hereditary Cancer of Women with Family Histories of Breast, Colorectal, or Both Types of Cancer. **Journal of Cancer Education**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.167-172, 3 maio 2014. Springer Nature.

CARSETTI, Rita; ROSADO, M. Manuela; WARDMANN, Hedda. Peripheral development of B cells in mouse and man. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 197, n. 1, p.179-191, fev. 2004. Wiley.

CHANG, Julie E. *et al.* Augmented and standard Berlin–Frankfurt–Münster chemotherapy for treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, [s.l.], v. 49, n. 12, p.2298-2307, jan. 2008. Informa UK Limited.

CHEN, Zong-you. Clinical application of adoptive T cell therapy in solid tumors. **Medical Science Monitor**, [s.l.], v. 20, p.953-959, 2014. International Scientific Information, Inc..

CHICAYBAM, Leonardo *et al.* An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.1-11, 26 mar. 2013. Public Library of Science (PLoS).

CHICAYBAM, Leonardo; SODRÉ, Andressa Laino; BONAMINO, Martin. Chimeric Antigen Receptors in Cancer Immuno-Gene Therapy: Current Status and Future Directions. **International Reviews Of Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 5-6, p.294-311, 7 nov. 2011. Informa UK Limited.

CHMIELEWSKI, Markus; ABKEN, Hinrich. TRUCKs: the fourth generation of CARs. **Expert Opinion On Biological Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.1145-1154, 18 maio 2015. Informa Healthcare.

CURRAN, Emily K.; GODFREY, James; KLINE, Justin. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. **Trends in Immunology**, [s.l.], v. 38, n. 7, p.513-525, jul. 2017. Elsevier BV.

DENARDO, David G. *et al.* CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.91-102, ago. 2009. Elsevier BV.

DUBOIS, Jeffrey A.; CLARKE, William. Point-of-Care Testing. **Point Of Care: The Journal of Near-Patient Testing & Technology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.118-123, set. 2014. O

DUDLEY, Mark E. *et al.* Adoptive Cell Transfer Therapy Following Non-Myeloablative but Lymphodepleting Chemotherapy for the Treatment of Patients With Refractory Metastatic Melanoma. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.2346-2357, abr. 2005. American Society of Clinical Oncology (ASCO)

DUNN, Gavin P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.991-998, nov. 2002. Springer Nature.

EBELT, Kathleen *et al.* Prostate cancer lesions are surrounded by FOXP3+, PD-1+ and B7-H1+ lymphocyte clusters. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 45, n. 9, p.1664-1672, jun. 2009. Elsevier BV.

ERLANDSSON, Ann *et al.* M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. **The Prostate**, [s.l.], p.1-7, 30 nov. 2018. Wiley.

ESHAR, Z. *et al.* Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 90, n. 2, p.720-724, 15 jan. 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences.

FDA approves axicabtagene ciloleucel for large B-cell lymphoma. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm581296.htm>>. Acesso em: 06 jan. 2019.

FRAIETTA, Joseph A. *et al.* Disruption of TET2 promotes the therapeutic efficacy of CD19-targeted T cells. **Nature**, [s.l.], v. 558, n. 7709, p.307-312, 30 maio 2018. Springer Nature

FRIGAULT, M. J. *et al.* Identification of Chimeric Antigen Receptors That Mediate Constitutive or Inducible Proliferation of T Cells. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.356-367, 19 jan. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

GERSTEN, Omer; WILMOTH, John R.. The Cancer Transition in Japan since 1951. **Demographic Research**, [s.l.], v. 7, p.271-306, 6 ago. 2002. Max Planck Institute for Demographic Research.

GOLUBOVSKAYA, Vita; WU, Lijun. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. **Cancers**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.36-48, 15 mar. 2016. MDPI AG.

GOKBUGET, N. *et al.* Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. **Blood**, [s.l.], v. 120, n. 10, p.2032-2041, 4 abr. 2012. American Society of Hematology.

GREAVES, Mel. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.471-484, 21 maio 2018. Springer Nature.

GREAVES, Mel. Leukaemia 'firsts' in cancer research and treatment. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.163-172, mar. 2016. Springer Nature.

GROSS, G.; WAKS, T.; ESHHAR, Z.. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 24, p.10024-10028, 1 dez. 1989. Proceedings of the National Academy of Sciences.

GRUPP, Stephan A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 368, n. 16, p.1509-1518, 18 abr. 2013. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

GRYWALSKA, Ewelina *et al.* Immune-checkpoint inhibitors for combating T-cell dysfunction in cancer. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 11, p.6505-6524, out. 2018. Dove Medical Press Ltd..

HACKETT, Perry B; A LARGAESPADA, David; COOPER, Laurence Jn. A Transposon and Transposase System for Human Application. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.674-683, abr. 2010. Elsevier BV.

HÉRIN, M. *et al.* Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.390-396, 15 mar. 1987. Wiley.

HOELZER, Dieter *et al.* Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. **The American Society Of Hematology**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.123-131, 1 jan. 1988.

HOMBACH, Andreas A.; RAPPL, Gunter; ABKEN, Hinrich. Arming Cytokine-induced Killer Cells With Chimeric Antigen Receptors: CD28 Outperforms Combined CD28–OX40 “Super-stimulation”. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.2268-2277, dez. 2013. Elsevier BV.

IMAI, C *et al.* Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.676-684, 12 fev. 2004. Springer Nature.

INABA, Hiroto; GREAVES, Mel; MULLIGHAN, Charles G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s.l.], v. 381, n. 9881, p.1943-1955, jun. 2013. Elsevier BV.

ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The Embo Journal**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.3887-3895, nov. 1992. Wiley

ITZHAKI, Orit *et al.* Establishment and Large-scale Expansion of Minimally cultured “Young” Tumor Infiltrating Lymphocytes for Adoptive Transfer Therapy. **Journal Of Immunotherapy**, [s.l.], p.212-220, mar. 2011.

IVICS, Zoltán *et al.* Molecular Reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like Transposon from Fish, and Its Transposition in Human Cells. **Cell**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.501-510, nov. 1997. Elsevier BV.

JACOBY, E. *et al.* Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. **Blood**, [s.l.], v. 127, n. 10, p.1361-1370, 11 dez. 2015. American Society of Hematology.

JOHNSON, L. A. *et al.* Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. **Blood**, [s.l.], v. 114, n. 3, p.535-546, 18 maio 2009. American Society of Hematology.

JULIUSSON, Gunnar; HOUGH, Rachael. **Leukemia. Progress In Tumor Research**, [s.l.], p.87-100, 2016. S. Karger AG.

KALOS, M. *et al.* T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. **Science Translational Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 95, p.1-21, 10 ago. 2011. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

KATZ, S. C. *et al.* Phase I Hepatic Immunotherapy for Metastases Study of Intra-Arterial Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cell Therapy for CEA+ Liver Metastases. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 21, n. 14, p.3149-3159, 7 abr. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

KEBRIAIEI, Partow *et al.* Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 126, n. 9, p.3363-3376, 2 ago. 2016. American Society for Clinical Investigation.

KLEBANOFF, Christopher A.; GATTINONI, Luca; RESTIFO, Nicholas P.. Sorting Through Subsets. **Journal Of Immunotherapy**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.651-660, 2012.

KOCHENDERFER, J. N. *et al.* Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. **Blood**, [s.l.], v. 116, n. 20, p.4099-4102, 28 jul. 2010. American Society of Hematology.

KUMAR, Vinit *et al.* The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.208-220, mar. 2016. Elsevier BV.

LAMERS, Cor H.j. *et al.* Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 24, n. 13, p.20-22, maio 2006. American Society of Clinical Oncology (ASCO).

LEON, Maria E. *et al.* European Code against Cancer, 4th Edition: Tobacco and cancer. **Cancer Epidemiology**, [s.l.], v. 39, p.20-33, dez. 2015. Elsevier BV.

LEVINE, Bruce L. *et al.* Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, [s.l.], v. 4, p.92-101, mar. 2017. Elsevier BV.

LI, Si *et al.* Enhanced Cancer Immunotherapy by Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells Engineered to Secrete Checkpoint Inhibitors. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 23, n. 22, p.6982-6992, 14 set. 2017. American Association for Cancer Research (AACR).

MAJZNER, Robbie G.; MACKALL, Crystal L.. Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. **Cancer Discovery**, [s.l.], v. 8, n. 10, p.1219-1226, 22 ago. 2018. American Association for Cancer Research (AACR).

MAN, Louise M.; MORRIS, Amy L.; KENG, Michael. New Therapeutic Strategies in Acute Lymphocytic Leukemia. **Current Hematologic Malignancy Reports**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.197-206, 28 mar. 2017. Springer Nature.

MARTEL, Catherine de *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.607-615, jun. 2012. Elsevier BV.

MÁTÉS, Lajos *et al.* Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.753-761, 3 maio 2009. Springer Nature.

MAUDE, Shannon L. *et al.* Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 371, n. 16, p.1507-1517, 16 out. 2014. Massachusetts Medical Society.

MAULE, Milena; MERLETTI, Franco. Cancer transition and priorities for cancer control. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 13, n. 8, p.745-746, ago. 2012. Elsevier BV.

MICKLETHWAITE, K. P. *et al.* Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. **Blood**, [s.l.], v. 115, n. 13, p.2695-2703, 28 jan. 2010. American Society of Hematology. h

MILONE, Michael C. *et al.* Chimeric Receptors Containing CD137 Signal Transduction Domains Mediate Enhanced Survival of T Cells and Increased Antileukemic Efficacy In Vivo. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1453-1464, ago. 2009. Elsevier BV.

MIYAHIRA, Andrea. **Types of immune cells present in human PBMC**. 2012. Disponível em: <<https://technical.sanguinebio.com/types-of-immune-cells-present-in-human-pbmc/>>. Acesso em: 01 fev. 2019.

MONJEZI, R *et al.* Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. **Leukemia**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.186-194, 24 jun. 2016. Springer Nature.

MULCAHY, Nick. **What's the Total Cost of One CAR T-Cell Treatment?** 2018. Disponível em: <https://www.medscape.com/viewarticle/895735#vp_2>. Acesso em: 6 jan. 2019.

MUUL, Linda Mesler *et al.* Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 138, n. 3, p.989-995, 1 fev. 1987

MURPHY, K. P. **Janeway's immunobiology**. 8. ed. New York: Garland Science, 2012. 868 p.

NEELAPU, Sattva S. *et al.* Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 377, n. 26, p.2531-2544, 28 dez. 2017.

NERI, S. *et al.* Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.1131-1135, 1 nov. 2001. American Society for Microbiology

Novartis receives European Commission approval of its CAR-T cell therapy, Kymriah® (tisagenlecleucel). Disponível em: <<https://novartis.gcs-web.com/Novartis-receives-European-Commission-approval-of-its-CAR-T-cell-therapy-Kymriah-tisagenlecleucel>>. Acesso em: 03 jan. 2019.

NOWILL, A.. Natural killer clones derived from fetal (25 wk) blood. Probing the human T cell receptor with WT31 monoclonal antibody. **Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 163, n. 6, p.1601-1606, 1 jun. 1986. Rockefeller University Press.

OKŁA, Karolina *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Myeloid-Derived Suppressor Cells as Immunosuppressive Mechanism in Ovarian Cancer Patients: Progress and Challenges. **International Reviews Of Immunology**, [s.l.], v. 35, n. 5, p.372-385, 2 set. 2016. Informa UK Limited

PARK, Julie R *et al.* Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.825-833, abr. 2007. Elsevier BV.

PEGRAM, H. J. *et al.* Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. **Blood**, [s.l.], v. 119, n. 18, p.4133-4141, 21 fev. 2012. American Society of Hematology.

PERICA, Karlo *et al.* Building a CAR Garage: Preparing for the Delivery of Commercial CAR T Cell Products at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. **Biology Of Blood And Marrow Transplantation**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.1135-1141, jun. 2018. Elsevier

REYES-ALDASORO, Constantino Carlos. The proportion of cancer-related entries in PubMed has increased considerably; is cancer truly “The Emperor of All Maladies”? **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.1-15, 10 mar. 2017. Public Library of Science (PLoS).

RIBATTI, Domenico. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.7175-7180, 18 out. 2016. Impact Journals, LLC.

ROBBINS, P. F. *et al.* A Pilot Trial Using Lymphocytes Genetically Engineered with an NY-ESO-1-Reactive T-cell Receptor: Long-term Follow-up and Correlates with Response. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 21, n. 5, p.1019-1027, 23 dez. 2014. American Association for Cancer Research (AACR).

RODGERS, David T. *et al.* Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 4, p.459-468, 12 jan. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences.

ROHAAN, Maartje W.; WILGENHOF, Sofie; HAANEN, John B. A. G.. Adoptive cellular therapies: the current landscape. **Virchows Archiv**, [s.l.], p.1-13, 23 nov. 2018. Springer Nature America, Inc.

ROSENBERG, S. A.; DUDLEY, Mark e. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.233-240, abr. 2009. Elsevier BV.

ROSENBERG, S. A. *et al.* Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 17, n. 13, p.4550-4557, 15 abr. 2011. American Association for Cancer Research (AACR)

ROSENBERG, S. A. *et al.* Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal Of**

Medicine, [s.l.], v. 319, n. 25, p.1676-1680, 22 dez. 1988. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS).

SALLUSTO, Federica *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, [s.l.], v. 401, n. 6754, p.708-712, 14 out. 1999. Springer Nature.

SEIBEL, N. L.. Acute Lymphoblastic Leukemia: An Historical Perspective. *Hematology*, [s.l.], v. 2008, n. 1, p.365-365, 1 jan. 2008. American Society of Hematology.

SERGANOVA, Inna *et al.* Enhancement of PSMA-Directed CAR Adoptive Immunotherapy by PD-1/PD-L1 Blockade. **Molecular Therapy - Oncolytics**, [s.l.], v. 4, p.41-54, mar. 2017. Elsevier BV.

SINGH, Harjeet *et al.* Manufacture of Clinical-Grade CD19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-11, 31 maio 2013. Public Library of Science (PLoS).

SHANKARAN, Vijay *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, [s.l.], v. 410, n. 6832, p.1107-1111, 26 abr. 2001. Springer Nature

SOTILLO, E. *et al.* Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discovery*, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1282-1295, 29 out. 2015. American Association for Cancer Research (AACR).

STAMBROOK, Peter J.; MAHER, John; FARZANEH, Farzin. Cancer Immunotherapy: Whence and Whither. **Molecular Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.635-650, 29 mar. 2017. American Association for Cancer Research (AACR).

TORIKAI, Hiroki; MOYES, Judy S; COOPER, Laurence Jn. Non-viral gene transfer with Sleeping Beauty system to engineer T cells for hematologic malignancies and solid tumors. **Cell And Gene Therapy Insights**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.301-311, 6 jun. 2017. BioInsights Publishing, Ltd..

THOMAS, Lewis. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States: A Symposium at the New York Academy of Medicine. **Journal Of The American**

Medical Association, [s.l.], v. 170, n. 7, p.883-883, 13 jun. 1959. American Medical Association (AMA).

THORSSON, Vésteinn *et al.* The Immune Landscape of Cancer. **Immunity**, [s.l.], v. 48, n. 4, p.812-830, abr. 2018. Elsevier BV.

VAIRY, Stephanie *et al.* CTL019 (tisagenlecleucel): CAR-T therapy for relapsed and refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Drug Design, Development And Therapy**, [s.l.], v. 12, p.3885-3898, nov. 2018. Dove Medical Press Ltd..

VAN SCHANDEVYL, Steven; KERRE, Tessa. Chimeric antigen receptor T-cell therapy: design improvements and therapeutic strategies in cancer treatment. **Acta Clinica Belgica**, [s.l.], p.1-7, 13 nov. 2018. Informa UK Limited.

VIAUD, Sophie *et al.* Switchable control over in vivo CAR T expansion, B cell depletion, and induction of memory. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 115, n. 46, p.10898-10906, 29 out. 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences.

VONDERHEIDE, Robert H.; JUNE, Carl H.. Engineering T cells for cancer: our synthetic future. *Immunological Reviews*, [s.l.], v. 257, n. 1, p.7-13, 13 dez. 2013. Wiley.

WEINBERG, Robert A.. **The Biology of Cancer**. 2. ed. New York: Garland Science, 2014. 876 p.

WENZINGER, Christopher; WILLIAMS, Eli; GRU, Alejandro A.. Updates in the Pathology of Precursor Lymphoid Neoplasms in the Revised Fourth Edition of the WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Current Hematologic Malignancy Reports**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.275-288, 27 jun. 2018. Springer Nature America, Inc.

WING, Anna *et al.* Improving CART-Cell Therapy of Solid Tumors with Oncolytic Virus-Driven Production of a Bispecific T-cell Engager. **Cancer Immunology Research**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.605-616, 27 mar. 2018. American Association for Cancer Research (AACR).

XIA, An-liang *et al.* Chimeric-antigen receptor T (CAR-T) cell therapy for solid tumors: challenges and opportunities. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 52, p.90521-90531, 18 jul. 2017. Impact Journals, LLC.

YANG, Yiping. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 125, n. 9, p.3335-3337, 1 set. 2015. American Society for Clinical Investigation.

YONG, Carmen S M *et al.* CAR T-cell therapy of solid tumors. **Immunology And Cell Biology**, [s.l.], v. 95, n. 4, p.356-363, 17 jan. 2017. Wiley.

ZHANG, Xuhua; LV, Xiaodong; SONG, Yongping. Short-term culture with IL-2 is beneficial for potent memory chimeric antigen receptor T cell production. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 495, n. 2, p.1833-1838, jan. 2018. Elsevier BV

ZHAO, Xixi *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 18, p.30576-30586, 26 fev. 2017. Impact Journals, LLC.

ZHOU, J. *et al.* Selective Growth, In Vitro and In Vivo, of Individual T Cell Clones from Tumor-Infiltrating Lymphocytes Obtained from Patients with Melanoma. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 173, n. 12, p.7622-7629, 7 dez. 2004. The American Association of Immunologists.

9. ANEXOS

I. Artigo aceito na Human Gene Therapy

CAR T cells generated using *Sleeping Beauty* transposon vectors and expanded with an EBV-transformed lymphoblastoid cell line (LCL) display antitumor activity *in vitro* and *in vivo*.

Leonardo Chicaybam*^{1,2}, Mayra Carneiro*¹, Luiza Abdo*¹, Bárbara Peixoto³, Mariana Viegas¹, Priscila de Sousa¹, Márcia C. Fornazin⁴, Maria C. Spago⁴, Angelo Brunelli Albertoni Laranjeira⁴, Pedro O. de Campos-Lima⁵, Alexandre Nowill⁴, Luciana Rodrigues Carvalho Barros¹, Martín H. Bonamino^{1,2#}

1- Programa de Carcinogênese Molecular – Coordenação de Pesquisa – INCA

2- Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas (VPPCB), Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ),

3- Programa de Biologia Celular – Coordenação de Pesquisa – INCA

4- Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância (CIPOI), UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

5- Institute of Molecular and Cell Engineering, Boldrini Children's Center, Campinas, Sao Paulo, Brazil; Functional and Molecular Biology Program, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, Sao Paulo, Brazil

* Contributed equally to this work

Corresponding author:

Martín Hernán Bonamino, Programa de Carcinogênese Molecular, Coordenação de Pesquisa (CPQ), Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Rua André Cavalcanti, 37/6 andar. 20231-050. Rio de Janeiro - RJ. Brazil. email: mbonamino@inca.gov.br

Running title: LCL expanded Sleeping beauty based CD19 CAR T cell

Financial Support: Ministério da Saúde, INCA, CNPq, CAPES, INCT Synthetic Biology, Fundação do Câncer, Programa de Oncobiologia - UFRJ, FAPESP 2014/04412-4

Abstract:

CAR T cell immunotherapy for the treatment of cancer is now an approved treatment for B-cell malignancies. However, the use of viral vectors to provide long-term CAR expression is associated with high production costs and cumbersome quality controls, impacting the final cost of CAR-T cell therapies. Non-viral integrative vectors, such as Sleeping Beauty (SB) transposons, provide an alternative to modify primary T cells. Therefore, we developed a protocol to expand SB-transfected 19BB ζ CAR T cells using a lymphoblastoid cell line (LCL), and evaluated T cell phenotype as well as function along the T cell expansion. Electroporation of PBMCs with transposon plasmid decreased cell viability on day 1 but had a minor impact on the frequency of memory subpopulations when compared to mock condition. CAR+ lymphocytes showed increased proliferation compared to mock control and high cytotoxic activity towards CD19+ cells without significant differences in exhaustion markers expression. Moreover, CAR+ lymphocytes showed an increased frequency by the end of the stimulation cycle compared to day 1, suggesting that CAR expression confers a selective proliferation advantage. Immunodeficient NSG mice engrafted with the human pre-B leukemic cell line RS4;11 and treated with 19BB ζ CAR T cells showed improved overall survival when compared to mock T cells treated animals. The results showed that electroporation using the SB system is a simple and affordable method for inducing long-term CAR expression in T lymphocytes. Expansion of gene-modified T cells with the LCL provided up to 2 cycles of stimulations, generating effective T cells against leukemia *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: CAR, T lymphocyte, CD19, Sleeping Beauty Transposon, EBV, LCL

II. Revisão publicada na CLINICS



REVIEW ARTICLE

Immunological-based approaches for cancer therapy

Luciana Barros,¹ Marco Antonio Pretti,¹ Leonardo Chicaybam,^{II} Luiza Abdo,¹ Mariana Boroni,^{III} Martin Hernán Bonamino^{III,*}

¹Programa de Carcinogênese Molecular, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, BR. ^{II}Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, BR. ^{III}Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional, Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, BR.

Barros L, Pretti MA, Chicaybam L, Abdo L, Boroni M, Bonamino MH. Immunological-based approaches for cancer therapy. Clinics. 2018;73(suppl 1):e429s

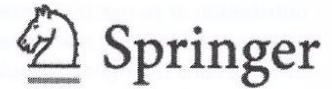
*Corresponding author. E-mail: mbonamino@inca.gov.br / martinbonamino@yahoo.com.br

The immunologic landscape of tumors has been continuously unveiled, providing a new look at the interactions between cancer cells and the immune system. Emerging tumor cells are constantly eliminated by the immune system, but some cells establish a long-term equilibrium phase leading to tumor immunoediting and, eventually, evasion. During this process, tumor cells tend to acquire more mutations. Bearing a high mutation burden leads to a greater number of neoantigens with the potential to initiate an immune response. Although many tumors evoke an immune response, tumor clearance by the immune system does not occur due to a suppressive tumor microenvironment. The mechanisms by which tumors achieve the ability to evade immunologic control vary. Understanding these differences is crucial for the improvement and application of new immune-based therapies. Much effort has been placed in developing *in silico* algorithms to predict tumor immunogenicity and to characterize the microenvironment via high-throughput sequencing and gene expression techniques. Each sequencing source, transcriptomics, and genomics yields a distinct level of data, helping to elucidate the tumor-based immune responses and guiding the fine-tuning of current and upcoming immune-based therapies. In this review, we explore some of the immunological concepts behind the new immunotherapies and the bioinformatic tools to study the immunological aspects of tumors, focusing on neoantigen determination and microenvironment deconvolution. We further discuss the immune-based therapies already in clinical use, those underway for future clinical application, the next steps in immunotherapy, and how the characterization of the tumor immune contexture can impact therapies aiming to promote or unleash immune-based tumor elimination.

KEYWORDS: Cancer Immunology; Immunotherapy; Gene Therapy.

III. Capítulo de livro em revisão

Consent to Publish



Series Title:
MiMB

Title of Book/Volume/Conference: Chimeric Antigen Receptor T Cells: Development and Production

Editor(s) name(s): Kamilla Swiech, PhD, Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias, PhD, and Virginia Picanco-Castro, PhD

Title of Contribution: Generation of CAR+ T lymphocytes using the Sleeping Beauty transposon system

Author(s) full name(s): Leonardo Chicaybam, Luiza Abdo, Martín H. Bonamino

Corresponding Author's name, address, affiliation and e-mail: mbonamino@inca.gov.br

When Author is more than one person the expression "Author" as used in this agreement will apply collectively unless otherwise indicated.

IV. Cartas de aprovação comitê de ética



Memo 31/11-CEP-INCA



Rio de Janeiro, 14 de fevereiro de 2011.

A(o): Dr. Martin Bonamino
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 153/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Construção de receptores quiméricos (CARs) em células memória T CD8 citotóxicas capazes de reconhecer e eliminar especificamente blastos leucêmicos (LLA)

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise o estudo intitulado: **Construção de receptores quiméricos (CARs) em células memória T CD8 citotóxicas capazes de reconhecer e eliminar especificamente blastos leucêmicos (LLA)**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2, em 7 de fevereiro de 2011.

Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo, os primeiros estão previstos para as seguintes datas: *agosto/2011 e fevereiro/2012*.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dra. Marisa Breitenbach – Coordenadora de Pesquisa




PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 013/13

Parecer nº 034/13

Pesquisador: Martin Hernan Bonamino	
Título do projeto: Modulação de Linfócitos e sua Utilização em Imunoterapia	
Data de entrada: 28/03/2013	Data da reunião: 26/06/2013
Finalidade do projeto: Pesquisa	
Situação do Projeto: APROVADO	Validade: 01/12/2019
Número de animais aprovado para todo o projeto: 700	Linhagem: C57BL/6J - 350 NOD/scid - 350
Idade / Peso: 8-12 semanas	Sexo: macho ou fêmea
Considerações e Parecer:	
<p>Ao analisar a reapresentação do projeto de pesquisa "Modulação de Linfócitos e sua Utilização em Imunoterapia", tendo como pesquisador responsável Martin Hernán Bonamino, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO.</p>	
Obs.: RENOVAÇÃO DE PARECER	

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2019.



 Renata Batista da Silva
 Coordenadora da CEUA-INCA