

# CONSENSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR SOBRE CÉLULAS GENETICAMENTE MODIFICADAS



## Consenso da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular sobre Células Geneticamente Modificadas.

### VII: O presente e o futuro de tecnologias para a produção de terapias com células CAR

Rodrigo Nalio Ramos <sup>a,b</sup>, Virginia Picanço-Castro <sup>c</sup>, Theo Gremen M. Oliveira <sup>a,d</sup>, Alfredo Mendrone Jr <sup>d</sup>,  
Gil Cunha De Santis <sup>c</sup>, Martin Hernan Bonamino <sup>e,f</sup>, Vanderson Rocha <sup>a,b,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Investigação Médica 31 (LIM31) em Patogênese e Terapia dirigida em Onco-Imuno-Hematologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>b</sup>Instituto D'Or de Ensino e Pesquisa, São Paulo, Brasil

<sup>c</sup>Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, (HC FMRPUSP) Ribeirão Preto, SP, Brasil

<sup>d</sup>Fundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>e</sup>Divisão de Pesquisa Experimental e Translacional, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>f</sup>Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas da Fundação Oswaldo Cruz (VPPCB FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

#### PALAVRAS-CHAVES

Novas tecnologias  
Terapias com células CAR-T  
Produção e Entrega de gene  
Imunoterapia  
Terapia Celular  
Terapia Celular Avançada  
Terapia Celular Adotiva

#### RESUMO

As células CAR-T constituem uma terapia importante para pacientes com malignidades hematológicas recidivadas e/ou refratárias. Atualmente, há cinco produtos de células CAR-T aprovados pelo FDA, mas vários grupos de pesquisa e/ou empresas biofarmacêuticas são incentivados a desenvolver novos produtos à base de células CAR, usando células T ou de outros tipos. A produção de células CAR exige um trabalho intensivo, desde os níveis básicos, pré-clínicos até os translacionais, visando superar as dificuldades técnicas e falhas na produção. No mínimo, cinco etapas comuns são necessárias para a manipulação de linfócitos T (ou outras células), são elas: seleção do tipo celular, ativação, entrega do gene, expansão celular e formulação do produto final. No entanto, a manufatura reprodutível de produtos de células CAR de grau clínico de alta qualidade ainda é necessária para aplicar essa tecnologia a um maior número de pacientes. Este capítulo discute o desenvolvimento presente e futuro de novas estratégias usando as células CAR que sejam mais seguras e eficientes, alcançando uma destruição mais seletiva das células malignas com menor toxicidade no cenário clínico.

Correspondência: Serviço de Hematologia e Terapia Celular do HCFMUSP. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1o. andar,  
CEP 05403-000, São Paulo, SP, Brasil  
E-mail: vanderson.rocha@hc.fm.usp.br

## INTRODUÇÃO

Atualmente, há cinco produtos de células CAR-T (do inglês, chimeric antigen receptor) aprovados pelo FDA e produzidos por grandes empresas farmacêuticas com o uso de sistemas automatizados ou semi-automatizados, que permitem a manufatura de células CAR-T em larga escala. Contudo, outros protocolos distintos, que usam tecnologias semelhantes ou diferentes para a geração de células CAR-T autólogas ou alogênicas ou células CAR-NK, estão atualmente em desenvolvimento. A manufatura dessas células exige um trabalho intensivo desde os níveis básicos, pré-clínicos até os translacionais, visando superar as dificuldades técnicas e as falhas na produção (1). As características do produto final, incluindo o número de células modificadas obtidas, e seu grau de ativação e funcionalidade também podem variar de acordo com os diferentes esquemas de produção e das características intrínsecas dos pacientes.

No geral, a produção de células CAR-T autólogas exige, pelo menos, cinco etapas comuns para a manipulação de linfócitos T, são elas: seleção do tipo celular, ativação, entrega do gene, expansão celular e formulação do produto final (Figura 1; Tabela 1).



Figura 1. Esquema geral para a produção de células CAR-T descrevendo cada etapa definida.

Posterior à manufatura, exige-se um teste de controle de qualidade, antes da infusão das células CAR-T nos pacientes.

Neste capítulo, resumimos as principais etapas para a produção de células CAR (T ou outras), incluindo algumas novas tecnologias que estão em desenvolvimento ou em estudos clínicos de fase I/II.

### Principais Etapas para Manufatura das CAR

#### 1) Seleção do tipo celular

A primeira etapa na produção das células CAR-T é a obtenção de linfócitos T do doador/paciente a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês peripheral blood mononuclear cells) ou um produto de leucaférese. Em seguida, os

pesquisadores podem isolar as células T CD3 positivas ou outro tipo específico dessas células. A abordagem mais comum para enriquecer as células T alvo é por separação imunomagnética (IMS), com o uso de microesferas magnéticas conjugadas a anticorpos específicos para marcadores de células alvo (positivas) ou não alvo (negativas) a fim de separar uma população específica (2). Geralmente, as células T são positivamente selecionadas com o marcador CD3+, mas a seleção com CD4+ e CD8+ também pode ser aplicada ao isolamento específico de fenótipos auxiliares ou citotóxicos, especialmente, quando proporções específicas de CD4:CD8 são pretendidas (3).

Outros subconjuntos de células T são de especial interesse devido a algumas particularidades que podem melhorar a função das células CAR-T. As células T gama-delta ( $\gamma\delta$ ) estão sendo exploradas como um grupo específico que exibe uma reatividade antitumoral natural e não precisa de apresentação de antígeno via MHC para reconhecimento e ativação, aumentando o escopo de aplicação das células CAR-T no cenário alogênico (4). Além disso, a expansão dessas células em cultura se mostrou viável com a aplicação de IL-2 e bisfosfonatos (4, 5).

As células T citotóxicas (CTLs, do inglês cytotoxic T lymphocytes) antigênicas específicas, como as CTLs do Vírus Epstein-Barr (EBV), cuja eficácia no contexto imunoterápico foi amplamente demonstrada, também estão sendo exploradas como uma fonte para produção de células CAR-T. O cocultivo de PBMCs com linhagens celulares linfoblásticas de células B EBV+ irradiadas (LCLs) potencializa as CTLs-EBV em cultura, permitindo sua expansão e futura aplicação nas malignidades das células B e infecções relacionadas ao EBV (6) (Tabela 1).

Como alternativa, outros tipos celulares estão hoje sob avaliação em estudos pré-clínicos ou de fase 1-2, tais como macrófagos e células NK. Klichinsky et al. relataram a inserção de CARs anti-HER2 tanto em linhagens celulares THP-1 quanto em macrófagos primários humanos (CAR-M) (7). As CAR-M anti-HER2 foram eficientes na fagocitose de células tumorais de ovário e eliminação in vitro em modelos xenogênicos pré-clínicos de células tumorais SKOV3. Além disso, Liu e colaboradores publicaram recentemente o primeiro estudo de fase 1-2 que usou células CAR-NK derivadas de células do cordão umbilical (8). Onze pacientes com leucemia linfocítica crônica recidivada ou linfoma não-Hodgkin foram tratados com células CAR-NK anti-CD19-IL-15 e os dados não indicaram efeitos adversos ou toxicidade em nenhum dos indivíduos. Ademais, aproximadamente 70% dos pacientes responderam ao tratamento e as células CAR-NK foram encontradas na circulação dos pacientes por cerca de 12 meses.

#### 2) Ativação

Os vetores retrovirais derivados do vírus da leucemia de Moloney (NLV) exigem que as células alvo estejam ativamente em ciclo celular para permitir a transferência gênica enquanto os vetores lentivirais derivados do HIV se beneficiam da proliferação das células T para atingir uma alta eficiência de transdução nessas células (9). A ativação completa das células T exige o envolvimento do sinal 1 (CD3) e 2 (CD28) (10), que se pode alcançar com o uso dos anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28 para ativação das células T in vitro. Uma contribuição crucial veio posteriormente quando foram desenvolvidas esferas (beads) carregadas com anticorpos anti-CD3/CD28 (11), constituindo a base para a maioria dos protocolos de transdução de células T

in vitro (12), com a suplementação de citocinas (geralmente IL-2) amplamente aplicadas nesses protocolos (Tabela 1).

O estímulo e cultura de células T por um longo período pode levar à diferenciação terminal. Para superar essa limitação e otimizar o fenótipo das células T terapêuticas, alguns grupos começaram a reduzir o tempo de cultura (13, 14) ou a acrescentar citocinas que possam ajudar a manter um fenótipo progenitor e de memória. Tais citocinas incluem, mas não se restringem a, IL-7, IL-15 (15) e IL-21 (16). Esses protocolos baseados em um fenótipo progenitor podem potencialmente resultar em protocolos de expansão mais curtos e a infusão de um número menor de células para alcançar o mesmo efeito biológico, uma vez que essas células se expandem e se diferenciam in vivo, mantendo a resposta antitumoral (15).

A sinalização via citocinas pode ser feita por moléculas solúveis adicionadas à cultura ou por linhagens celulares desenvolvidas por engenharia que exibem muitos desses sinais na membrana, como IL-15, várias moléculas coestimuladoras como CD80 e até mesmo moléculas CAR alvo, como CD19 (17). Essas células apresentadoras de antígenos artificiais (aAPC, do inglês artificial antigen presenting cells) estimuladoras podem representar uma ferramenta valiosa para geração de células CAR-T. Uma variação dessa estratégia consiste em usar as LCLs como células estimuladoras com a possibilidade de gerar células CAR-T que direcionem o antígeno tumoral e os antígenos virais. Alguns exemplos desses protocolos já foram descritos no cenário pré-clínico ou clínico (19).

Além das citocinas, vários grupos de pesquisa estão caracterizando moléculas diferentes que possam ser usadas para manter fenótipos melhores de células CAR-T para atuarem como fortes agentes antitumorais uma vez infundidas nos pacientes. Tais moléculas incluem alguns inibidores de AKT (20) ou PI3K (21), entre outros candidatos.

### 3) Entrega ou transferência gênica

O sucesso da terapia com células CAR-T depende da seleção de um vetor adequado que transportará o construto CAR até as células (Tabela 1). As duas opções mais comumente usadas são à base de vetores virais (retrovírus ou lentivírus) ou vetores não virais, que são predominantemente vetores de transposons (Figura 2A). Atualmente, há cinco produtos de CAR-T lançados no mercado e todos usam vetores virais para introduzir o CAR nas células T (Figure 2B).

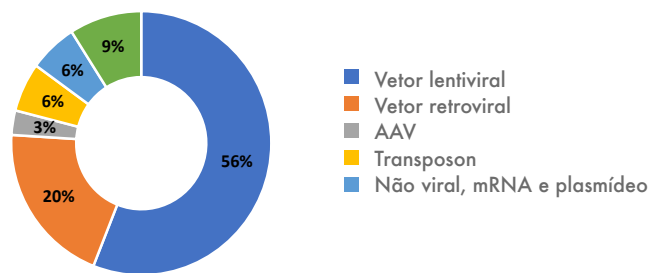


Figura 2. A) Sistemas de vetores usados nas terapias com células CAR-T. B) Produtos de CAR-T atualmente no Mercado. Dados disponíveis no banco de dados Integrity (Clarivate Analytics).

### Entrega viral do CAR

Dois dos produtos de CAR-T disponíveis hoje no mercado são baseados em vetores retrovirais (Yescarta e Tecartus). O vetor baseado no vírus da leucemia murina (MLV) mais usado é vetor do gamma-retrovírus (22) e foi aplicado com êxito em outras terapias, como a imunoterapia com células T para imunodeficiência combinada grave (SCID) X1 (23). Embora a imunodeficiência tenha sido tratada com sucesso, em alguns pacientes, houve o surgimento de leucemia causada pelo local de integração do vetor retroviral (23, 24). Os vetores gamma-retrovirais tendem a se integrar próximos às regiões promotoras, o que pode ser a causa de suas propriedades oncogênicas. Por outro lado, os vetores lentivirais, derivados da família dos retrovírus, Lentiviridae, mostraram ser mais seguros e com melhores propriedades de integração que suas contrapartidas gamma-retrovirais (25, 26). Os vetores lentivirais são capazes de inserir material genético em células que não estão em divisão (27), enquanto os vetores gamma-retrovirais transduzem apenas células em divisão (28). As vantagens do sistema lentiviral estão refletidas no grande número de produtos de CAR-T em desenvolvimento com o uso desse sistema e três produtos de CAR-T disponíveis no mercado usam vetores lentivirais (Kymriah, Breyanzi e Abecma) (Tabela 1). Desde o início da terapia com células CAR-T, os vetores virais demonstraram alta eficiência de transdução. No entanto, esse tipo de vetor i) apresenta risco de mutagenese insercional (29), ii) pode ser imunogênico e iii) sua produção é extremamente onerosa (30).

### Entrega não viral de CAR

Uma alternativa para os vetores virais é o sistema de transpo-



Empresa	Novartis	Kite/Gilead	Bristol-Myers Squibb	Celgene	Kite/Gilead
<b>Leitor de edição de Genes</b>	Lentivirus	Retrovírus	Lentivirus	Lentivirus	Retrovírus
<b>Alvo</b>	CD19	CD19	CD19	BCMA	CD19

Figura 2. B)

<b>Tabela 1- Vantagens e Desvantagens das tecnologias para a produção de células CAR</b>		
<b>Etapas</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>1) Seleção do tipo celular</b>		
<i>Seleção positiva ou negativa de CD3+ e/ou CD4+ ou CD8+</i>	Fácil separação por esferas imunomagnéticas; Na seleção positiva, as células isoladas são altamente purificadas quando comparadas à seleção negativa	Custos Métodos de seleção negativa são inerentemente menos puros que os métodos de seleção positiva
<i>Células T γδ</i>	Possibilidade de uso no contexto alogênico	Números pequenos de células; expansão laboriosa e cara
<i>LTCs-EBV</i>	Uso em malignidades de células B e infecções relacionadas ao EBV	Números pequenos de células
<i>Células NK</i>	Aplicável nos cenários alogênicos, efeitos de baixa toxicidade, várias fontes	Números pequenos de células; expansão laboriosa e dificuldade de modificação genética
<i>Monócitos/Macrófagos</i>	Aplicável nos cenários alogênicos, baixa toxicidade em modelos animais, potencial aplicação em tumores sólidos	Procedimentos laboriosos de transfecção e expansão Não existem ensaios clínicos disponíveis
<b>2) Ativação</b>		
<i>Esferas/anticorpos anti-CD3/CD28</i>	Ativação eficiente, fácil manipulação	Longas culturas podem induzir células T terminalmente diferenciadas/exaustas
<i>Citocinas</i>	IL-2: eficiente para expansão de células T IL-7, IL-15, IL-21: indução de fenótipo de memória e/ou de tipo progenitor	IL-2: altas doses e culturas em longo prazo podem induzir a exaustão das células T ou expansão de células T CD4+ reguladoras
<i>Linhagens celulares estimuladoras</i>	Ativação eficiente, fácil manipulação	Risco de células residuais estimuladoras no produto final, dificuldade de escalonamento e restrições de licenciamento
<b>3) Entrega do gene</b>		
<b><i>Entrega viral de CAR</i></b>	Melhores técnicas estabelecidas para a entrega de transgene	Risco de ativação de oncogene, alto custo de produção para uso clínico (BPM) e um conjunto extenso de regulações rigorosas deve ser seguido
<i>Gammaretrovírus</i>	Usado no Yescarta e Tecartus	Propriedades oncogênicas Custos Inserção apenas em células em divisão celular Pode ser imunogênico
<i>Lentivírus</i>	Usado no Kymriah, Breyanzi, Abecma e em muitos outros estudos. Mais seguro e com melhores propriedades de integração. Inserção do material genético em células que não estejam em divisão celular	Custos Risco de mutagênese insercional Pode ser imunogênico
<b><i>Entrega não viral de CAR</i></b>	Mais fácil de produzir em larga escala, caracterização química, maior reprodutibilidade, maior capacidade transgênica, menos preocupações quanto à biossegurança	A padronização das técnicas é mais difícil comparada ao uso de vetores virais Altas taxas de morte celular com nucleoporação, toxicidade induzida por lipofetamina
<i>Sleeping Beauty (SB)</i>	Bons resultados nas células T, atividade antitumoral <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , SB100X foi iniciado para tratar pacientes com mieloma múltiplo	Baixa taxa de integração em larga escala
<i>Piggy bac</i>	Propriedades mais semelhantes aos vetores virais, também com CAR anti-CD73, MSLN, EGFRvIII e PSMA para tratar tumores sólidos	Dois casos de linfoma maligno derivado de células T CAR com modificação gênica preparadas com o vetor PB
<i>mRNA transcrito in vitro (IVT)</i>	Baixo risco de mutagênese insercional	Expressão temporária de CAR
<i>Nanoplasmídeos</i>	Baixo risco de mutagênese insercional, expressão transgênica em longo prazo viável para a produção em larga escala	Difícil de produzir
<b>4) Expansão</b>		
<i>Frascos T</i>	Consumíveis de valor mais acessível	Demanda tempo, manipulação por operadores treinados, risco de contaminação, sem agitação
<i>Bolsa de cultura</i>	Baixo risco de contaminação	Manipulação por operadores treinados, sem agitação
<i>G-Rex</i>	Demanda menos tempo dos operadores, volume final superior	Manipulação por operadores treinados, sem agitação
<i>Biorreator com movimento</i>	Sistema fechado, baixa probabilidade de contaminação, células mantidas em agitação constante, volume final de até 25 litros	Não indicado para células sensíveis à força de cisalhamento

son. Um transposon é uma sequência de DNA com a habilidade de mudar de posição dentro de um genoma via excisão e inserção da transposase (3). Diversos sistemas à base de transposon foram relatados para a produção de células CAR-T. O sistema de transposon sleeping beauty (SB) mostrou bons resultados em células T modificadas com CAR anti-CD19, apresentando atividade antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo* (18). O principal obstáculo para o uso do transposon SB em larga escala é sua lenta taxa de integração. Novos sistemas, como o SB1 e SB100X, possuem taxas muito maiores de transposição que o transposon SB nativo (31, 32). O SB foi o primeiro vetor não viral a ser usado em estudos clínicos para geração de células CAR-T CD19 específicas para o tratamento de LNH (linfoma não Hodgkin) e LLA (leucemia linfocítica aguda) (NCT00968760, NCT01497184) e, recentemente, iniciou-se um novo estudo clínico com células CAR-T SLAMF7, preparadas com SB100X, para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (33). Embora o perfil de integração do SB possa ser considerado biologicamente seguro, outros transposons, como o PiggyBac (PB), demonstraram propriedades mais semelhantes aos vetores virais (31). O PB foi utilizado com sucesso na geração de células CAR-T contra CD19 para o tratamento de malignidades hematológicas (34) e também com CAR anti-CD73 (35), MSLN (36), EGFRvIII (37) e PSMA (38) para o tratamento de tumores sólidos (Tabela 1).

É importante citar que dois casos de linfomas malignos derivados de células CAR-T que sofreram modificação gênica foram descritos em pacientes que receberam células CAR-T anti-CD19 preparadas com o vetor PB (39), o que enfatiza a necessidade do monitoramento constante dos novos métodos de transferência gênica usados na imunoterapia clínica.

O risco de mutagênese insercional tem guiado o desenvolvimento de outras metodologias inovadoras de entrega de gene, como o nanocarreador, que entrega o CAR transcrito *in vitro* (IVT), e os nanoplasmiídeos. O mRNA transcrito *in vitro* (IVT) surgiu como uma nova classe de drogas inovadoras que podem ser usadas para entregar o CAR nas células T. Vários estudos clínicos em andamento estão testando a eficiência e segurança das células CAR-T desenvolvidas por engenharia com mRNA para tratar pacientes com câncer (NCT01355965, NCT01897415, NCT02277522 e NCT02624258) e os dados sugerem que uma expressão temporária de CAR, após a infusão das células, já seria suficiente para desencadear respostas antitumorais (40).

Os nanoplasmiídeos estão surgindo como uma alternativa mais segura de integração de vetores. Os vetores plasmidiais à base de S/MAR (do inglês scaffold e matrix attachment region) possibilitam a retenção do plasmídeo no núcleo da célula hospedeira por meio de interações com as proteínas nucleares da matriz, garantindo a segregação adequada do plasmídeo durante a mitose (41). Bozza et al. (2021) demonstraram que esse tipo de vetor pode ser usado de forma eficiente para manipular linfócitos T humanos e sustentar a expressão transgênica em longo prazo, ademais, ele pode ser escalonado e é viável para uso clínico (42). Inovações para otimizar os vetores que possam ser usados na terapia com células CAR certamente continuarão a surgir.

#### 4) Expansão

Os protocolos convencionais para ativação/expansão de células

T *ex-vivo* incluem uma combinação das três etapas para melhor qualidade do produto final: estratégia de ativação, método de entrega de gene e expansão. Os perfis fenotípicos e funcionais das células CAR-T podem variar de acordo com o esquema usado para expansão e ainda com as características intrínsecas dos pacientes. Alguns estudos sugeriram vantagens no desenvolvimento de células CAR-T que apresentam fenótipos como memória da célula-tronco (43) e memória central (44), desta forma, os processos de expansão de células CAR-T são críticos para a qualidade do produto final. Na verdade, a escolha do esquema de cultura para expansão representa um dos principais fatores para a expansão de células T. Como revisado por Vormittag e colegas (3), os sistemas de cultura mais usados, relatados nos estudos clínicos, podem ser categorizados em três tipos principais: 1) Placas ou frascos T, presentes em 22% dos estudos; 2) Bolsas de cultura estática, encontradas em 35% dos relatos; e 3) Biorreator em movimento, relatado por 43% dos estudos clínicos. As vantagens e desvantagens de cada uma dessas condições de cultura estão listadas na Tabela 1.

Considerando a variação nos fluxos de trabalho para a obtenção de um número satisfatório de células para infusão, há uma necessidade urgente de padronização dos protocolos clínicos.

#### 5) Formulação/produto final

A formulação final dos produtos envolve etapas críticas de validação antes da criopreservação. Esses testes visam checar a segurança, pureza e potência, incluindo a viabilidade das células T e a expressão de CAR na superfície celular. A fórmula de criopreservação pode conter de 5 a 10% de DMSO de grau clínico, juntamente com uma solução eletrolítica, albumina sérica humana e solução coloidal em várias combinações. Além disso, a taxa de congelamento deve estar entre um ou dois graus Celsius por minuto, pelo menos até -40°C, quando o produto pode então ser transferido para um tanque de nitrogênio líquido. Os produtos de CAR-T também devem ser liberados a partir de testes de esterilidade e pureza a fim de garantir a segurança do produto. Os protocolos padrão consistem em testar para contaminação bacteriana, fúngica ou de micoplasma bem como para endotoxinas.

#### Novas abordagens para os produtos de CAR-T

##### Modulação das funções das CAR-T

Uma série de limitações foi reportada sobre o uso da terapia com células CAR-T. A preocupação principal é a magnitude incontrolável da ativação e expansão das células CAR-T após infusão (45, 46). Além disso, os pacientes que responderam bem ao tratamento com às células CAR-T CD19 específicas também apresentaram aplasia de células B e, consequentemente, hipogamaglobulinemia, uma complicação que geralmente requer a administração periódica de imunoglobulina intravenosa. Para sobrepor essas complicações, estudos recentes descreveram estratégias para ligar e desligar as células CAR-T. Dentre essas abordagens, alguns grupos projetaram dispositivos reguladores para inibir ou promover a ativação das células infundidas. Fedorov e colaboradores (47) desenvolveram um sistema inibidor de CAR (iCAR) ao combinarem o domínio de reconhecimento do antígeno com a sinalização intracelular inibidora por meio dos receptores CTLA-4 e PD-1, duas moléculas envolvidas na

supressão da célula T. Essa estratégia leva a uma capacidade limitada dos linfócitos T, reduzindo a proliferação das células T, citotoxicidade e produção de citocinas. Outras séries de estudos aplicaram o uso de drogas via pequenas moléculas capazes de controlar a magnitude da ativação das células CAR-T (48-50). Recentemente, Jan e colegas relataram o uso de lenalidomida em um sistema induzível de dispositivos de “liga e desliga” para a ativação e degradação das células CAR-T, respectivamente. Para a degradação do receptor de CAR-T, uma marcação para um zinc finger do gene IKZF3 foi inserida nos domínios intracelulares de 4-1BB e CD3z, tornando-o acessível para a ligação da lenalidomida. Isso levará ao recrutamento da ubiquitina-ligase, seguida de uma poliubiquitinação e, posteriormente, à degradação temporária do CAR. Em contrapartida, no esquema do dispositivo ligar, os autores construíram um CAR com dois componentes: uma subunidade de CAR, contendo a porção transmembrana de CD28 e os domínios intracelulares compostos pelo zinc finger do gene IKZF3 dependente de lenalidomida, e a segunda subunidade composta por um domínio de CD28, um CRBN mutado e um domínio de sinalização de CD3-zeta. Nesses contextos, a dimerização dependente de lenalidomida induziu um aumento de cinco vezes da ativação das células CAR-T.

### **Células CAR-T biespecíficas/triespecíficas**

Uma série de estudos recentes mostrou o aparecimento de células B neoplásicas desprovidas de expressão de CD19 em uma proporção importante de pacientes tratados com células CAR-T anti-CD19, sugerindo um mecanismo de escape (51, 52). Estratégias recentes apresentaram células CAR-T que carregam estruturas de TCR biespecíficas ou triespecíficas, capazes de atacar simultaneamente diferentes antígenos tumorais.

O primeiro estudo clínico de fase 1 foi publicado, recentemente, por Shah e colaboradores (53) sobre o uso de células CAR-T anti-CD19/CD20 biespecíficas para o tratamento de pacientes que apresentavam linfoma não-Hodgkin de células B ou leucemia linfocítica crônica. A partir do uso do sistema CliniMACS Prodigy (Miltenyi), células CAR-T anti-CD19/CD20 biespecíficas não criopreservadas foram testadas em 22 pacientes. Os resultados indicam uma alta taxa de resposta (82%) e uma baixa taxa de citotoxicidade (5%) de síndrome de liberação de citocinas.

Outra estratégia publicada, recentemente, relatou resultados promissores in vitro e pré-clínicos com o emprego de células CAR-T triespecíficas capazes de direcionar os antígenos CD19, CD20 e CD22. Fousek et al. (54) apresentaram a construção de um CAR anti-CD19/CD20/CD22 triespecífico, utilizando apenas um único transgene que expressava três moléculas com endodomínios 4-1BB e CD3z. Os resultados obtidos a partir de ensaios in vitro e in vivo mostraram que as células CAR-T anti-CD19/CD20/CD22 triespecíficas apresentaram atividade superior de destruição e controle do tumor quando comparadas às células CAR-T anti-CD19 únicas, mesmo nas linhagens celulares tumorais desprovidas da molécula de CD19. Em consonância, Schneider e colegas (55) relataram células CAR-T anti-CD19/CD20/CD22 triespecíficas recém-desenvolvidas por engenharia a partir do uso de vetores lentivirais ao testarem múltiplos motivos de sinalização intracelulares de células T. As células CAR-T anti-CD19/CD20/CD22 triespecíficas foram capazes de eliminar e produzir citocinas de forma eficiente, quando incubadas com uma variedade de linhagens celulares tumorais que expressa-

vam níveis diferentes de CD19, CD20 e CD22. Nos ensaios pré-clínicos, células Raji criadas por engenharia que expressavam níveis heterogêneos de moléculas de CD19, CD20 e CD22 foram completamente eliminadas em camundongos NSG em cerca de 14 dias após a infusão.

### **Produção automatizada e entrega de CAR**

A rotina de um sistema “aberto” para a produção de células CAR-T ainda é altamente laboriosa e onerosa. O surgimento de sistemas fechados totalmente automatizados foi de grande contribuição para superar esses desafios.

O sistema CliniMACS® Prodigy, lançado em 2016 pela Miltenyi Biotec, é um grande exemplo de como esse tipo de sistema pode ser viável e aplicado nos protocolos de terapia celular dos laboratórios. A principal vantagem tecnológica oferecida por esse sistema é a automação totalmente fechada de, pelo menos, quatro etapas da produção de células CAR-T (separação celular, ativação, transdução e expansão) em uma máquina uni modular, em cerca de 10 dias de produção (56).

Os estudos pré-clínicos que usaram a máquina Prodigy tiveram sucesso ao mostrar que as células transduzidas e expandidas nesse sistema poderiam eliminar as células tumorais in vitro e in vivo. Quando expostas às células tumorais CD19+, as células CAR+ produziram altas taxas de IFN-gama, TNF-alfa e granzima-B, provando seu efeito antitumoral (57, 58).

Dois relatos recentes de um estudo clínico foram publicados para linfoma ou leucemia CD19+ refratária adulta e pediátrica (NCT03144583) com o uso de produtos de células CAR-T autólogas transduzidas com um vetor lentiviral por meio do sistema Prodigy (59, 60). Em 2020, foram tratados 34 pacientes com LLA, LLC e LNH (adulto e pediátrico) com uma expansão máxima de 2.160 x 10<sup>6</sup> células com 48,2% de células CAR+. A viabilidade celular após a produção variou de 90 a 100% e todos os produtos finais estavam totalmente livres de contaminantes biológicos e químicos. No segundo relato, em 2021, um total de 58 pacientes foi tratado no mesmo fluxo de trabalho padronizado. Os resultados mostraram que cerca de 71% dos pacientes apresentaram taxa de resposta completa após 100 dias de infusão.

Outra opção para a expansão automatizada de células T é o sistema Cytiva's Xuri Cell Expansion System W25. Esse sistema é composto por uma bandeja de agitação com temperatura controlada que visava promover a mistura suave e aeração na bolsa de cultura celular. O equipamento é auxiliado por um software para o ajuste de vários parâmetros de cultura celular (e.g., temperatura, ângulo de agitação e concentração gasosa). A última versão aceita uma gama de aplicações para cultura celular (T, NK e outras células aderentes) e expande em um volume de até 25 litros (61).

---

## **CONCLUSÃO**

As células CAR-T representam uma terapia importante para pacientes com malignidades hematológicas recidivadas e/ou refratárias. Além disso, devido ao lançamento no mercado de cinco produtos de células CAR-T estabelecidos como opções confiáveis para o tratamento de doenças celulares malignas, diversos grupos de pesquisa e/ou empresas farmacêuticas foram



incentivados a desenvolver novos produtos com células CAR-T. No entanto, a manufatura reprodutível dos produtos de CAR-T de grau clínico de alta qualidade ainda precisa aplicar essa tecnologia a um maior número de pacientes. O isolamento, modificação genica e expansão de células T são etapas primordiais para o sucesso da produção de células CAR-T. O desenvolvimento de novas estratégias de produção de CARs que sejam mais seguras e mais eficientes é necessário para aprimorar essa terapia, alcançando a destruição mais seletiva das células malignas com pouca toxicidade.

### Agradecimentos

RNR, TGMO e VGR receberam recursos do CNPq# 442676/2020-4, VPC recebeu recursos da FAPESP# 2019/25309-0, FAPESP# 2013/08135-2, CNPq# 442484/2020-8. MHB recebeu recursos do CNPq e FAPERJ.

### REFERÊNCIAS

- Vera JF, Brenner LJ, Gerdemann U, Ngo MC, Sili U, Liu H, et al. Accelerated production of antigen-specific T cells for preclinical and clinical applications using gas-permeable rapid expansion cultureware (G-Rex). *J Immunother*. 2010;33(3):305-15. Epub 2010/05/07.
- Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2017;4:92-101. Epub 2017/03/28.
- Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CART cell therapies. *Current opinion in biotechnology*. 2018;53:164-81. Epub 2018/02/21.
- Rozenbaum M, Meir A, Aharony Y, Itzhaki O, Schachter J, Bank I, et al. Gamma-Delta CAR-T Cells Show CAR-Directed and Independent Activity Against Leukemia. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1347. Epub 2020/07/28.
- Tanaka Y, Murata-Hirai K, Iwasaki M, Matsumoto K, Hayashi K, Kumagai A, et al. Expansion of human gammadelta T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate pro-drug. *Cancer science*. 2018;109(3):587-99. Epub 2017/12/31.
- Dutour A, Marin V, Pizzitola I, Valsesia-Wittmann S, Lee D, Yvon E, et al. In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Advances in hematology*. 2012;2012:683065. Epub 2012/01/25.
- Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nature biotechnology*. 2020;38(8):947-53. Epub 2020/05/04.
- Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *The New England journal of medicine*. 2020;382(6):545-53. Epub 2020/02/06.
- Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Canedo A, Bonamino MH. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):288. Epub 2016/10/13.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*. 1996;14:233-58. Epub 1996/01/01.
- Levine BL, Cotte J, Small CC, Carroll RG, Riley JL, Bernstein WB, et al. Large-scale production of CD4+ T cells from HIV-1-infected donors after CD3/CD28 costimulation. *Journal of hematotherapy*. 1998;7(5):437-48. Epub 1998/11/26.
- Porter DL, Levine BL, Bunin N, Stadtmauer EA, Luger SM, Goldstein S, et al. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation. *Blood*. 2006;107(4):1325-31. Epub 2005/11/05.
- Ghassemi S, Nunez-Cruz S, O'Connor RS, Friaetta JA, Patel PR, Scholler J, et al. Reducing Ex Vivo Culture Improves the Antileukemic Activity of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Cancer immunology research*. 2018;6(9):1100-9. Epub 2018/07/22.
- de Macedo Abdo L, Barros LRC, Saldanha Viegas M, Vieira Codeco Marques L, de Sousa Ferreira P, Chicaybam L, et al. Development of CAR-T cell therapy for B-ALL using a point-of-care approach. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1752592. Epub 2020/05/05.
- Arcangeli S, Falcone L, Camisa B, De Girardi F, Biondi M, Giglio F, et al. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1217. Epub 2020/07/09.
- Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, Switzer K, et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer research*. 2011;71(10):3516-27. Epub 2011/05/12.
- Rushworth D, Jena B, Olivares S, Maiti S, Briggs N, Somanchi S, et al. Universal artificial antigen presenting cells to selectively propagate T cells expressing chimeric antigen receptor independent of specificity. *J Immunother*. 2014;37(4):204-13. Epub 2014/04/10.
- Chicaybam L, Abdo L, Carneiro M, Peixoto B, Viegas M, de Sousa P, et al. CAR T Cells Generated Using Sleeping Beauty Transposon Vectors and Expanded with an EBV-Transformed Lymphoblastoid Cell Line Display Antitumor Activity In Vitro and In Vivo. *Human gene therapy*. 2019;30(4):511-22. Epub 2019/02/23.
- Lapteva N, Gilbert M, Diaconu I, Rollins LA, Al-Sabbagh M, Naik S, et al. T-Cell Receptor Stimulation Enhances the Expansion and Function of CD19 Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(24):7340-50. Epub 2019/09/29.
- Klebanoff CA, Crompton JG, Leonardi AJ, Yamamoto TN, Chandran SS, Eil RL, et al. Inhibition of AKT signaling uncouples T cell differentiation from expansion for receptor-engineered adoptive immunotherapy. *JCI insight*. 2017;2(23). Epub 2017/12/08.
- Zheng W, Jones LL, Geiger TL. Modulation of PI3K signaling to improve CART cell function. *Oncotarget*. 2018;9(88):35807-8. Epub 2018/12/12.
- Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(9):566-81. Epub 2016/08/24.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288(5466):669-72. Epub 2000/04/28.

24. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3132-42. Epub 2008/08/09.
25. Correa de Freitas MC, Fontes AM, de Castilho Fernandes A, Picanco-Castro V, de Sousa Russo EM, Covas DT. Murine leukemia virus-derived retroviral vector has differential integration patterns in human cell lines used to produce recombinant factor VIII. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2014;36(3):213-8. Epub 2014/07/18.
26. Tsukahara T, Agawa H, Matsumoto S, Matsuda M, Ueno S, Yamashita Y, et al. Murine leukemia virus vector integration favors promoter regions and regional hot spots in a human T-cell line. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345(3):1099-107. Epub 2006/05/23.
27. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7. Epub 1996/04/12.
28. Jarrosson-Wuilleme L, Goujon C, Bernaud J, Rigal D, Darlix JL, Cimarelli A. Transduction of nondividing human macrophages with gammaretrovirus-derived vectors. *Journal of virology*. 2006;80(3):1152-9. Epub 2006/01/18.
29. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A. [Ten years of gene therapy: thoughts and perspectives]. *Medicine sciences : M/S*. 2010;26(2):115-8. Epub 2010/03/02. Dix ans de therapie genique: reflexions.
30. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(5):346-58. Epub 2003/05/03.
31. Geurts AM, Yang Y, Clark KJ, Liu G, Cui Z, Dupuy AJ, et al. Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2003;8(1):108-17. Epub 2003/07/05.
32. Jin Z, Maiti S, Huls H, Singh H, Olivares S, Mates L, et al. The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene therapy*. 2011;18(9):849-56. Epub 2011/04/01.
33. Prommersberger S, Reiser M, Beckmann J, Danhof S, Amberger M, Quade-Lyssy P, et al. CARAMBA: a first-in-human clinical trial with SLAMF7 CAR-T cells prepared by virus-free Sleeping Beauty gene transfer to treat multiple myeloma. *Gene therapy*. 2021. Epub 2021/04/14.
34. Saito S, Nakazawa Y, Sueki A, Matsuda K, Tanaka M, Yanagisawa R, et al. Anti-leukemic potency of piggyBac-mediated CD19-specific T cells against refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cytotherapy*. 2014;16(9):1257-69. Epub 2014/08/12.
35. Wang J, Lupo KB, Chambers AM, Matosevic S. Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73(+) solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):136. Epub 2018/12/06.
36. Zhang Z, Jiang D, Yang H, He Z, Liu X, Qin W, et al. Modified CAR T cells targeting membrane-proximal epitope of mesothelin enhances the antitumor function against large solid tumor. *Cell death & disease*. 2019;10(7):476. Epub 2019/06/19.
37. Ma Y, Chen Y, Yan L, Cao HX, Han SY, Cui JJ, et al. EGFRvIII-specific CAR-T cells produced by piggyBac transposon exhibit efficient growth suppression against hepatocellular carcinoma. *International journal of medical sciences*. 2020;17(10):1406-14. Epub 2020/07/07.
38. Ptackova P, Musil J, Stach M, Lesny P, Nemeckova S, Kral V, et al. A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy*. 2018;20(4):507-20. Epub 2018/02/25.
39. Micklethwaite KP, Gowrishankar K, Gloss BS, Li Z, Street JA, Moezzi L, et al. Investigation of product derived lymphoma following infusion of piggyBac modified CD19 chimeric antigen receptor T-cells. *Blood*. 2021. Epub 2021/05/12.
40. Beatty GL, O'Hara MH, Lacey SF, Torigian DA, Nazimuddin F, Chen F, et al. Activity of Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Pancreatic Carcinoma Metastases in a Phase 1 Trial. *Gastroenterology*. 2018;155(1):29-32. Epub 2018/03/24.
41. Picanco-Castro V, Pereira CG, Covas DT, Porto GS, Athanassiadou A, Figueiredo ML. Emerging patent landscape for non-viral vectors used for gene therapy. *Nature biotechnology*. 2020;38(2):151-7. Epub 2020/02/09.
42. Bozza M, De Roia A, Correia MP, Berger A, Tuch A, Schmidt A, et al. A nonviral, nonintegrating DNA nanovector platform for the safe, rapid, and persistent manufacture of recombinant T cells. *Science advances*. 2021;7(16). Epub 2021/04/16.
43. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine*. 2011;17(10):1290-7. Epub 2011/09/20.
44. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(1):294-305. Epub 2007/12/07.
45. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(4):843-51. Epub 2010/02/25.
46. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine*. 2011;3(95):95ra73. Epub 2011/08/13.
47. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Science translational medicine*. 2013;5(215):215ra172. Epub 2013/12/18.
48. Wu CY, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 2015;350(6258):aab4077. Epub 2015/09/26.
49. Zajc CU, Dobeisberger M, Schaffner I, Mlynek G, Puhringer D, Salzer B, et al. A conformation-specific ON-switch for controlling CAR T cells with an orally available drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117(26):14926-35. Epub 2020/06/20.
50. Jan M, Scarfo I, Larson RC, Walker A, Schmidts A, Guirguis AA, et al. Reversible ON- and OFF-switch chimeric antigen receptors controlled by lenalidomide. *Science translational medicine*. 2021;13(575). Epub 2021/01/08.



51. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019;16(6):372-85. Epub 2019/03/07.
52. Ruella N, Maus MV. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Computational and structural biotechnology journal*. 2016;14:357-62. Epub 2016/10/21.
53. Shah NN, Johnson BD, Schneider D, Zhu F, Szabo A, Keever-Taylor CA, et al. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nature medicine*. 2020;26(10):1569-75. Epub 2020/10/07.
54. Fousek K, Watanabe J, Joseph SK, George A, An X, Byrd TT, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia*. 2021;35(1):75-89. Epub 2020/03/25.
55. Schneider D, Xiong Y, Wu D, Hu P, Alabanza L, Steimle B, et al. Trispecific CD19-CD20-CD22-targeting duoCAR-T cells eliminate antigen-heterogeneous B cell tumors in preclinical models. *Science translational medicine*. 2021;13(586). Epub 2021/03/26.
56. Mizukami A, Swiech K. Platforms for Clinical-Grade CAR-T Cell Expansion. *Methods Mol Biol*. 2020;2086:139-50. Epub 2019/11/11.
57. Castella M, Boronat A, Martin-Ibanez R, Rodriguez V, Sune G, Caballero M, et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2019;12:134-44. Epub 2019/01/10.
58. Zhu F, Shah N, Xu H, Schneider D, Orentas R, Dropulic B, et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*. 2018;20(3):394-406. Epub 2017/12/31.
59. Castella M, Caballero-Banos M, Ortiz-Maldonado V, Gonzalez-Navarro EA, Sune G, Antonana-Vidosola A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Frontiers in immunology*. 2020;11:482. Epub 2020/06/13.
60. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castella M, Alonso-Saladrigues A, Benitez-Ribas D, Caballero-Banos M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19(+) Relapsed/Refractory Malignancies. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2021;29(2):636-44. Epub 2020/10/04.
61. Smith TA. CAR-T Cell Expansion in a Xuri Cell Expansion System W25. *Methods Mol Biol*. 2020;2086:151-63. Epub 2019/11/11.

**Este artigo está em processo de publicação na revista *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*.**