

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. VIII: Células CAR-T: Desenvolvimento pré-clínico – avaliação da segurança e eficácia

Virginia Picanço e Castro^a, Martín Bonamino^{b,c}, Rodrigo Nalio Ramos^{d,e}, Renato L. Guerino-Cunha^f, Theo Gremen M. Oliveira^{d,g}, *Eduardo M Rego^h

^aFundação 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

^bDivisão de Pesquisa Experimental e Translacional, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^cVice-Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas da Fundação Oswaldo Cruz (VPPCB FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^dLaboratório de Investigação Médica 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

^eInstituto D'Or de Ensino e Pesquisa, São Paulo, Brasil.

^fDepartamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^gFundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brasil

^hHospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC USP), Ribeirão Preto, Brasil

PALAVRAS-CHAVES

Imunoterapia
Receptor de antígeno quimérico
Terapia celular adotiva
Estudos pré-clínicos
Terapia celular avançada

RESUMO

Atualmente, há quatro produtos de T-CAR comercialmente disponíveis no mercado. As células T-CAR mostraram altas taxas de remissão e representam uma opção efetiva de tratamento para pacientes com malignidades de célula B resistentes ou refratárias. A aprovação desses produtos de terapia celular se deu após um longo período de avaliação pré-clínica que demonstrou eficácia inédita nessa população difícil de tratar. Este artigo de revisão descreve as principais avaliações pré-clínicas necessárias para o desenvolvimento de produtos de células T-CAR.

INTRODUÇÃO

Células T que expressam o receptor de antígeno quimérico (células T-CAR) surgiu como uma terapia promissora para malignidades hematológicas. Desde 2017, quatro produtos de células T-CAR – axicabtagene ciloleucel (axi-cel), tisagenlecleucel (tisa-cel), lisocabtagene maraleucel (liso-cel) e brexucabtagene auto-leucel – receberam aprovação do US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de linfoma não Hodgkin de célula B (LNH célula B) recidivado/refratário (RR). Concomitantemente, o tisa-cel foi aprovado pelo FDA para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) R/R (1).

Um aspecto crucial da terapia com células T-CAR é o estabelecimento e validação de um processo de manufatura reproduzível e de alta qualidade, capaz de entregar produtos de células T-CAR de grau clínico. Trata-se de um pré-requisito para a vasta aplicação dessa tecnologia. Um produto de qualidade precisa ser integrado dentro de cada etapa do processo de manufatura (Figura 1).

com T-CAR no Brasil. Sua significativa complexidade, todavia, representa um desafio importante para a devida implementação e alcance dos mesmos objetivos observados em outros países. Este consenso é baseado na opinião de especialistas que apontaram os ensaios pré-clínicos mínimos necessários para apoiar o desenvolvimento de novas terapias com células T-CAR.

Vetores usados na terapia com células T-CAR

Com o crescente progresso nas tecnologias de modificação genética, várias abordagens foram testadas para gerar células T-CAR. Os dois métodos principais são a transdução viral (vetor retroviral ou lentiviral) ou a transfecção com plasmídeo de DNA nu (do inglês naked plasmid DNA), integração de DNA mediada por transposase ou mRNA por eletroporação ou por sistema de transfecção com lipídeo (2). Os vetores comumente usados e suas vantagens e desvantagens estão listados na Tabela 1. A maioria dos estudos atuais usa vetores retrovirais (como vetores lenti e retrovirais). Os vetores lentivirais tornaram-se especialmente atrativos para as aplicações clínicas graças à sua habi-

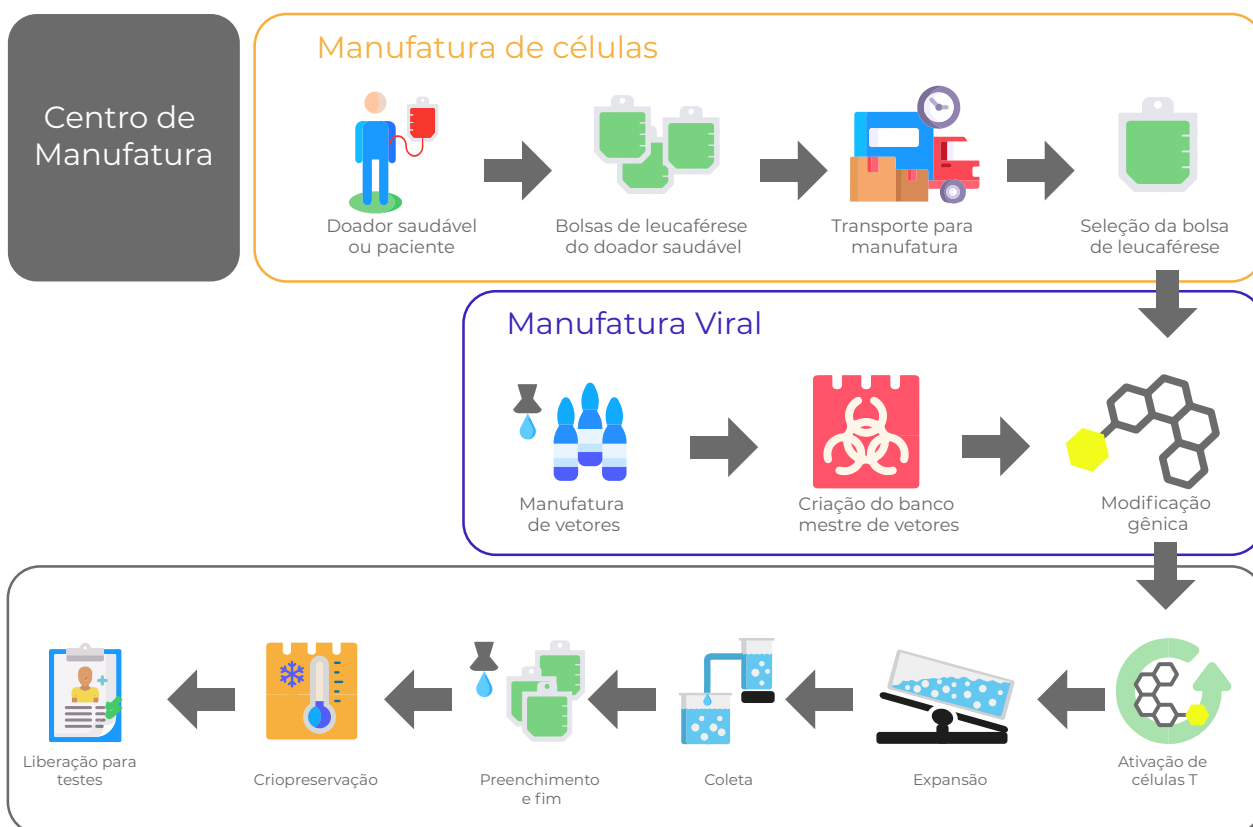


Figura 1. Produção de células CAR-T em um laboratório conforme com as boas práticas de manufatura.

No entanto, antes da validação de uma plataforma de grau clínico, muitos ensaios pré-clínicos foram realizados. Há vários experimentos imperativos exigidos por diferentes agências reguladoras internacionais – por exemplo, o FDA e a European Medicines Agency (EMA) – como dados essenciais prévios às etapas para o estabelecimento de um dossiê robusto de uma nova droga investigacional. No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) incorporou ao seu marco regulatório os mesmos princípios do FDA e da EMA (65).

Há grandes expectativas para a iminente introdução da terapia

de transduzir eficientemente a maioria dos tipos celulares, incluindo células não proliferativas, como as células T naive (3). Ambos os retrovírus- γ e os lentivírus se integram, de forma semialeatória, no genoma da célula hospedeira. Portanto, apresentam um risco de mutagênese insercional e desregulação de genes adjacentes ao local da integração (4, 5).

O desenvolvimento e o uso de vetores não integrativos, ou dos que se integram em locais específicos, são objetivos importantes para a terapia com CAR. O desenvolvimento de novos vetores tem sido conduzido, principalmente, pela necessidade de

se abordar a questão da segurança, em especial, o problema da mutagênese insercional (6).

Vetores não virais, como o Sleeping Beauty (SB), PiggyBac (PB) ou Tol2, derivados de transposons, tipicamente, necessitam da co-transfecção do DNA do transposon com uma transposase, como um plasmídeo de expressão ou mRNA. Em consequência, isso resulta em integração genômica geralmente nas regiões genômicas ricas de AT (7). Embora o perfil de integração do transposon possa ser considerado biologicamente seguro, recentemente, dois pacientes desenvolveram linfoma maligno após um tratamento com células T-CAR anti-CD19 com o uso do vetor PB (8). Além disso, é mais fácil produzi-los em larga escala, abrigam maior capacidade transgênica e geram menos preocupações com relação à biossegurança. Contudo, uma diferença importante entre as diversas tecnologias é a duração da expressão de CAR na célula modificada. Para uma expressão mais duradoura (várias semanas), a transdução viral é geralmente empregada, enquanto os resultados da eletroporação de mRNA na expressão transiente duram cerca de uma a duas semanas.

reconhecem o alvo com afinidades diferentes nas moléculas de CAR, pode potencialmente permitir a discriminação entre as células saudáveis e as tumorais. Alguns grupos exploraram essa abordagem, especialmente no cenário pré-clínico, (9) e a revisaram (10). Resultados recentes mostraram uma potencial toxicidade devido ao reconhecimento do alvo fora do tumor quando se usam CARs de alta afinidade (11), e isso também advoga a favor das afinidades reduzidas de CAR em contextos específicos. A redução da afinidade dos scFvs anti-CD19 também demonstrou benefícios potenciais, como a cinética tardia da ativação das células T (e potencialmente menos indução de CRS) sem a perda da capacidade de eliminação do tumor (12). Um aspecto crítico dessa abordagem é que alguns antígenos alvo podem ser modulados em diferentes tipos celulares, de acordo com o status de inflamação do tecido da exposição farmacológica. Como exemplo, CD22, um antígeno alvo da LLA, pode ser modulado com drogas tanto in vitro como in vivo, aumentando o reconhecimento e destruindo a partir dos CARs específicos das CD22 (13). Tais contextos tornam desafiador o ajuste do reconhecimento

Tabela 1. Vetores usados atualmente na terapia com células T-CAR.

	Viral vectors				Non viral vectors		
	Lentiviral vector	Retroviral vector	Adenovirus vector	Adeno-associated virus vector	Transposon	mRNA	CRISPR/Cas9
Infected cells	Dividing and quiescent cells	Dividing cells	Dividing and quiescent cells	Dividing and quiescent cells	Dividing cells	Dividing cells	Dividing cells
Large transgene capacity	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes
Safe and well tolerated in clinical studies	Most used now				Less used, but with great potential		
Permanent modification of the cells	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	Yes
IP protection	✓✓✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓✓	✓✓✓✓	✓✓✓✓
Cost of production	Costly and laborious				Cheap and simple		
Advantages	High efficiency				Cheap High efficiency	No integration risks, Cheaper than virus product	Precise gene insertion, Don't need exogenous promoter
							Expensive, Low efficiency, Potential off targets

Abreviação. PI: propriedade intelectual.

A afinidade do scFv pode impactar a especificidade de CAR e potencial fora do alvo

A maioria dos alvos moleculares para as células T-CAR não está exclusivamente expressa nas células tumorais. Algumas dessas moléculas podem ser encontradas expressas, em níveis diferentes, nas células tumorais e nas saudáveis. Explorar os scFvs, que

do alvo com base no equilíbrio da afinidade de scFv e o direcionamento da densidade de expressão da molécula.

Caracterização e teste de controle da produção de vetores

Produção de vetores de DNA

Seja com o uso de vetores virais ou não virais, o início da produção da maioria dos vetores se dá com a produção do DNA do plasmídeo. Os testes dos vetores de DNA devem incluir testes de identidade e integridade genética, incluindo a confirmação da sequência terapêutica e sequências regulatórias/controladoras, ausência de agentes externos, esterilidade e níveis de endotoxina. Além disso, a presença/ausência de características específicas, como as sequências de CpG, deve ser confirmada por métodos viáveis (66).

Bancos de células

Os testes de banco de células eucariótica (bancos mestres e em operação) conduzidos em linhagens celulares produtoras/empacotadoras (do inglês *producer/packing cell lines*) devem incluir identidade, pureza, número de células, viabilidade, caracterização da cepa, genotipagem/fenotipagem. Além disso, os testes devem ser realizados para verificar uma possível contaminação por vírus acidentais, ausência de contaminação bacteriana ou fúngica, bem como de micoplasma (67).

Vetores virais

Qualquer preparação de vetores virais deve ser totalmente caracterizada com relação à atividade de transdução e outras características relevantes para as partículas de vetores e a ausência de RCL (lentivírus competente em replicação) ou RCR (retrovírus competente em replicação). As especificações de liberação de lote devem estar baseadas em testes adequados para caracterizar e garantir a integridade do vetor. Para qualquer vetor viral, o nível máximo de contaminação pelo DNA do plasmídeo, no lote final, deve ser estabelecido e recomenda-se o tratamento com DNase para remover o DNA do plasmídeo. O tratamento com DNase é essencial para eliminar possíveis contaminações no produto viral com VSV-G que codifica o plasmídeo, outras proteínas do envelope ou outras proteínas virais como Gag/Pol (66). Vetores retrovirais estão sendo usados em um número crescente de aplicações clínicas de T-CAR. À medida que aumenta o uso desse tipo de vetor, há uma preocupação de segurança quanto a uma possível recombinação viral e risco de desenvolvimento de um retrovírus competente em replicação (RCR), durante a manufatura do material do vetor. A patogenicidade potencial da presença de retrovírus competente em replicação (RCR) exige um teste de vigilância para excluir a presença de RCR em produtos de terapia gênica para humanos à base de vetores. O RCR de lentivírus é referido como lentivírus competente em replicação (RCL). Para gerenciar esse risco, as agências regulatórias têm exigido o teste para RCR/RCL nos produtos com células T infundidos em pacientes (14, 15).

Atividade de transdução

Aspectos importantes da atividade de transdução são a capacidade de integração, expressão transgênica e funcionalidade. Há dois tipos comuns de medidas: física, que determina a concentração da partícula, e.g. quantificação de p24 ou funcional que

conta as partículas capazes de transdução produtiva (IFU/ml). A produção viral pode ser medida a partir do uso de técnicas de diluição limitantes do vírus que vai transduzir um número específico de células e a atividade de transdução pode ser medida por citometria de fluxo ou por qPCR (16) (17).

Caracterização e teste de controle da produção de células T-CAR

Testes sorológicos

Geralmente, os pacientes submetidos à terapia com células T-CAR são repetidamente hospitalizados e expostos a produtos sanguíneos. Portanto, o teste para agentes infecciosos deve ser realizado como uma etapa de controle de qualidade para garantir a biossegurança do material fonte. O painel mínimo sugerido para doenças infecciosas antes da manufatura das células T-CAR é o seguinte:

- Anti-HTLV I e HTLV II (HTLV I/II);
- Anticorpo de CMV;
- Antígeno de hepatite B (HBSAG);
- Anticorpo contra antígeno do núcleo da hepatite B (HBCAB);
- Teste de sorologia para sífilis (RPR);
- Antígeno de HIV/HCV, realizado por Teste de Ácido Nucleico (NAT);
- HIV por NAT;
- HCV por NAT;
- Anti-HIV-1 e HIV-2 (HIV 1/2);
- Anticorpo contra o vírus da hepatite C (HCVAB ou HCV).

Os resultados esperados devem ser HIV/HCV por NAT, Anti-HIV1/2, HTLV I/II, HBSAG, HBCAB, HCVAB (HCV) e RPR = Não reagente (NR). O CMV pode ser tanto positivo quanto negativo e é realizado apenas a critério de informações.

Citogenética

O longo período de cultura e expansão das células T demanda a realização de testes de integridade genômica para assegurar que não sejam gerados clones aberrantes como consequência da integração viral ou deleções/duplicações de genes ou que ocorram padrões maiores de bandas cromossômicas. Geralmente, a análise de pelo menos 20 metafases em um cariótipo de banda G é o teste mínimo de informação para checar anomalias cromossômicas ou aneuploidias. No entanto, os testes de cariótipo não informam sobre deleções ou duplicações em nível molecular. Caso seja necessário um teste mais preciso, um arranjo genômico deve ser considerado para um teste amplo de genoma de anomalias de número de cópias e a detecção da perda da heterozigiosidade (18).

Testes de esterilidade

Como a produção de células T-CAR envolve a manipulação intensa do produto com uma diversidade de reagentes e consumíveis plásticos e os sistemas totalmente fechados nem sempre estão disponíveis, os testes de esterilidade são obrigatórios para verificar a presença de contaminantes microbiológicos antes da infusão. Basicamente, os testes de rotina checam a contaminação por micoplasma, bactérias, fungos e endotoxina (19). Todos os testes devem ser realizados, preferencialmente, com kits

Tabela 2 – Descrição de citocinas e quimiocinas para a caracterização fenotípica de células T-CAR.

Categorias de citocinas e quimiocinas solúveis				
Efetoras	Estimuladoras	Regulatórias	Inflamatórias	Quimioatrativas
granzima-B, IFN-gama, MI-P-1alfa, perforina, TNF-alfa, TNF-beta	GM-CSF, IL-2, IL-5, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21	IL-4, IL-10, IL-13, IL-22, TGF-beta1, sCD137, sCD40L	IL-1B, IL-6, IL-17A, IL-17F, MCP-1, MCP-4	CCL-11, IP-10, MIP-1beta, RANTES

Abreviações: GM-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos; IL: Interleucina; TGF-Beta1: Fator de transformação do crescimento beta 1; MCP: proteína quimiotática de monócitos; CCL11: ligante de motivo 11 quimiocina; IP-10: proteína induzida por interferon gama 10; MIP: proteína inflamatória de macrófago; RANTES: Regulada por Ativação, célula T Normal Expressa e Secretada.

aprovados pelas agências reguladoras competentes. Produtos contaminados não devem ser usados para infusão em nenhuma circunstância.

Os testes de micoplasma, no geral, envolvem duas técnicas diferentes: 1) O uso de bioluminescência para checar a presença de enzimas de micoplasma no produto final ou 2) um teste de PCR com oligos que amplificam regiões específicas do genoma do micoplasma. Ambas as abordagens usam uma amostra pequena do sobrenadante do produto final para extrair o material citoplasmático/genético do micoplasma. A realização das duas técnicas é comparável, contudo, a validação interna é necessária (19).

A contaminação bacteriana ou fúngica pode ser avaliada por meio de métodos automatizados de cultura e pode ser conduzida tanto antes quanto depois da produção de células T-CAR. Os métodos mais comuns para detectar a produção de CO₂ por microrganismos mostram os resultados a partir das alterações na cor do meio de cultura ou pressão da garrafa. Os principais painéis de patógenos incluem *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. sporogenes* e *C. albicans* (20).

Por fim, o teste de endotoxina bacteriana (BET) visa detectar a presença de substâncias liberadas por bactérias lisadas que podem causar efeitos tóxicos (e.g. LPS gram-negativo). O BET mais popular é o *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) que se baseia na reatividade dos amebócitos extraídos de cavalo-marinho quando expostos a endotoxinas. Os quatro tipos principais de testes LAL incluem um qualitativo (gel composto por proteínas coaguladas) e três ensaios quantitativos (turbidimétrico, cromogênico e fator C recombinante). Os níveis indicados de endotoxina no produto final devem ser inferiores a 5 EU/kg (21).

Caracterização fenotípica e funcional dos produtos de células T-CAR

Caracterização molecular

Os produtos de células T-CAR são, geralmente, avaliados de acordo com seu fenótipo efetor-de memória via análise transcricional e/ou proteômica. As técnicas mais comuns usadas para caracterizar as células T-CAR podem incluir sequenciamento de RNA, sequenciamento de RNA de célula individual e citometria de fluxo multiparamétrica (22) (23) (24). Fatores de transcrição e moléculas de superfície também podem definir o status da diferenciação da célula T, que pode corresponder a sua habilidade em responder aos antígenos tumorais, autorrenovar-se, migrar,

proliferar e chegar à exaustão (25) (26) (27). Os marcadores mais comuns usados para definir as subpopulações de célula T se baseiam na expressão dos marcadores de superfície CD45RA, CD45RO, CCR7, CD62L, CD95 e CD27 (28) (29) (30). As características fenotípicas e funcionais dos diferentes subconjuntos de células T CD8+ estão detalhados na Figura 2, de acordo com Gattinoni e colaboradores (31).

Produção de citocinas

A avaliação da produção de citocinas representa uma etapa importante para o perfilamento dos produtos finais de células T-CAR. A liberação de citocinas pode oferecer informações funcionais sobre o status de diferenciação (e.g. perfil efetor, de memória ou progenitor), espectro de polifuncionalidade adquirida, bem como a amplitude e potência das respostas das células T, considerando também seu potencial neurotóxico (32).

Os testes mais aplicados para avaliar a produção de citocinas incluem o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ensaio imunospot enzimático (ELISpot) (33), coloração de citocina intracelular por citometria de fluxo (34) e técnicas de multiplex recém-descritas para avaliar os compostos em nível celular individual (35). A produção de citocinas representa um ensaio importante para a caracterização dos produtos de células T-CAR funcionais, embora não haja diretrizes definindo essa etapa como um requisito de validação para infusão.

Uma série de estudos usaram um painel padrão de citocinas para a caracterização clássica de ativação das células T, incluindo IFN-gama, TNF-alfa, Granzima B dentre os fatores avaliados (28) (36) (37) (38). O padrão de produção de citocinas pode diferenciar de acordo com a escolha do tipo celular original para a manufatura de células T-CAR. O uso de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) ou células T CD3+ totais na primeira etapa de seleção celular pode conduzir o perfil de citocinas/quimiocinas para um fenótipo misto, incluindo também citocinas tipicamente produzidas por células T CD4+ auxiliares, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17. Em contraste, as células T-CAR geradas a partir de células T CD8+ isoladas produzirão, sobretudo, IFN-gama, TNF-alfa, perforina e granzima-B mediante estimulação.

Importante ressaltar que achados recentes por Alizadeh e colaboradores (39) descreveram um papel importante das células T-CAR que produzem IFN-gama não apenas na eliminação de células tumorais e controle do tumor, mas também na estimula-

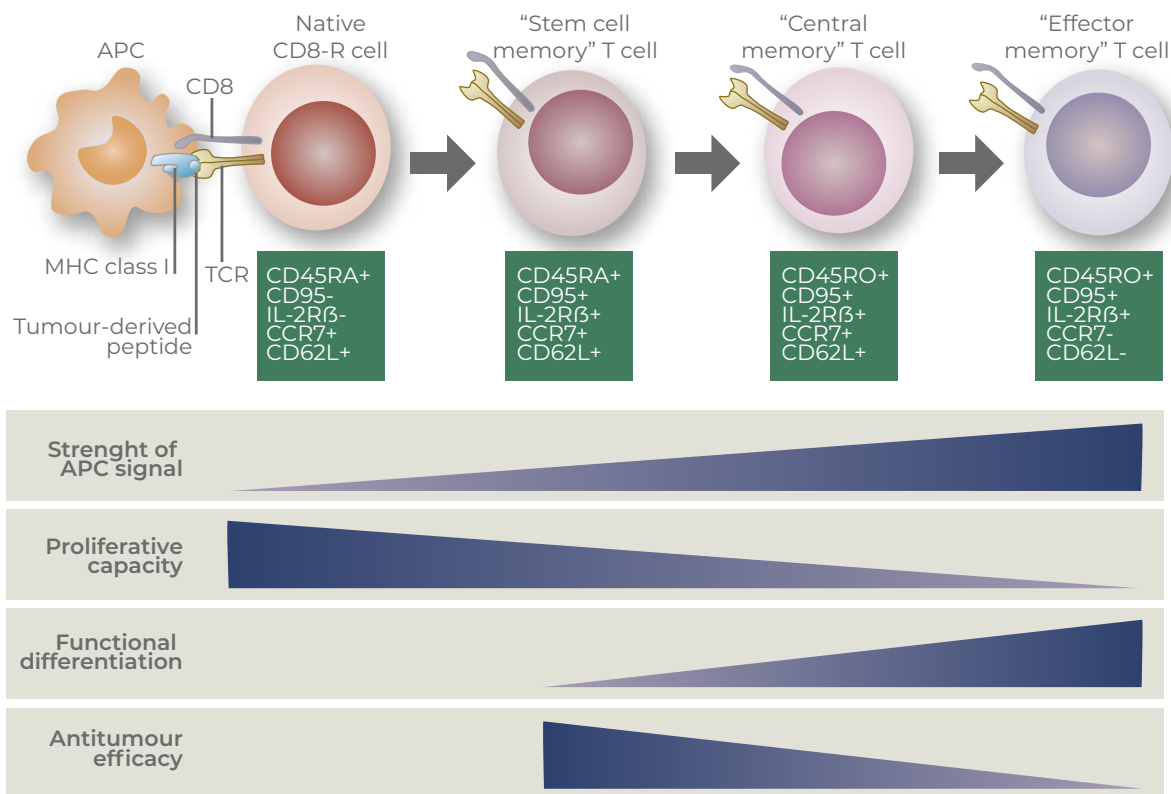


Figura 2. Descrição dos estados de diferenciação das células T CD8+ (Gattinoni e colaboradores) (31).

ção sistêmica da imunidade inata do hospedeiro ao estimular as funções pró-inflamatórias dos macrófagos. Estudos adicionais concentraram esforços para gerar células T-CAR que adquirem características polifuncionais. Essas células são normalmente definidas como capazes de secretar, no mínimo, duas citocinas ao mesmo tempo, o que representa um grande ganho na capacidade estimuladora in vivo (40). A geração de células T-CAR polifuncionais está descrita em modelos pré-clínicos (41) e estudos de fase I/II para linfoma não Hodgkin (42) e linfoma de célula B (43). Na verdade, as células T polifuncionais foram amplamente associadas a um melhor prognóstico para diferentes tipos de câncer sólido ou hematológico (44) (45) (46), mas são necessárias melhorias nos protocolos para a ativação e expansão de células T para gerar uma manutenção continuada dessas células in vivo.

Grupos diferentes de citocinas e quimiocinas devem ser avaliadas para o perfilamento das células T-CAR. As moléculas podem ser subdivididas em cinco categorias de acordo com Rossi e colegas (42): efetor, estimulador, regulatório, inflamatório e quimioatrativo (Tabela 2).

Ao usarem abordagens de citocina de célula individual, Rossi e colaboradores (42) relataram que cerca de 20% dos produtos de células T-CAR apresentaram perfil polifuncional em seu protocolo. Curiosamente, os pacientes que mostraram respostas objetivas foram infundidos com células T-CAR CD4+ polifuncionais que secretavam citocinas inflamatórias, citocinas regulatórias e efetoras (Tabela 2), enquanto pacientes não respondedores receberam células T-CAR CD4+ polifuncionais que produziram moléculas efetoras, em sua maioria (Tabela 2), sugerindo que melhores características polifuncionais das células T-CAR podem representar um benefício para o paciente.

Ensaio de co-cultura

A funcionalidade dos produtos de células T-CAR se baseia sobretudo em sua habilidade de reconhecer efetivamente e destruir células neoplásicas alvo (47). Mesmo considerando que algumas preparações com células T-CAR possam incluir células T CD4+ expandidas, a grande maioria dos ensaios estão focados no papel dos linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTLs) na eliminação de células tumorais. A especificidade da célula T-CAR é independente de HLA e conta sobretudo com a capacidade de seu domínio de ligação extracelular com antígenos de superfície celular, incluindo proteínas, carboidratos e glicolipídios (48). Os mecanismos classicamente descritos abrangem a via de interação do ligante Fas/Fas (FasL), secreção de perforina/granzima e a produção de citocinas efetoras como IFN-gama e TNF-alfa (49). Para avaliar o efeito citotóxico das células T-CAR, ensaios de co-cultura padrão foram descritos (50).

Seguindo o reconhecimento de antígeno, as células T ativadas para eliminar podem ser determinadas por um ensaio de liberação de citocina, e a produção de citocina in vitro e a atividade citolítica das células T CD8+ estão frequentemente correlacionadas, principalmente porque o IFN-γ melhora a expressão de MHC-I e Faz nas células alvo (51) (52). Por outro lado, a detecção da liberação de citocina apenas pode ser considerada como um marcador potencial para a função citolítica, uma vez que a destruição das células alvo requer a produção de linfócitos e liberação posterior de mediadores para indução à destruição, bem como a interação de célula com célula (53).

Número de cópias integradas

Há um risco aumentado de oncogênese se o número de cópias

do vetor (VCN) por célula for alto. Devido à vasta distribuição de locais de inserção de DNA pró-viral, o risco de oncogênese por causa da mutagênese insercional aumenta com o número de inserções por genoma celular. Por essa razão, é altamente recomendável que o VCN seja <5 cópias por genoma (67). A medição rápida e precisa do VCN é uma etapa importante no controle de qualidade necessário para a liberação dos produtos com células T-CAR para infusão no paciente e a identificação dos locais de integração no genoma humano pode contribuir para a garantia da segurança.

Ensaio in vivo – metodologias e modelos animais

Modelos de camundongos são de importância central na determinação da eficácia e segurança da terapia com células T-CAR. De acordo com a natureza do enxerto do tumor e seu receptor, os modelos animais podem ser categorizados em quatro grupos: a) singênico; b) xenoenxertos humanos; c) transgênico imunocompetente; e d) modelos de camundongos transgênicos humanizados (54).

Modelos de aloenxertos de camundongos singênicos ou imunocompetentes usam células T-CAR, tumores e antígenos alvo que são todos derivados de murinos. A grande base desse modelo é que o receptor tenha um sistema fisiológico imune, então, configurando-se em uma excelente ferramenta para observar a interação das células T-CAR com outras células e elementos do sistema imune. Além disso, modelos singênicos podem revelar toxicidades causadas pela presença de antígenos associados ao tumor (TAA) em tecidos murinos saudáveis, as chamadas toxicidades do alvo fora do tumor. No entanto, como a biologia dos camundongos nem sempre recapitula precisamente a biologia humana e muitos eventos adversos importantes associados à terapia com células T-CAR não foram observados em modelos singênicos, como a chamada síndrome de liberação de citocina (CRS). Além disso, a persistência na circulação das células T-CAR murinas é menor comparada às células T-CAR humanas (55). Um exemplo importante da contribuição dos modelos singênicos foi fornecido pelos estudos do grupo de David Gilham que mostraram que CARs de segunda geração com domínios co-estimuladores de CD28 induziram aplasia de células B e toxicidade crônica seguida de um aumento de células supressoras derivadas de CD11b+Gr-1+ mieloides (MDSCs) (56) (57). O efeito inesperado das MDSCs poderia ser detectado apenas em um modelo singênico.

Os modelos de xenoenxerto se baseiam na injeção de tumores humanos e células T-CAR em camundongo imunocomprometido. Atualmente, a maioria dos modelos de camundongos de xenoenxerto de terapia com T-CAR usam a linhagem de camundongos NOD-SCID-IL2r γ null (NSG) (58). A linhagem parental de NOD-SCID foi obtida pelo cruzamento de camundongos não obesos diabéticos (NOD), que possuem imunidade inata prejudicada, com camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID), que são deficientes quanto ao sistema imune adaptativo. Os camundongos NSG foram desenvolvidos a partir da introdução de uma mutação no gene da cadeia γ do receptor de IL-2 que resultou na perda da transdução de sinal de inúmeras citocinas e imunodeficiência aumentada comparada aos camundongos NOD-SCID. Os modelos de xenoenxerto são frequentemente usados para validar estudos de prova de conceito. Como nesse modelo, as células T-CAR humanas interagem com

o tecido tumoral humano na ausência de um sistema imune funcional, e os modelos de xenoenxerto são ferramentas para testar a seletividade de novos ou mais complexos construtos de CAR. Uma área de interesse está no desenvolvimento de CARs que dependam de múltiplos TAAs para ativação total para diminuir a chance de efeitos fora do tumor ou fuga de antígeno. Exemplos de novas estratégias de células T-CAR avaliadas em modelos de xenoenxerto são a) CARs biespecíficos direcionando tanto CD19 quanto CD20 para o tratamento de linfomas e leucemia linfoblástica aguda (59), b) CARs anti-EGFR mascarados (masked CARs) em que os scFVs são complexados com um peptídeo que possui um ligante que é clivado pelas proteases expressas pelas células tumorais, mas não pelos tecidos saudáveis (60) c) Ativação mediada por dispositivo e redirecionamento das células T-CAR (Switch-CAR) que direcionam a um novo epítipo introduzido em um anticorpo de ligação por TAA (61). Os modelos de xenoenxerto também foram usados para compreender os mecanismos de exaustão das células CAR-T. Em duas células CAR-T humanas de segunda geração, a exaustão foi evitada com a coestimulação de 4-1BB e exacerbada pela coestimulação de CD28 (62).

Modelos de xenoenxerto derivados (PDX) de pacientes representam um subtipo específico de modelo de xenoenxerto gerado pela implantação de uma biópsia de tumor primário em vez da injeção de linhagens celulares tumorais em um hospedeiro imunocomprometido. As vantagens dos modelos de PDX são a melhor obtenção da heterogeneidade do tumor e prevenção da exposição a ambientes artificiais usados nos experimentos in vitro. Em um modelo de PDX de hepatocarcinoma, Jiang et al. mostraram que ele prevê com precisão a resposta do paciente e poderia ser útil em determinar o curso do tratamento, como uma combinação de bloqueio de checkpoint e terapias com T-CAR (63).

Camundongos transgênicos imunocompetentes têm sido o modelo usado com menos frequência nos estudos com T-CAR. Sua utilidade conta com seu potencial para avaliação dos efeitos tumorais do alvo fora do tumor. Esses camundongos transgênicos são desenvolvidos por engenharia para não possuírem a expressão de um TAA murino (knockout) e para expressar um TAA humano (knockin) em tecidos específicos e em certo nível. Pegram et al. relataram que o tratamento com células T-CAR CD19 específicas, que foram posteriormente modificadas para secretar IL-12 constitutivamente, foi capaz de erradicar a doença estabelecida na ausência de condicionamento prévio (36). Além disso, a eliminação do tumor exigiu subconjuntos de células T CD4(+) e CD8(+), estimulação autócrina de IL-12 e secreção subsequente de IFN γ por células CAR(+) T. Os autores propõem que a terapia adotiva com o uso de células T direcionadas por CAR e modificadas para secretar IL-12 poderia prevenir ou reduzir a necessidade de regimes de condicionamento (36).

Camundongos transgênicos humanizados são camundongos imunocomprometidos submetidos ao implante de células imunes humanas além do tumor humano e das células T-CAR-T. A principal vantagem desse modelo é o fato de que esses camundongos são tolerantes às células humanas e ainda possuem aspectos do sistema imune humano. Vários grupos usaram camundongos NSG transplantados com células CD34+ humanas para investigar a toxicidade das CAR-T contra as células-tronco hematopoiéticas (CTH). Em um modelo de sistema imune humanizado (HIS), camundongos recém-nascidos BALB/c Rag2-/-

yc -/-, subletalmente irradiados, receberam a injeção de células CD34+ humanas. O uso de camundongos imunodeficientes recém-nascidos foi importante porque eles suportaram melhor o desenvolvimento das células T, uma vez que eles não mostram involução do timo e atividade fagocítica contra a enxertia de células imunes humanas vista em camundongos adultos. Hombach et al. usaram um modelo HIS para testar se células T-CAR anti-CD30 poderiam erradicar o linfoma sem aplasia duradoura de células B (64). As CTH também expressam CD30 durante ativação, mas em níveis menores do que as células do linfoma. Essa diferença no nível de expressão, bem como a expressão do inibidor de granzima B pelas CTH, pode ter contribuído para a proteção das CTH enxertadas a partir da toxicidade mediada pelas T-CAR. Uma grande preocupação quanto aos modelos humanizados é o fato de que as taxas de células linfoides e mieloides produzidas pelas células CD34+ humanas, assim como o perfil das citocinas circulantes, são diferentes daquelas encontradas em humanos e, portanto, não refletem o desenvolvimento da célula imune humana.

Pelo exposto acima, fica claro que não há um único modelo de camundongo capaz de contemplar todos os aspectos envolvidos na eficácia e segurança da terapia com T-CAR, mas trata-se de uma área em movimento em que houve melhorias significativas na humanização dos sistemas imunes murinos. No momento, ainda precisamos da associação de vários modelos animais que fornecerão informações complementares sobre os diferentes aspectos do tratamento com células T-CAR. Contudo, é evidente que os modelos animais são ferramentas essenciais para prever a segurança e eficácia das T-CAR no cenário clínico.

CONCLUSÃO

A ciência do desenvolvimento e produção das células T-CAR evoluiu em um ritmo rápido nos anos recentes. Embora muitos aspectos biológicos das células que expressam CAR ainda estão revelados, os parâmetros mínimos para a caracterização da função das células T-CAR são amplamente aceitos pela comunidade científica. Abordamos aqui a maioria dos aspectos importantes para a caracterização de um produto celular à base de CAR funcional e de alta qualidade. Os ensaios biológicos para avaliação de tais parâmetros também são impactados por novos desenvolvimentos tecnológicos, enquanto esperam-se as atualizações constantes dos testes de validação.

É importante observar que novas tecnologias estão em desenvolvimento e a ciência revolucionária apoia os desenvolvimentos com células T-CAR de forma que novos aspectos da biologia das células T-CAR, como marcadores substitutos para efetividade antitumoral in vivo e exaustão/disfunção, possam ser incorporados como critérios de avaliação em um futuro próximo.

Agradecimento

RC recebe subsídios do CNPq# 442686/2020-0 e Pronon# 25000.021774/2019-13. VPC recebe subsídios da FAPESP# 2019/25309-0, FAPESP# 2013/08135-2, CNPq# 442484/2020-8 e Pronon# 25000.189625/2016-16. MHB recebe recursos do CNPq e FAPERJ.EMR e VCP também recebe recursos da FAPESP# 2020/07055-9. RNR e TGMO recebem recursos do CNPq# 44676/2020-4.

REFERÊNCIAS

1. SL M, TW L, J B, S R, M B, H B, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine*. 2018;378(5).
2. DY Q, Y H, D L, YS W, W W, YQ W. Paralleled comparison of vectors for the generation of CAR-T cells. *Anti-cancer drugs*. 2016;27(8).
3. PF L, M E. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 1994;68(1).
4. AR S, P S, H C, C B, JR E, F B. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110(4).
5. X W, Y L, B C, SM B. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5626).
6. G R. Development of safer gene delivery systems to minimize the risk of insertional mutagenesis-related malignancies: a critical issue for the field of gene therapy. *ISRN oncology*. 2012;2012.
7. N S-V, W N, M A, Z I. Contemporary Transposon Tools: A Review and Guide through Mechanisms and Applications of Sleeping Beauty, piggyBac and Tol2 for Genome Engineering. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(10).
8. KP M, K G, BS G, Z L, JA S, L M, et al. Investigation of product derived lymphoma following infusion of piggyBac modified CD19 chimeric antigen receptor T-cells. *Blood*. 2021.
9. Castellarin M, Sands C, Da T, Scholler J, Graham K, Buza E, et al. A rational mouse model to detect on-target, off-tumor CAR T cell toxicity. 2020.
10. L C, MH B. Moving receptor redirected adoptive cell therapy toward fine tuning of antitumor responses. *International reviews of immunology*. 2014;33(5).
11. SA R, S N-C, B M, LZ L, ZT G, Z M, et al. High-Affinity GD-2-Specific CAR T Cells Induce Fatal Encephalitis in a Preclinical Neuroblastoma Model. *Cancer immunology research*. 2018;6(1).
12. S G, AM K, S O, G W, J B, R R, et al. Enhanced CAR T cell expansion and prolonged persistence in pediatric patients with ALL treated with a low-affinity CD19 CAR. *Nature medicine*. 2019;25(9).
13. S R, SL H, Z W, SM N, H L, JF S, et al. Modulation of Target Antigen Density Improves CAR T-cell Functionality and Persistence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(17).
14. K C, L D, CJ T, M J, S F, G B-S, et al. Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2018;26(1).
15. K C, S K, E N, K H, L D. Replication-Competent Lentivirus Analysis of Vector-Transduced T Cell Products Used in Cancer Immunotherapy Clinical Trials. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2020;2086.
16. V P-C, PD M, A M, LD V, M dSFP, RN S, et al. Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion: from lentiviral production to in vivo studies. *Hematology, transfusion and cell therapy*. 2020;42(2).
17. M G, S W, V B, Z D, R G. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC biotechnology*. 2006;6.

18. Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, Beverloo HB, Costa D, Espinet B, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019;33(8):1851-67.
19. X W, I R. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Molecular therapy oncolytics*. 2016;3.
20. G L, J S, S P, W L, S Z, Y W, et al. Comparison of the Performance of Three Blood Culture Systems in a Chinese Tertiary-Care Hospital. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019;9.
21. D H, J S, M P, S B, O B-O, C T, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2009;32(2).
22. I X, B D, G L, D K, Y X, R F. Single-cell Analysis of CAR-T Cell Activation Reveals A Mixed T H 1/T H 2 Response Independent of Differentiation. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2019;17(2).
23. A S, V V, LA H, HA D, M Y, R H, et al. Clonal kinetics and single-cell transcriptional profiling of CAR-T cells in patients undergoing CD19 CAR-T immunotherapy. *Nature communications*. 2020;11(1).
24. R C-R, RB DR, FS S, ST R. Leveraging Single-Cell Sequencing for Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapies. *Trends in biotechnology*. 2021.
25. H S, E G-A, W Z, P R, C Y, CJ L, et al. BATF and IRF4 cooperate to counter exhaustion in tumor-infiltrating CAR T cells. *Nature immunology*. 2021;22(8).
26. RC L, EW W, E S, D G, P X, Z G, et al. c-Jun overexpression in CAR T cells induces exhaustion resistance. *Nature*. 2019;576(7786).
27. J C, IF L-M, H S, CJ L, LJ H, T S, et al. NR4A transcription factors limit CAR T cell function in solid tumours. *Nature*. 2019;567(7749).
28. F B, D S, T K, S W, R L, AD K, et al. Induction of a central memory and stem cell memory phenotype in functionally active CD4 + and CD8 + CAR T cells produced in an automated good manufacturing practice system for the treatment of CD19 + acute lymphoblastic leukemia. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2018;67(7).
29. M S, J H, M S, S G, V F, JD H, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood*. 2016;128(4).
30. S T, TN Y, RA G, CJ T, MC J, SR R. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood*. 2012;119(1).
31. L G, DE S, M L, C B. T memory stem cells in health and disease. *Nature medicine*. 2017;23(1).
32. J G, R P, WC L, GA G, CJ T. Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Frontiers in immunology*. 2020;11.
33. AM M, S S, K D, MR S, TJ S. ELISPOT Assay for Monitoring Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) Activity in Cancer Vaccine Clinical Trials. *Cells*. 2012;1(2).
34. TM C, AC H, PJ M, HK L, MA M. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(5).
35. Q X, E B, P P, C N, A K, T M, et al. Single-cell multiplexed cytokine profiling of CD19 CAR-T cells reveals a diverse landscape of polyfunctional antigen-specific response. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2017;5(1).
36. HJ P, JC L, EG H, GH I, TF T, M S, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*. 2012;119(18).
37. M Y, R Z, P G, C W, M B, LJ M, et al. Overcoming Immunological Resistance Enhances the Efficacy of A Novel Anti-tMUC-1-CAR T Cell Treatment against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cells*. 2019;8(9).
38. E D, XZ Y, L S, BR L, QQ L, Y Y, et al. IFN- γ surmounts PD-L1/PD1 inhibition to CAR-T cell therapy by upregulating ICAM-1 on tumor cells. *Signal transduction and targeted therapy*. 2021;6(1).
39. D A, RA W, S G, M M, M A, X Y, et al. IFN γ is Critical for CAR T Cell Mediated Myeloid Activation and Induction of Endogenous Immunity. *Cancer discovery*. 2021.
40. RE T, EK R, HC T. Revisiting the role of CD4 + T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer gene therapy*. 2021;28(1-2).
41. K F, J W, SK J, A G, X A, TT B, et al. CAR T-cells that target acute B-lineage leukemia irrespective of CD19 expression. *Leukemia*. 2021;35(1).
42. J R, P P, YW S, K M, B F, A K, et al. Preinfusion polyfunctional anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells are associated with clinical outcomes in NHL. *Blood*. 2018;132(8).
43. JN K, RPT S, T L, V S, A B, J R, et al. Lymphoma Remissions Caused by Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells Are Associated With High Serum Interleukin-15 Levels. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(16).
44. R DG, MM VL, A G, BP N, JJ F-VH, OJHM V, et al. Polyfunctional tumor-reactive T cells are effectively expanded from non-small cell lung cancers, and correlate with an immune-engaged T cell profile. *Oncoimmunology*. 2019;8(11).
45. JL T, CL C, J C, AC T, P B, F H, et al. Personalized cancer vaccine strategy elicits polyfunctional T cells and demonstrates clinical benefits in ovarian cancer. *NPJ vaccines*. 2021;6(1).
46. ZC D, L H, BR B, H Y, AL M, DH M, et al. Polyfunctional CD4 + T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy. *Blood*. 2012;120(11).
47. T K, A F, Y H, E C. Cancer immunotherapy: moving forward with peptide T cell vaccines. *Current opinion in immunology*. 2017;47.
48. EJ C, H G, V B, V H, RE H, DE G. CAR T cells: driving the road from the laboratory to the clinic. *Immunological reviews*. 2014;257(1).
49. S H, O H, R F. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in immunology*. 2017;38(6).
50. WA L, CH J. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell*. 2017;168(4).
51. MA S, VC M, HT M. Ex vivo analysis of T-cell function. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4).
52. A S, AD B, KM J, JW W, RH W, H Y, et al. Antigen presented by tumors in vivo determines the nature of CD8+ T-cell cytotoxicity. *Cancer research*. 2009;69(16).
53. GG K, VS D, AD D, W G, TL W. A novel multiparametric flow cytometry-based cytotoxicity assay simultaneously immunophenotypes effector cells: comparisons to a 4 h 51Cr-release assay. *Journal of immunological methods*. 2007;325(1-2).
54. EL S, P W. Preclinical Models in Chimeric Antigen Receptor

tor-Engineered T-Cell Therapy. Human gene therapy. 2018;29(5).

55. BM H, F W, L T, JP L, DW H. Concise review: humanized models of tumor immunology in the 21st century: convergence of cancer research and tissue engineering. Stem cells (Dayton, Ohio). 2015;33(6).

56. EJ C, RE H, H B, AL ON, SJ D, DE G. Natural expression of the CD19 antigen impacts the long-term engraftment but not antitumor activity of CD19-specific engineered T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(4).

57. EJ C, V S, DG R, JS B, G A, V H, et al. Differential role of Th1 and Th2 cytokines in autotoxicity driven by CD19-specific second-generation chimeric antigen receptor T cells in a mouse model. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2014;192(8).

58. NC W, LL K, S J, KE A, DL G, MA B, et al. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. Annual review of pathology. 2017;12.

59. E Z, MY L, A S-B, MC J, YY C. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. Cancer immunology research. 2016;4(6).

60. X H, PD B, Y Z, GE C, S L, Y G, et al. Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2017;25(1).

61. DT R, M M, EN H, Y C, NS R, IR H, et al. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

States of America. 2016;113(4).

62. AH L, WM H, JF S, KM W, M M, M I, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. Nature medicine. 2015;21(6).

63. Z J, X J, S C, Y L, X W, B L, et al. Anti-GPC3-CART Cells Suppress the Growth of Tumor Cells in Patient-Derived Xenografts of Hepatocellular Carcinoma. Frontiers in immunology. 2017;7.

64. AA H, A G, M C, F M, J K, B G, et al. Superior Therapeutic Index in Lymphoma Therapy: CD30(+) CD34(+) Hematopoietic Stem Cells Resist a Chimeric Antigen Receptor T-cell Attack. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(8).

65. Brasil. MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No 508, de 27 de maio de 202. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências [Internet]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-508-de-27-de-maio-de-2021-323013606>

66. EMA. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. 2018. (https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf).

67. FDA. Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up. 2020 (<https://www.fda.gov/media/113790/download>).

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