



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

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

Leonardo Chicaybam Peixoto

Desenvolvimento de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado em CARs ativadores e inibitórios

Orientador: Prof. Dr. Martin H. Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2016**



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

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

Leonardo Chicaybam Peixoto

Desenvolvimento de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado em CARs ativadores e inibitórios

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

Orientador (es): Prof. Dr. Martin H. Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2016**

Palavras-chave: 1. Linfócito T 2. Receptor Quimérico de Antígeno 3. Imunoterapia



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

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

Leonardo Chicaybam Peixoto

Desenvolvimento de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado em CARs ativadores e inibitórios

ORIENTADOR: Prof. Dr. Martin H. Bonamino

Aprovada em: 18 / 10 / 16

EXAMINADORES:

Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola
Prof. Dr. Claudia Esther Rocio Hassan
Prof. Dr. Elaine Sobral da Costa
Prof. Dr. Renata de Meirelles Santos Pereira
Prof. Dr. Bárbara Monte-Mor – Suplente I
Prof. Dr. Zilton Vasconcelos – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2016**



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Desenvolvimento de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado em CARs ativadores e inibitórios

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Leonardo Chicaybam Peixoto

Introdução: O uso de linfócitos T para o tratamento do câncer tem sido dificultado pela baixa persistência das células infundidas e pela dificuldade de isolar e expandir linfócitos reativos contra o tumor. A utilização de receptores quiméricos de antígeno (CARs) permite evitar alguns desses problemas. CARs redirecionam a especificidade dos linfócitos, reconhecendo o antígeno alvo com alta afinidade, de modo MHC-independente e induzem a ativação destas células através de domínios citoplasmáticos derivados de moléculas como CD3 ξ ou 4-1BB. No contexto da leucemia linfóide aguda de precursores B, linfócitos redirecionados contra CD19 (CAR 19BBz) são usados clinicamente, visto que os blastos leucêmicos expressam este antígeno. No entanto, como o CD19 é expresso por toda a linhagem B, isto pode acarretar efeitos colaterais como a depleção de células B maduras saudáveis. **Objetivo:** Como as células saudáveis expressam CD19 e CD20, nós propomos a criação de um CAR inibitório que reconheça o antígeno CD20, que quando utilizado em conjunto com o 19BBz, permita que o sistema discrimine entre os blastos leucêmicos e as células B maduras. **Métodos:** CARs anti-CD20 20CTLA4, 20PD1, 20LAG3 e 20BTLA foram construídos contendo domínios de sinalização derivados de receptores inibitórios. Células Jurkat expressando o plasmídeo pGL4.30 – um sistema reporter de ativação que expressa a proteína luciferase sob o controle de NFAT – foram geradas. Como células alvo utilizamos a linhagem K562 modificada para expressar CD19 (K519), CD20 (K520) ou CD19 e CD20 (K5D). O sistema transposon *Sleeping Beauty* foi usado para a modificação de linfócitos T primários humanos. **Resultados:** Células Jurkat expressando o 19BBz apresentaram alta atividade de luciferase quando cocultivadas com K519 ou K5D. No entanto, células Jurkat expressando 19BBz e um dos CARs inibitórios apresentaram uma grande redução na atividade de luciferase quando foram cocultivadas com as K5D, apesar de apresentarem alta atividade quando cultivadas com a K519, com exceção do CAR 20LAG3. Além disso, o CAR 20PD1 induziu uma diminuição do marcador de ativação CD69 e da produção de IL-2 em células Jurkat ativadas através do 19BBz. Em células T primárias humanas, o CAR 20PD1 não foi capaz de inibir a proliferação e a atividade citotóxica induzida pelo 19BBz. O 20PD1 também não foi capaz de inibir o CAR de primeira geração 19z, que não possui o domínio coestimulatório derivado do 4-1BB, mostrando que este domínio inibitório é ineficiente em nosso sistema. **Conclusões:** CARs 20PD1 e 20BTLA têm atividade inibitória em células Jurkat. No entanto, experimentos adicionais são necessários para avaliar a atividade de 20PD1 em células T humanas primárias. Experimentos com CARs inibitórios adicionais (20BTLA, 20LAG3 e 20PD1LAG3) e podem servir como uma alternativa ao CAR 20PD1 na construção de um sistema de resposta condicional. concondicional.CTLA-4 e BTLA em linfócitos humanos primários.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Desenvolvimento de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado em CARs ativadores e inibitórios

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Leonardo Chicaybam Peixoto

Introduction: The use of adoptive transfer of T cells for the treatment of cancer is hampered by low avidity and persistence of infused cells and the difficulty in isolating and expanding antitumor lymphocytes. The use of chimeric antigen receptors (CARs) avoids some of these problems. CARs consist of an antigen recognition unit (Fab fragment as scFv), a transmembrane region and an intracellular activation domain. CARs redirect the specificity of lymphocytes, recognizing the target antigen with high affinity and independently of MHC. However, on target/off tumor responses due to target recognition in normal cells limits the widespread application of this therapy. The CD19 antigen represents a good target for elimination of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and lymphocytes expressing anti-CD19 CARs (19BBz) are being used in the clinical setting. However, the expression of CD19 as a pan-B marker can lead to undesired side effects such as depletion of mature B cells. **Objective:** As mature B cells express both CD19 and CD20 antigens, we propose the creation of an inhibitory anti-CD20 CAR, that when used in combination with 19BBz would be able to discriminate between leukemic blasts and normal B cells. **Methods:** CARs 20CTLA4, 20PD1, 20LAG3 and 20BTLA were constructed containing signaling domains derived from inhibitory receptors. As a reporter system to test our hypothesis, Jurkat T cells expressing the plasmid pGL4.30 - expressing luciferase controlled by a NFAT responsive promoter - were generated. K562 cell line was used as target cells and modified to express CD19 (K5-19), CD20 (K5-20) or CD19 and CD20 (K5-19/20). The *Sleeping Beauty* transposon was used to modify primary human T lymphocytes. **Results:** In coculture experiments, Jurkat cells expressing 19BBz showed induction of luciferase activity when cultured with K5-19 or K5-19/20. However, Jurkat expressing both activation and inhibitory CARs showed inhibition of luciferase activity when incubated with K5-19/20 while maintained high activity when cultured with K5-19 cells, with exception of 20LAG3. Furthermore, 20PD1 was able to inhibit the expression of the activation marker CD69 and IL-2 production induced by 19BBz in Jurkat cells. In primary human T cells, the 20PD1 CAR did not inhibit proliferation or cytotoxicity induced by 19BBz. The 20PD1 CAR was also unable to inhibit the first generation 19z CAR, which lacks the 4-1BB coestimulatory endodomain, showing that PD1-mediated inhibition in our system is inefficient. **Conclusions:** CARs 20PD1 and 20BTLA have inhibitory activity in Jurkat T cells. However, additional experiments are needed to evaluate the activity of 20PD1 in primary human T cells. Experiments with additional inhibitory CARs (20BTLA, 20LAG3 and 20PD1LAG3) are ongoing and can serve as an alternative to CAR 20PD1 in the construction of a conditional response system.

ÍNDICE

1) Introdução	1
1.1) Tratamento atual de cancer	1
1.2) Relação entre os linfócitos T e o câncer	2
1.2.1) Linfócito T e suas subpopulações	2
1.2.2) Imunovigilância e imunoeedição	3
1.2.3) Padrão de expressão de antígenos tumorais	5
1.3) Imunoterapia como nova opção de tratamento	6
1.3.1) Histórico	6
1.3.2) Anticorpos monoclonais	8
1.4) Transferência Adotiva de linfócitos T	10
1.4.1) Importância das subpopulações infundidas e da indução de linfopenia	10
1.4.2) Linfócitos infiltrantes do tumor	12
1.5) Receptores Quiméricos de Antígeno (CARs)	14
1.5.1) Estrutura - domínio extracelular e transmembrana	16
1.5.2) Estrutura - domínio intracelular	17
1.5.3) Teste clínicos	22
1.6) Leucemia Linfóide Aguda – B (LLA-B)	24
1.7) Importância da resposta condicional	26
1.7.1) Respostas contra o tecido normal	26
1.7.2) O uso de domínios inibitórios para a criação de um sistema condicional de ativação dos linfócitos T	27
2) Objetivos	32
3) Materiais e métodos	33
3.1) Plasmídeos	33
3.2) Linhagens celulares	33
3.3) Detecção dos CARs	34
3.4) 3.4 Geração de linhagens de Jurkat 4.30 expressando diferentes combinações de CARs	34
3.5) Ensaio de transativação do NFAT baseado em luciferase	34
3.6) Avaliação do marcador de ativação CD69	34

3.7) Avaliação da produção de IL-2	35
3.8) Origem das células primárias de doadores	35
3.9) Geração de células T primárias CAR+	35
3.10) Fenotipagem dos linfócitos T e linhagem L388	36
3.11) Avaliação de linfócitos T produtores de IFN γ	37
3.12) Avaliação da exposição de fosfatidilserina (PS) em linfócitos T	38
3.13) Ensaio de lise	38
4) Resultados	39
4.1) Estabelecimento de um protocolo para a modificação genética de células Jurkat e linfócitos T primários	39
4.2) Avaliação dos CARs inibitórios anti-CD20 na linhagem Jurkat	44
4.3) Avaliação da função inibitória do CAR 20PD1 sobre a expansão de linfócitos primários humanos	50
4.4) Efeito do CAR 20PD1 sobre a produção de IFN γ e indução de Apoptose	56
4.5) Avaliação da função inibitória do CAR 20PD1 sobre a atividade citotóxica de linfócitos primários humanos	57
5) Discussão	64
6) Conclusões	68
7) Referências	69
8) Anexos	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
AICD	Morte celular induzida por ativação (<i>activation induced cell death</i>)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APC	Célula apresentadora de antígeno (<i>antigen presenting cell</i>)
CAR	Receptor quimérico de antígeno (<i>chimeric antigen receptor</i>)
CD	<i>Cluster designation</i>
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento (<i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CDR	Região determinante de complementariedade (<i>complementarity determining regions</i>)
CLP	Progenitor linfóide comum (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	Progenitor mielóide comum (<i>common myeloid progenitor</i>)
CsA	Ciclosporina A
DC	Célula dendrítica (<i>dendritic cell</i>)
DECH	Doença enxerto contra hospedeiro
DLI	Infusão de linfócitos do doador (<i>donor lymphocyte infusion</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECL	Enxerto contra a leucemia

GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
HPV	Vírus do papiloma humano (<i>human papilloma virus</i>)
HSC	Célula tronco hematopoiética (<i>hematopoietic stem cell</i>)
IFN	Interferon
ITAM	Motivos ativadores baseados em tirosina dos imunoreceptores (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
ITIM	Motivos inibitórios baseados em tirosina dos imunoreceptores (<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>)
ITSM	Motivos de troca baseados em tirosina dos imunoreceptores (<i>immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>)
LLA	Leucemia linfóide aguda
mHAgs	Antígenos de histocompatibilidade menor (<i>minor histocompatibility antigens</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MLV	Vírus da leucemia murina Moloney (<i>Moloney murine leukemia virus</i>)
NK	Assassino natural (<i>natural killer</i>)
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMA	Forbol miristato acetato (<i>phorbol miristate acetate</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa (<i>reverse transcription</i>)

scFv	Fragmento variável de cadeia única (<i>single chain variable fragment</i>)
SOE	<i>Splicing by overlapping extension</i>
TAA	Antígeno associado ao tumor (<i>tumor-associated antigen</i>)
TCR	Receptor de célula T (<i>T cell receptor</i>)
TIL	Linfócito infiltrante do tumor (<i>tumor-infiltrating lymphocyte</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TPH	Transplante de precursores hematopoiéticos
TSA	Antígeno específico do tumor (<i>tumor-specific antigen</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Lista de anticorpos utilizados para fenotipagem dos linfócitos T e linhagens	37
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Esquema comparando a estrutura dos anticorpos utilizados na clínica (quiméricos e humanizados) com os murinos e humanos. 10
- Figura 1.2: Gráfico ilustrando a evolução das taxas de respostas objetivas em pacientes com melanoma metastático após tratamento com imunoterapias. ACT = transferência adotiva de linfócitos; NMA = regime não mieloablativo; TBI= irradiação de corpo total. Adaptado de (ROSENBERG; DUDLEY, 2009). 14
- Figura 1.3: Esquema descrevendo a estrutura do CAR. Do lado direito estão descritas as potenciais vantagens de cada região do receptor. Adaptado de (CHICAYBAM; SODRÉ; BONAMINO, 2011) 16
- Figura 1.4: Esquema mostrando os receptores da família CD28 e TNF. Enquanto a família TNF (B) apresenta apenas receptores coestimulatórios, a família CD28 (A) possui receptores coestimulatórios e inibitórios. A: adaptado de (PARRY; RILEY; WARD, 2007); B: adaptado de (WATTS, 2005). 19
- Figura 1.5: Esquema ilustrando as principais vias ativadas por CD28. O domínio citoplasmático desta molécula apresenta um motivo YMNM capaz de ser fosforilado, provavelmente pelas cinases Lck ou Fyn. Este motivo fosforilado é capaz de recrutar proteínas que contenham o domínio SH2, como a PI3K e o adaptador GRB2. A via de PI3K produz mediadores lipídicos como PIP3, que induz a co-localização na face interna da membrana plasmática das cinases PDK-1 e PKB-Akt através da interação com os domínios de homologia a pleckstrina (PH) presentes nestas proteínas. PDK-1 fosforila e ativa PKB-Akt, que possui um papel crucial na produção de IL-2 e IFN- γ . Essa via também apresenta um importante efeito antiapoptótico, induzindo a expressão de Bcl-xL (não mostrado). Adaptado de (RUDD; SCHNEIDER, 2003). 20
- Figura 1.6: Esquema apresentando os principais efeitos da estimulação via 4-1BB. Estes efeitos são decorrentes da sinalização via TRAF2, que em última análise ativa AKT, NF κ B e AP-1. Adaptado de (CROFT, 2003). 21

- Figura 1.7: Esquema da ontogenia da linhagem B, apresentando os principais marcadores expressos nas diferentes etapas de diferenciação. Adaptado de PUI; EVANS, 2006. 24
- Figura 1.8: Representação esquemática dos mecanismos de ação dos receptores inibitórios da família CD28. Esses receptores são capazes de suprimir a proliferação e secreção de citocinas por meio do recrutamento de fosfatases como SHP-1 e SHP-2, que inibem a ativação de proteínas-chave (por exemplo, PI3K) da via de sinalização do TCR. Adaptado de (MURPHY; NELSON; SEDÝ, 2006). 28
- Figura 1.9: Esquema demonstrando o princípio da eventual terapia utilizando o sistema de CARs ativadores/inibitórios. As células T são modificadas *ex vivo*, expandidas e infundidas. Estas células migram para o sítio da doença, onde encontram células B normais e malignas. As células T reconhecem as células B normais, mas não se tornam ativadas devido à expressão de CD20 pela célula alvo, que interage com o CAR inibitório. Já a célula B maligna não expressa CD20, tornando-se alvo da célula T infundida pois apenas o receptor de ativação (anti- CD19) é ligado. Adaptado de (SADELAIN; RIVIÈRE; BRENTJENS, 2003). 31
- Figura 3.1: Esquema experimental utilizado para a modificação genética e expansão de linfócitos primários humanos. 36
- Figura 3.2: Estratégia de *gating* seguida no experimento de lise. Os *gates* seguem a hierarquia {Viáveis [GFP (CD20)]}. 39

Figura 4.1: Otimização da eletroporação em PBMCs humanos. (A) PBMC de dois doadores saudáveis foram eletroporados usando 7 diferentes tampões e 4ug de plasmídeo pT2-GFP. A viabilidade celular e a expressão da GFP foram analisadas após 24 horas por citometria de fluxo. A viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo através do perfil de FSC/SSC e foi normalizada em relação às células eletroporadas sem plasmídeo (mock; considerado 100%). Os valores mostrados são a média de dois doadores em triplicata e estão mostrados como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA One Way e Tukey pós-teste (* = P, 0,05). (B) Gráficos representativos da expressão de GFP (pT2-GFP; 4ug) 24 horas após a eletroporação com tampão 1SM. Os números representam a porcentagem de células no *gate*. Linha cinza = controle negativo; linha preta = células eletroporadas com pT2-GFP. (C) Linfócitos eletroporados foram corados para CD4 e CD8 24h após a eletroporação com tampão 1SM e 4ug plasmídeo pT2-GFP. Os dados são representativos de dois doadores. Os números representam a porcentagem de células no *gate*. 41

Figura 4.2: Expressão de longo prazo de GFP após eletroporação com o tampão 1SM. PBMCs de dois doadores foram eletroporados com 4ug de pT2-GFP utilizando-se o tampão 1SM. Após 24h as células foram ativadas com anti-CD3/anti-CD28 e a expressão foi avaliada por citometria de fluxo. 42

Figura 4.3: Eletroporação da linhagem Jurkat. (A) Células Jurkat foram eletroporadas com 4ug do plasmídeo pT2-GFP utilizando-se um dos 7 tampões. Viabilidade e expressão de GFP foram avaliadas por citometria de fluxo após 24h. A viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo através do perfil de FSC/SSC e é expressa como % do controle eletroporados sem plasmídeo (mock; considerado 100%). A análise estatística foi realizada através de ANOVA e teste de Tukey (*: P=0,05). (B) Células Jurkat foram eletroporadas com tampão 3P. A viabilidade celular e expressão GFP foram observados até d+20. Os valores nesta figura são a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata e são mostrados como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não parado; P = 0,05 (*); P = 0,01 (**). 43

Figura 4.4: Análise da atividade de luciferase em células Jurkat após 8h de incubação com as células alvo na proporção 1:1 ou PMA+Ionomicina (P+I). O gráfico mostra a média média \pm desvio padrão e é representativo de dois experimentos realizados em triplicata. 44

Figura 4.5: PBMCs de um doador foram eletroporadas com 20ug de pT3-20z e 0,5ug de SB100x usando o tampão 1SM e no dia seguinte as células foram estimuladas com L388 irradiadas. (A) A expressão do CAR foi avaliada até o d+30 por citometria de fluxo utilizando-se um anticorpo anti-Fab (linha vermelha = células eletroporadas sem plasmídeo – mock – marcadas com anti-Fab; linha preta = linfócitos eletroporados com 20z). (B) Dados da expressão do 20z até o d+30, resumindo os dados do painel A. (C) Cinética de expansão das células mock (Neg) ou 20z+ após estímulo com L388. (D) Os linfócitos expandidos foram utilizados em diferentes razões efetora/alvo (E/A) em ensaio de lise contra as células da linhagem Nalm-6 GFP+ CD20+.

Figura 4.6: Expressão dos diferentes CARs na linhagem Jurkat 4.30 após purificação por sorting. As células foram eletroporadas utilizando-se o tampão 3P e os plasmídeos codificando os CARs indicados. Os CARs foram detectados por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-myc conjugado a Alexa488 (A488) (para detecção do 19BBz) e anti-Fab conjugado a biotina revelado com uma estreptavidina-PECy5 (para detecção dos CARs anti-CD20).

Figura 4.7: Ensaio de luciferase utilizando células Jurkat expressando diferentes combinações de CARs. Células Jurkat (10^5) foram incubadas na proporção de 1:1 com as células alvo por 8h. Após este período as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi avaliada utilizando-se um luminômetro. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Figura 4.8: Análise por citometria de fluxo do marcador de ativação CD69 24h após a co-incubação das células Jurkat expressando diferentes combinações de CARs com as células alvo. A proporção de Jurkat:alvo foi de 1:1. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey.

Figura 4.9: A produção da citocina IL-2 foi avaliada por ELISA após 24h de co-cultura entre as células Jurkat e as células alvo na proporção de 1:1. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey. 49

Figura 4.10: Fenotipagem da linhagem L388. Células da linhagem L388 foram marcadas com anticorpos para detecção das proteínas de membrana CD80, CD86 (moléculas coestimulatórias), MHC classe I, PDL1 (ligante do receptor PD-1), CD19 e CD20 (marcadores de células B) e analisadas por citometria de fluxo. Os números em negrito representam os percentuais de células dentro dos *gates*. 50

Figura 4.11: Gráficos mostrando o fenótipo dos linfócitos T obtidos após 13 dias de expansão com L388 para o doador 3. Em (A) foi determinada a composição de T (CD3+), NK (CD3-CD56+) e NKT (CD3+CD56+) nas células expandidas. O valor obtido para CD4+ e CD8+ está contido dentro da população de linfócitos T CD3+. Em (B) e (C) estão mostradas as subpopulações de linfócito T de memória para CD4+ e CD8+, respectivamente. MC = memória central (CCR7+ CD62L+); ME = memória efetora (CCR7+ CD62Lneg); linfócitos efetores foram determinados como CCR7neg CD62Lneg. 51

Figura 4.12: Gráfico representativo da expressão dos CARs após 20 dias de expansão usando como estímulo a linhagem L388. As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo. Os quadrados coloridos nos painéis do meio ilustram as cores utilizadas para identificar as três diferentes subpopulações da condição 19BBz 20PD1 nos resultados descritos nesta tese: linfócitos 19BBz+ (azul), 20PD1+ (vermelho) e 19BBz+ 20PD1+ (verde). 52

Figura 4.13: Expressão dos CARs nas condições 19BBz e 19BBz 20PD1 ao longo do ciclo de expansão após estímulo com L388. (A) e (B) são dois doadores distintos (doador 1 e 2, respectivamente). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos. 53

Figura 4.14: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 3, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19z+20PD1 em (B) e 19BBz+20PD1 em (C). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos. 54

Figura 4.15: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 4, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19z 20PD1 em (B) e 19BBz 20PD1 em (C). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos. 55

Figura 4.16: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 5, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19BBz 20PD1 em (B), 19BBz 20PD1mut em (C) e 19BBz 20trunc em (D). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos. 56

Figura 4.17: Impacto da expressão de 20PD1 sobre a produção de IFN γ e exposição de PS. (A) Linfócitos produtores de IFN γ foram identificados por citometria de fluxo após 6h de incubação com as células alvo Nalm-6 CD20 (Nalm20) ou L388. Monensina foi adicionada após 2h do início da co-cultura. (B) Exposição de PS detectada utilizando-se AnexinaV – FITC após co-cultura com as células alvo indicadas por 6h. Em ambos os experimentos as células alvo foram excluídas da análise utilizando-se um anticorpo anti-CD19 FITC, permitindo a análise apenas nas células CD19 negativas (linfócitos T). A tabela mostra o percentual de células CAR+ no dia de ambos os ensaios. 57

Figura 4.18: Avaliação da expressão de GFP e CD20 na linhagem Nalm-6 GFP+. Em (A) estão mostradas as células Nalm-6 GFP, com 87,3% de expressão desta proteína. Em (B) as células Nalm-6 GFP foram transduzidas com o vetor lentiviral EF1 α -CD20 e avaliadas 1 semana depois. A proteína CD20 foi detectada utilizando-se um anticorpo anti-CD20 APC. 58

Figura 4.19: Resultado do ensaio de citotoxicidade dos doadores 1 (A, B) e 2 (C, D) realizado no fim do 2 ciclo (d29). No gráfico (A) e (C) está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no (B) e (D) a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

Figura 4.20: Resultado do ensaio de citotoxicidade do doador 4 (A e B) e 5 (C e D) realizado no fim do 2 ciclo (d20 e d23 respectivamente). No gráfico A e C está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no B e D a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

Figura 4.21: Resultado do ensaio de citotoxicidade do doador 5 realizado no fim do 1 ciclo (d25). No gráfico A está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no B a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

Figura 4.22: Gráfico representativo da expressão dos CARs 19BBz e 20PD1 utilizando diferentes massas de plasmídeo. Painel da esquerda: Neg (controle negativo eletroporado sem plasmídeo); painel do meio: 10ug de cada plasmídeo; painel da direita: 18ug do 19BBz e 2ug do 20PD1. Esta análise foi realizada no d25, mesmo dia do experimento da figura 4.21. As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo. 63

Figura 4.23: Comparação entre a utilização de um anticorpo anti-CD20 ou corante eFluor 670 para identificação e análise da fração CD20+. Os linfócitos expressando as diferentes combinações de CARs foram incubados na proporção de 3:1 com as células alvo Nalm-6/Nalm-6 CD20+ e incubadas por 4h. A razão mostrada refere-se ao percentual de células CD20+ identificadas através do anticorpo anti-CD20 APC (método anti-CD20) ou através do corante eFluor 670 (método eFluor). 64

1) Introdução

1.1) Tratamento atual de câncer

Segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2014-2015 ocorrerão mais de 570.000 novos casos de câncer no Brasil. Esta doença é decorrente de um processo de transformação, ou tumorigênese, das células normais de um indivíduo. Estas células transformadas adquirem vantagens seletivas sobre as células normais através de uma série de eventos genéticos e epigenéticos que incluem mutações no DNA, mudanças na expressão de genes e, em muitos casos, perda de quantidade significativa de material genético. De modo geral, as células cancerosas possuem capacidade de proliferação ilimitada e de evadir os mecanismos de apoptose, além de serem insensíveis aos sinais anti-proliferativos fisiológicos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os tratamentos atuais para os diversos tipos de câncer baseiam-se principalmente em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, terapias pouco específicas e que acarretam efeitos colaterais graves para o paciente. Além disso, as taxas de cura alcançadas com estes tratamentos são muito variáveis. Mais recentemente, o desenvolvimento de áreas como biologia molecular e bioquímica estrutural permitiu a elucidação de diversas vias importantes para o processo oncogênico. Isto possibilitou o desenvolvimento racional de drogas, como os inibidores de tirosina cinases, desenhadas para se ligarem especificamente em determinada molécula e inibir a sua atividade. No entanto, a maioria dos pacientes eventualmente desenvolve resistência, causada pela amplificação do gene da proteína cinase ou pela seleção de um clone que possui mutações secundárias na proteína alvo ou mesmo pela ativação de vias alternativas de sinalização, sendo uma terapia incapaz de curar a doença.

Nos últimos anos o grande avanço na compreensão da biologia do câncer permitiu o desenvolvimento de novas drogas e novos regimes de tratamento, além de proporcionar melhorias no diagnóstico. Ainda assim, com as terapias atuais empregadas na clínica, 30% a 40% dos pacientes morrem da doença. Com isso torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novas terapias, de preferência direcionadas especificamente contra o tumor, visando a diminuição dos efeitos colaterais e o aumento da taxa de sobrevivência e da qualidade de vida do paciente.

1.2) Relação entre os linfócitos T e o câncer

1.2.1: Linfócito T e suas subpopulações

Os linfócitos T são pertencentes ao sistema imune adaptativo, sendo as células efetoras da imunidade celular. A geração destas células tem início na medula óssea, através do processo de hematopoiese. Durante este processo, a célula tronco hematopoiética gera dois precursores que vão dar origem à linhagem mielóide ou linfóide: o progenitor mielóide comum (CMP) e o progenitor linfóide comum (CLP) (DOULATOV et al., 2012). O CLP por sua vez gera precursores comprometidos com a diferenciação de linfócitos T, que migram para o timo, gerando as células T maduras. Durante a passagem pelo timo o locus gênico do receptor da célula T (TCR) sofre rearranjos, gerando TCRs com a diversidade necessária para o reconhecimento de praticamente qualquer antígeno. Além disso, este repertório recém formado é moldado pelos mecanismos de seleção positiva e negativa, que vão eliminar as células com alta capacidade de reconhecer o complexo antígeno-MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e também as incapazes de reconhecê-lo (KLEIN et al., 2014).

As células T maduras se dividem em duas grandes populações: os linfócitos CD8⁺ e CD4⁺. Os linfócitos CD8⁺ efetores são células com função citotóxica, sendo diretamente responsáveis pela eliminação da célula alvo através da liberação de perforinas e granzimas. Estes linfócitos, após encontro com o antígeno, podem gerar duas populações de células de memória capazes de responder rapidamente ao reestímulo (CHANG; WHERRY; GOLDRATH, 2014). Os linfócitos de memória central são definidos pela presença na membrana das moléculas CD45RO, CD62L e CCR7 e, apesar de possuírem uma grande capacidade de proliferação e migração para o linfonodo, não possuem capacidade efetora imediata. Os linfócitos de memória efetora são CD45RO⁺ e negativos para CD62L e CCR7. Apresentam atividade efetora imediata, mas pouca capacidade de proliferação. Os linfócitos CD4⁺, após reconhecimento do antígeno e ativação, produzem citocinas que são capazes de modular atividade de outras células, como linfócitos CD8⁺, macrófagos e células B. Também podem gerar células de memória central e efetora. Além disso, estas células podem se diferenciar em quatro subpopulações com diferentes fenótipos e funções (DE OBALDIA; BHANDOOOLA, 2015). A população Th1 produz citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , tendo um papel crucial na resposta contra vírus e patógenos intracelulares, além de aumentar a função das células CD8⁺. A população Th2 está envolvida em processos de alergia, ativação de eosinófilos e células B através da produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. A população Th17 é caracterizada pela produção de altos níveis de IL17A e IL17F, além de IL-9

e IL-21. Esta população está envolvida na defesa contra organismos extracelulares, respostas autoimunes e recrutamento de neutrófilos para os sítios de inflamação. Já as células T reguladoras (Treg) estão envolvidas na regulação e supressão de linfócitos através da produção de citocinas como IL-10 e TGF- β . É importante frisar que tanto as subpopulações CD4+ quanto as CD8+ não são estáticas e possuem uma alta plasticidade, permitindo a interconversão de fenótipos e funções mediante estímulos ainda não totalmente identificados (NAKAYAMADA et al., 2012; COSMI et al., 2014).

1.2.2: Imunovigilância e imunoeedição

O papel do sistema imune e, principalmente dos linfócitos T, no desenvolvimento tumoral foi um tópico de grande discussão durante décadas. Em 1967, Burnet propôs a teoria da imunovigilância, onde o sistema imune atuaria como uma sentinela, reconhecendo e eliminando células tumorais recentemente transformadas (BURNET, 1967). No entanto, recentemente um vasto número de trabalhos demonstrou que a imunovigilância era apenas uma parte do processo, e que o sistema imune participa não apenas da inibição de tumores iniciais mas também molda o crescimento dos tumores do ponto de vista imunológico e eventualmente favorece seu desenvolvimento (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Esse processo dinâmico e aparentemente paradoxal foi denominado de imunoeedição e segue uma linha de evolução composta de três fases: eliminação, equilíbrio e escape. A fase de eliminação é caracterizada pela destruição dos tumores iniciais, e a maior incidência de tumores em animais imunodeficientes é uma forte evidência deste processo *in vivo* (SHANKARAN et al., 2001). Outra evidência de um estudo recente demonstra que a hiperplóidia, um processo comum durante as fases iniciais da carcinogênese e caracterizado pelo ganho de cromossomos, induz uma resposta de estresse do retículo endoplasmático. Esta resposta resulta exposição da proteína calreticulina na superfície da celular, um sinal do tipo “eat me” (ou seja, sinalização para fagocitose da célula expondo calreticulina) e no aumento da imunogenicidade tumoral, levando à eliminação destas células (SENOVILLA et al., 2012). Em humanos, a maior incidência de tumores em pacientes que sofreram transplante de órgãos, e por isso usam medicamentos imunossupressores (por exemplo, ciclosporina), apoia a existência dessa fase (SHEIL; DISNEY; MATHEW, 1997; OPELZ; DÖHLER, 2004; ANDRÉS, 2005).

Na fase de equilíbrio, as células neoplásicas que sobreviveram à eliminação inicial ficam em estado de dormência e são ao longo do tempo moldadas pelo sistema imune devido aos constantes ataques dos linfócitos. Esta é a fase menos compreendida, em grande parte

devido à dificuldade de estabelecer modelos animais que reflitam esta situação, e sua existência é suportada basicamente por observações clínicas, onde órgãos transplantados contendo lesões neoplásicas não detectadas (presumidamente por estarem em equilíbrio com o doador) culminaram no desenvolvimento da doença no órgão umavez que este se encontre enxertado no receptor imunodeprimido (MACKIE; REID; JUNOR, 2003; STRAUSS; THOMAS, 2010). Estudos demonstraram que a manutenção do equilíbrio é dependente de linfócitos T CD4⁺ Th1 e a evolução para a fase de escape é dependente do processo de edição (KOEDEL et al., 2007). Esta fase pode durar anos (MACKIE; REID; JUNOR, 2003) e uma maior proporção de linfócitos CD8 e NK quando comparado aos linfócitos NKT e T reguladores pode estar associado com a manutenção desta fase (WU et al., 2013).

O processo de transformação celular faz com que a célula tumoral tenha uma alta instabilidade genômica, possuindo uma maior propensão ao acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas. Na fase de escape, a constante pressão do sistema imune aliada a esta enorme heterogeneidade tumoral faz com que variantes ou clones tumorais capazes de evitar o reconhecimento e/ou a destruição pelos linfócitos T sejam selecionados, culminando no desenvolvimento da doença (MATSUSHITA et al., 2012). Diversos mecanismos de escape existem, tanto a nível da célula tumoral quanto ao nível do microambiente tumoral. Com relação à célula tumoral, um dos mecanismos mais frequentes é a perda de antígenos alvo reconhecidos pelo sistema imune, seja de forma direta (silenciamento epigenético, alteração do quadro de leitura devido a deleções/inserções, etc) ou indireta (diminuição da expressão de MHC de classe I, desregulação da maquinaria de processamento e apresentação de antígenos etc). Já ao nível de microambiente, o escape geralmente é resultado de mecanismos imunossupressores induzidos pelo tumor, como a secreção dos fatores TGF- β , VEGF e IDO. Outra camada de subversão do sistema imunológico pode derivar do recrutamento de células com funções imunomodulatórias para o microambiente tumoral, atuando como efetoras da imunossupressão, como as T CD4⁺ reguladoras (Tregs) e as células mielóides supressoras (HANAHAN; COUSSENS, 2012). As Tregs atuam através da secreção de IL-10 e/ou TGF- β , além do consumo e depleção da IL-2 do meio, uma citocina crucial para a função de linfócitos T citotóxicos. As células mielóides supressoras atuam de maneira similar, produzindo TGF- β e depletando os aminoácidos essenciais arginina, triptofano e cisteína, além de induzir a diferenciação de linfócitos T efetoras em Tregs.

Uma das maiores evidências de que o processo de imunoedição ocorre em humanos foi a demonstração de que a composição do infiltrado linfocitário pode prever a sobrevivência de pacientes com diversos tipos de câncer, sendo a presença de linfócitos T CD8⁺ e a presença de citocinas como IFN- γ e TNF- α correlacionados com um melhor

resultado clínico (MAHMOUD et al., 2011; FRIDMAN et al., 2012). Além da composição, diversos trabalhos mostraram que outras características do infiltrado, como densidade, tipo e localização são capazes de prever a evolução clínica da doença com maior acurácia do que os métodos patológicos de estadiamento do tumor, formando o chamado “Immunoscore” (ANGELL; GALON, 2013; GALON et al., 2006, 2014). Estes resultados demonstram que o sistema imune, especialmente os linfócitos T, possuem um importante papel tanto na inibição quanto na progressão do câncer através do reconhecimento direto das células tumorais.

1.2.3: Padrão de expressão de antígenos tumorais

O sistema imune mantém um diverso repertório de células T com alta avidéz para um antígeno externo, enquanto limita a atividade de células que reconhecem antígenos próprios. O processo de imunoeedição implica no reconhecimento de antígenos tumorais para a posterior indução de uma resposta contra a célula neoplásica. Estes antígenos tumorais podem ser divididos em duas categorias básicas: antígenos específicos do tumor (TSA) e antígenos associados ao tumor (TAA). TSAs são geralmente imunogênicos visto que são derivados de vírus associados a tumores humanos, como o EBV e o HPV. A ocorrência aumentada de tumores induzidos por vírus em pacientes imunocomprometidos sugere que a expressão destes antígenos pelas células transformadas promove uma resposta antitumoral, atuando como alvos em terapias profiláticas baseadas em linfócitos T para EBV já aplicadas em clínica (HESLOP et al., 2009).

Outra classe de TSAs são os antígenos únicos, resultado de mutações somáticas ocorridas durante o processo de tumorigênese (PARMIANI et al., 2007). Essas mutações podem alterar o processamento pelo proteassomo e gerar novos epítomos para serem apresentados ou podem alterar a estrutura de um epítomo já existente, levando ao reconhecimento do tumor pelos linfócitos T (SAVAGE, 2014). Muitas destas mutações ocorrem em genes cruciais para o fenótipo maligno, como RAS ou CDK4, sendo alvos atrativos para a imunoterapia, pois seriam resistentes à seleção de variantes. No entanto, enquanto algumas mutações são encontradas em vários tumores, freqüentemente elas são unicamente encontradas nos tumores na qual elas foram identificadas, e novas mutações podem ser geradas durante a progressão da doença. Este fato cria a necessidade de avaliar o conjunto de mutações do tumor ao nível individual e além disso determinar quais mutações são reconhecidas pelos linfócitos e induzem uma resposta efetora, tarefa que se tornou possível apenas recentemente devido às metodologias de sequenciamento de DNA de nova geração. Trabalhos recentes usando esta tecnologia identificaram novos TSAs em diversos

pacientes e estes antígenos eram capazes de ser reconhecidos pelos linfócitos infiltrantes do mesmo tumor (ROBBINS et al., 2013; VAN ROOIJ et al., 2013; LU et al., 2014).

TAAAs são antígenos próprios, não mutados, derivados de proteínas expressas pelos tumores e pelo tecido normal, e constituem a grande maioria dos antígenos tumorais. TAAAs podem ser caracterizados pelo seu padrão de expressão como antígenos tecido-específicos ou antígenos ubiquamente expressos (KESSLER; MELIEF, 2007). Os antígenos de câncer/testículo (MAGE, BAGE, NY-ESO-1) são importantes exemplos de antígenos tecido-específicos. Esses antígenos são normalmente expressos nos testículos e placenta, mas são reativados em células tumorais. O baixo nível de expressão de MHC nestes tecidos impede o reconhecimento destes antígenos pelo sistema imune, tornando-os alvos atrativos para a imunoterapia. Outro exemplo são os antígenos de diferenciação, presentes tanto no tecido tumoral quanto no tecido normal do qual o tumor se originou, mas não em outros tecidos. Os antígenos deste tipo mais estudados são os relacionados ao melanoma, como o gp100, Mart-1/Melan-A, pMel-17. Já os antígenos ubiquamente expressos são encontrados na maioria dos tecidos normais, mas estão freqüentemente superexpressos nas células transformadas, como hTERT, survivina e PRAME. A superexpressão destes antígenos aumenta a quantidade de peptídeos apresentados pelas moléculas de MHC na superfície celular, aumentando também o reconhecimento da célula tumoral pela célula T.

1.3) Imunoterapia como nova opção de tratamento

1.3.1: Histórico

Devido às diversas evidências de reconhecimento e eliminação tumoral por parte dos linfócitos T no processo de imunoeedição tumoral, muitos trabalhos começaram a explorar estas propriedades como uma nova abordagem de tratamento, formando assim a base teórica para o surgimento da imunoterapia celular do câncer. A imunoterapia do câncer é uma nova área de estudo que emprega componentes do sistema imune, como anticorpos, células dendríticas ou linfócitos T para o tratamento de tumores, com a grande vantagem de serem mais específicos quando comparados aos métodos atualmente utilizados na clínica. Os tumores clinicamente detectáveis já passaram por todo o processo de imunoeedição e já se encontram adaptados ao hospedeiro através de mecanismos de escape. Com isso, para ser efetiva, a imunoterapia precisa induzir e/ou aumentar a frequência de linfócitos antitumorais, assim como a capacidade destes de destruir o tumor em um microambiente imunossupressor.

A primeira tentativa documentada de estimulação do sistema imune para o tratamento de câncer data de 1893, quando William Coley tratou pacientes com sarcoma e carcinoma utilizando culturas de *Streptococcus pyogenes* (COLEY, 1893). Essa estratégia foi derivada de observações da época que descrevem casos de regressões tumorais ocasionais após infecções agudas. Em seu artigo, Coley descreve 12 casos onde injeções ou infeções naturais por *S. pyogenes* aparentemente induziram uma melhora no quadro clínico dos pacientes, com alguns casos de regressão total das lesões. Durante os anos seguintes Coley tratou mais de 900 pacientes com as “toxinas de Coley”, atingindo uma taxa de resposta de aproximadamente 10% (WIEMANN; STARNES, 1994). Apesar destes resultados, a comunidade científica da época rejeitou os achados, e estes permaneceram durante muito tempo esquecidos.

Na década de 1950 a imunologia tumoral sofreu avanços importantes, com trabalhos demonstrando que o sistema imune possuía capacidade de induzir a regressão tumoral (BALDWIN, 1955; PREHN; MAIN, 1957). No contexto do transplante de precursores hematopoiéticos (TPH) em 1956, foi observado por Barnes e cols. que as células leucêmicas de camundongos irradiados eram eliminadas quando estes recebiam transplantes alogênicos, mas não singênicos. O mesmo foi comprovado anos mais tarde em humanos, onde pacientes que recebiam transplante alogênico (porém HLA- *human leukocyte antigen* -compatível) tinham uma menor probabilidade de recidivas do que pacientes que receberam a medula de um irmão gêmeo (FEFER et al., 1987). Essa consequência do transplante alogênico foi chamada de efeito enxerto contra a leucemia (ECL), sendo uma das primeiras evidências em humanos de que células do sistema imune podem eliminar o tumor. No contexto do TPH alogênico HLA-compatível, as proteínas das células do paciente e do doador apresentam diferenças devido a polimorfismos genéticos. Essas proteínas polimórficas também são processadas e apresentadas como antígenos (chamados antígenos minoritários de histocompatibilidade – mHAgs). Sendo assim as células T presentes no enxerto, que não são tolerizadas contra esses peptídeos, reconhecem esse complexo peptídeo-HLA diferente e se tornam ativadas, exercendo sua atividade efetora. Quando esses antígenos são expressos pelos clones leucêmicos, são alvos do reconhecimento que resulta no efeito ECL (BLEAKLEY; RIDDELL, 2004). No entanto, outros tecidos do paciente também podem expressar os mesmos antígenos minoritários, ou ainda um conjunto diferente de mHAgs, como a pele, trato gastrointestinal e o fígado, sendo este alo-reconhecimento fundamental para o estabelecimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Estudos posteriores demonstraram que pacientes que desenvolvem DECH tem uma menor chance de recidiva da doença, o que evidencia o compartilhamento da expressão dos mHAgs entre o tecido normal e a leucemia (HOROWITZ et al., 1990).

Outra evidência do importante papel que o efeito ECL tem na eliminação da leucemia é a utilização de infusões de linfócitos do doador (DLI) para o tratamento de pacientes que sofreram recidivas da leucemia mielóides crônica (LMC) após o TPH alogênico. Este tratamento é capaz de induzir uma nova remissão completa em aproximadamente 70% dos pacientes, sendo menor que 20% a probabilidade de uma nova recidiva em 3 anos (KOLB; SCHATTENBERG; GOLDMAN, 1995) quando a nova remissão é alcançada. O efeito ECL, sendo dependente das células T do doador, pode ser considerado um precursor da imunoterapia envolvendo o uso de linfócitos T, uma vez que demonstrou a capacidade destas células de, nas condições ideais, reconhecer e eliminar a leucemia do hospedeiro.

1.3.2: Anticorpos monoclonais

Em 1975, Kohler e Milstein desenvolveram a tecnologia do hibridoma, tornando possível a produção de anticorpos com especificidade conhecida em larga escala (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Com isso, foi proposta a utilização de anticorpos no tratamento de câncer, direcionados contra proteínas-chave na progressão tumoral e geralmente superexpressas pelo tumor. No entanto, em testes clínicos iniciais os pacientes desenvolveram uma resposta humoral contra os anticorpos infundidos, apesar da resposta antitumoral que foi observada (MILLER et al., 1982). Este fato ocorreu devido à origem murina destes anticorpos, o que limitou o número de doses tolerado pelos pacientes.

Esses obstáculos foram superados com a geração de anticorpos monoclonais quiméricos (estrutura da IgG humana com as regiões variáveis derivadas de camundongo) e humanizados (estrutura da IgG humana com as regiões determinantes de complementariedade – CDRs – de camundongo) (figura 1.1). Os mecanismos de ação destas moléculas estão relacionados com o isotipo de IgG. Anticorpos com a estrutura de IgG1 são capazes de induzir citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), induzindo diretamente a morte das células tumorais. Outros isotipos, como IgG2, são utilizados quando o anticorpo atua através de suas propriedades de ligação ao antígeno. Como muitos alvos são receptores de fatores de crescimento, essas moléculas agem bloqueando fisicamente a interação entre o ligante e o receptor ou impedindo a mudança de conformação necessária para a dimerização e sinalização (WEINER; MURRAY; SHUPTRINE, 2012).

Diversos anticorpos já estão sendo regularmente utilizados em clínica, alguns com resultados promissores. O primeiro a ter seu uso aprovado foi o Rituximab, anticorpo anti-CD20 utilizado no tratamento de linfomas não Hodgkin de células B, onde cerca de 50% dos

pacientes apresentam resposta significativa (MCLAUGHLIN et al., 1998). Os efeitos adversos desta terapia estão associados à ligação do anticorpo na molécula alvo. O tratamento com Rituximab pode causar toxicidade relacionada à rápida lise de células CD20+ normais e tumorais, especialmente na primeira dose.

Mais recentemente uma nova abordagem de tratamento usando anticorpos foi criada, consistindo na utilização de anticorpos bloqueadores que reconhecem receptores de membrana dos linfócitos T, como CTLA-4 e PD-1. Esta abordagem se baseia no fato de que estes receptores inibem a função efetora dos linfócitos, impedindo a ativação, proliferação, produção de citocinas e citotoxicidade (NIRSCHL; DRAKE, 2013). Ensaio clínico demonstraram que o uso do anti-CTLA4 (Ipilimumab) aumentou a sobrevida dos pacientes com melanoma metastático, com alguns pacientes apresentando regressão completa de lesões (HODI et al., 2010; ROBERT et al., 2011). Já o anti-PD1 apresentou efeito benéfico em pacientes com diversos tipos de câncer, como melanoma, carcinoma renal e câncer de pulmão, com taxas de resposta de 28%, 27% e 18% respectivamente (TOPALIAN et al., 2012). Os resultados clínicos obtidos com esses anticorpos foram bem acima das obtidas com os tratamentos baseados em quimioterapia e radioterapia, o que levou à elaboração de um estudo para avaliar a combinação dos dois medicamentos. Os resultados dos estudos clínicos de fase I demonstraram a alta eficácia desta combinação, com 53% dos pacientes com melanoma respondendo ao tratamento, todos com mais de 80% de regressão das lesões (WOLCHOK et al., 2013). Vale ressaltar que os pacientes que respondem ao tratamento com estes anticorpos vivenciam uma longa fase de remissão, provavelmente devido à maior função das células T e conseqüentemente maior capacidade do sistema imune de atacar as células tumorais.

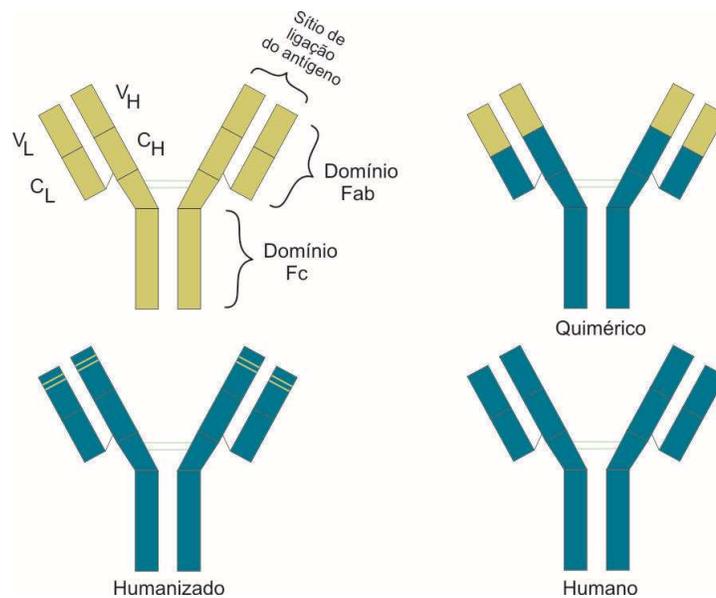


Figura 1.1: Esquema comparando a estrutura dos anticorpos utilizados na clínica (quiméricos e humanizados) com os murinos e humanos.

1.4) Transferência Adotiva de linfócitos T

Os resultados derivados dos estudos de imunoeedição do câncer colocam os linfócitos T como uma unidade central da resposta imune contra o câncer, e protocolos utilizando estas células no combate ao tumor surgiram a partir da década de 80. A transferência adotiva de células T consiste na infusão de vários subtipos de linfócitos T maduros com o objetivo de retardar ou eliminar o tumor e impedir recidivas da doença. Clones de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos contra o tumor podem ser gerados ou isolados do paciente e, após expansão para atingir o número de células necessário para a terapia, são re-infundidos. Esta abordagem tem se mostrado uma das mais promissoras no campo da imunoterapia do câncer uma vez que uma grande quantidade de linfócitos antitumorais pode ser gerada e infundida nos pacientes, evitando importantes mecanismos de imunossupressão tumoral associados à geração deste tipo de resposta *in vivo*. Os estudos pré-clínicos e clínicos definiram diversos parâmetros importantes para a eficácia deste tipo de terapia, assim como diferentes abordagens de tratamento.

1.4.1: Importância das subpopulações infundidas e da indução de linfopenia

Estudos realizados na década de 90 demonstraram que linfócitos T CD8⁺ citotóxicos possuem a capacidade de induzir regressão de tumores em modelos animais, sendo que o

número de células infundidas está diretamente correlacionado com o sucesso do tratamento (DUDLEY; ROSENBERG, 2003; MELIEF; KAST, 1995). Outro parâmetro importante é a subpopulação e o grau de diferenciação das células infundidas. Células que apresentam um perfil menos diferenciado, com marcadores de membrana da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ de memória central, são muito mais eficazes na eliminação do tumor (GATTINONI et al., 2005a; KLEBANOFF et al., 2005). Essa subpopulação possui uma capacidade proliferativa mais alta e é menos propensa à apoptose devido à menor expressão de moléculas pró-apoptóticas como BID e BAD. Além disso, as células desta subpopulação expressam a molécula CD62L, importante na migração para o linfonodo, e são capazes de responder melhor a citocinas como IL-7, devido à alta expressão da cadeia α do receptor desta citocina (IL7R). Estudos recentes conseguiram gerar *in vitro*, através da manipulação farmacológica da via de sinalização de Wnt, células T CD8⁺ de memória com características de células tronco. Para isso os autores inibiram a cinase Gsk-3 β , levando a um acúmulo de β -catenina no núcleo e conseqüentemente ativação da via. Estas células, quando transferidas para outro animal, apresentaram capacidade de gerar todas as subpopulações de linfócitos CD8⁺, além de expressarem marcadores característicos de célula tronco como Sc1 e Bcl2. Também apresentaram um efeito antitumoral muito maior, sendo necessária a infusão de apenas 5x10⁴ células para induzir regressão tumoral em todos os animais analisados (GATTINONI et al., 2009). No entanto, a inibição farmacológica de Gsk-3 β também induziu uma diminuição da proliferação dos linfócitos, dificultando a adoção desta estratégia nos ensaios clínicos. Recentemente um trabalho demonstrou a geração de células tronco de memória CD8⁺ utilizando apenas as citocinas IL-7 e IL-15 após estímulo via TCR/CD28, mas sem a inibição de proliferação, abrindo o caminho para a aplicação clínica destas células (CIERI et al., 2012).

Apesar dos linfócitos CD8⁺ formarem a base do tratamento de transferência adotiva, muitos estudos indicam que as limitações associadas a esta terapia (baixa persistência das células infundidas, baixo efeito antitumoral) podem ser contornados através da co-infusão de células CD4⁺ (HOEPNER et al., 2013; KAMPHORST; AHMED, 2013b). As células CD4⁺ são essenciais para a geração de células CD8⁺ de memória (SHEDLOCK; SHEN, 2003; SUN; BEVAN, 2003) e para sua correta função (BOURGEOIS et al., 2002). Também são capazes de inibir a exaustão funcional dos linfócitos citotóxicos e aumentar a infiltração nos tumores (GIUNTOLI et al., 2002; HUNZIKER et al., 2002). A diversidade genética do HLA de classe II em qualquer população de pacientes é bem maior quando comparada ao HLA de classe I, tornando a identificação de epítomos e TCRs para a sub-população CD4⁺ mais complexa. Além disso, a expansão destas células em cultura é mais difícil e existem poucos

modelos animais que mimetizem o uso destas células (MURANSKI; RESTIFO, 2009). No entanto, um estudo comparou as diferentes subpopulações (Th0, Th1 e Th17) de células T CD4⁺ TCR-transgênicas reconhecendo o antígeno TRP-1 expresso por células próprias e tumorais em um modelo de melanoma subcutâneo (B16F10). Neste modelo, as células Th17 apresentaram um efeito antitumoral superior às células Th1, sendo este efeito altamente dependente de IFN- γ (MURANSKI et al., 2008). A maioria dos ensaios clínicos envolve o tratamento de pacientes com uma população purificada de linfócitos CD8⁺ ou uma população mista de CD4/CD8, com poucos trabalhos reportando a apenas de linfócitos CD4. A transferência para um paciente de melanoma de um clone de linfócitos CD4 reconhecendo o antígeno NY-ESO-1, sem regime de condicionamento para indução de linfopenia ou administração de IL-2 exógena, induziu a regressão completa do tumor, com o paciente permanecendo livre de doença por dois anos (HUNDER et al., 2008). Em outro trabalho mais recente, a infusão de um produto enriquecido em linfócitos CD4⁺ Th1 específicos contra uma mutação no gene *ErbB2ip* induziu regressão das lesões e estabilização da doença, mostrando pela primeira vez que estas células podem ser efetivas contra tumores epiteliais (TRAN et al., 2014).

Estudos demonstraram que o uso de radioterapia ou quimioterapia antes da transferência dos linfócitos T pode aumentar a persistência e a atividade antitumoral destas células (NORTH, 1982). As doses utilizadas para esta finalidade constituem um regime não mieloablativo, induzindo uma severa, mas transitória, leucopenia sem dano permanente às células tronco hematopoiéticas, permitindo assim uma recuperação espontânea da hematopoiese do hospedeiro. Este efeito benéfico é, ao menos em parte, dependente da depleção de células com características inibidoras, como linfócitos T reguladores e células mielóides supressoras, além de propiciar uma menor competição por citocinas como IL-7 e IL-15 (GATTINONI et al., 2005b) e infiltração do tumor (BRACCI et al., 2007). Os quimioterápicos e a radiação também induzem efeitos específicos sobre os tumores, modulando o repertório de antígenos expressos, a expressão de HLA de classe I e o tipo de morte celular induzida, consequentemente aumentando o reconhecimento do tumor pelos linfócitos infundidos (GASSER et al., 2005; REITS et al., 2006).

1.4.2: Linfócitos infiltrantes do tumor

Um método muito eficiente para a geração de linfócitos específicos contra o tumor foi desenvolvido utilizando-se um modelo murino de sarcoma. Linfócitos infiltrantes do tumor (TILs) foram isolados e cultivados em altas doses de IL-2 e apresentaram atividade lítica

específica contra células tumorais murinas *in vitro*. Além disso, essas células também foram capazes de mediar regressão do tumor quando transferidas para camundongos com sarcoma (ROSENBERG; SPIESS; LAFRENIERE, 1986). Testes com células humanas foram então realizados e culturas de TILs puderam ser geradas de pacientes com melanoma, carcinoma renal, carcinoma de cólon, glioma e câncer de mama. O uso de TILs se mostrou mais eficaz para o tratamento de melanoma, provavelmente porque as culturas de TIL de outros tipos de neoplasia raramente produzem linfócitos capazes de reconhecer e lisar o tumor (JONCKER et al., 2006).

As culturas de TIL geradas a partir das biopsias de pacientes com melanoma apresentaram alta atividade lítica, padrão oligoclonal e geralmente continham células CD4 e CD8. O protocolo de expansão consiste em estimulação com anti-CD3, IL-2 e PBMCs HLA-compatíveis, onde melhorias recentes nos métodos de cultura resultaram na geração de TILs em 78% dos pacientes com melanoma. Em um teste clínico, 34% dos pacientes imunocompetentes tratados com TIL e altas doses de IL-2 apresentaram respostas clínicas objetivas. No entanto, a maioria das respostas observadas foi transiente, tendo sido observada uma persistência limitada das células transferidas (ROSENBERG et al., 1994).

Testes clínicos recentes para o tratamento de melanoma metastático, impulsionados pela evidência em modelos pré-clínicos, utilizaram a infusão de culturas de TIL e o tratamento com altas doses de IL-2 após um regime de condicionamento (quimioterapia) não mieloablativo, mas que induz linfodepleção. Outra modificação do protocolo foi a seleção dos TILs infundidos, onde a liberação de IFN- γ após estímulo com o tumor autólogo atuou como parâmetro de seleção de culturas responsivas. Este tratamento foi capaz de induzir uma resposta clínica em 18 de 35 pacientes tratados (51%), sendo 3 respostas completas e 15 respostas parciais, com duração média de 11 meses (DUDLEY et al., 2005). As células infundidas foram capazes de enxertar e proliferar, e 4 de 5 pacientes analisados apresentaram alta persistência dos TILs meses após a transferência. Estudos do mesmo grupo demonstraram que a persistência das células é crucial para o sucesso da terapia (ROBBINS et al., 2004), e que esta característica está associada ao comprimento dos telômeros (ZHOU et al., 2005) e à expressão de altos níveis de CD28 (HUANG et al., 2005). No entanto, 17 pacientes apresentaram reação autoimune contra os melanócitos (vitiligo, uveíte), demonstrando que o melanoma compartilha diversos antígenos reconhecidos pelos TILs com as células normais. Em outro teste clínico do mesmo grupo, um regime de condicionamento mais intenso foi testado, combinando quimioterapia e radioterapia. Com isso, a taxa de respostas objetivas chegou a 72%, constituindo atualmente o melhor tratamento para pacientes com melanoma (DUDLEY et al., 2008) (figura 1.2). O acompanhamento a longo prazo mostrou que dos 20

pacientes que atingiram resposta completa, 93% permanecem vivos após 5 anos de tratamento, uma taxa de resposta que não é alcançada com a terapia padrão (ROSENBERG et al., 2011). Com o objetivo de definir a melhor população de TILs para a infusão, um estudo foi realizado comparando células CD8 purificadas e TILs não selecionados. Este estudo demonstrou que não houve diferença entre os grupos tratados, favorecendo a adoção dos TILs como opção de tratamento para pacientes com melanoma devido à produção mais rápida e barata (DUDLEY et al., 2013).

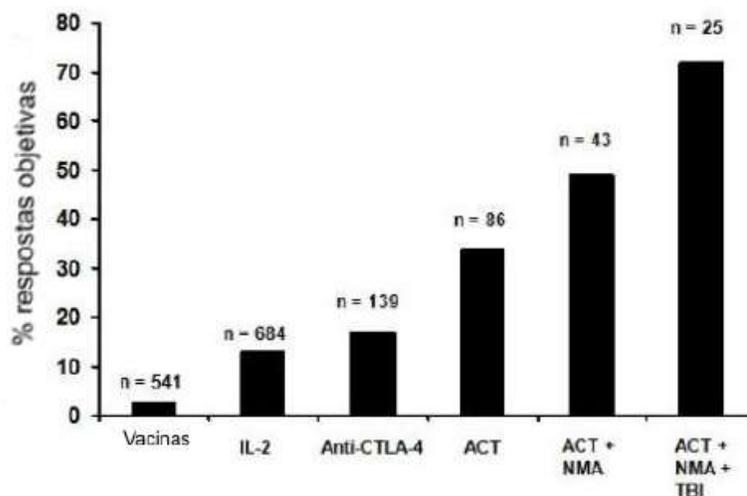


Figura 1.2: Gráfico ilustrando a evolução das taxas de respostas objetivas em pacientes com melanoma metastático após tratamento com imunoterapias. ACT = transferência adotiva de linfócitos; NMA = regime não mieloablativo; TBI= irradiação de corpo total. Adaptado de (ROSENBERG; DUDLEY, 2009).

1.5) Receptores Quiméricos de Antígeno (CARs)

Como mencionado, com exceção do melanoma, as estratégias imunoterapêuticas para geração e utilização de linfócitos antitumorais tem falhado em induzir respostas clínicas nos pacientes. Células específicas contra o tumor geralmente não estão presentes nos pacientes ou estão em baixa frequência, resultado da baixa imunogenicidade da neoplasia e dos mecanismos de tolerância. Além disso, diversos mecanismos de evasão tumoral dificultam a atividade das células infundidas. As células tumorais comumente apresentam defeitos na maquinaria de processamento de antígenos, como diminuição da expressão de TAP e β -2-microglobulina, e diminuição da expressão do MHC de classe I, resultando em uma menor quantidade de antígenos apresentados. Moléculas com função imunossupressora secretadas

pelo tumor, como IL- 10, induzem a diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias em DCs, de modo que a apresentação de antígenos por estas células pode levar à anergia das células T. Além destes mecanismos de evasão, complexos sistemas de cultura são necessários para a expansão e seleção dos clones reativos. As doses terapêuticas podem ultrapassar 10^9 células T/Kg, necessitando assim de diversos ciclos de estimulação (DUDLEY et al., 2002). Esta cultura prolongada das células T, no entanto, apresenta o risco de perda dos clones reativos e diminuição da funcionalidade das células (YEE et al., 2002).

Com o objetivo de superar algumas destas limitações, Eshhar e colaboradores desenvolveram, em 1993, o conceito de receptor de antígeno quimérico (CAR) (ESHAR; WAKS; GROSS, 1993). Este receptor é composto de um domínio extracelular de reconhecimento de antígeno, um espaçador, uma região transmembrana e um domínio intracelular de sinalização (Figura 1.3). Geralmente a porção extracelular é derivada de um anticorpo monoclonal, mas receptores ou ligantes (CD4, CD8, heregulina) também podem ser utilizados. As células T que expressam estes receptores tornam-se ativadas após o reconhecimento do antígeno na célula alvo, sendo então capazes de produzir citocinas e exibir atividade citotóxica independente da ligação do TCR endógeno com o complexo MHC/peptídeo. Sendo assim, a expressão desta molécula na membrana dos linfócitos permite o redirecionamento da especificidade da célula, constituindo um novo método de geração de linfócitos antitumorais. Além disso, como o reconhecimento do antígeno não é restrito ao MHC, um importante mecanismo de evasão tumoral é evitado e permite que esta molécula seja utilizada em pacientes com qualquer haplótipo de HLA. Com o advento de métodos efetivos de transferência gênica para linfócitos, baseados principalmente em retrovírus e lentivirus, tornou-se possível a modificação genética de um grande número de células, o que diminui a necessidade de longos protocolos de expansão e seleção (SADELAIN; BRENTJENS; RIVIÈRE, 2013).

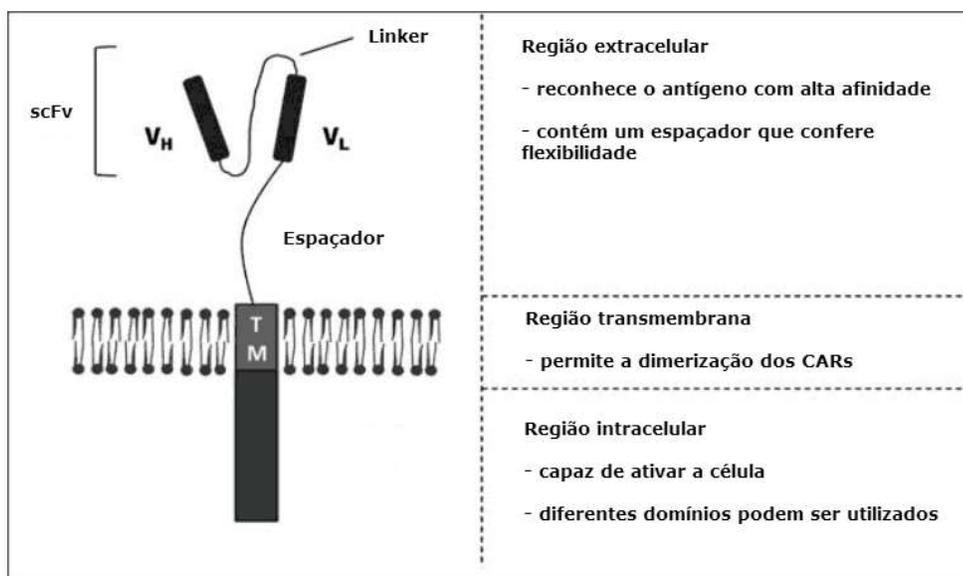


Figura 1.3: Esquema descrevendo a estrutura do CAR. Do lado direito estão descritas as potenciais vantagens de cada região do receptor. Adaptado de (CHICAYBAM; SODRÉ; BONAMINO, 2011)

1.5.1: Estrutura - domínio extracelular e transmembrana

O CAR conecta a especificidade dos anticorpos à maquinaria celular do sistema imune adaptativo. O fragmento Fab de um anticorpo é uma unidade estruturalmente independente que contém o sítio de ligação ao antígeno, composto de 4 domínios: cadeia pesada variável (VH), cadeia pesada constante (CH), cadeia leve variável (VL) e cadeia leve constante (CL). A especificidade da ligação é dada pelas duas regiões variáveis. Com isso, a porção de reconhecimento de antígeno do CAR consiste na expressão dos domínios VH e VL separados por um conector flexível em uma única cadeia polipeptídica, chamada também de scFv (fragmento variável de cadeia única). O conector aproxima os dois domínios e forças não covalentes proporcionam a correta orientação, preservando o sítio de ligação (PULE; FINNEY; LAWSON, 2003). Essas regiões podem facilmente ser amplificadas a partir do cDNA de hibridomas por RT-PCR, tornando possível o redirecionamento dos linfócitos contra qualquer molécula da superfície celular para a qual haja um anticorpo monoclonal identificado. Com isso, diferentemente do TCR, CARs podem reconhecer não somente antígenos protéicos como antígenos derivados de carboidratos e glicolípídeos, ampliando o conjunto de moléculas que podem ser utilizadas como alvo. Além disso, esses receptores apresentam alta afinidade pelo antígeno, uma vez que não foram modelados pelos mecanismos de tolerância central do sistema imune, como ocorre com o TCR.

Nesta configuração de CAR o reconhecimento fica restrito a proteínas que estejam na membrana da célula, limitando o conjunto de alvos no tumor. No entanto, grande parte dos antígenos tumorais descritos são intracelulares, e diversos trabalhos vem demonstrando que proteínas mutadas ou fosforiladas acima do normal são processadas e carregadas no MHC, constituindo um importante grupo de alvos terapêuticos (NOGUCHI et al., 2012; COBBOLD et al., 2013). Neste sentido, trabalhos recentes desenvolveram anticorpos que reconhecem o complexo MHC-peptídeo de forma altamente específica (DAO et al., 2013; JAIN et al., 2013), de modo que a incorporação destas regiões variáveis em um CAR poderá expandir o uso desta terapia (CHICAYBAM; BONAMINO, 2014).

Entre a região de reconhecimento de antígeno e a região transmembrana existe um espaçador, que parece ser necessário para a função ótima de algumas construções. De fato, um estudo demonstrou que espaçadores são necessários para CARs anti-5T4 e anti-NCAM, mas não anti-CD19 (GUEST et al., 2005). Em CARs anti-CD22, a adição do espaçador não alterou a função do receptor (HASO et al., 2012). Acredita-se que a presença do espaçador forneça mais flexibilidade à porção de reconhecimento para se ligar a epítomos perto da membrana plasmática. A região espaçadora hinge-CH2-CH3, derivada de IgG, é a mais comumente utilizada, e parece ser superior em termos de expressão, estabilidade, ativação da célula T e função efetora. A região transmembrana conecta a parte extracelular à parte intracelular, sendo importante para a dimerização dos receptores e conseqüente amplificação do sinal de ativação, além de contribuir para a co-localização do receptor com a sinapse imunológica.

1.5.2: Estrutura - domínio intracelular

A parte intracitoplasmática do CAR é responsável pela sinalização do receptor e, quando ativada, deve ser capaz de induzir as funções efetoras do linfócito. Estudos iniciais desenvolveram CARs que possuíam apenas um domínio de sinalização, sendo chamados de CARs de primeira geração. O domínio mais utilizado é a cadeia ζ do complexo TCR-CD3 que contém três domínios ITAM baseados em tirosina, se mostrando mais efetivo do que domínios com 1 ITAM, como por exemplo a cadeia γ derivada do Fc ϵ RI (receptor de alta afinidade para IgE) (HEUSER et al., 2003). Apesar de apresentarem função efetora *in vitro*, a função *in vivo* mostrou-se limitada uma vez que a persistência das células infundidas foi muito baixa (KOWOLIK et al., 2006). A coestimulação da célula T é um importante aspecto da transferência adotiva de células antígeno-específicas, visto que os sinais fornecidos são cruciais na determinação do limiar de ativação, do tipo da resposta e na sobrevivência das

células. Como as células tumorais geralmente não expressam moléculas coestimulatórias, o desenvolvimento de uma resposta antitumoral pode ser comprometido (MAJ et al., 2013).

Esses fatores levaram ao desenvolvimento de CARs com capacidade coestimulatória, chamados de segunda geração, através da fusão do domínio citoplasmático de moléculas da família CD28 e TNF com o domínio de sinalização da cadeia ζ . Uma grande variedade de moléculas coestimulatórias modula a resposta imune, exercendo seu papel sobre uma subpopulação específica ou em determinado momento do programa de diferenciação do linfócito. Conseqüentemente, os sinais transmitidos podem diferir, resultando na indução de diferentes fenótipos que podem ser utilizados de acordo com o tipo de resposta desejada e assim aumentar a eficácia da terapia. Além de moléculas coestimulatórias, o fenótipo do linfócito pode ser controlado por moléculas inibitórias expressas após a ativação, limitando e controlando a resposta imune (Figura 1.4).

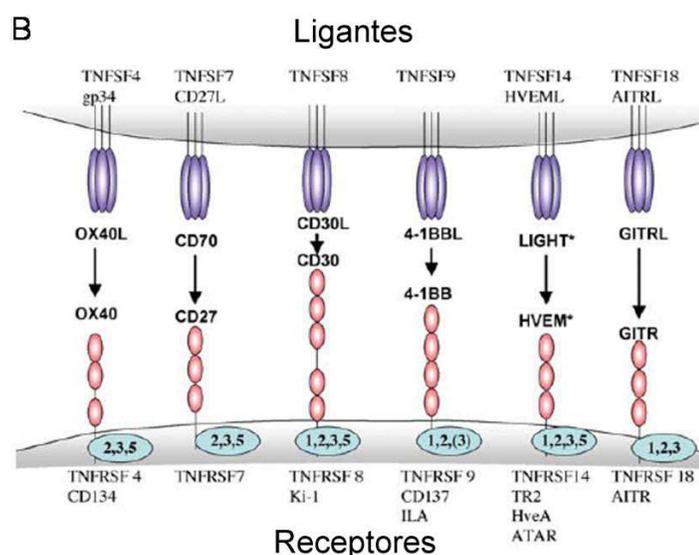
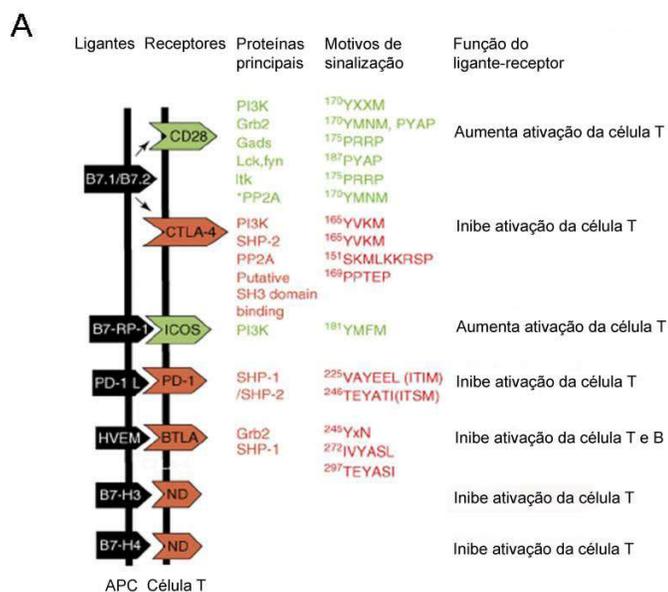


Figura 1.4: Esquema mostrando os receptores da família CD28 e TNF. Enquanto a família TNF (B) apresenta apenas receptores coestimulatórios, a família CD28 (A) possui receptores coestimulatórios e inibitórios. A: adaptado de (PARRY; RILEY; WARD, 2007); B: adaptado de (WATTS, 2005).

A molécula CD28 apresenta um papel crucial na ativação de células naïve através da interação com membros da família B7 (CD80, CD86) nas APCs, sendo o principal receptor coestimulador expresso pelos linfócitos T (figura 1.5). Após interação com os ligantes, o CD28 migra para os clusters de ativação da sinapse imunológica, atuando através da modificação e amplificação dos sinais das vias induzidas pelo TCR como PI3K, Lck e PKC ζ (BOOMER; GREEN, 2010). Os estudos *in vitro* utilizando células primárias murinas e humanas transduzidas com o CAR scFv-CD28- ζ mostraram uma liberação de IL-2 e proliferação significativamente maior quando comparada ao receptor scFv- ζ (FINNEY et al.,

1998; HOMBACH; WIECZARKOWIECZ, 2001). Os estudos *in vivo* também demonstraram uma atividade antitumoral superior deste receptor de segunda geração (HAYNES et al., 2002; KOWOLIK et al., 2006), com uma maior persistência das células infundidas.

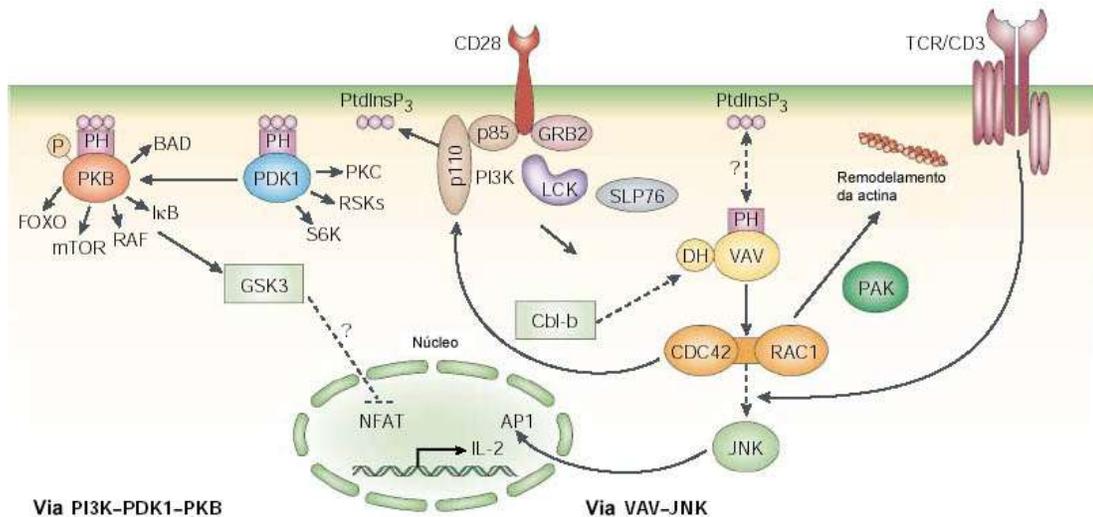


Figura 1.5: Esquema ilustrando as principais vias ativadas por CD28. O domínio citoplasmático desta molécula apresenta um motivo YMNM capaz de ser fosforilado, provavelmente pelas cinases Lck ou Fyn. Este motivo fosforilado é capaz de recrutar proteínas que contenham o domínio SH2, como a PI3K e o adaptador GRB2. A via de PI3K produz mediadores lipídicos como PIP3, que induz a co-localização na face interna da membrana plasmática das cinases PDK-1 e PKB-Akt através da interação com os domínios de homologia a pleckstrina (PH) presentes nestas proteínas. PDK-1 fosforila e ativa PKB-Akt, que possui um papel crucial na produção de IL-2 e IFN- γ . Essa via também apresenta um importante efeito antiapoptótico, induzindo a expressão de Bcl-xL (não mostrado). Adaptado de (RUDD; SCHNEIDER, 2003).

O sucesso obtido com a incorporação do domínio intracitoplasmático de CD28 levou diferentes grupos a testar outros domínios de ativação. Um dos domínios de sinalização testados deriva da molécula 4-1BB (CD137), membro da família TNF de receptores. Esta molécula tem a sua expressão induzida pela ativação do TCR e produz respostas como proliferação, secreção de citocinas do tipo Th1, aumento da citotoxicidade e maior sobrevivência, tanto em células CD4⁺ como CD8⁺ (MBANWI; WATTS, 2014) (figura 1.6). A estimulação através deste receptor pode substituir os sinais de CD28 na expansão *in vivo* de células T CD8, apesar de induzir menores níveis de IL-2. Estudos demonstraram que este receptor apresenta um efeito preferencial sobre células CD8 e tem a capacidade de inibir a morte celular induzida por ativação (AICD) (VINAY; KWON, 2012). Utilizando uma população de linfócitos CD8 de sangue periférico previamente estimulado com um antígeno,

foi demonstrado que 4-1BB induz uma expansão preferencial das células de memória, resultando em um enriquecimento das células antígeno-específicas (ZHANG et al., 2007). Estas propriedades levaram os pesquisadores a incorporar o domínio de sinalização desta molécula no CAR. Estudos *in vitro* com células T CD8 e células NK demonstraram maior proliferação e atividade efetora das células transduzidas com o scFv-4-1BB- ζ quando comparado com scFv- ζ (FINNEY; AKBAR; LAWSON, 2004; IMAI et al., 2004; IMAI; IWAMOTO; CAMPANA, 2005). Além disso, estudos *in vivo* comprovaram a eficácia destes CARs contendo o domínio de 4-1BB em modelos de leucemia linfóide aguda (LLA) (BRENTJENS et al., 2007; MILONE et al., 2009).

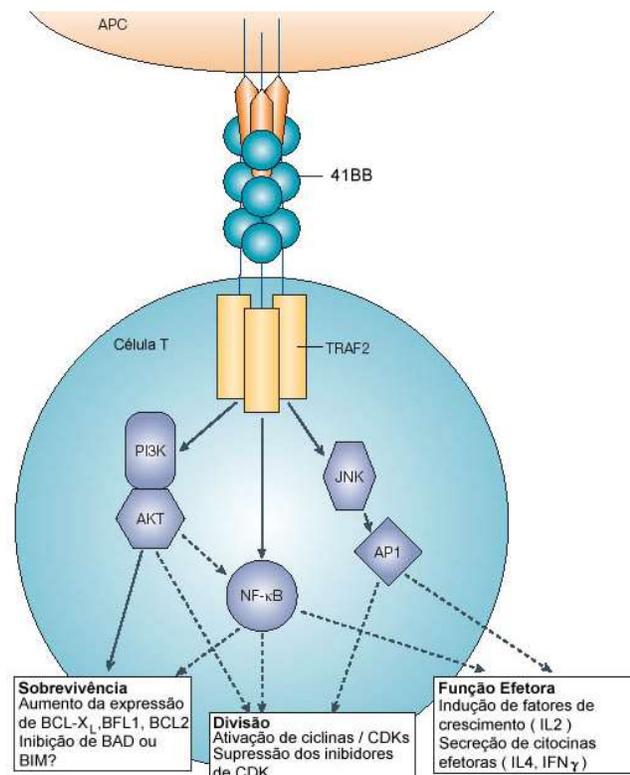


Figura 1.6: Esquema apresentando os principais efeitos da estimulação via 4-1BB. Estes efeitos são decorrentes da sinalização via TRAF2, que em última análise ativa AKT, NFκB e AP-1. Adaptado de (CROFT, 2003).

Outros domínios de sinalização, como o derivado da molécula OX40 (CD134), foram testados *in vitro* (FINNEY; AKBAR; LAWSON, 2004; PULÈ et al., 2005; HOMBACH et al., 2012) e *in vivo* (BRENTJENS et al., 2007), mas em geral não foram muito eficazes, apresentando taxas de proliferação e liberação de citocinas menores do que os receptores com CD28 e 4-1BB. Trabalhos recentes incorporaram o domínio de sinalização do receptor ICOS, demonstrando que este domínio induz um fenótipo intermediário Th17/Th1 e uma função

efetora e persistência *in vivo* comparável aos CARs contendo 4-1BB ou CD28 (GUEDAN et al., 2014). A adição de ICOS também mostrou ser eficiente em um modelo de glioma *in vivo* (SHEN et al., 2013).

Recentemente, na tentativa de melhorar ainda mais a ativação dos linfócitos T, pesquisadores desenvolveram CARs com três domínios intracelulares, chamados de terceira geração. Estes CARs demonstram ser altamente eficientes, produzindo altos níveis de citocinas e possuindo uma alta atividade citotóxica, além da persistência *in vivo* aumentada (CARPENITO et al., 2009; MILONE et al., 2009; ZHAO et al., 2009). Esses resultados podem se traduzir em uma maior atividade antitumoral *in vivo* e em um menor tempo de expansão *ex vivo* dos linfócitos. Acredita-se que este efeito possa ser explicado pelas diferentes vias de sinalização ativadas por estes domínios, visto que CD28 atua principalmente via PI3K e 4-1BB via TRAF2. Os melhores domínios de sinalização a serem incorporados nos CARs ainda não estão definidos e provavelmente serão definidos baseados em fatores como fenótipo requerido e doença a ser tratada.

1.5.3: Teste clínicos

O primeiro teste clínico utilizando a abordagem do CAR foi para tratamento de pacientes infectados com HIV (MITSUYASU et al., 2000). Neste estudo, 24 pacientes receberam uma única infusão de linfócitos CD4 e CD8 modificados para expressar o CAR CD4- ζ . Com isso, as células infectadas pelo HIV seriam eliminadas devido à expressão de proteínas do envelope viral, que se ligam na molécula CD4. Apesar das células infundidas terem persistido por até um ano e terem migrado para os tecidos que atuam como reservatórios de células infectadas, não houve diminuição nos níveis plasmáticos de RNA e DNA viral. Alguns pacientes apresentaram diminuição do RNA viral no tecido retal por até 14 dias, sugerindo uma atividade antiviral compartimentalizada. Um estudo recente foi publicado mostrando neste mesmo grupo de pacientes que as células T modificadas estavam presentes em 98% das amostra testadas 11 anos após a infusão, sem evidências de expansão clonal ou enriquecimento de sítios de integração do CAR perto de genes que regulam proliferação ou sobrevivência celular (SCHOLLER et al., 2012).

Após os importantes resultados obtidos nos estudos pré-clínicos, diversos estudos clínicos começaram a ser realizados utilizando CARs direcionados contra diversos antígenos tumorais. Ensaios clínicos iniciais usando CARs de primeira geração anti-CD20 para tratamento de linfoma folicular (TILL et al., 2008), anti-FBP para câncer de ovário (KERSHAW et al., 2006) ou anti-CD171 (PARK et al., 2007) para tratamento de

neuroblastoma não apresentaram resultados satisfatórios, provavelmente devido à persistência *in vivo* limitada. Com isso, um estudo foi desenhado especificamente com o objetivo de aumentar a persistência das células infundidas por meio da indução da expressão dos CARs em linfócitos anti-EBV. Grande parte da população já foi exposta a este vírus e possui linfócitos T de memória que são constantemente reativados após um reencontro com este patógeno. Sendo assim, o constante re-estímulo de linfócitos anti-EBV CAR+ poderia aumentar a persistência destas células nos pacientes. Esta estratégia foi utilizada no tratamento de pacientes com neuroblastoma usando um CAR anti-GD2, e foi o primeiro teste clínico a reportar resultados positivos, com 6 de 11 pacientes apresentando regressão tumoral. A persistência dos linfócitos anti-EBV foi aproximadamente 6 semanas, contra 1 semana dos linfócitos não selecionados (PULE et al., 2008).

A utilização dos CARs de segunda geração representou uma grande melhora nos resultados clínicos. Grande parte dos ensaios clínicos reportados utilizam CARs direcionados contra o antígeno CD19, uma proteína uniformemente expressa em tumores de células B. Esta proteína configura um alvo ideal uma vez que sua expressão em tecidos normais é restrita a células da linhagem B, eliminando as chances de uma resposta contra tecidos essenciais para a vida dos pacientes (KOCHENDERFER; ROSENBERG, 2013). O primeiro teste clínico a mostrar resultados benéficos foi reportado em 2010, onde um paciente com linfoma folicular foi tratado com uma regime de condicionamento baseado em quimioterapia e infusão de células T expressando um CAR anti-CD19 (KOCHENDERFER et al., 2010b). O paciente apresentou regressão do linfoma em vários sítios (medula óssea, abdômen) juntamente com uma eliminação das células B normais que permaneceu por 39 semanas. A eliminação destas células não pôde ser relacionada com o regime de condicionamento, uma vez que as outras populações (células T, NK) apresentaram a recuperação no tempo esperado. Mais 7 pacientes com linfoma folicular ou leucemia linfocítica crônica (LLC) foram adicionados ao estudo, onde 6 apresentaram regressão das lesões e 4 apresentaram eliminação das células B normais por até 36 semanas (KOCHENDERFER et al., 2012). Vale ressaltar que todos os pacientes que apresentaram a eliminação das células B normais apresentaram também a regressão do tumor.

Resultados semelhantes ou melhores foram obtidos por outros grupos em LLC (KALOS et al., 2011; PORTER et al., 2011). Em leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA-B), resultados excepcionais foram obtidos tanto no contexto pediátrico (GRUPP et al., 2013) quanto no contexto adulto, onde o prognóstico historicamente é pior (BRENTJENS et al., 2013). Nestes estudos em LLA, longas remissões moleculares foram alcançadas, demonstrando a grande eficácia deste tipo de terapia. Apesar de todos estes estudos terem

direcionado a resposta para o mesmo antígeno, os tipos de tumor podem ser diferencialmente susceptíveis ao tratamento com CARs anti-CD19, uma vez que a taxa de resposta da LLA (aproximadamente 80%) vem demonstrando ser superior ao da LLC, mesmo quando são comparadas diferentes instituições (MAUS et al., 2014). Diversos parâmetros como tratamentos prévios, composição do produto celular infundido nos pacientes, defeitos intrínsecos dos linfócitos T devido ao tumor e mecanismos de imunossupressão do microambiente tumoral podem contribuir para estas diferenças.

Estudos tendo como alvo outros antígenos, como CD20 para o tratamento de linfoma (TILL et al., 2012) e mesotelina para o tratamento de tumores sólidos (BEATTY et al., 2013) apresentaram resultados limitados. Atualmente existem mais de 140 estudos clínicos em andamento registrados no banco de dados ClinicalTrials.gov direcionados contra diversos antígenos (consulta em setembro de 2016). A determinação de diversos parâmetros como desenho do CAR, número de células infundidas e regime de condicionamento provavelmente será definida caso a caso, sempre levando em conta o antígeno alvo e o tipo de tumor.

1.6) Leucemia de precursores de célula B – (BCP-ALL)

A hematopoiese é um processo guiado por mudanças sequenciais na expressão gênica de progenitores multipotentes induzidas por microambientes como o fígado fetal, medula óssea e timo. A manutenção deste sistema requer células tronco hematopoiéticas (HSC), que continuamente geram na medula óssea os CMP e os CLP, através de divisão assimétrica. O CLP dá origem aos precursores de células NK, T, e B. O desenvolvimento dos linfócitos B acontece na medula óssea e no baço, e cada estágio pode ser identificado através de uma combinação de marcadores de membrana e rearranjos dos segmentos gênicos que codificam a parte variável do receptor da célula B (BCR) (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013) (figura 1.7).

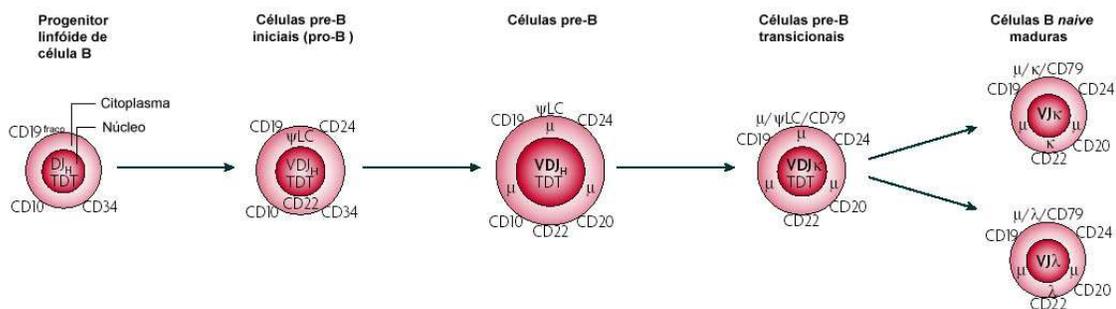


Figura 1.7: Esquema da ontogenia da linhagem B, apresentando os principais marcadores expressos nas diferentes etapas de diferenciação. Adaptado de PUI; EVANS, 2006.

Apesar de sujeito a inúmeros mecanismos de controle, translocações e mutações podem ocorrer nas diferentes etapas do desenvolvimento da linhagem B, resultando na indução do fenótipo maligno característico da BCP-ALL. Aproximadamente 70% das BCP-ALL pediátricas e 50% das LLAs adultas envolvem o compartimento de precursores B iniciais, que pode ser definido através da expressão dos marcadores CD10, CD19, CD24, CD34 e TdT. A proliferação e o acúmulo de células leucêmicas resultam na supressão da hematopoiese normal e envolve vários sítios extramedulares, como o fígado, baço e linfonodo. As mudanças na regulação gênica, induzidas por translocações como TEL-AML1, alteram a capacidade de auto-renovação e diferenciação das HSC, levando ao desenvolvimento do quadro leucêmico.

Os tratamentos atuais baseados em quimioterápicos atingem uma taxa de cura de mais de 80% em crianças (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013). Os pacientes de alto risco (BCR-ABL+, por exemplo) são submetidos ao TPH. No entanto, muitos pacientes desenvolvem sérias complicações devido aos efeitos adversos do tratamento, especialmente os que são submetidos ao transplante. Além disso, as taxas de sobrevivência de adultos com LLA-B são muito baixas (~40%) e os pacientes que sofrem recidivas não respondem bem aos tratamentos disponíveis, como a DLI. Em um estudo retrospectivo multicêntrico, 75% (n=44) dos pacientes tratados com DLI não alcançaram remissão completa (COLLINS et al., 2000). Acredita-se que características associadas aos blastos leucêmicos, como apresentação de antígeno defeituosa e baixa expressão de moléculas coestimulatórias e de adesão, sejam responsáveis por tal resultado (D'AMICO et al., 2004). Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapias com o objetivo de aumentar as taxas de cura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Neste contexto, o uso de CARs direcionados contra antígenos expressos pelos blastos leucêmicos tem se mostrado uma alternativa promissora. A molécula CD19 representa um bom alvo, visto que é expressa por todos os subtipos de LLA e apenas pela linhagem B, poupando os outros tecidos em uma eventual ataque dos linfócitos CAR+. Além disso, a subpopulação de LLA-B com potencial clonogênico, ou seja, que sustenta o crescimento do tumor, expressa este antígeno. Testes clínicos utilizando anticorpos monoclonais contra CD19 não revelaram uma alta incidência de variantes de escape negativas para este antígeno (MA et al., 2002). Os estudos clínicos já publicados demonstram o potencial curativo desta terapia, especialmente no contexto pediátrico (MAUS et al., 2014). No entanto, um efeito adverso desta terapia seria a eliminação de todos os progenitores e células B maduras, poupando apenas os plasmócitos.

1.7) Importância da resposta condicional

1.7.1: Respostas contra o tecido normal

Com a escassez de TSAs caracterizados, os protocolos de imunoterapia têm utilizado como alvo TAAs. Apesar de serem expressos nos tumores, a expressão destes antígenos nos tecidos normais pode induzir respostas autoimunes, diminuindo a eficácia da terapia e podendo provocar sérios efeitos colaterais nos pacientes. De fato, em testes clínicos para tratamento de pacientes com melanoma utilizando infusão de TIL foi observada a destruição de melanócitos normais, com desenvolvimento de vitiligo e uveíte (DUDLEY et al., 2002; YEH et al., 2009). Embora estas respostas sejam prejudiciais para os pacientes, elas não são uma ameaça à vida e são facilmente controladas no ambiente clínico.

O uso de CARs também está associado com respostas autoimunes. Modelos pré-clínicos demonstraram que o reconhecimento do antígeno alvo em células saudáveis pode inibir o tratamento (KONG et al., 2012) e induzir a eliminação de linfócitos B (KOCHENDERFER et al., 2010a). Esses dados foram corroborados pelos resultados dos ensaios clínicos utilizando CAR anti-CD19 já descritos no tópico 5.3. Resultados semelhantes foram reportados em um teste clínico utilizando CARs anti-CAIX para o tratamento de carcinoma renal (LAMERS et al., 2006). Neste estudo foi observada uma grave toxicidade hepática decorrente da expressão inesperada do antígeno alvo nos ductos biliares. Estes efeitos exigiram medidas como suspensão da terapia, redução da dose de células T ou administração de corticosteroide, limitando o sucesso da terapia. Outra coorte deste mesmo estudo que foi pré-tratada com o anticorpo anti-CAIX não apresentou toxicidade, mas os efeitos terapêuticos também foram limitados (LAMERS et al., 2016).

No entanto, o direcionamento dos linfócitos usando CARs contra antígenos expressos em órgãos vitais ou que não tenham o seu perfil de expressão completamente caracterizado é uma prática arriscada, e os resultados publicados na literatura demonstram que esta é uma importante limitação deste tipo de terapia. Um paciente com câncer de cólon metastático foi tratado com um regime de condicionamento não mieloablativo e com infusão de 10^{10} linfócitos expressando um CAR anti-ErbB2 de terceira geração contendo os domínios de sinalização de CD28, 4-1BB e CD3. No entanto, apenas 15 minutos após a infusão a paciente apresentou edema e infiltrado pulmonar, e cinco dias depois a paciente veio a óbito. A análise do soro da paciente demonstrou altos níveis de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) 4

horas após a infusão, consistente com o processo de intensa liberação de citocinas. Os autores postularam que a morte desta paciente foi devido ao reconhecimento do antígeno alvo expresso em baixos níveis pelas células epiteliais do pulmão, e à migração inicial das células infundidas pelo pulmão, levando à liberação de altas quantidades de citocinas e conseqüentemente falha de múltiplos órgãos (MORGAN et al., 2010). Este estudo deixa clara a limitação dos protocolos atuais de transferência adotiva, sendo necessário o desenvolvimento de mecanismos capazes de direcionar a resposta especificamente contra células tumorais.

1.7.2: O uso de domínios inibitórios para a criação de um sistema condicional de ativação dos linfócitos T

Fisiologicamente, a resposta imune mediada pelos linfócitos T é regulada por um balanço entre os receptores coestimulatórios e inibitórios. Os receptores inibitórios possuem um importante papel na homeostasia do sistema imune, sendo que alterações nestas vias de regulação podem estar relacionados à progressão do câncer e a doenças autoimunes, além de controlarem a resposta à infecção (MOCELLIN; BENNA; PILATI, 2013; ODORIZZI; WHERRY, 2012). A utilização dos domínios de sinalização destas moléculas inibitórias nos CARs poderia proporcionar um importante mecanismo de controle, direcionando a resposta efetora apenas contra as células do tumor e poupando os tecidos normais. Uma maneira de obter estes resultados seria a utilização de um sistema com dois CARs, sendo um receptor de ativação específico contra um TAA compartilhado pelo tumor e pelo tecido alvo e o receptor inibitório específico para um antígeno expresso somente pelo tecido normal. Este sistema mimetiza o funcionamento de portas (ou circuitos) lógicos, onde o output (neste caso, a ativação da célula) é dependente dos inputs (sinais) recebidos pelos dois CARs.

Diversos receptores inibitórios já foram descritos, sendo que vários apresentam uma função importante na regulação da resposta de linfócitos T, como desenvolvimento de células de memória (KRIEG et al., 2007) e mecanismos de exaustão funcional (WHERRY; KURACHI, 2015). Dentre os receptores inibitórios descritos, os mais estudados são os da família CD28, como o CTLA-4, PD-1 e BTLA (figura 1.8). Além disso, receptores descritos mais recentemente, como o Lag-3, possuem um importante papel na regulação de linfócitos T, apesar do mecanismo de ação ainda não estar definido.

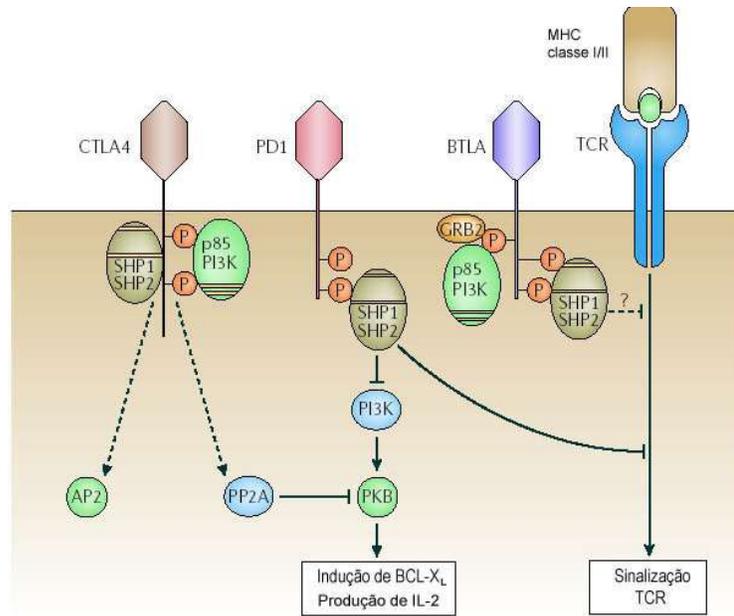


Figura 1.8: Representação esquemática dos mecanismos de ação dos receptores inibitórios da família CD28. Esses receptores são capazes de suprimir a proliferação e secreção de citocinas por meio do recrutamento de fosfatases como SHP-1 e SHP-2, que inibem a ativação de proteínas-chave (por exemplo, PI3K) da via de sinalização do TCR. Adaptado de (MURPHY; NELSON; SEDÝ, 2006).

A molécula CTLA-4 tem a sua expressão induzida logo após a ativação da célula T. Este receptor interage com os mesmos ligantes da molécula CD28, porém apresenta uma maior afinidade por eles. A função inibitória desta molécula é crucial para a manutenção da homeostase do sistema imune, como comprovado nos experimentos utilizando camundongos CTLA4-knockout (TIVOL et al., 1995). Esses animais, apesar de nascerem saudáveis, desenvolvem um fenótipo linfoproliferativo após 5-6 dias, caracterizado pela ativação de um grande percentual de células T e pela maciça infiltração destas em órgãos não linfóides, resultando em morte após 3-4 semanas. Como esta proteína não apresenta atividade enzimática, sua função é exercida através do recrutamento de moléculas de sinalização pelos domínios de tirosina fosforilados presentes no domínio citoplasmático. Moléculas como SHP-2, PP2A e PI3K já foram descritas como sendo recrutadas por CTLA-4 e atuam modulando a sinalização do TCR, além de impedir a formação de microclusters de ZAP70 (MOCELLIN; NITTI, 2013). Além disso, este receptor pode atuar de maneira independente de sinalização através da competição com o CD28 pelos ligantes CD80 e CD86, uma vez que o CTLA-4 possui uma maior afinidade por estas moléculas (QURESHI et al., 2011). Recentemente, um novo modelo de ação foi proposto, onde a ligação de CTLA-4 induziria um aumento na mobilidade da célula T. Esse aumento de mobilidade impediria o estabelecimento de

interações estáveis entre o linfócito e a APC, conseqüentemente inibindo a sua ativação (RUDD, 2008).

A molécula PD-1, originalmente descrita como um transcrito preferencialmente expresso em células apoptóticas, possui um importante papel na manutenção da tolerância periférica. Todos os estudos realizados até o momento demonstraram que a ligação de PD-1 bloqueia a ativação da célula T. A expressão deste receptor é induzida após a ativação do linfócito T, tendo o seu pico de expressão entre 24h e 48h após este evento. Camundongos knockout para PD-1 desenvolvem glomerulonefrite e artrite (linhagem C57BL/6) e cardiomiopatia autoimune (linhagem BALB/c), sustentando ainda mais o papel desta molécula como um regulador negativo da ativação do linfócito T (OKAZAKI et al., 2013). A cadeia citoplasmática deste receptor possui duas tirosinas, que estão localizadas em motivos conservados chamados ITIM (motivos inibitórios baseados em tirosina dos imunoreceptores) e ITSM (motivos de troca baseados em tirosina dos imunoreceptores). Esses motivos, quando fosforilados, são capazes de recrutar proteínas fosfatases e assim inibir a ativação do linfócito. No entanto, um estudo utilizando linfócitos T CD4 humanos demonstrou que apenas o motivo ITSM é crucial para a função do receptor, mediando o recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2 e inibindo a proliferação e produção de citocinas induzidas pela coestimulação por CD28 (CHEMNITZ; PARRY; NICHOLS, 2004).

O receptor BTLA é o mais recente membro da família CD28 descrito, sendo expresso por células T ativadas, mas não por células naïve (WATANABE et al., 2003). Experimentos *in vitro* e *in vivo* confirmaram a sua função inibitória, sendo capaz de inibir a proliferação e secreção de IL-2 em células murinas e humanas. Além disso, camundongos deficientes em BTLA apresentam uma maior suscetibilidade de desenvolver encefalomielite autoimune experimental (EAE) (TAO et al., 2005). A região citoplasmática de BTLA apresenta similaridade com PD-1, também possuindo os dois motivos baseados em tirosina ITIM e ITSM. Além disso, possui dois sítios (YXN) de ligação de proteínas adaptadoras como Grb2/Grap. Apesar disso, mutações direcionadas nestes motivos não tiveram efeito na habilidade do BTLA de inibir a ativação de linfócitos. A molécula perdeu sua função inibitória apenas quando as quatro tirosinas da porção citoplasmática foram mutadas. Apenas a fosfatase SHP-1 foi recrutada após ligação deste receptor, e mutações que impediram esta interação não comprometeram a função inibitória (CHEMNITZ; LANFRANCO, 2006; MOCELLIN; BENNA; PILATI, 2013).

O receptor LAG3 foi descrito em 1990 como uma molécula presente em linfócitos CD4+ e CD8+ ativados e em uma subpopulação de células NK (Triebel, 1990). Este receptor possui uma alta homologia estrutural com a molécula CD4, apesar de compartilhar apenas

20% dos aminoácidos. Como o CD4, a região extracelular de LAG3 possui domínios Ig-like e interage com o MHC de classe II, porém com uma afinidade muito mais alta (Huard, 1997). Trabalhos recentes descreveram outros possíveis ligantes, como LSEctin (XU et al., 2014) e Galectina-3 (Gal-3) (KOUO et al., 2015), aumentando a complexidade dos efeitos regulatórios deste receptor. Após a ativação do linfócito T, LAG-3 é rapidamente translocado para a superfície celular, e sua atividade é regulada pela ação de metaloproteases induzidas pela via do TCR, como ADAM10 e ADAM17. Estas metaloproteases clivam a região extracelular de LAG-3 e permitem a ativação da célula; linfócitos contendo uma versão mutada de LAG-3 incapaz de ser clivada tem capacidade de proliferação e produção de citocinas reduzida (LI et al., 2007). Diversos trabalhos já demonstraram que LAG-3 possui um papel inibitório sobre a função do linfócito T, sendo capaz de se associar com o complexo TCR/CD3 (HANNIER; TRIEBEL, 1999) e inibir atividades efetoras como proliferação e produção de citocinas (MAÇON-LEMAÎTRE; TRIEBEL, 2005; WORKMAN; VIGNALI, 2005). Além disso, camundongos NOD nocaute para LAG-3 apresentaram desenvolvimento acelerado de diabetes (BETTINI et al., 2011). Apesar deste importante papel na regulação dos linfócitos T, as vias de sinalização envolvidas com estes efeitos ainda não foram elucidadas. A região intracitoplasmática de LAG-3 possui três regiões conservadas entre camundongos e humanos: um potencial sítio de fosforilação em serina (aminácido 484 em humanos e 474 em camundongo); um motivo KIEELE altamente conservado e não encontrado em nenhuma outra proteína descrita; e uma repetição de aminoácidos ácido glutâmico/prolina (EP). Um estudo demonstrou que a lisina presente no motivo KIEELE é crucial para a função inibitória deste receptor, mas proteínas que sejam recrutadas por este motivo ainda não foram descritas (WORKMAN; DUGGER; VIGNALI, 2002).

Os ligantes e seus receptores inibitórios são expressos em diferentes células e tecidos, além de alguns possuírem expressão constitutiva e outros indutíveis. Além disso, os diferentes modos de ação descrito para estes receptores inibitórios implicam em papéis não redundantes no controle da função dos linfócitos T, abrindo a possibilidade de explorar potenciais combinações para um melhor efeito inibitório. Neste sentido, alguns estudos demonstraram uma possível sinergia entre os efeitos da sinalização de PD-1 e LAG-3, tanto no contexto da autoimunidade (OKAZAKI et al., 2011) quanto no contexto da imunidade antitumoral (WOO et al., 2012).

No contexto da LLA de precursores B iniciais, os receptores quiméricos inibitórios poderiam ser usados para direcionar a resposta especificamente contra os blastos leucêmicos, poupando as células B maduras. Para isso, um receptor de ativação seria direcionado contra o antígeno CD19, expresso nos blastos leucêmicos e nas B maduras, e o receptor inibitório seria

direcionado contra o antígeno CD20, expresso apenas nas B maduras (figura 1.9). Este tipo de abordagem pode possibilitar uma diminuição dos efeitos colaterais de uma eventual terapia com CARs anti-CD19, permitindo um controle maior da resposta induzida.

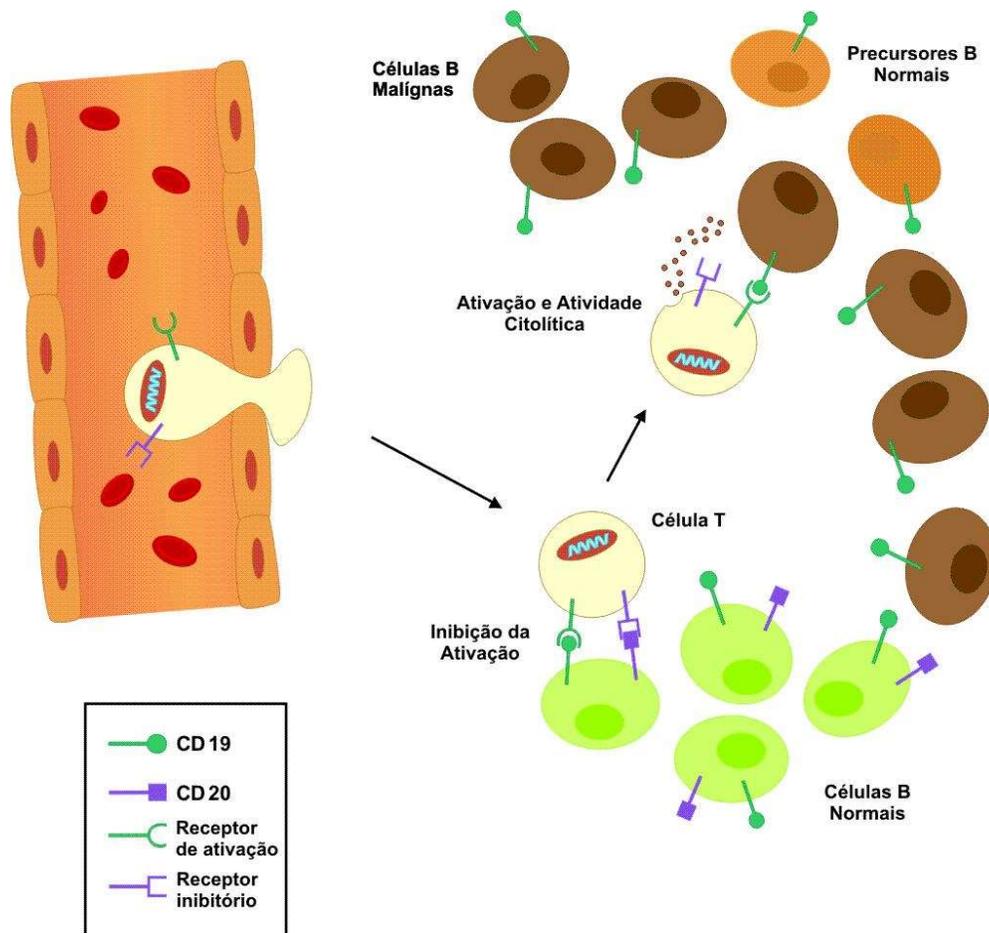


Figura 1.9: Esquema demonstrando o princípio da eventual terapia utilizando o sistema de CARs ativadores/inibitórios. As células T são modificadas *ex vivo*, expandidas e infundidas. Estas células migram para o sítio da doença, onde encontram células B normais e malignas. As células T reconhecem as células B normais, mas não se tornam ativadas devido à expressão de CD20 pela célula alvo, que interage com o CAR inibitório. Já a célula B maligna não expressa CD20, tornando-se alvo da célula T infundida pois apenas o receptor de ativação (anti-CD19) é ligado. Adaptado de (SADELAIN; RIVIÈRE; BRENTJENS, 2003).

Com isso, propomos neste trabalho a criação de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado na utilização de dois CARs em conjunto, tendo como modelo a LLA-B. Neste modelo, o CAR de ativação seria direcionada contra a proteína CD19 (expresso por toda a ontogenia B) e o CAR inibitório contra a proteína CD20 (expresso em células B maduras), propiciando o reconhecimento e eliminação das células neoplásicas CD19⁺ CD20^{neg} de forma específica e seletiva.

2) Objetivos

- Geral:

- Criação de um sistema condicional de ativação de linfócitos T baseado na utilização de receptores quiméricos de antígeno (CARs) ativadores e inibitórios.

- Específicos:

- Construção de CARs contendo diferentes domínios inibitórios
- Estabelecimento de um protocolo para a modificação genética de linfócitos T humanos primários
- Avaliação da função dos CARs inibitórios em células da linhagem Jurkat através de parâmetros como atividade de luciferase, expressão de CD69 e produção de IL-2
- Avaliar capacidade inibitória dos diferentes CARs anti-CD20 em linfócitos T primários humanos no contexto da expansão celular e atividade citotóxica

3) Materiais e métodos:

3.1 Plasmídeos

As sequências dos CARs 19BBz, 19z, 20z, 20PD1, 20PD1mut (Y223F, Y248F), 20LAG3 e 20PD1LAG3 tiveram seus códons otimizados e foram sintetizadas pela empresa Genscript (Piscataway, Nova Jersey, EUA). Aos CARs 19BBz e 19z foi adicionado um *tag* derivado da proteína Myc para permitir a detecção destes receptores por citometria de fluxo. O CAR 20trunc remete ao CAR anti-CD20 truncado no primeiro aminoácido após a região transmembrana e foi desenvolvido tendo o 20PD1mut como base. Durante a síntese do CAR 20PD1mut foi adicionado, após o códon de parada, um sítio de XmaI e um segundo códon de parada. Devido a um sítio de XmaI na posição 987 (segundo nucleotídeo após o fim da região transmembrana) já existente, a digestão com XmaI e posterior re-ligação deste plasmídeo gerou o CAR 20PD1x. Todas as sequências sintetizadas foram flanqueadas a 5' pelo sítio AgeI e a 3' pelo sítio NotI, e posteriormente estes CARs foram clonados no plasmídeo transposon pT3-GFP (doado pelo pesquisador Dr. Richard Morgan, NIH-EUA) utilizando-se estes sítios, no lugar do GFP. O plasmídeo pT3 contém repetições chamadas IR/DRs que flanqueiam o cassete de expressão formado pelas sequências do promotor U3 e do transgene. As IR/DRs são reconhecidas pela transposase *Sleeping Beauty* (SB) codificada no plasmídeo SB100x, que corta e insere o cassete de expressão no genoma da célula alvo.

3.2 Linhagens celulares

A linhagem Jurkat foi mantida em meio RPMI (Sigma) completo (10% soro fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina) e foi modificada para expressar o plasmídeo pGL4.30 (Promega), que expressa a enzima luciferase sobre o controle de um promotor responsivo a NFAT, gerando a linhagem Jurkat 4.30. A linhagem L388 é um linfócito B humano transformado com o vírus Epstein-Barr (EBV) e foi mantida em RPMI completo. As linhagens K562, K519 (subclone expressando CD19+), K520 (subclone expressando CD20), K5D (subclone expressando CD19 e CD20), Nalm-6GFP e Nalm-6GFP CD20+ foram mantidas em meio RPMI completo. K562 é uma linhagem de origem mielóides que não expressa CD19 ou CD20 (K5WT). Nalm-6 é uma linhagem de LLA de precursores B e por definição expressa a proteína CD19. A Nalm-6GFP expressa a proteína verde fluorescente (GFP), o que permite a identificação destas células em culturas mistas através da citometria de

fluxo. A Nalm-6GFP CD20+ é uma linhagem derivada da Nalm-6GFP que foi modificada para a expressão da proteína CD20 por meio da utilização de vetores lentivirais.

3.3 Detecção dos CARs

Os CARs foram detectados por citometria de fluxo utilizando-se um anticorpo anti-Myc conjugado à Alexa488 (CST; cat: 2276; diluição 1:50) para o 19BBz e 19z ou anti-Fab conjugado à biotina (Jackson Immunoresearch; cat: 82161; diluição 1:200) para os CARs anti-CD20 (tabela 3.1).

3.4 Geração de linhagens de Jurkat 4.30 expressando diferentes combinações de CARs:

A linhagem Jurkat 4.30 foi eletroporada conforme descrito em CHICAYBAM et al., 2013 com os plasmídeos pT3 (10ug) e SB100x (0,5ug) para indução da expressão dos diferentes CARs. Em resumo, 1×10^6 célula Jurkat 4.30 foram eletroporadas usando o eletroporador Nucleofector IIb (Lonza), programa X-001 e tampão 3P com as quantidades indicadas de cada plasmídeo. Logo após as eletroporação foi adicionado 1mL de meio RPMI com 20% SFB, 2mM L-Glutamina e sem antibiótico e as células foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após 1 semana em cultura para estabilização da expressão, a expressão foi avaliada por citometria de fluxo e as células positivas foram isoladas por *sorting* usando o aparelho MoFlo Astrios da plataforma de citometria do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz.

3.5 Ensaio de transativação do NFAT baseado em luciferase:

As células Jurkat 4.30 19BBz e suas derivadas expressando um dos CARs inibitórios (1×10^5) foram ativadas com PMA $5 \mu\text{M}$ + Ionomicina $1 \mu\text{M}$ (controle positivo) ou co-incubadas na proporção de 1:1 com as linhagens K562, K519, K520 ou K5D em placa de 96 poços. Após 8 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS e o pellet foi ressuspensionado em tampão PBL (tampão de lise). Ao lisado de cada condição experimental foi adicionado o substrato luciferina e os resultados foram obtidos utilizando-se um luminômetro Veritas® (Turner Biosystems).

3.6 Avaliação do marcador de ativação CD69:

As células Jurkat 4.30 19BBz e suas derivadas expressando um dos CARs inibitórios (1×10^5) foram ativadas com PMA $20 \mu\text{M}$ + Ionomicina $1 \mu\text{M}$ (controle positivo) ou co-incubadas na proporção de 1:1 com as linhagens K562, K519, K520 ou K5D em placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação as células foram marcadas com o anticorpo aCD69-PE (clone FN50;

eBioscience) e analisadas por citometria de fluxo no aparelho BD Accuri (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo (Tree Star software).

3.7 Avaliação da produção de IL-2:

Do mesmo experimento para avaliação do marcador CD69 foi isolado o sobrenadante das diferentes condições. Todos os sobrenadantes foram armazenados no -80°C até o momento da análise. Para a quantificação da IL-2 foi utilizado o kit “IL-2 Ready-SET-Go! ELISA” - 2 geração (eBioscience) seguindo as instruções do fabricante. A placa foi lida no leitor de ELISA Spectra Max 190 (Molecular Devices).

3.8 Origem das células primárias de doadores :

Todos os procedimentos envolvendo células primárias foram realizados apenas após a liberação do material pelo serviço de sorologia do INCA. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram obtidas a partir de filtros de leucócitos obtidos de doadores saudáveis após centrifugação em gradiente de Ficoll (890g, 25min). A execução deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (registro nº153/10; Anexo I) e os doadores assinaram termos de consentimento livre e esclarecido no ato de suas doações.

3.9 Geração de células T primárias CAR+:

PBMCs (10×10^6) foram eletroporadas usando o tampão 1SM (CHICAYBAM et al., 2013) e o programa U-014 no aparelho Nucleofector II (Lonza) com os plasmídeos codificando os CARs (pT3) e a transposase SB100x (SB), que catalisa a reação de integração do transgene no genoma da célula. Após a eletroporação, 1mL de meio RPMI com 20% de SFB, 2mM L-Glutamina e sem antibiótico foi adicionado. No dia 1 após a eletroporação as células foram contadas e estimuladas com a linhagem L388 irradiada (100Gy) na proporção 3 linfócitos :1 L388. O primeiro ciclo de estímulo dura aproximadamente 15-20 dias, sendo repetido a cada 7-10 dias. Os linfócitos viáveis foram contados a cada 5 dias utilizando-se o corante Trypan Blue. A cada 10 dias ou ao final de cada ciclo as células foram fenotipadas por citometria de fluxo (expressão dos CARs, fenótipo de memória, expressão de CD56) e utilizadas nos experimentos de lise e produção de citocinas (figura 3.1).

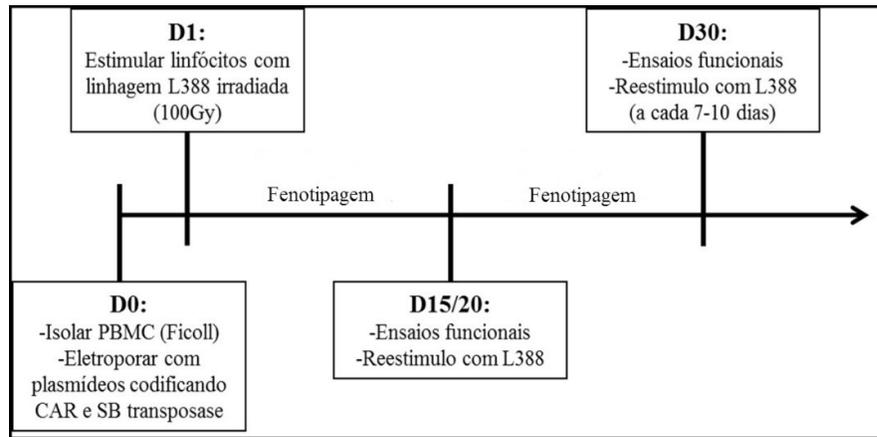


Figura 3.1: Esquema experimental utilizado para a modificação genética e expansão de linfócitos primários humanos.

3.10 Fenotipagem dos linfócitos T e linhagem L388:

Os linfócitos expandidos foram avaliados para a determinação dos fenótipos de memória (anticorpos utilizados: CD62LFITC, CD8PE, CCR7PerCP, CD4APC) onde avaliamos a subpopulação de memória central (MC; CCR7+ CD62L+) e memória efetora (ME; CCR7neg CD62L+) dentro das populações CD4+ e CD8+. Através da utilização dos anticorpos CD56FITC e CD3PECy5 também foi avaliado a frequência de células NK (CD56+), NKT (CD56+ CD3+) e T (CD3+). As células L388 foram avaliadas utilizando-se os anticorpos anti-CD80FITC, anti-CD19FITC, anti-MHCclasseIPE, anti-CD86APC, anti-CD20APC e anti-PDL1APC. Todos os anticorpos foram provenientes da empresa eBioscience e os clones e diluições utilizados podem ser encontrados na tabela 1. As células foram analisadas no aparelho BD Accuri (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo (Tree Star software).

Tabela 3.1: Lista de anticorpos utilizados para fenotipagem dos linfócitos T e linhagens.

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Diluição
CD62L	FITC	DREG56	1:10
CD56	FITC	TULY56	1:10
MYC	Alexa 488	9B11	1:50
CD19	FITC	HIB19	1:10
CD4	PE, APC	OKT4	1:10
IFN γ	PE	4S.B3	1:10
MHC classe I	PE	BB7.2	1:10
CD3	PECy5	SK7	1:10
CCR7	PerCP	3D12	1:10
CD20	APC	2H7	1:10
CD86	APC	OKT8	1:10
CD86	APC	GL1	1:10
PDL1	APC	MIH1	1:10
Fab	Biotina	Policlonal	1:200

3.11 Avaliação de linfócitos T produtores de IFN γ :

Os linfócitos T primários expressando os CARs foram co-cultivados com as células alvo Nalm-6 GFP+ CD20+ ou L388 na proporção de 1:1 em poços de placas de 96 poços (10^5 de cada célula). Após 2h do início da cultura, a droga monensina (5 μ g/mL) foi adicionada para inibir a secreção de proteínas. Após 6h de incubação total, as células foram permeabilizadas utilizando-se saponina e marcadas com um anticorpo anti-IFN γ PE (BD Biosciences). As células alvo foram marcadas com um anticorpo anti-CD19 FITC e excluídas da análise. O experimento foi analisado por citometria de fluxo no aparelho BD Accuri (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo (Tree Star software).

3.12 Avaliação da exposição de fosfatidilserina (PS) em linfócitos T:

Os linfócitos T primários expressando os CARs foram co-cultivados com as células alvo Nalm-6 GFP+ CD20+ ou L388 na proporção de 1:1 em poços de placas de 96 poços (10^5 células de cada população). Após 6h de incubação o lipídeo PS foi detectado na superfície dos linfócitos através do uso de anexinaV conjugada ao fluorocromo APC (eBioscience) utilizando-se o tampão de marcação apropriado. As células alvo foram marcadas com um anticorpo anti-CD19 FITC e excluídas da análise. O experimento foi analisado por citometria de fluxo no aparelho BD Accuri (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software FlowJo (Tree Star software).

3.13 Ensaio de lise:

Como células alvo foi utilizada uma mistura de células Nalm-6GFP / Nalm-6GFP CD20 onde aproximadamente 80% das células eram CD20+, tornando possível avaliar a presença desta população após interação com linfócitos expressando 19BBz ou 19BBz + CAR inibitório. Os linfócitos foram incubados com as células alvo por 4 horas em placas de 96 poços (fundo V) em duplicata. Diferentes razões efetora/alvo (E/A) foram utilizadas, de 12:1 até 0,18:1. Após este período os poços foram marcados utilizando-se um anticorpo anti-CD20APC (eBioscience) e a presença das células alvo foi determinada por citometria de fluxo, avaliando-se a lise total através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$. Para o ensaio de lise usando o corante eFluor 670 (eBioscience), as células Nalm-6 GFP+ CD20+ foram carregadas com o corante seguindo as instruções do fabricante. Após o carregamento, as células foram misturadas na proporção de 1:1 com células Nalm-6 GFP+ e usadas como alvo no experimento de lise. Todas estas análises foram feitas levando-se em consideração as células com morfologia de viáveis, determinadas pelo perfil de *forward scatter* e *side scatter*. A estratégia de *gating* está detalhada abaixo (figura 3.2).

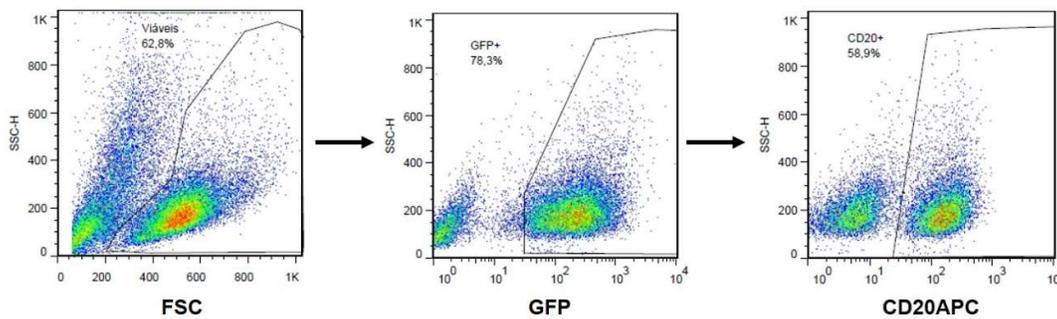


Figura 3.2: Estratégia de *gating* seguida no experimento de lise. Os *gates* seguem a hierarquia {Viáveis [GFP (CD20)]}.

4) Resultados

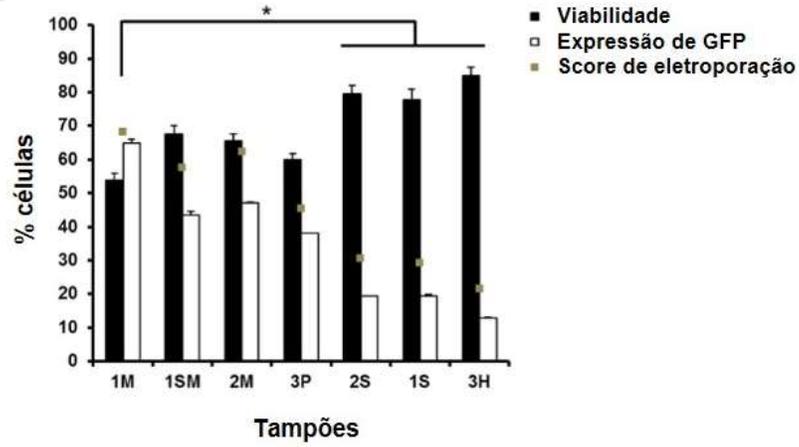
4.1: Estabelecimento de um protocolo para a modificação genética de células Jurkat e linfócitos T primários

Historicamente, a ferramenta mais eficiente para a modificação genética de linfócitos T são os vetores virais, principalmente os derivados do retrovirus (MLV) e lentivirus (HIV), que permitem a expressão estável do transgene através da integração no genoma da célula alvo. No entanto, a produção deste vetores é um procedimento demorado e trabalhoso, sendo necessário pelo menos 1 semana para que o processo seja completado. Ao final do protocolo a titulação dos vetores torna-se necessária uma vez que é preciso determinar a quantidade de partículas a ser adicionada nas células para evitar toxicidade. Além disso, como estes vetores derivam de vírus patogênicos, devem ser manipulados e descartados seguindo rígidas normas de biossegurança.

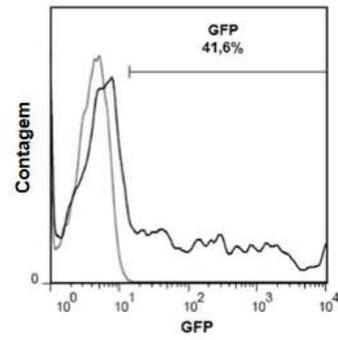
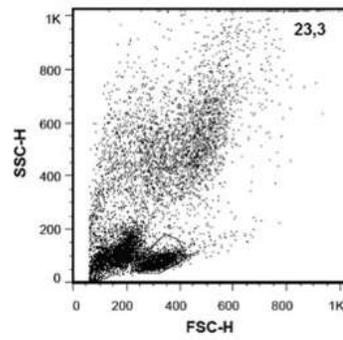
A criação de vetores não virais que permitem a integração do transgene representou um grande avanço na modificação genética de linfócitos T, facilitando a sua aplicação no contexto experimental. Dentre os mais utilizados estão os vetores baseados em transposons, como o *Sleeping Beauty* (SB). Neste sistema o cassete de expressão (promotor + transgene) é flanqueado por sequencias repetitivas IR/DRs reconhecidas pela transposase, enzima que é suplementada *in trans* por outro plasmídeo. Após o reconhecimento a transposase cliva e insere o cassete no genoma da célula com alta eficiência (IVICS et al., 2009). Geralmente os plasmídeos codificando a transposase SB e o transgene são entregues por meio de eletroporação, sendo os métodos baseados em pulsos de ondas quadradas, como o adotado pelo eletroporador Nucleofector (Lonza), os mais eficientes para células T. No entanto, o uso repetido deste aparelho estaria associado à utilização em larga escala dos kits de eletroporação

específicos para linfócitos T, que apesar de serem altamente eficientes iriam inviabilizar financeiramente os experimentos.

Na tentativa de criar um protocolo que não dependesse destes kits, desenvolvemos 7 soluções com diferentes composições destinadas à eletroporação (1M, 1SM, 2M, 3P, 2S, 1S e 3H) para serem testadas juntamente com o programa de eletroporação recomendado para linfócitos T pela Lonza, U-014. Após diversos experimentos, demonstramos que a solução 1SM é tão eficiente quanto o kit da Lonza na eletroporação de linfócitos T humanos não ativados (figura 4.1 e figura 4.2). O tampão 3P também se mostrou eficiente para a eletroporação de células Jurkat utilizando-se o programa X-001 (figura 4.3).

A**B**

Doador 1



Doador 2

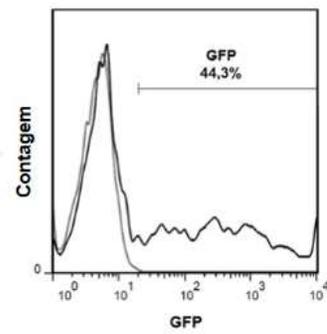
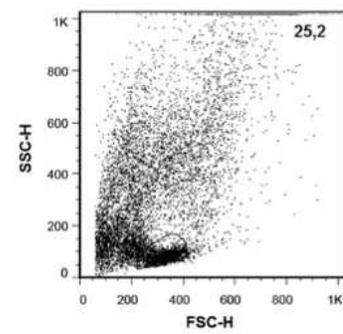
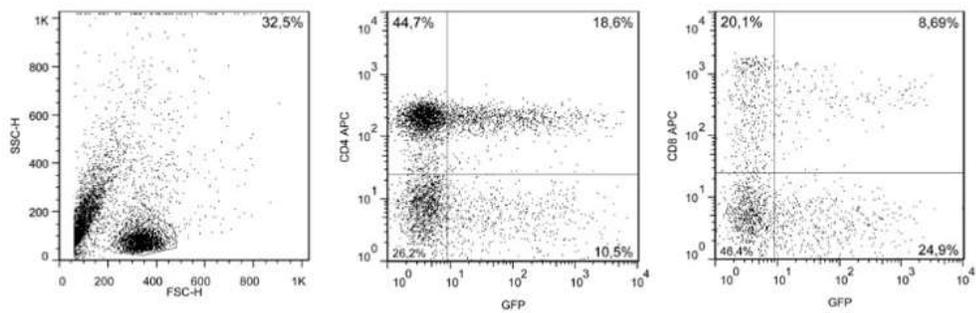
**C**

Figura 4.1: Otimização da eletroporação em PBMCs humanos. (A) PBMC de dois doadores saudáveis foram eletroporados usando 7 diferentes tampões e 4ug de plasmídeo pT2-GFP. A viabilidade celular e a expressão da GFP foram analisadas após 24 horas por citometria de fluxo. A viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo através do perfil de FSC/SSC e foi normalizada em relação às células eletroporadas sem plasmídeo (mock; considerado 100%). Os valores mostrados são a média de dois doadores em triplicata e estão mostrados como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA One Way e Tukey pós-teste (* = P, 0,05). (B) Gráficos representativos da expressão de GFP (pT2-GFP; 4ug) 24 horas após a eletroporação com tampão 1SM. Os números representam a porcentagem de células no *gate*. Linha cinza = controle negativo; linha preta = células eletroporadas com pT2-GFP. (C) Linfócitos eletroporados foram corados para CD4 e CD8 24h após a eletroporação com tampão 1SM e 4ug plasmídeo pT2-GFP. Os dados são representativos de dois doadores. Os números representam a porcentagem de células no *gate*.

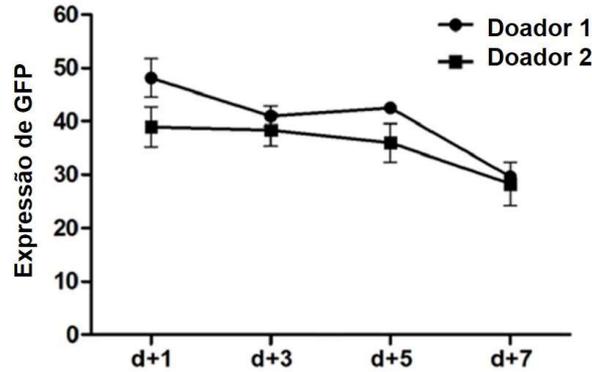


Figura 4.2: Expressão de longo prazo de GFP após eletroporação com o tampão 1SM. PBMCs de dois doadores foram eletroporados com 4ug de pT2-GFP utilizando-se o tampão 1SM. Após 24h as células foram ativadas com anti-CD3/anti-CD28 e a expressão foi avaliada por citometria de fluxo.

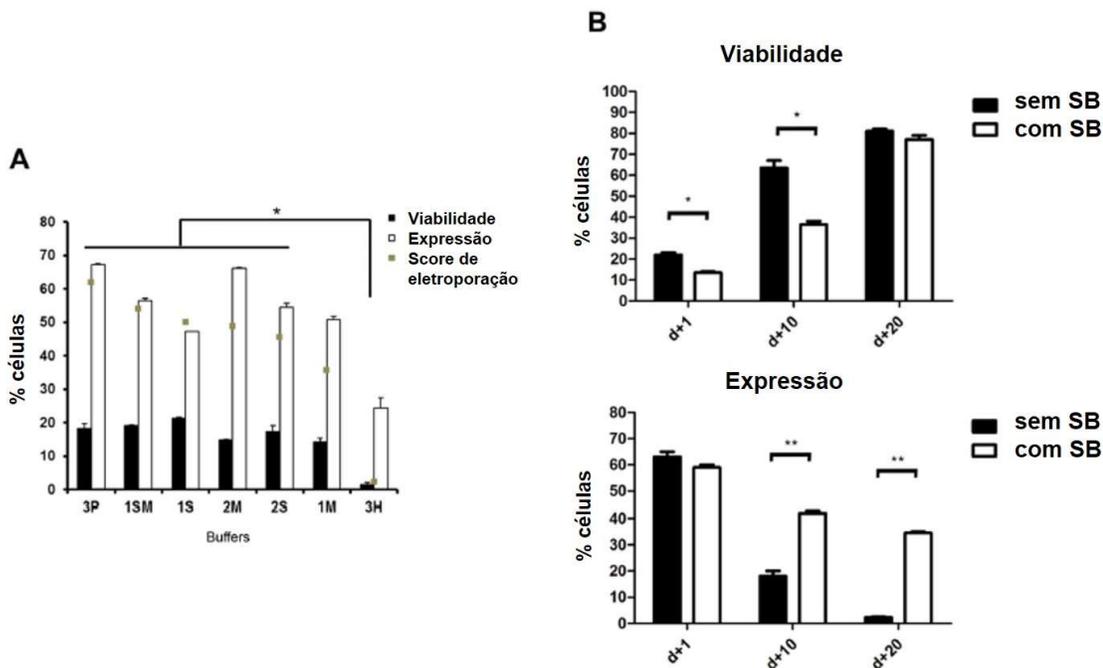


Figura 4.3: Eletroporação da linhagem Jurkat. (A) Células Jurkat foram eletroporadas com 4 μ g do plasmídeo pT2-GFP utilizando-se um dos 7 tampões. Viabilidade e expressão de GFP foram avaliadas por citometria de fluxo após 24h. A viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo através do perfil de FSC/SSC e é expressa como % do controle eletroporados sem plasmídeo (mock; considerado 100%). A análise estatística foi realizada através de ANOVA e teste de Tukey (*: P=0,05). (B) Células Jurkat foram eletroporadas com tampão 3P. A viabilidade celular e expressão GFP foram observados até d+20. Os valores nesta figura são a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata e são mostrados como média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não parado; P = 0,05 (*); P = 0,01 (**).

O conjunto dos resultados de otimização das eletroporações e também a caracterização da utilização deste protocolo para a eletroporação de linfócitos T murinos estão descritos no artigo contido no anexo II deste documento (CHICAYBAM et al., 2013).

Com o objetivo de caracterizar se esta ferramenta de eletroporação também pode ser utilizada em outros contextos biológicos, realizamos no nosso laboratório um esforço de descrição da viabilidade da utilização destas ferramentas de eletroporação em diferentes contextos celulares, que incluíram células tronco hematopoiéticas e células mesenquimais derivadas de gordura de pacientes, além de linfócitos T humanos editados geneticamente com CRISPR e diversas linhagens celulares humanas e murinas que representam modelos biológicos relevantes. Os tampões se mostraram eficientes em todos os contextos testados. Os resultados desta caracterização estão submetidos para publicação e se encontram depositados

no servidor de preprint bioRxiv (os dados podem ser consultados em <http://biorxiv.org/content/early/2016/09/07/073387>) e já estão submetidos para publicação.

4.2: Avaliação dos CARs inibitórios anti-CD20 na linhagem Jurkat

Todos os CARs inibitórios foram desenhados tendo como base a sequência do CAR de ativação anti-CD20 20z, sendo a única diferença a região intracelular. Antes da construção destes novos CARs, realizamos alguns experimentos para avaliar a funcionalidade do CAR 20z com o objetivo de caracteriza o funcionamento do scFV anti CD20. Células Jurkat 4.30 expressando este CAR apresentaram atividade de luciferase quando incubadas por 8h com as células alvo K520 (K562 CD20+) (figura 4.4). Utilizando o protocolo descrito acima, eletroporamos PBMCs com o plasmídeo codificando 20z e um dia depois estimulamos as células com a linhagem linfoblásticoide L388 (NOWILL et al., 1986). Como podemos ver nas figuras 4.5A e 4.5B, as células possuem expressão do CAR e esta vai aumentando com o passar do tempo, possivelmente um reflexo da sinalização de ativação do 20z. Além disso, o CAR 20z induz uma grande proliferação dos linfócitos (figura 4.5C) e estas células possuem alta atividade citotóxica contra a linhagem leucêmica Nalm-6 (figura 4.5D).

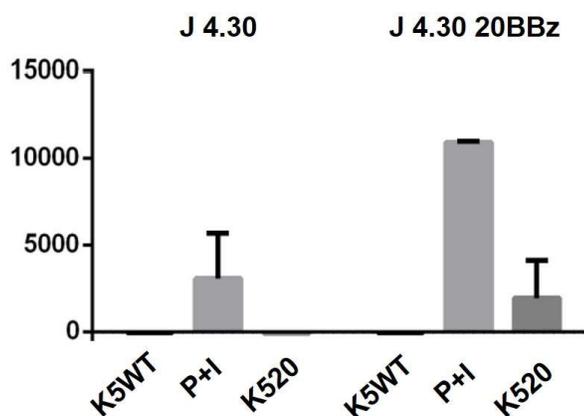


Figura 4.4: Análise da atividade de luciferase em células Jurkat após 8h de incubação com as células alvo na proporção 1:1 ou PMA+Ionomomicina (P+I). O gráfico mostra a média média \pm desvio padrão e é representativo de dois experimentos realizados em triplicata.

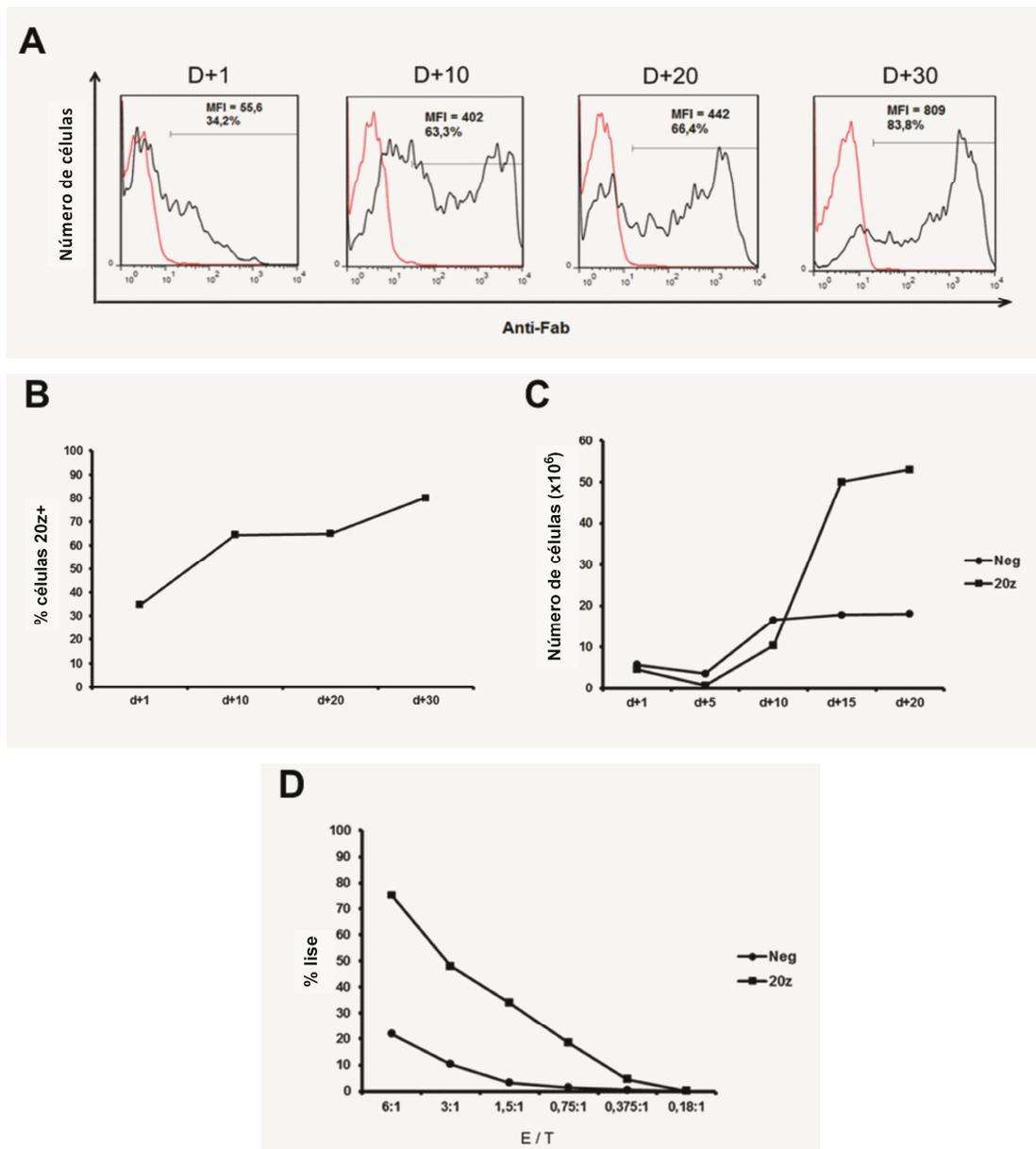


Figura 4.5: PBMCs de um doador foram eletroporadas com 20ug de pT3-20z e 0,5ug de SB100x usando o tampão 1SM e no dia seguinte as células foram estimuladas com L388 irradiadas. (A) A expressão do CAR foi avaliada até o d+30 por citometria de fluxo utilizando-se um anticorpo anti-Fab (linha vermelha = células eletroporadas sem plasmídeo – mock – marcadas com anti-Fab; linha preta = linfócitos eletroporados com 20z). (B) Dados da expressão do 20z até o d+30, resumindo os dados do painel A. (C) Cinética de expansão das células mock (Neg) ou 20z+ após estímulo com L388. (D) Os linfócitos expandidos foram utilizados em diferentes razões efetora/alvo (E/A) em ensaio de lise contra as células da linhagem Nalm-6 GFP+ CD20+.

Como uma primeira forma de avaliar o potencial inibitório de cada um dos CARs construídos, expressamos diferentes receptores em conjunto com o CAR de ativação 19BBz. As células foram eletroporadas e a população duplo-positiva foi purificada por sorting. Como

podemos ver na figura 4.6, grande parte das células apresentavam marcação para os dois CARs após a purificação.

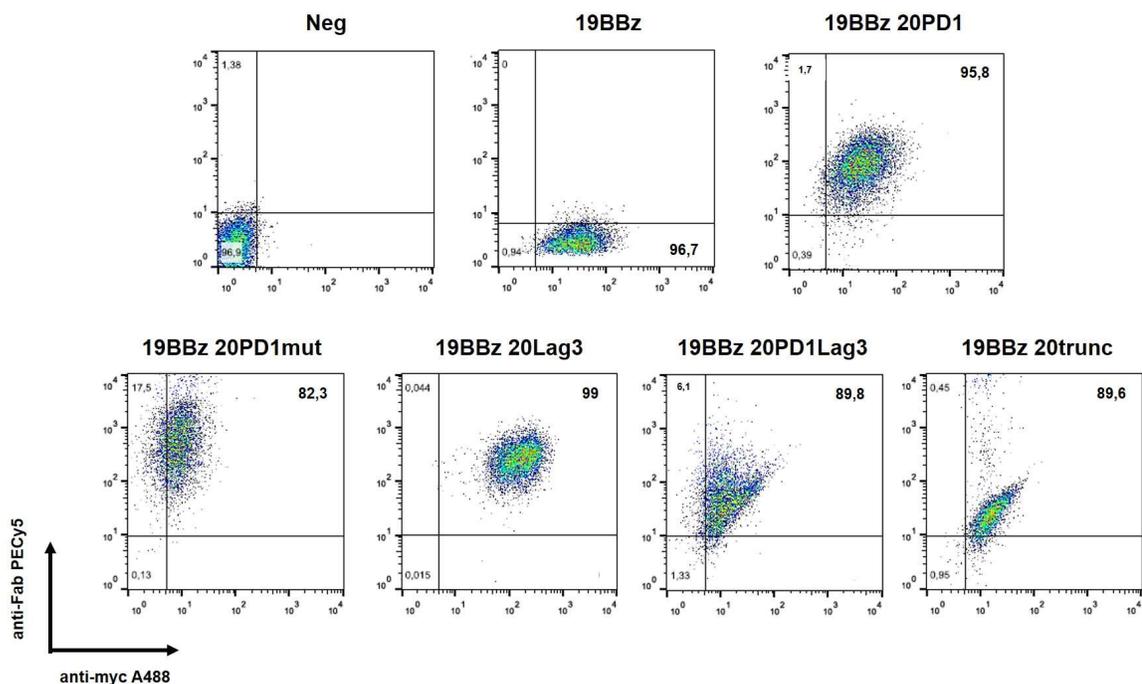


Figura 4.6: Expressão dos diferentes CARs na linhagem Jurkat 4.30 após purificação por sorting. As células foram eletroporadas utilizando-se o tampão 3P e os plasmídeos codificando os CARs indicados. Os CARs foram detectados por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-myc conjugado a Alexa488 (A488) (para detecção do 19BBz) e anti-Fab conjugado a biotina revelado com uma estreptavidina-PECy5 (para detecção dos CARs anto-CD20).

Os CARs construídos devem ser capazes de inibir a função efetora dos linfócitos T induzida pelo 19BBz, uma ativação composta pelo sinal 1 vindo da cadeia zeta e o sinal coestimulatório do domínio 4-1BB. Para uma análise mais completa, 3 parâmetros foram escolhidos para avaliação: translocação do fator de transcrição NFAT para o núcleo (avaliado pela expressão de luciferase sob o controle de um promotor mínimo responsivo ao NFAT), expressão do marcador de ativação recente CD69 e produção da citocina IL-2. Para avaliar estes parâmetros, utilizamos um sistema de co-cultura entre as células Jurkat e células alvo K562 parental (WT, do inglês wild type) ou modificadas para expressar os antígenos alvo CD19 (K519), CD20 (K520) ou ambos (K5D). Após 8h de incubação, a atividade de luciferase foi avaliada. Os dados estão demonstrados na figura 4.7. Como podemos ver, os domínios derivados de PD-1 e BTLA apresentaram uma tendência de inibir a atividade de luciferase, enquanto que o domínio LAG-3 não apresentou este efeito. Utilizamos também um

domínio PD-1 com os motivos de sinalização ITIM e ITSM mutados (PD1mut), onde as tirosinas necessárias para a sinalização via estes motivos foram alteradas para fenilalanina. Nesta condição, as células Jurkat incubadas com a K5D apresentaram atividade de luciferase semelhante à condição K519, indicando que a mutação possivelmente afetou a capacidade inibitória deste domínio. A combinação dos domínios PD-1 e LAG-3 no mesmo CAR não apresentou atividade inibitória, mostrando um perfil semelhante ao CAR contendo apenas LAG-3. É importante ressaltar que em todas as condições a incubação das células Jurkat parental com a K520 não alterou a atividade de luciferase, permanecendo similar ao sinal obtido com a co-incubação com a K5WT.

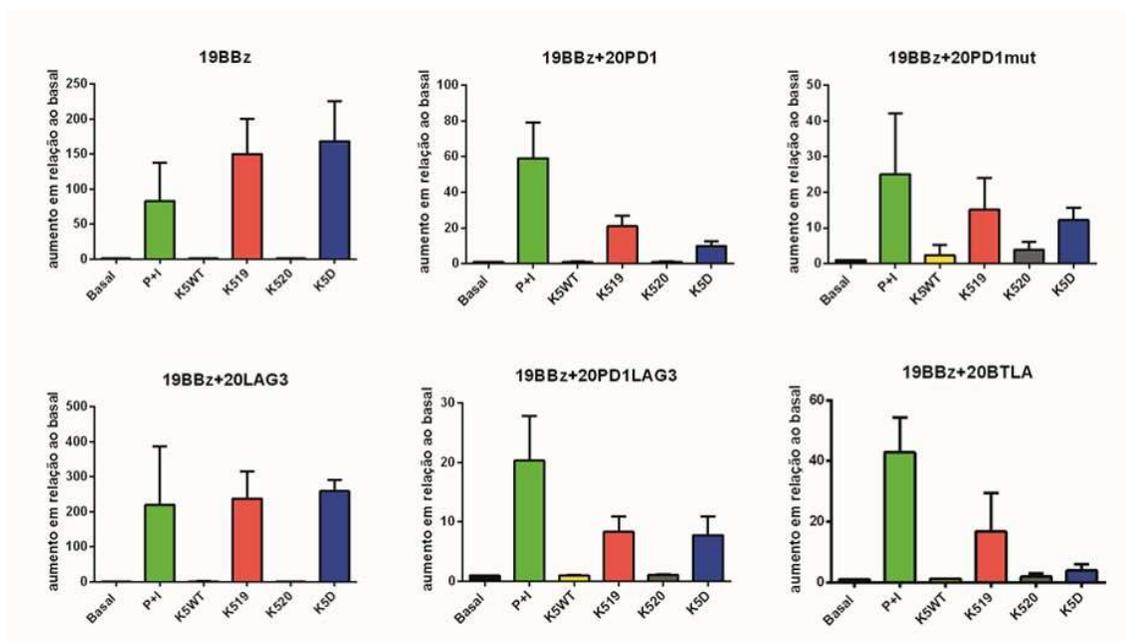


Figura 4.7: Ensaio de luciferase utilizando células Jurkat expressando diferentes combinações de CARs. Células Jurkat (10^5) foram incubadas na proporção de 1:1 com as células alvo por 8h. Após este período as células foram lisadas e a atividade de luciferase foi avaliada utilizando-se um luminômetro. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey.

A proteína CD69 é uma glicoproteína de membrana que tem a expressão aumentada após a ativação dos linfócitos T, sendo utilizada como marcador recente deste fenômeno (Cambiaggi, 1992), também em células da linhagem Jurkat (Aussel, 1996; Fernández-Riejos, 2008). Sendo assim, avaliamos o percentual desta molécula por citometria de fluxo após 24h de co-cultura entre as células Jurkat e as células alvo. Neste experimento adicionamos um

CAR anti-CD20 chamado 20trunc que é truncado na região transmembrana e não apresenta domínio de sinalização citoplasmática, atuando como um controle do experimento. Como podemos observar na figura 4.8, a maioria das linhagens de Jurkat modificadas apresentaram aumento do marcador CD69 após co-cultura com K519 e particularmente com K5D. No entanto, este aumento se mostrou muito menor na Jurkat expressando o CAR 20PD1 e os níveis de CD69 após estímulo com K519 ou K5D se mantiveram em patamares semelhantes, apontando um efeito inibitório deste CAR quando este parâmetro é analisado. Quando comparada às outras linhagens, a menor indução de CD69 na condição K519, onde o ligante do CAR inibitório não está presente, pode ser condizente com uma sinalização independente de ligante. Este fato é reforçado pelo resultado da Jurkat expressando 19BBz + 20trunc, onde a célula K519 foi capaz de induzir altos níveis de CD69. A célula Jurkat expressando 19BBz + 20BTLA não foi avaliada nesta série de experimentos.

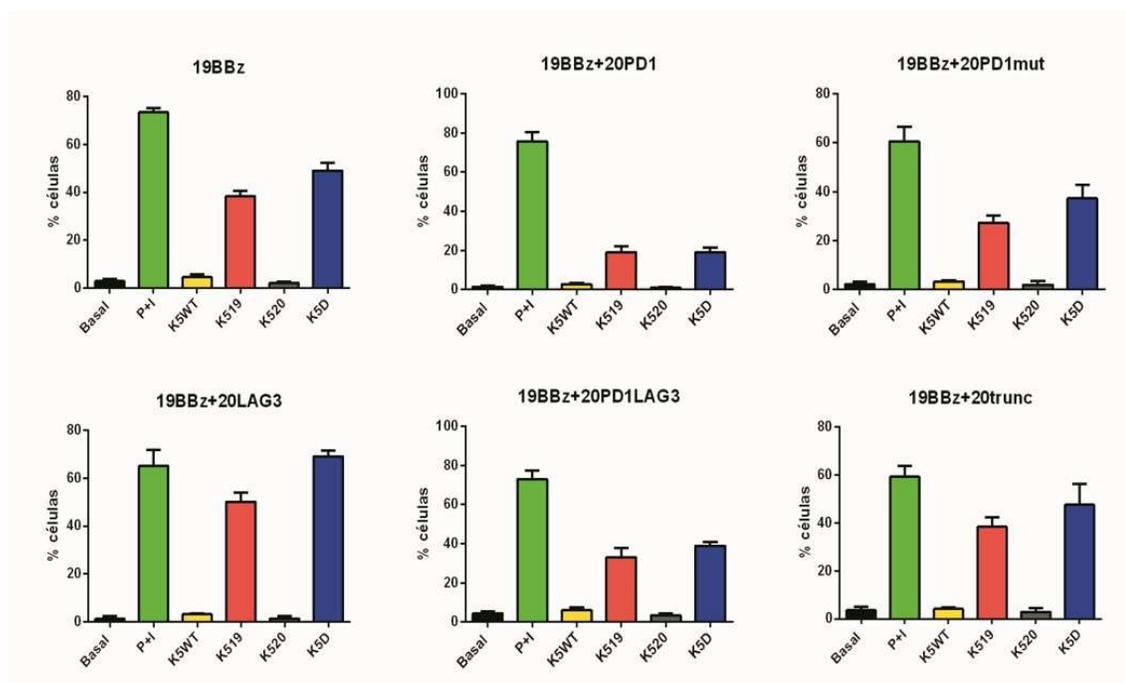


Figura 4.8: Análise por citometria de fluxo do marcador de ativação CD69 24h após a co-incubação das células Jurkat expressando diferentes combinações de CARs com as células alvo. A proporção de Jurkat:alvo foi de 1:1. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey.

A citocina IL-2 é produzida após a ativação dos linfócitos T e o coestímulo através do 4-1BB aumenta a produção desta molécula, atuando como um fator de crescimento para estas células (SAOULLI et al., 1998). A avaliação da produção desta molécula foi realizada através

de ELISA após 24h de incubação com as células alvo. A Jurkat 19BBz+20LAG3 apresentou um perfil de produção de IL-2 semelhante à Jurkat 19BBz, corroborando os resultados dos outros parâmetros e indicando que este domínio não apresenta atividade inibitória neste sistema para os parâmetros avaliados neste trabalho. Já as condições que possuem o domínio PD1, PD1mut ou PD1LAG3 apresentaram uma diminuição da produção quando incubadas com K5D e também com K519, indicando uma possível função independente de ligante, como visto também nos outros parâmetros avaliados (expressão de luciferase e de CD69). No entanto, a baixa produção de IL-2 vista na células 19BBz+20trunc após incubação com os mesmos alvos, onde se esperava um perfil semelhante à Jurkat 19BBz, impossibilita a definição deste fenômeno (figura 4.9) e sugere que eventualmente os domínios de scFv+transmembrana sejam já suficientes para interferir em qualquer ativação promovida pelo CAR 19BBz através de mecanismos que não estão claros neste momento, mas que poderiam envolver, por exemplo, a heterodimerização dos receptor 19NNz com o 20 transmembrana, uma vez que os domínios transmembrana de ambos são baseados no CD8 alfa.

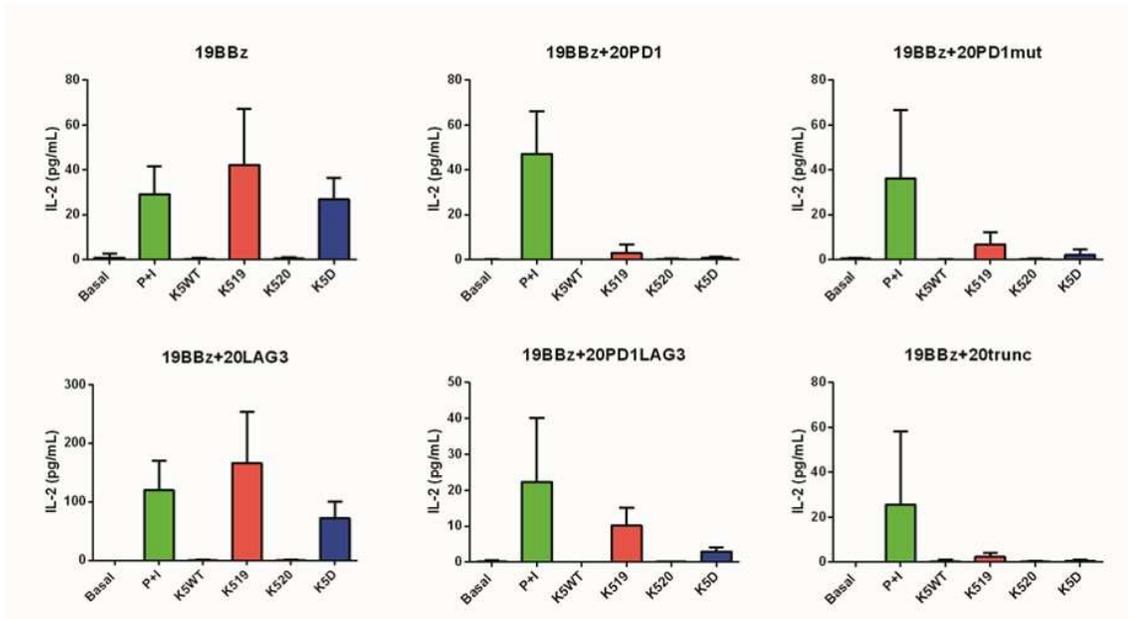


Figura 4.9: A produção da citocina IL-2 foi avaliada por ELISA após 24h de co-cultura entre as células Jurkat e as células alvo na proporção de 1:1. O gráfico representa a média \pm desvio padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. As condições K519 e K5D não apresentaram diferença significativa em nenhuma das condições após análise dos dados utilizando-se ANOVA (um fator) e teste de múltiplas comparações de Tukey.

4.3: Avaliação da função inibitória do CAR 20PD1 sobre a expansão de linfócitos primários humanos

Baseado nos resultados obtidos na linhagem Jurkat, o receptor 20PD1 foi escolhido para a avaliação em células T primárias humanas. Para a expansão das células CAR+ utilizamos como estímulo a linhagem linfoblástica L388, um linfócito B alogênico imortalizado por vírus EBV que expressa diversos ligantes coestimulatórios (CD80, CD86) e MHC de classe I, apresentando constitutivamente peptídeos virais e atuando como uma eficiente APC (figura 20). Além disso, por ser um linfócito B maduro, a L388 expressa altos níveis de CD19 e CD20, os ligantes dos CARs ativadores e inibitórios, respectivamente, permitindo a avaliação da função destes CARs em culturas de longo prazo. Parte das células (~33%) também expressa PDL1, um ligante do receptor PD-1 (figura 4.10).

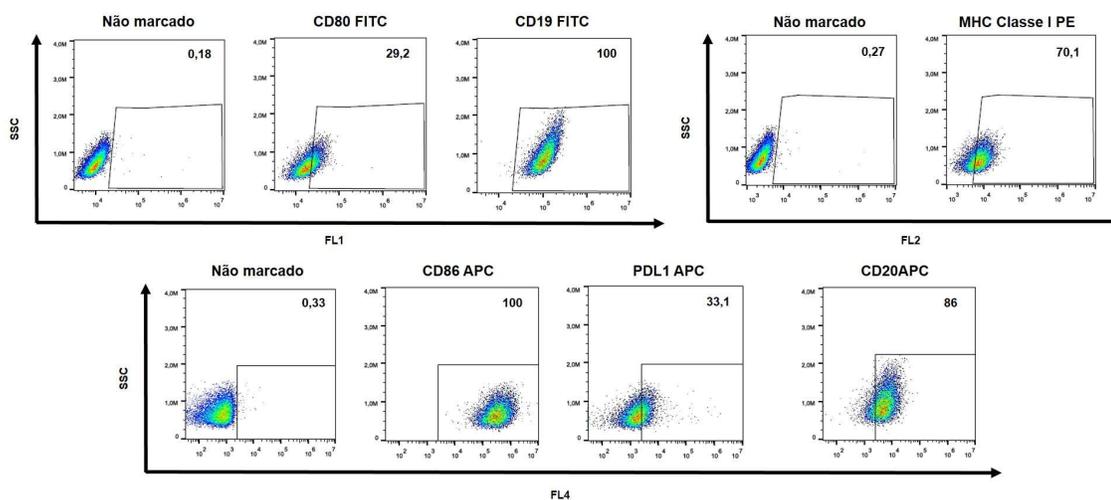


Figura 4.10: Fenotipagem da linhagem L388. Células da linhagem L388 foram marcadas com anticorpos para detecção das proteínas de membrana CD80, CD86 (moléculas coestimulatórias), MHC classe I, PDL1 (ligante do receptor PD-1), CD19 e CD20 (marcadores de células B) e analisadas por citometria de fluxo. Os números em negrito representam os percentuais de células dentro dos *gates*.

Após este estímulo os linfócitos T são ativados e começam a proliferar, apresentando em geral mais células CD4 do que CD8 e poucas células NK / NKT ao final do ciclo de expansão. Além disso, estas populações de linfócitos são compostas por células T de memória central (MC; CCR7+ CD62L+) e efetora (ME; CCR7+ CD62Lneg), e também por linfócitos efetores (CCR7neg CD62Lneg) (Figura 4.11).

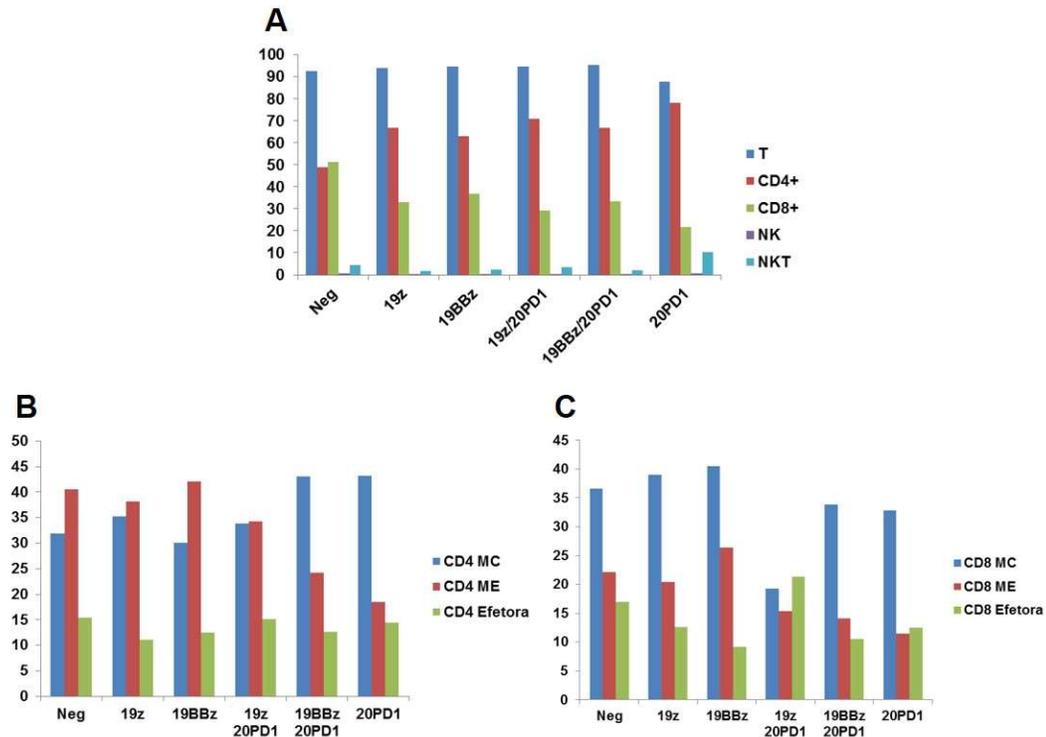


Figura 4.11: Gráficos mostrando o fenótipo dos linfócitos T obtidos após 13 dias de expansão com L388 para o doador 3. Em (A) foi determinada a composição de T (CD3+), NK (CD3-CD56+) e NKT (CD3+CD56+) nas células expandidas. O valor obtido para CD4+ e CD8+ está contido dentro da população de linfócitos T CD3+. Em (B) e (C) estão mostradas as subpopulações de linfócito T de memória para CD4+ e CD8+, respectivamente. MC = memória central (CCR7+ CD62L+); ME = memória efetora (CCR7+ CD62Lneg); linfócitos efetores foram determinados como CCR7neg CD62Lneg.

Após a co-eletroporação de dois plasmídeos (um para cada CAR) obtemos uma população mista de linfócitos expressando o CAR de ativação, CAR inibitório ou ambos no d+1 do experimento (figura 4.12). Inicialmente realizamos os experimentos com o CAR de ativação de 2ª geração 19BBz, uma vez que este CAR já está sendo utilizado na clínica por diversos grupos (MAUDE et al., 2014; PORTER et al., 2011) e já se mostrou eficaz em diferentes modelos pré-clínicos (MILONE et al., 2009; CARPENITO et al., 2009). O desenho experimental prevê a avaliação da composição das diferentes populações de linfócitos CAR+ em uma cultura de longo prazo, levando à determinação da potencial função inibitória do 20PD1, com a diminuição da população contendo o CAR inibitório. Sendo assim, PBMCs foram eletroporados com pT3-19BBz ou pT3-19BBz + pT3-20PD1 e as culturas foram acompanhadas por até 3 ciclos de estimulação. Os linfócitos eletroporados apenas com o 19BBz apresentaram o enriquecimento das células CAR+ como esperado, uma vez que este

receptor fornece uma vantagem seletiva devido à sua função de ativação (figura 4.13). No entanto, para a nossa surpresa, a condição que foi eletroporada com os plasmídeos para os dois CARs não mostrou a diminuição da frequência de linfócitos duplo positivos (19BBz+20PD1) em relação aos linfócitos expressando apenas 19BBz, sugerindo que o CAR 20PD1 não apresenta um efeito deletério sobre a proliferação destas células *in vitro* (figura 4.13).

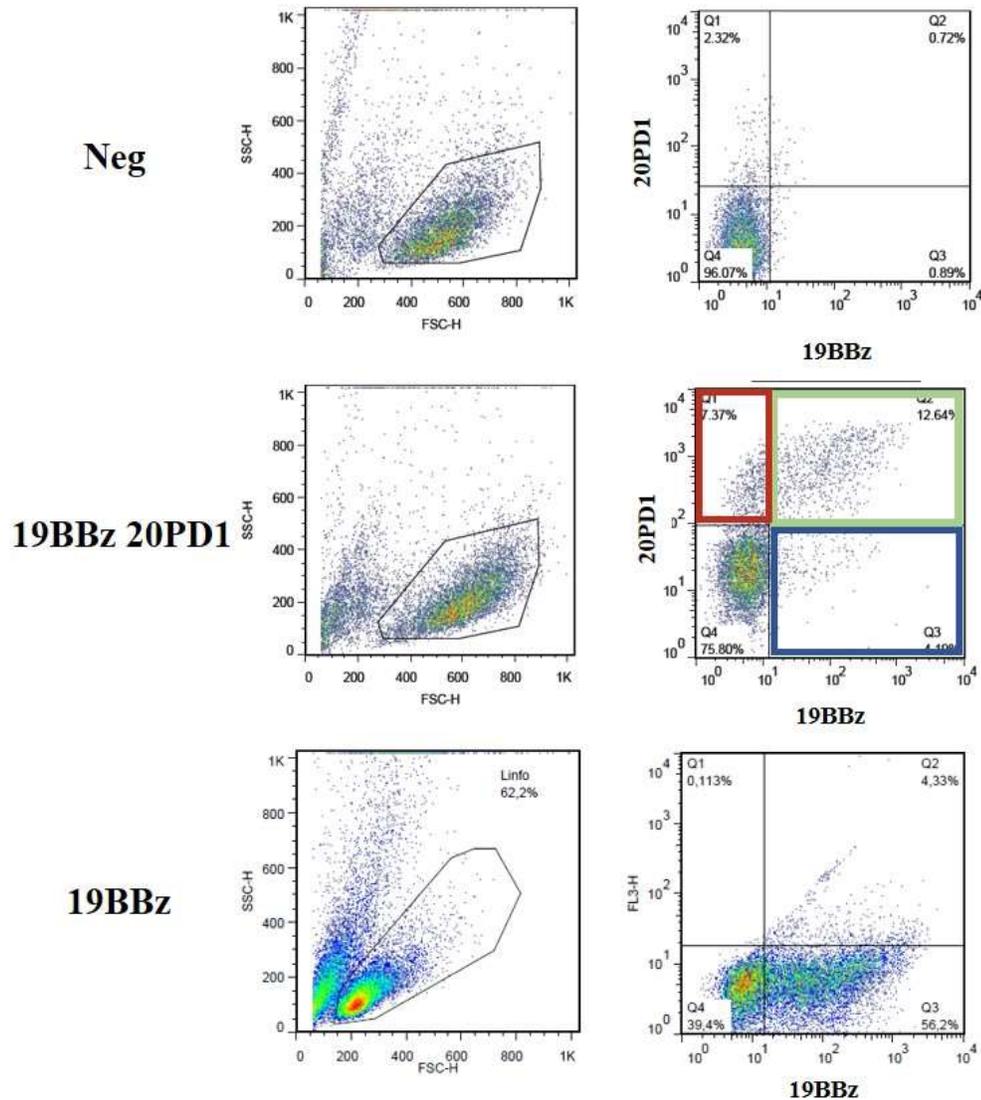


Figura 4.12: Gráfico representativo da expressão dos CARs após 20 dias de expansão usando como estímulo a linhagem L388. As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo. Os quadrados coloridos nos painéis do meio ilustram as cores utilizadas para identificar as três diferentes subpopulações da condição 19BBz 20PD1 nos resultados descritos nesta tese: linfócitos 19BBz+ (azul), 20PD1+ (vermelho) e 19BBz+ 20PD1+ (verde).

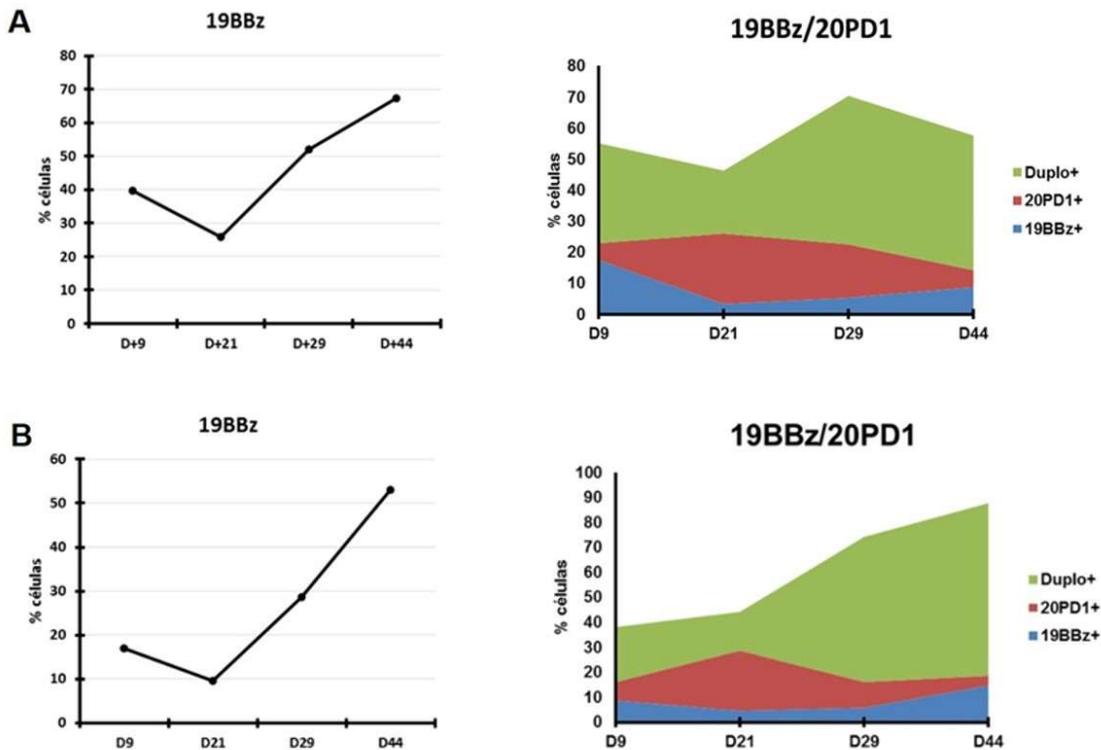


Figura 4.13: Expressão dos CARs nas condições 19BBz e 19BBz 20PD1 ao longo do ciclo de expansão após estímulo com L388. (A) e (B) são dois doadores distintos (doador 1 e 2, respectivamente). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos.

Pouco ainda se sabe sobre a sinalização do PD-1 e seus efeitos sobre as diferentes populações de linfócitos. A utilização de um CAR de segunda geração pode dificultar a interpretação dos dados anteriores, uma vez que os linfócitos expressando 19BBz e 20PD1 estariam sinalizando através de três domínios diferentes ao mesmo tempo, sem contar os diversos ligantes apresentados pela L388 que também podem ter um papel nesta resposta. Levando em conta que 20PD1 não foi capaz de inibir a ativação mediada pelo 19BBz, é importante avaliar se este efeito é dependente do domínio 4-1BB ou não. Para verificar esta hipótese, construímos um CAR de primeira geração chamado 19z, contendo apenas a cadeia ζ do complexo TCR/CD3 e utilizamos 2 doadores para os experimentos. O acompanhamento a longo prazo da cultura mostrou que o CAR 19z também fornece uma vantagem seletiva para os linfócitos, sendo que esta ocorreu com mais intensidade do que o 19BBz no doador 3 (figura 4.14A). Já no doador 4 os CARs 19z e 19BBz se comportaram de maneira semelhante (figura 4.15A). Nas condições que receberam também o CAR inibitório, os linfócitos duplo positivos 19z+20PD1 continuaram apresentando um enriquecimento na cultura semelhante aos 19BBz+20PD1 quando comparados às outras frações, mostrando que o domínio PD-1

parece não ser capaz de inibir a proliferação de linfócitos ativados com CARs de primeira ou segunda geração em nosso sistema (comparar figura 4.14B com 4.14C e 4.15B com 4.15C). Neste experimento incluímos para os dois doadores a condição expressando apenas 20PD1 como controle e constatamos uma forte queda das células expressando este CAR inibitório ao longo do tempo, como esperado para a expressão de um CAR que não provê sinal ativador (figuras 4.14A e 4.15A). Estes dados sugerem que o 20PD1, na ausência dos CARs de ativação, representa uma desvantagem para estas células, se aproximando da sua função esperada por possuir um domínio inibitório de sinalização.

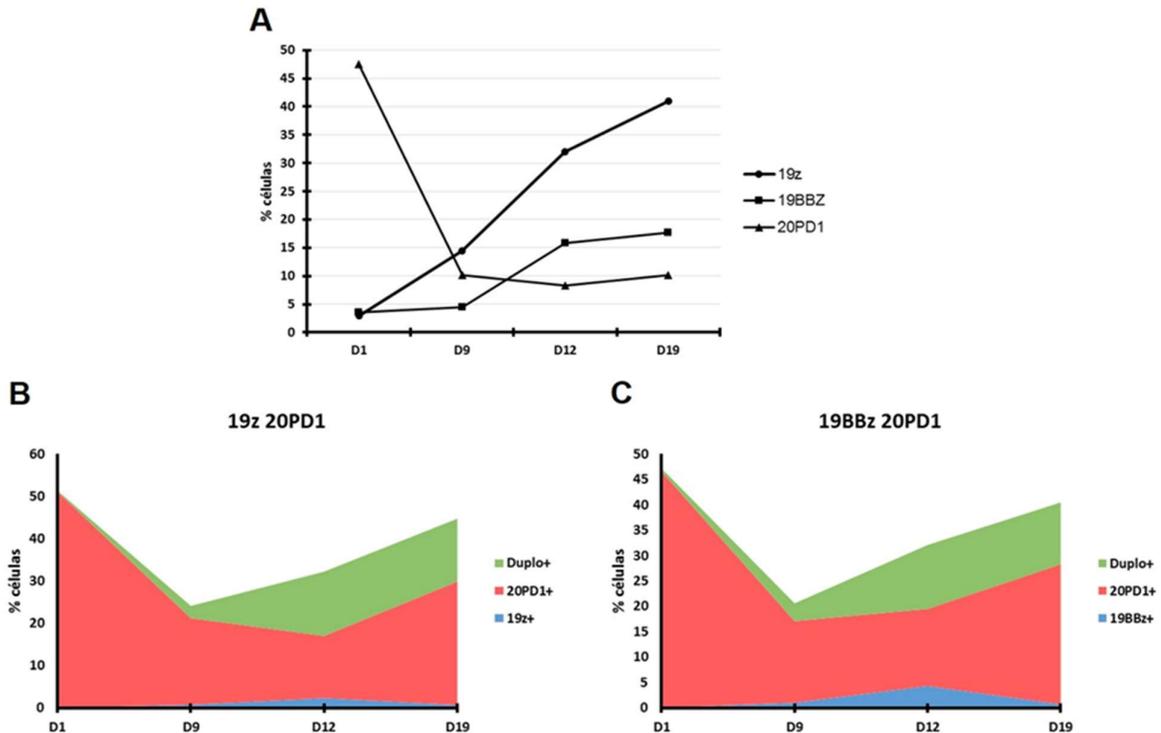


Figura 4.14: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 3, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19z+20PD1 em (B) e 19BBz+20PD1 em (C). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos.

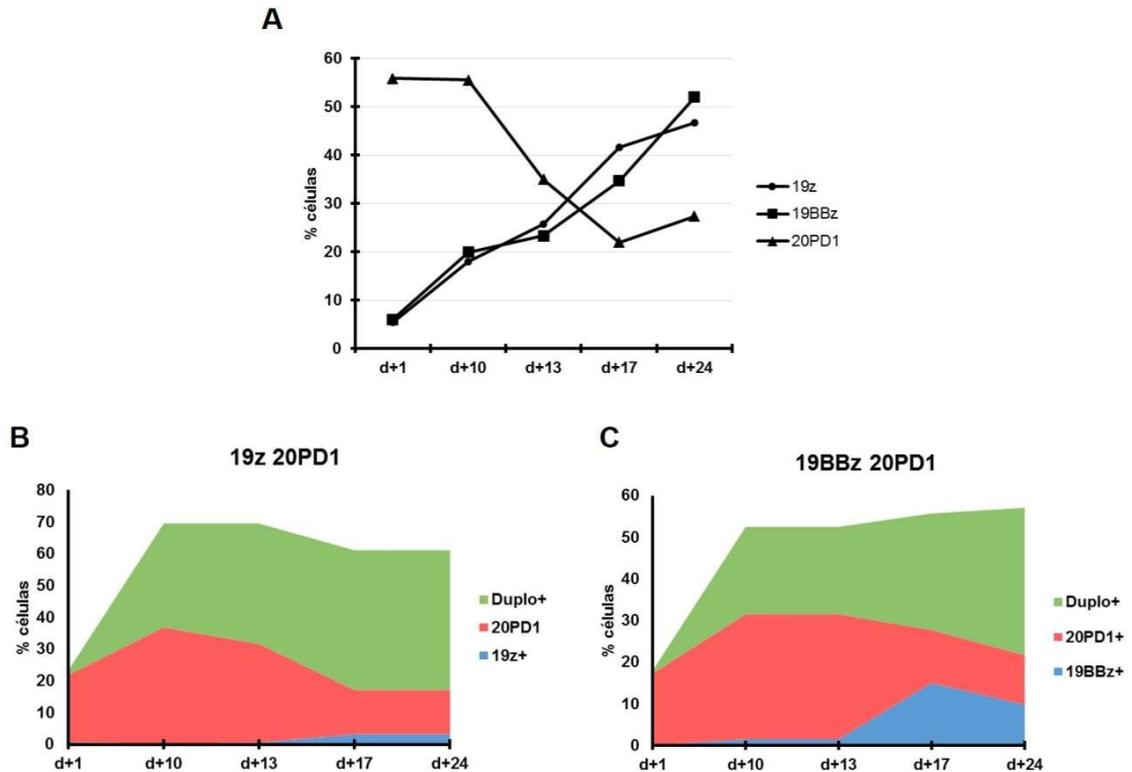


Figura 4.15: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 4, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19z 20PD1 em (B) e 19BBz 20PD1 em (C). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos.

Para avaliar se de fato o CAR 20PD1 possui um efeito inibitório sobre a proliferação na ausência dos CARs de ativação, construímos um CAR anti-CD20 contendo o domínio intracelular de PD1 mutado (20PD1mut) no ITSM e ITIM (motivos cruciais para a sinalização deste receptor) e também um CAR anti-CD20 sem domínio de sinalização, truncado na região transmembrana (20trunc). Como podemos observar na figura 4.16A, os linfócitos expressando 20PD1mut ou 20trunc apresentaram um pequeno aumento de frequência no início da cultura (d10) quando comparado aos linfócitos expressando 20PD1. No entanto, ao final da cultura (d25) todas as condições apresentaram frequências similares, sugerindo a ausência de atividade inibitória do domínio PD-1 neste sistema. O resultado dos linfócitos deste mesmo doador eletroporados com dois CARs reforçam a ausência de inibição por parte do PD-1, uma vez que a fração de linfócitos duplo-positivos apresenta o mesmo perfil de aumento de frequência ao longo da cultura independente do CAR anti-CD20 utilizado (figura 4.16B, 4.16C e 4.16D).

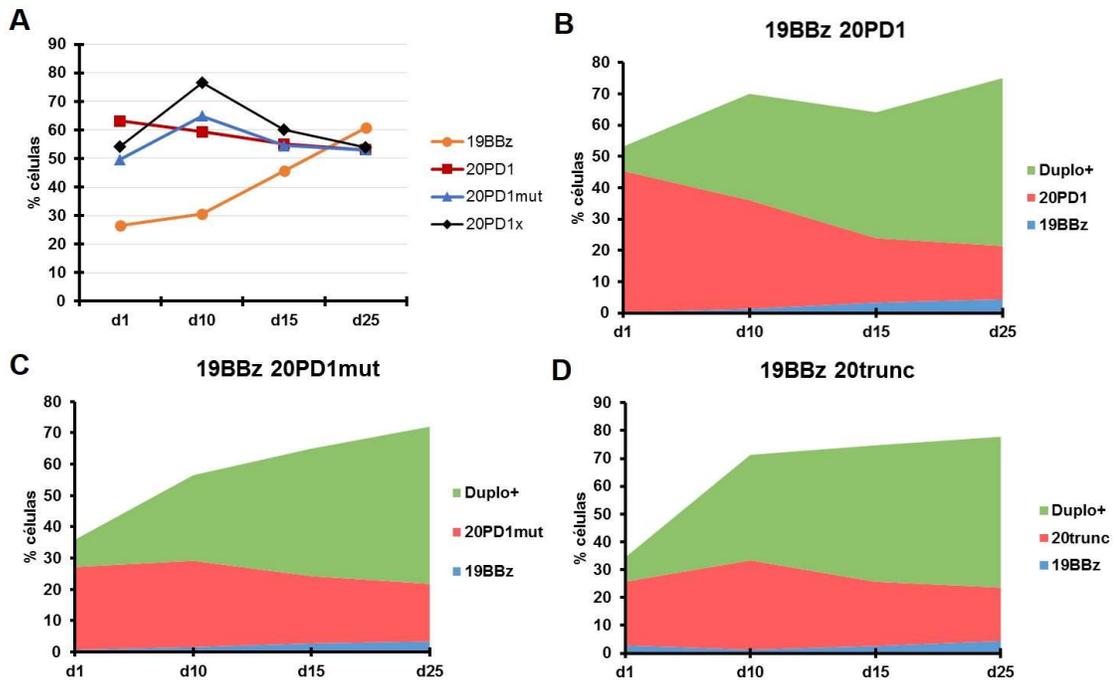


Figura 4.16: Expressão dos CARs ao longo da cultura para o doador 5, com os linfócitos expressando apenas um CAR representados em (A), expressando 19BBz 20PD1 em (B), 19BBz 20PD1mut em (C) e 19BBz 20trunc em (D). As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo em diferentes tempos.

4.4: Efeito do CAR 20PD1 sobre a produção de IFN γ e indução de apoptose

Dados já descritos na literatura apontam que o receptor PD-1 é capaz de inibir a secreção de IFN γ por linfócitos ativados (CHEMNITZ; PARRY; NICHOLS, 2004). Sendo assim, avaliamos os linfócitos expressando diferentes combinações de CARs de ativação e inibição e avaliamos o percentual de células IFN γ + através de citometria de fluxo após 6h de incubação com as células alvo. No entanto, após incubação com a linhagem Nalm-6 CD20+, que possui os ligantes dos CARs, a produção de IFN γ foi muito baixa, e todas as condições apresentaram um perfil semelhante aos linfócitos controle. Quando incubadas com a linhagem L388, que além de estimular as células CAR+ também ativa os clones anti-EBV através dos seus TCRs, a produção de IFN γ se mostrou maior, mas ainda assim sem diferenças entre as condições analisadas (figura 4.17A).

Avaliamos também a exposição do lipídeo fosfatidilserina (PS) após a incubação com as células alvo com o objetivo de verificar se o CAR 20PD1 é capaz de induzir apoptose nos linfócitos T. Como podemos ver na figura 4.17B, os linfócitos ativados através do 19BBz, independente da expressão qualquer CAR anti-CD20, possuem maior exposição de PS na

superfície. Este dado pode ser decorrente do processo de ativação da célula T, uma vez que resultados presentes na literatura apontam que PS pode ser exposto após a sinalização através do TCR (FISCHER et al., 2006). Já os linfócitos expressando apenas 20PD1, 20PD1mut ou 20trunc apresentaram exposição de PS semelhante aos linfócitos controle (negativos), sugerindo que o domínio PD-1 não apresenta um papel na exposição de PS no nosso sistema (figura 4.17B) nos tempos avaliados.

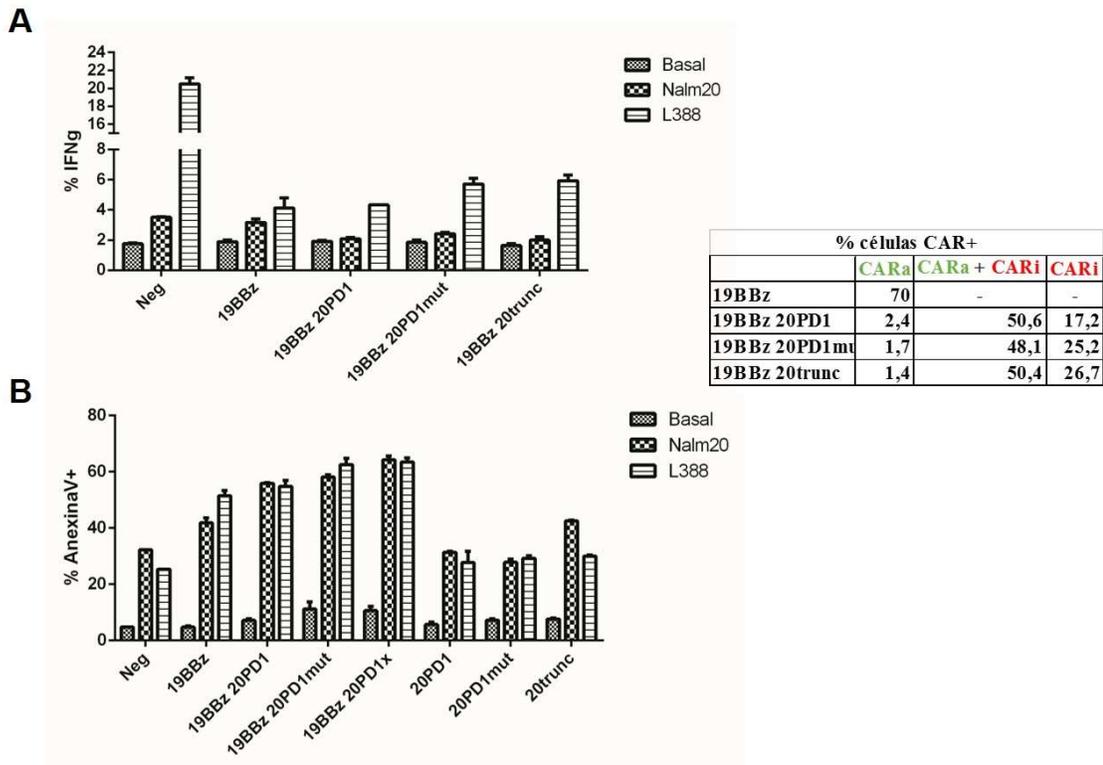


Figura 4.17: Impacto da expressão de 20PD1 sobre a produção de IFN γ e exposição de PS. (A) Linfócitos produtores de IFN γ foram identificados por citometria de fluxo após 6h de incubação com as células alvo Nalm-6 CD20 (Nalm20) ou L388. Monensina foi adicionada após 2h do início da cocultura. (B) Exposição de PS detectada utilizando-se AnexinaV – FITC após cocultura com as células alvo indicadas por 6h. Em ambos os experimentos as células alvo foram excluídas da análise utilizando-se um anticorpo anti-CD19 FITC, permitindo a análise apenas nas células CD19 negativas (linfócitos T). A tabela mostra o percentual de células CAR+ no dia de ambos os ensaios.

4.5: Avaliação da função inibitória do CAR 20PD1 sobre a atividade citotóxica de linfócitos primários humanos

Com o objetivo de avaliar a atividade antitumoral dos linfócitos expandidos e o efeito do CAR 20PD1 sobre esta atividade, realizamos um ensaio de citotoxicidade ao final do

segundo ciclo de estimulação com L388. A melhor situação para testar a função dos linfócitos expressando os dois CARs seria mimetizar o contexto fisiológico, onde estes encontrariam no mesmo tecido os blastos leucêmicos (CD19+, CD20neg) e os linfócitos B normais (CD19+, CD20+). Para isso, modificamos a linhagem Nalm-6 GFP (CD19+, CD20neg) para expressar CD20 por meio de vetores lentivirais e utilizamos uma população mista como alvo, onde aproximadamente 50% das células é CD20+ (figura 4.18).

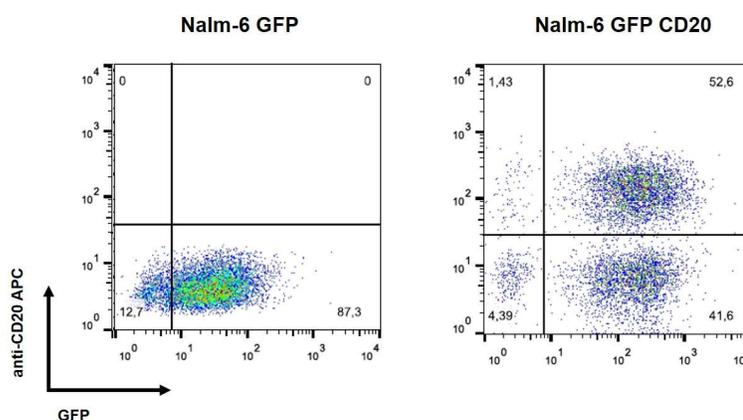


Figura 4.18: Avaliação da expressão de GFP e CD20 na linhagem Nalm-6 GFP+. Em (A) estão mostradas as células Nalm-6 GFP, com 87,3% de expressão desta proteína. Em (B) as células Nalm-6 GFP foram transduzidas com o vetor lentiviral EF1 α -CD20 e avaliadas 1 semana depois. A proteína CD20 foi detectada utilizando-se um anticorpo anti-CD20 APC.

Sendo assim, após incubação dos linfócitos com as células alvo pudemos avaliar por citometria de fluxo o percentual de lise total (avaliado pelo percentual de GFP na cultura) e a razão de células CD20+ em relação ao poço controle sem linfócitos (apenas Nalm-6 GFP com o percentual original de células CD20+). Como mostrado na figura 4.19A e 4.19C, os linfócitos expressando o CAR 19BBz apresentaram uma alta atividade citotóxica contra a Nalm-6. No entanto, surpreendentemente, os linfócitos expressando 19BBz e 20PD1 apresentaram uma taxa de citotoxicidade contra a Nalm-6 semelhante ou maior que os linfócitos 19BBz, indicando que o 20PD1 não está atuando como receptor inibitório neste contexto.

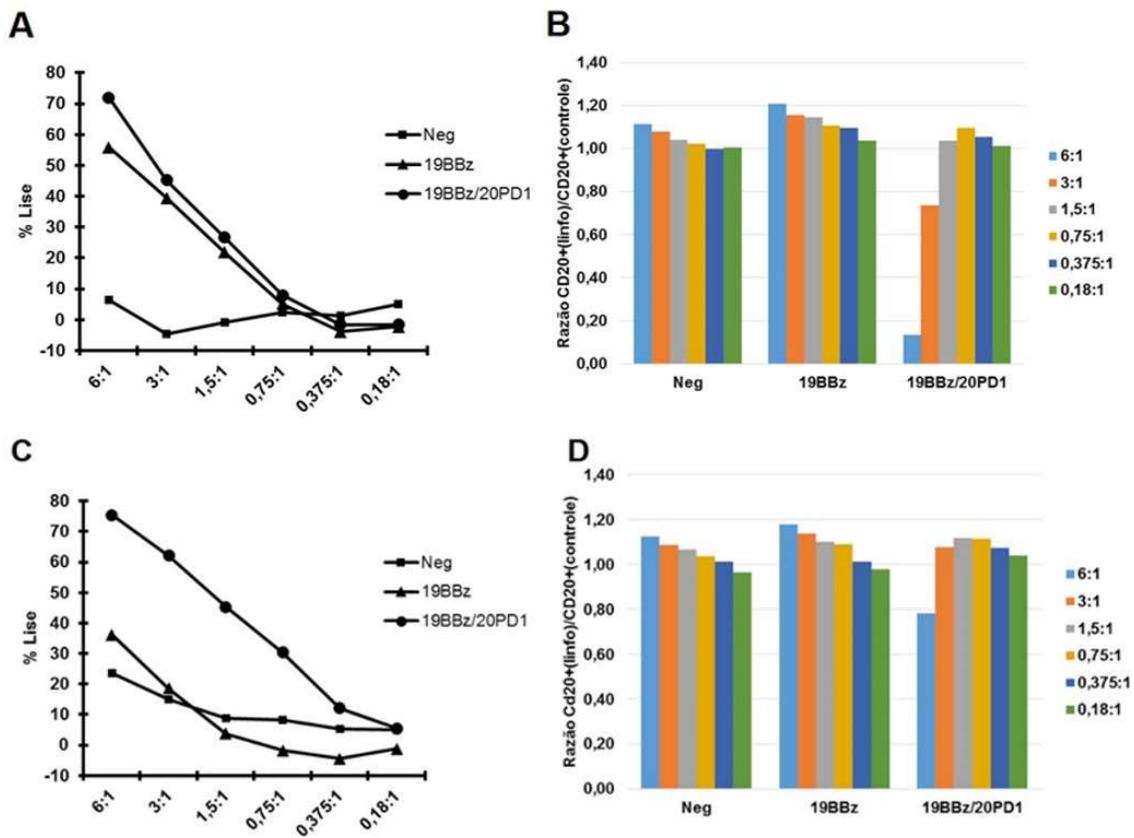


Figura 4.19: Resultado do ensaio de citotoxicidade dos doadores 1 (A, B) e 2 (C, D) realizado no fim do 2 ciclo (d29). No gráfico (A) e (C) está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no (B) e (D) a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

A análise da razão de células CD20+ após as 4h de incubação do ensaio de lise não mostrou um efeito de proteção sobre a fração CD20+. No desenho original do experimento esperávamos ver um aumento da fração Nalm-6 CD20+ na cultura, reflexo da proteção destas células devido à interação da molécula CD20 com o CAR inibitório 20PD1, resultando numa razão maior do que 1 (1 é a razão de células CD20+/CD20neg no poço controle, sem linfócitos). No entanto, não observamos um aumento significativo desta razão quando comparamos o resultado das células 19BBz+20PD1 com as condições Neg e 19BBz, demonstrando que este domínio não é capaz de inibir a atividade citotóxica dos linfócitos ativados através de 19BBz (figura 4.19B e 4.19D). Ao contrário do esperado, em razões efetora/alvo (E/A) mais elevadas observamos uma razão menor do que 1 na condição

19BBz+20PD1, o que poderia ser interpretado como uma eliminação preferencial das células CD20+ por parte destes linfócitos. Vale ressaltar que nestes experimentos o percentual de linfócitos 19BBz em relação aos linfócitos 19BBz+20PD1 não foi equalizado mas, como podemos ver na figura 4.13, este parâmetro não diferia substancialmente entre as duas condições no dia da realização do experimento (D+29) para ambos os doadores.

Avaliamos também a atividade inibitória do CAR 20PD1 sobre linfócitos expressando o CAR de 1ª geração 19z. O ensaio de citotoxicidade apresentou resultados distintos nos doadores 3 e 4, com diversas condições apresentando “lise negativa”. Este resultado pode ser interpretado neste tipo de ensaio como derivado da morte de linfócitos T durante o ensaio, uma vez que o valor de lise é calculado considerando a razão de células alvo contra células totais viáveis na leitura ao citômetro. No doador 3 o linfócito 19z+20PD1 mostrou atividade citotóxica similar ao linfócito 19BBz, com as demais condições apresentando baixa atividade (figura 4.20A).

O ensaio realizado no fim do segundo ciclo para o doador 4 mostrou que os linfócitos expressando dois CARs continuaram apresentando atividade citotóxica similar aos linfócitos expressando apenas os CARs de ativação, sendo que a retirada do domínio 4-1BB não resultou em uma diferença perceptível (figura 4.20C). A avaliação da população CD20+ apresentou um resultado similar aos experimentos anteriores, com uma diminuição da razão de células CD20+ na cultura após 4h de incubação com os linfócitos T, sejam eles 19z+20PD1 ou 19BBz+20PD1 (figuras 4.20B e 4.20D). Esses dados sugerem que este efeito é independente do domínio 4-1BB, podendo estar associado apenas ao domínio PD-1 ou a outro sinal fornecido pela L388.

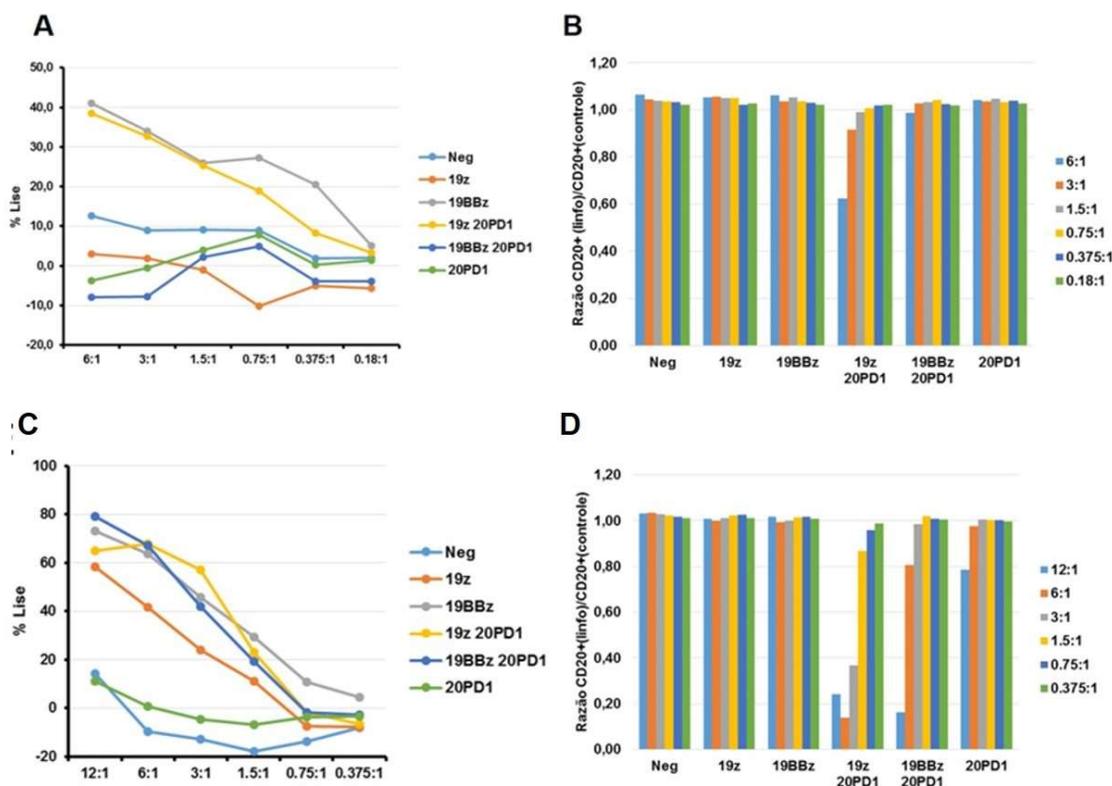


Figura 4.20: Resultado do ensaio de citotoxicidade do doador 4 (A e B) e 5 (C e D) realizado no fim do 2 ciclo (d20 e d23 respectivamente). No gráfico A e C está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no B e D a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

Os resultados obtidos com o CAR 20PD1 não podem ser justificados pelos dados descritos até o momento na literatura, que apontam o PD-1 como sendo um receptor que induz vias de sinalização inibitórias. Uma outra hipótese seria uma função independente de sinalização, onde um aumento da lise poderia ser justificado pela maior estabilização da interação entre o linfócito e o alvo devido à interação com dois CARs. Sendo assim, os experimentos de citotoxicidade foram repetidos utilizando-se também os CARs 20PD1mut e 20trunc. Como podemos observar na figura 4.21A, as condições expressando 19BBz apresentaram alta atividade de lise, mesmo quando também expressavam 20PD1, 20PD1mut ou 20trunc, mostrando que estes CARs não inibem a atividade citotóxica dos linfócitos T primários ativados através de CARs de ativação. Surpreendentemente, os linfócitos expressando 19BBz 20PD1mut e 19BBz 20trunc apresentaram nas maiores razões E/A a

mesma redução da fração CD20+ vista na condição 19BBz 20PD1 (figura 4.21B), condizente com a hipótese de função independente de sinalização. Para avaliarmos se este efeito é dependente da quantidade de receptor 20PD1, adicionamos uma condição ao experimento onde alteramos a massa eletroporada dos plasmídeos codificando 19BBz e 20PD1, utilizando 18ug e 2ug de cada um respectivamente (condição 19BBz 20PD1 18-2; figura 4.22). Como podemos ver na figura 4.21A, esta alteração não alterou a lise total mas a redução da fração CD20+ foi menor quando comparada à condição padrão dos outros experimentos (10ug de cada plasmídeo; 19BBz 20PD1 10-10) (figura 4.21B).

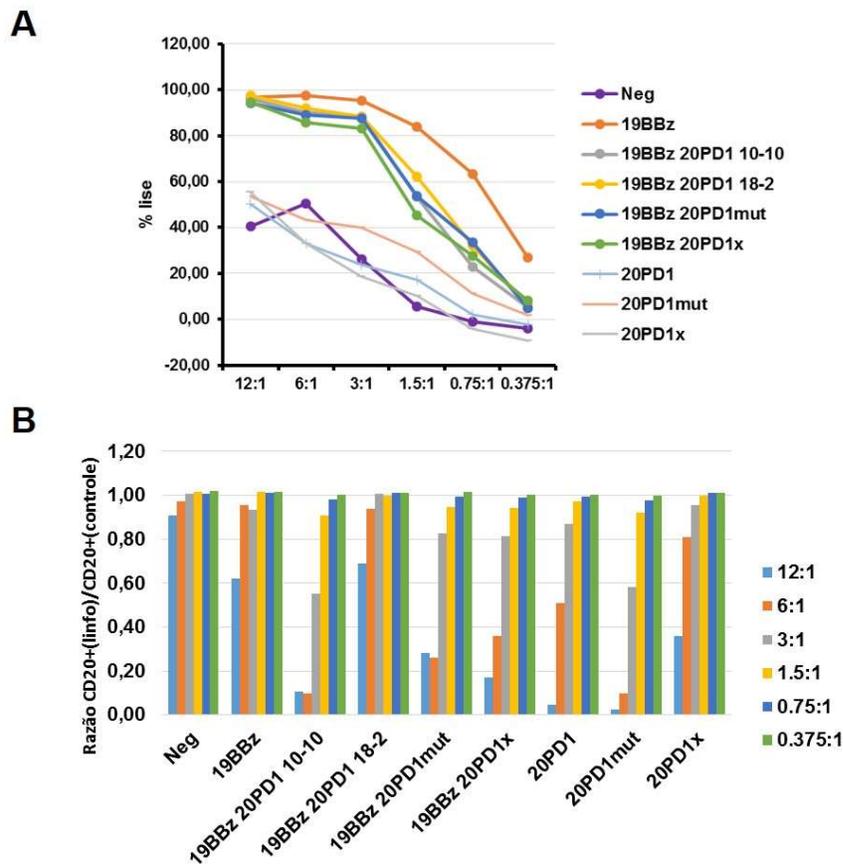


Figura 4.21: Resultado do ensaio de citotoxicidade do doador 5 realizado no fim do 1 ciclo (d25). No gráfico A está mostrada a lise total das células Nalm-6 GFP CD20 e no B a fração de células CD20+ após a incubação de 4h com os linfócitos T em diferentes razões E/A. O percentual de células alvo sobreviventes após as 4h de incubação foi determinado por citometria de fluxo. A lise total foi determinada através da fórmula $[100 - (\text{percentual de células GFP obtido} / \text{percentual de células GFP esperado}) \times 100]$. A razão de células CD20+ na cultura foi determinada através da fórmula $[\text{percentual de células GFP+CD20+ na condição com linfócitos} / \text{percentual de células GFP+CD20+ no poço contendo apenas células alvo}]$.

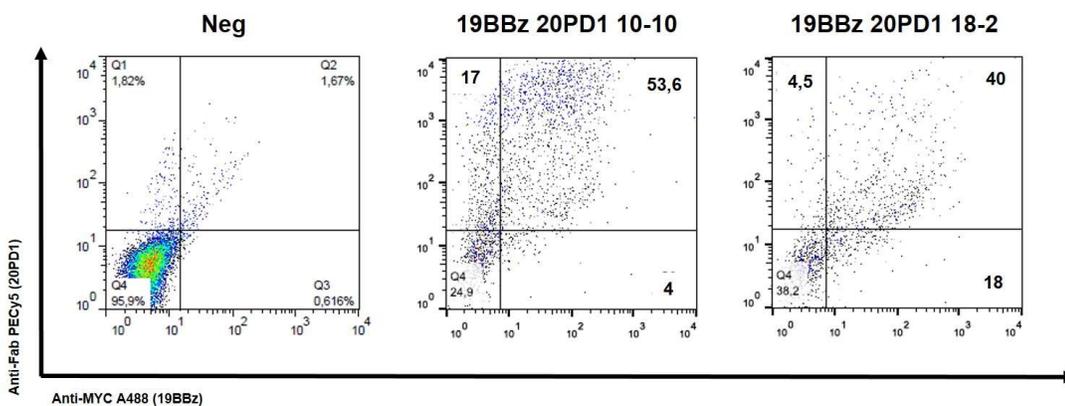


Figura 4.22: Gráfico representativo da expressão dos CARs 19BBz e 20PD1 utilizando diferentes massas de plasmídeo. Painel da esquerda: Neg (controle negativo eletroporado sem plasmídeo); painel do meio: 10ug de cada plasmídeo; painel da direita: 18ug do 19BBz e 2ug do 20PD1. Esta análise foi realizada no d25, mesmo dia do experimento da figura 4.21. As células foram marcadas utilizando-se os anticorpos anti-myc (19BBz) e/ou anti-Fab (20PD1) e analisadas por citometria de fluxo.

Para avaliar a hipótese de função independente de sinalização realizamos experimentos adicionais utilizando um outro método para análise da fração CD20+. Neste experimento uma linhagem Nalm-6 GFP+ expressando CD20 em 100% das células foi carregada com o corante eFluor 670 e estas células foram misturadas na proporção de 1:1 com células Nalm-6 GFP+ não carregadas. Após a incubação, avaliamos a fração de células positivas para o corante e fizemos a mesma análise anterior. Como podemos ver na figura 4.23, quando a fração CD20+ é identificada pelo anticorpo o resultado é semelhante aos experimentos mostrados anteriormente, com uma baixa detecção das células CD20+ quando o 20PD1 está presente. Além disso, observamos o mesmo efeito quando utilizamos receptores mutados (20PD1mut) ou truncados (20trunc) expressados em conjunto com o 19BBz ou não, o que seria altamente improvável visto que estes CARs possuem mutações em domínios críticos para a sinalização ou não possuem domínio citoplasmático. Em clara oposição, quando a detecção do corante foi utilizada para avaliar a lise das células alvo, a razão de células CD20+/CD20neg se mantém próxima de 1 em todas as condições, indicando que as células CD20+ não são eliminadas ou poupadas preferencialmente devido à atuação do CAR 20PD1.

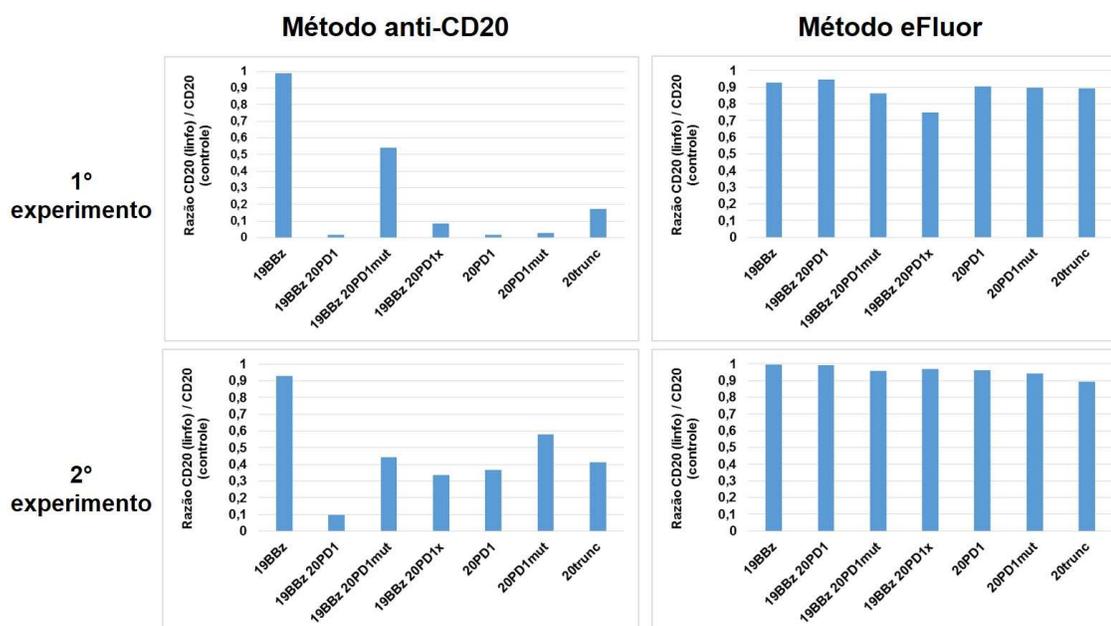


Figura 4.23: Comparação entre a utilização de um anticorpo anti-CD20 ou corante eFluor 670 para identificação e análise da fração CD20+. Os linfócitos expressando as diferentes combinações de CARs foram incubados na proporção de 3:1 com as células alvo Nalm-6/Nalm-6 CD20+ e incubadas por 4h. A razão mostrada refere-se ao percentual de células CD20+ identificadas através do anticorpo anti-CD20 APC (método anti-CD20) ou através do corante eFluor 670 (método eFluor).

5) Discussão

Apesar dos impactantes resultados obtidos nos ensaios clínicos para tratamento de LLA-B, a ausência de TSAs caracterizados poderá ser limitar o uso de CARs em outros tumores devido às respostas contra o tecido normal. Como já foi reportado, o uso de linfócitos expressando CAR que reconhecem antígenos compartilhados pode ter sérias consequências, desde quadros de tempestade de citocinas até a morte dos pacientes (revisto em (CHICAYBAM; BONAMINO, 2014). A incorporação de domínios inibitórios nos CARs como mecanismo de controle da resposta *in vivo* tem potencial para solucionar este problema, limitando ou impedindo a ocorrência destes efeitos colaterais. De fato, dados publicados em dezembro de 2013 pelo grupo do Dr. Michel Sadelain demonstram que CARs contendo o domínio de sinalização de CTLA-4 ou PD-1 são capazes de inibir a ativação mediada pelo TCR ou pelo CAR de ativação 1928z (contendo o domínio de sinalização do CD28 e a cadeia ζ). Estes CARs inibitórios foram capazes de inibir a função *in vitro* dos linfócitos T (secreção de citocinas, atividade citotóxica) e *in vivo* (efeito anti tumoral) em modelos animais. Além disso, mostraram que o efeito inibitório é reversível, sem dano funcional aparente ao linfócito T (FEDOROV, V; THEMELI; SADELAIN, 2013).

Estes dados publicados contrastam com os resultados obtidos no nosso modelo experimental. Os resultados obtidos no modelo de Jurkat indicaram uma atividade inibitória do 20PD1 sobre a atividade de luciferase (indicador da translocação de NFAT para o núcleo) e do marcador de ativação CD69. No entanto, no nosso modelo utilizando células T primárias humanas o CAR 20PD1 não mostrou ser capaz de inibir a proliferação ou a citotoxicidade induzida pelo 19BBz, mesmo interagindo constantemente com a L388 (CD20+) durante a expansão ou com a Nalm-6 GFP CD20 do ensaio de lise. Este CAR também não foi capaz de inibir a atividade do CAR de primeira geração 19z, que apresentou perfil de proliferação no longo prazo e atividade citotóxica similar à condição 19BBz + 20PD1. Estes dados poderiam sugerir que a construção do CAR inibitório por algum motivo não está funcional. No entanto, os dados mostrados na figura 15 demonstram que a estrutura deste receptor é funcional. Além disso, quando apenas o 20PD1 é expresso nos linfócitos, o percentual de células positivas para o CAR decresce com o tempo, mostrando que na ausência do CAR de ativação o 20PD1 parece atuar como receptor inibitório, proporcionando desvantagem proliferativa aos linfócitos 20PD1+. Estes dados sugerem que os CARs anti-CD20 testados neste trabalho possuem baixa ou nenhuma capacidade de inibir os CARs ativadores 19BBz ou 19z no contexto da estimulação com L388, apesar de parecerem atrasar um pouco a expansão das células co-expressando 19BBz e o CAR inibitório 20PD1. A permanência de células expressando apenas 20PD1 nas culturas eletroporadas com dois CARs pode estar associada à presença de citocinas e é um tópico que será estudado em experimentos futuros.

Outro parâmetro avaliado em nosso trabalho que mostrou não ser inibido pelo 20PD1 foi a atividade citotóxica. Além disso, os experimentos desenhados para avaliar a proteção da fração CD20+ após incubação com os linfócitos expressando os CARs mostraram resultados inversos ao esperado, com diminuição desta população nas razões E/A mais altas. Uma hipótese para este fenômeno seria a impossibilidade de detecção do CD20 após interação com o CAR inibitório. De fato existem relatos na literatura mostrando que determinados clones de anticorpos anti-CD20 chamados de tipo I, como o Rituximab e o 1F5, induzem a internalização do CD20 após a interação, sendo o mesmo não observado com outros clones (chamados de tipo II) (MICHEL; MATTES, 2002; BEERS et al., 2010). Como o scFv do 20PD1 é derivado do clone 1F5, podemos supor que o mesmo acontece em nosso sistema, impedindo a detecção do CD20 após incubação com os linfócitos expressando esse CAR. Este dado é muito relevante uma vez que uma internalização do CD20, mesmo que transiente, deixaria as células B normais susceptíveis à lise pelos linfócitos expressando 19BBz+20PD1, diminuindo a eficiência do sistema condicional de ativação e consequentemente eliminando células normais. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento e teste de novos CARs

anti-CD20 possuindo scFvs derivados de anticorpos tipo II, como o FGM6 ou Tositumomab, para a construção de um robusto sistema condicional.

Vale ressaltar que, de maneira geral, as linhagens linfoblastóides são exímias APCs, apresentando altos níveis de moléculas coestimulatórias. Este fato nos permite criar a hipótese de que as diferentes moléculas presentes na superfície da L388 poderiam estar contribuindo para a aparente ineficácia do 20PD1 no nosso sistema. Experimentos futuros do nosso laboratório tentarão desvendar se moléculas presentes na L388 poderiam estar induzindo este comportamento. Já o trabalho de Fedorov e colaboradores previamente mencionado utilizou como APC a linhagem mielóide K562 modificada para expressar alguns ligantes coestimulatórios, como 4-1BBL, CD80 e CD86, além do ligante do CAR. Neste sentido, o sistema baseado na K562 possivelmente fornece uma menor diversidade de estímulos para os linfócitos T, introduzindo menos variáveis que possam alterar o comportamento dos CARs e sendo uma potencial explicação para a divergência nos resultados obtidos. Experimentos piloto realizados em nosso laboratório utilizando a mesma APC derivada da K562 e que expressa CD19 na superfície não foram bem sucedidos. Apesar de induzirem uma ótima ativação e expansão dos linfócitos, o percentual de células CAR+ diminuiu na cultura ao longo dos dias, mesmo expressando apenas o CAR 19BBz (dados não mostrados).

Diversos parâmetros podem impactar a função de um CAR inibitório, como o nível de expressão dos ligantes, a estrutura do CAR e as (sub)populações de linfócitos onde este é expresso. A escolha do melhor domínio inibitório provavelmente dependerá do quão robusta é a inibição induzida por este receptor. Com os dados obtidos neste trabalho, o PD-1 não parece ser a melhor opção de domínio inibitório no nosso modelo, estimulando a busca de outras opções. Diversos trabalhos vem demonstrando que alguns destes receptores, como LAG-3 e PD-1, possuem atividade sinérgica e recrutam diferentes parceiros de sinalização, contribuindo para aumentar o nível de inibição (WOO et al., 2012). Sendo assim, a criação de CARs inibitórios de segunda geração, contendo dois ou mais domínios inibitórios, surge como uma potencial alternativa e está estudada por nosso grupo. Nossos dados em células Jurkat apontam que o domínio LAG-3 não apresenta atividade inibitória sobre os parâmetros que utilizamos. A combinação com o domínio PD-1 apresentou uma melhora no efeito inibitório em relação à produção de IL-2, mas este foi similar ao obtido com o PD-1 sozinho. Uma análise mais detalhada destes CARs em linfócitos humanos primários é necessária para avaliação do seu potencial.

A criação de sistemas condicionais altamente controlados possui potencial aplicação no contexto da imunoterapia com CARs, levando em conta os efeitos adversos descritos na literatura. No entanto, a utilização de domínios de sinalização endógenos para este tipo de

controle pode levar à ativação de inúmeras vias de sinalização, muitas delas com efeitos negativos sobre a função do linfócito T. Como exemplo deste efeito podemos citar o próprio domínio PD-1, onde trabalhos já mostraram uma correlação positiva entre a expressão deste receptor e a indução de apoptose em linfócitos T de memória (PETROVAS et al., 2006). Além disso, as proteínas endógenas possuem interações com muitas outras proteínas e são difíceis de controlar em termos de amplitude e duração da resposta, uma vez que possuem diversos mediadores intermediários compartilhados com outras vias, introduzindo variabilidade no sistema. Recentemente, trabalhos exploraram a criação de sistemas condicionais baseados em ativação por pequenas moléculas (WU et al., 2015) ou em circuitos de sinalização ortogonais (ROYBAL et al., 2016) para o controle de linfócitos expressando CARs, superando diversas destas limitações descritas. A utilização destes novos sistemas baseados em biologia sintética tem potencial para, no médio prazo, aumentar a segurança da imunoterapia baseada em CARs e do seu uso na clínica.

6) Conclusões

- CARs inibitórios contendo o domínio PD-1 possuem atividade inibitória em células Jurkat de modo não específico
- O CAR 20PD1 não exerce efeito inibitório sobre os linfócitos T primários 19BBz+ ou 19z+ estimulados com L388
- Os dados sugerem que o scFv derivado do clone 1F5, utilizado no CAR anti-CD20, pode induzir alterações nas células que levem à não detecção da proteína CD20 nas células alvo.

7) Referências

ANDRÉS, A. Cancer incidence after immunosuppressive treatment following kidney transplantation. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 56, n. 1, p. 71–85, out. 2005.

ANGELL, H.; GALON, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. **Current opinion in immunology**, v. 25, n. 2, p. 261–267, abr. 2013.

BALDWIN, R. W. Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. **British journal of cancer**, v. 9, n. 4, p. 652–657, dez. 1955.

BEATTY, G. L. et al. Mesothelin-Specific Chimeric Antigen Receptor mRNA-Engineered T Cells Induce Antitumor Activity in Solid Malignancies. **Cancer Immunology Research**, 19 dez. 2013.

BEERS, S. A. et al. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. **Seminars in hematology**, v. 47, n. 2, p. 107–114, abr. 2010.

BETTINI, M. et al. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. **Journal of immunology**, v. 187, n. 7, p. 3493–3498, 1 out. 2011.

BLEAKLEY, M.; RIDDELL, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 5, p. 371–380, maio 2004.

BOOMER, J. S.; GREEN, J. M. An enigmatic tail of CD28 signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 8, p. a002436, ago. 2010.

BOURGEOIS, C. et al. CD8 lethargy in the absence of CD4 help. **European journal of immunology**, v. 32, n. 8, p. 2199–2207, ago. 2002.

BRACCI, L. et al. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, 2007.

BRENTJENS, R. J. et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 18 Pt 1, p. 5426–5435, 12 set. 2007.

BRENTJENS, R. J. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. **Science translational medicine**, v. 5, n. 177, p. 177ra38, 20 mar. 2013.

BURNET, F. M. Immunological aspects of malignant disease. **The Lancet**, v. 1, n. 7501, p. 1171–1174, 3 jun. 1967.

CARPENITO, C. et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3360–3365, 11 fev. 2009.

CHANG, J. T.; WHERRY, E. J.; GOLDRATH, A. W. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. **Nature immunology**, v. 15, n. 12, p. 1104–1115, dez. 2014.

CHEMNITZ, J. M.; PARRY, R. V.; NICHOLS, K. E. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor **The Journal of Immunology**, 2004.

CHEMNITZ, J. M.; LANFRANCO, A. R. B and T lymphocyte attenuator-mediated signal transduction provides a potent inhibitory signal to primary human CD4 T cells that can be initiated by multiple **The Journal of Immunology**, 2006.

CHICAYBAM, L.; SODRE, A. [CITAÇÃO] A conditional system for the activation of lymphocytes expressing activating and inhibitory CARs. **HUMAN**, 2010.

CHICAYBAM, L.; SODRÉ, A. L.; BONAMINO, M. Chimeric antigen receptors in cancer immuno-gene therapy: current status and future directions. **International reviews of immunology**, v. 30, n. 5-6, p. 294–311, out. 2011.

CHICAYBAM, L. et al. An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e60298, mar. 2013.

CHICAYBAM, L.; BONAMINO, M. H. Moving Receptor Redirected Adoptive Cell Therapy Toward Fine Tuning of Antitumor Responses. **International reviews of immunology**, 9 jun. 2014.

CIERI, N. et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. **Blood**, v. 121, n. 4, p. 573–584, 15 nov. 2012.

COBBOLD, M. et al. MHC Class I–Associated Phosphopeptides Are the Targets of Memory-like Immunity in Leukemia. **Science translational medicine**, v. 5, n. 203, p. 203ra125–203ra125, 18 set. 2013.

COLEY, W. B. THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS: WITH A REPORT OF TEN ORIGINAL CASES. **The American journal of the medical sciences**, v. 105, n. 5, p. 487, maio 1893.

COLLINS, R. H., Jr et al. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. **Bone marrow transplantation**, v. 26, n. 5, p. 511–516, set. 2000.

COSMI, L. et al. T helper cells plasticity in inflammation. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 85, n. 1, p. 36–42, jan. 2014.

CROFT, M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 8, p. 609–620, ago. 2003.

DAO, T. et al. Targeting the intracellular WT1 oncogene product with a therapeutic human antibody. **Science translational medicine**, v. 5, n. 176, p. 176ra33, 13 mar. 2013.

DE OBALDIA, M. E.; BHANDoola, A. Transcriptional regulation of innate and adaptive lymphocyte lineages. **Annual review of immunology**, v. 33, p. 607–642, 4 fev. 2015.

DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, 3 fev. 2012.

DUDLEY, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 850–854, 25 out. 2002.

DUDLEY, M. E.; ROSENBERG, S. A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 9, p. 666–675, set. 2003.

DUDLEY, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, p. 2346–2357, 1 abr. 2005.

DUDLEY, M. E. et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 32, p. 5233–5239, 10 nov. 2008.

DUDLEY, M. E. et al. Randomized selection design trial evaluating CD8+-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 17, p. 2152–2159, 10 jun. 2013.

D'AMICO, G. et al. CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 744–751, 1 ago. 2004.

ESHHAR, Z.; WAKS, T.; GROSS, G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of **Proceedings of the National Academy of Science**, 1993.

FEDOROV, V; THEMELI, M.; SADELAIN, M. PD-1–and CTLA-4–based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. **Science translational medicine**, 2013.

FEFER, A. et al. Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation. **Progress in clinical and biological research**, v. 244, p. 401–408, 1987.

FINNEY, H. M. et al. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. **Journal of immunology**, v. 161, n. 6, p. 2791–2797, 15 set. 1998.

FINNEY, H. M.; AKBAR, A. N.; LAWSON, A. D. G. Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR ζ Chain. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 104–113, 1 jan. 2004.

FISCHER, K. et al. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4094–4101, 15 dez. 2006.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, abr. 2012.

GALON, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 29 set. 2006.

GALON, J. et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. **The Journal of**, 2014.

GASSER, S. et al. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1186–1190, 25 ago. 2005.

GATTINONI, L. et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 6, p. 1616–1626, jun. 2005a.

GATTINONI, L. et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 7, p. 907–912, 3 out. 2005b.

GATTINONI, L. et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. **Nature medicine**, v. 15, n. 7, p. 808–813, jul. 2009.

GIUNTOLI, R. L., 2nd et al. Direct costimulation of tumor-reactive CTL by helper T cells potentiate their proliferation, survival, and effector function. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 922–931, mar. 2002.

GRUPP, S. A. et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 16, p. 1509–1518, 2013.

GUEDAN, S. et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells. **Blood**, 1 jul. 2014.

GUEST, R. D. et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. **Journal of immunotherapy**, v. 28, n. 3, p. 203–211, maio 2005.

- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 20 mar. 2012.
- HANNIER, S.; TRIEBEL, F. The MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 is co-distributed with CD8 and CD3-TCR molecules after their engagement by mAb or peptide-MHC class I complexes. **International immunology**, v. 11, n. 11, p. 1745–1752, nov. 1999.
- HASO et al. Anti-CD22–chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 121, n. 7, p. 1165–1174, 14 dez. 2012.
- HAYNES, N. M. et al. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. **Blood**, v. 100, n. 9, p. 3155–3163, 1 nov. 2002.
- HESLOP, H. E. et al. Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 925–935, 30 out. 2009.
- HEUSER, C. et al. T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. **Gene therapy**, v. 10, n. 17, p. 1408–1419, ago. 2003.
- HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 19 ago. 2010.
- HOEPNER, S. et al. Synergy between CD8 T cells and Th1 or Th2 polarised CD4 T cells for adoptive immunotherapy of brain tumours. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63933, 23 maio 2013.
- HOMBACH, A. A. et al. OX40 costimulation by a chimeric antigen receptor abrogates CD28 and IL-2 induced IL-10 secretion by redirected CD4(+) T cells. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 4, p. 458–466, 1 jul. 2012.
- HOMBACH, A.; WIECZARKOWIECZ, A. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 ζ signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and **The Journal of Immunology**, 2001.
- HOROWITZ, M. M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. **Blood**, v. 75, n. 3, p. 555–562, 1 fev. 1990.

HUANG, J. et al. Survival, persistence, and progressive differentiation of adoptively transferred tumor-reactive T cells associated with tumor regression. **Journal of immunotherapy**, v. 28, n. 3, p. 258–267, maio 2005.

HUNDER, N. N. et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 25, p. 2698–2703, 19 jun. 2008.

HUNZIKER, L. et al. Exhaustion of cytotoxic T cells during adoptive immunotherapy of virus carrier mice can be prevented by B cells or CD4+ T cells. **European journal of immunology**, v. 32, n. 2, p. 374–382, fev. 2002.

IMAI, C. et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. 4, p. 676–684, abr. 2004.

IMAI, C.; IWAMOTO, S.; CAMPANA, D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 376–383, 1 jul. 2005.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943–1955, 1 jun. 2013.

IVICS, Z. et al. Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. **Nature methods**, v. 6, n. 6, p. 415–422, 28 maio 2009.

JAIN, R. et al. Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Targeting Major Histocompatibility Complex Class I–Her2 Peptide Complexes. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, n. 3, p. 202–218, 6 fev. 2013.

JONCKER, N. T. et al. Antigen-independent accumulation of activated effector/memory T lymphocytes into human and murine tumors. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 5, p. 1205–1214, 1 mar. 2006.

KALOS, M. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. **Science translational medicine**, v. 3, n. 95, p. 95ra73, 10 ago. 2011.

KAMPHORST, A. O.; AHMED, R. Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. **Current opinion in immunology**, v. 25, n. 3, p. 381–388, 9 abr. 2013a.

- KAMPHORST, A. O.; AHMED, R. CD4 T-cell immunotherapy for chronic viral infections and cancer. **Immunotherapy**, v. 5, n. 9, p. 975–987, set. 2013b.
- KERSHAW, M. H. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 20 Pt 1, p. 6106–6115, 15 out. 2006.
- KESSLER, J. H.; MELIEF, C. J. M. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. **Leukemia**, v. 21, n. 9, p. 1859–1874, set. 2007.
- KITZIG, F. et al. Cloning of two new splice variants of Siglec-10 and mapping of the interaction between Siglec-10 and SHP-1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 296, n. 2, p. 355–362, 16 ago. 2002.
- KLEBANOFF, C. A. et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9571–9576, 5 jul. 2005.
- KLEIN, L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 6, p. 377–391, jun. 2014.
- KOCHENDERFER, J. N. et al. Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3875–3886, 14 jul. 2010a.
- KOCHENDERFER, J. N. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4099–4102, 18 nov. 2010b.
- KOCHENDERFER, J. N. et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. **Blood**, v. 119, n. 12, p. 2709–2720, 22 mar. 2012.
- KOCHENDERFER, J. N.; ROSENBERG, S. A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 10, n. 5, p. 267–276, 2 abr. 2013.

- KOEBEL, C. M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 903–907, 6 dez. 2007.
- KOLB, H. J.; SCHATTENBERG, A.; GOLDMAN, J. M. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party 1995.
- KONG, S. et al. Suppression of Human Glioma Xenografts with Second-Generation IL13R-Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, 2012.
- KOUO, T. et al. Galectin-3 shapes anti-tumor immune responses by suppressing CD8+ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of plasmacytoid dendritic cells. **Cancer immunology research**, 17 fev. 2015.
- KOWOLIK, C. M. et al. CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. **Cancer research**, v. 66, n. 22, p. 10995–11004, 15 nov. 2006.
- KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495–497, 7 ago. 1975.
- KRIEG, C. et al. B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell–intrinsic homeostasis and memory cell generation. **Nature immunology**, v. 8, n. 2, p. 162–171, 7 jan. 2007.
- LAMERS, C. H. J. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 13, p. e20–2, 1 maio 2006.
- LAMERS, C. H. J. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with CAIX CAR-engineered T-cells-a completed study overview. **Biochemical Society transactions**, v. 44, n. 3, p. 951–959, 15 jun. 2016.
- LI, N. et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. **The EMBO journal**, v. 26, n. 2, p. 494–504, 24 jan. 2007.

LU, Y.-C. et al. Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3401–3410, 1 jul. 2014.

MA, D. et al. Radioimmunotherapy for model B cell malignancies using 90Y-labeled anti-CD19 and anti-CD20 monoclonal antibodies. **Leukemia**, v. 16, n. 1, p. 60–66, jan. 2002.

MACKIE, R. M.; REID, R.; JUNOR, B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 6, p. 567–568, 6 fev. 2003.

MAÇON-LEMAÎTRE, L.; TRIEBEL, F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 170–178, jun. 2005.

MAHMOUD, S. M. A. et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1949–1955, 20 maio 2011.

MAJ, T. et al. T cells and costimulation in cancer. **Cancer journal**, v. 19, n. 6, p. 473–482, nov. 2013.

MATSUSHITA, H. et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 400–404, 16 fev. 2012.

MAUDE, S. L. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 16, p. 1507–1517, 16 out. 2014.

MAUS, M. V. et al. Antibody-modified T cells: CARs take the front seat for hematologic malignancies. **Blood**, v. 123, n. 17, p. 2625–2635, 24 abr. 2014.

MBANWI, A. N.; WATTS, T. H. Costimulatory TNFR family members in control of viral infection: Outstanding questions. **Seminars in immunology**, v. 26, n. 3, p. 210–219, jun. 2014.

MCLAUGHLIN, P. et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 16, n. 8, p. 2825–2833, ago. 1998.

MELIEF, C.; KAST, W. M. T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. **Immunological reviews**, 1995.

MICHEL, R. B.; MATTES, M. J. Intracellular accumulation of the anti-CD20 antibody 1F5 in B-lymphoma cells. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 8, p. 2701–2713, ago. 2002.

MILLER, R. A. et al. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. **The New England journal of medicine**, v. 306, n. 9, p. 517–522, 4 mar. 1982.

MILONE, M. C. et al. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 17, n. 8, p. 1453–1464, 21 abr. 2009.

MITSUYASU, R. T. et al. Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 ζ gene-modified autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 785–793, 1 ago. 2000.

MOCELLIN, S.; BENNA, C.; PILATI, P. Coinhibitory molecules in cancer biology and therapy. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 24, n. 2, p. 147–161, abr. 2013.

MOCELLIN, S.; NITTI, D. CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1836, n. 2, p. 187–196, dez. 2013.

MORGAN, R. A. et al. 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**, v. 18, n. 4, p. 843–851, 23 fev. 2010.

MURANSKI, P. et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, v. 112, n. 2, p. 362–373, 15 jul. 2008.

MURANSKI, P.; RESTIFO, N. P. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4⁺ T cells. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 2, p. 200–208, abr. 2009.

MURPHY, K. M.; NELSON, C. A.; SEDÝ, J. R. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 9, p. 671–681, set. 2006.

NAKAYAMADA, S. et al. Helper T cell diversity and plasticity. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 3, p. 297–302, 15 fev. 2012.

NIRSCHL, C. J.; DRAKE, C. G. Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 18, p. 4917–4924, 18 jul. 2013.

NOGUCHI, T. et al. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. **Cancer research**, v. 72, n. 7, p. 1672–1682, 1 abr. 2012.

NORTH, R. J. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 155, n. 4, p. 1063–1074, 1 abr. 1982.

NOWILL, A. et al. Natural killer clones derived from fetal (25 wk) blood. Probing the human T cell receptor with WT31 monoclonal antibody. **The Journal of experimental medicine**, v. 163, n. 6, p. 1601–1606, 1 jun. 1986.

ODORIZZI, P. M.; WHERRY, E. J. Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections. **Journal of immunology**, v. 188, n. 7, p. 2957–2965, 1 abr. 2012.

OKAZAKI, T. et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 2, p. 395–407, 14 fev. 2011.

OKAZAKI, T. et al. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. **Nature immunology**, v. 14, n. 12, p. 1212–1218, dez. 2013.

OPELZ, G.; DÖHLER, B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. **American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 4, n. 2, p. 222–230, fev. 2004.

PARK, J. R. et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 15, n. 4, p. 825–833, 13 fev. 2007.

PARMIANI, G. et al. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. **Journal of immunology**, v. 178, n. 4, p. 1975–1979, 15 fev. 2007.

PARRY, R. V.; RILEY, J. L.; WARD, S. G. Signalling to suit function: tailoring phosphoinositide 3-kinase during T-cell activation. **Trends in immunology**, v. 28, n. 4, p. 161–168, abr. 2007.

PETROVAS, C. et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 10, p. 2281–2292, 2 out. 2006.

PORTER, D. L. et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 8, p. 725–733, 2011.

PREHN, R. T.; MAIN, J. M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 18, n. 6, p. 769–778, jun. 1957.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The New England journal of medicine**, v. 354, n. 2, p. 166–178, 12 jan. 2006.

PULE, M.; FINNEY, H.; LAWSON, A. Artificial T-cell receptors. **Cytotherapy**, v. 5, n. 3, p. 211–226, 2003.

PULÈ, M. A. et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 12, n. 5, p. 933–941, nov. 2005.

PULE, M. A. et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. **Nature medicine**, v. 14, n. 11, p. 1264–1270, nov. 2008.

QURESHI, O. S. et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science**, v. 332, n. 6029, p. 600–603, 29 abr. 2011.

REITS, E. A. et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 5, p. 1259–1271, 15 maio 2006.

ROBBINS, P. F. et al. Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. **Journal of immunology**, v. 173, n. 12, p. 7125–7130, 15 dez. 2004.

ROBBINS, P. F. et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. **Nature medicine**, v. 19, n. 6, p. 747–752, jun. 2013.

ROBERT, C. et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2517–2526, 30 jun. 2011.

ROSENBERG, S. A.; SPIESS, P.; LAFRENIERE, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. **Science**, v. 233, n. 4770, p. 1318–1321, 19 set. 1986.

ROSENBERG, S. A. et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 15, p. 1159–1166, 3 ago. 1994.

ROSENBERG, S. A.; DUDLEY, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 2, p. 233–240, abr. 2009.

ROSENBERG, S. A. et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 13, p. 4550–4557, 1 jul. 2011.

ROYBAL, K. T. et al. Precision Tumor Recognition by T Cells With Combinatorial Antigen-Sensing Circuits. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 770–779, 11 fev. 2016.

RUDD, C. E.; SCHNEIDER, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 7, p. 544–556, jul. 2003.

RUDD, C. E. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 2, p. 153–160, fev. 2008.

SADELAIN, M.; RIVIÈRE, I.; BRENTJENS, R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 1, p. 35–45, jan. 2003.

SADELAIN, M.; BRENTJENS, R.; RIVIÈRE, I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. **Cancer discovery**, v. 3, n. 4, p. 388–398, 2 abr. 2013.

SAOULLI, K. et al. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. **The Journal of experimental medicine**, v. 187, n. 11, p. 1849–1862, 1 jun. 1998.

SAVAGE, P. A. Tumor antigenicity revealed. **Trends in immunology**, v. 35, n. 2, p. 47–48, fev. 2014.

SCHOLLER, J. et al. Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. **Science translational medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra53, 2 maio 2012.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 25 mar. 2011.

SENOVILLA, L. et al. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. **Science**, v. 337, n. 6102, p. 1678–1684, 28 set. 2012.

SHANKARAN, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–1111, 26 abr. 2001.

SHEDLOCK, D. J.; SHEN, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 337–339, 11 abr. 2003.

SHEIL, A.; DISNEY, A.; MATHEW, T. H. [CITAÇÃO] Lymphoma incidence, cyclosporine, and the evolution and major impact of malignancy following organ transplantation. **Transplantation**, 1997.

SHEN, C.-J. et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRvIII expressing glioma. **Journal of hematology & oncology**, v. 6, p. 33, 9 maio 2013.

SIDORENKO, S. P.; CLARK, E. A. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. **Nature immunology**, v. 4, n. 1, p. 19–24, jan. 2003.

STRAUSS, D. C.; THOMAS, J. M. Transmission of donor melanoma by organ transplantation. **The lancet oncology**, v. 11, n. 8, p. 790–796, ago. 2010.

SUN, J. C.; BEVAN, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. **Science**, v. 300, n. 5617, p. 339–342, 11 abr. 2003.

TAO, R. et al. Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. **Journal of immunology**, v. 175, n. 9, p. 5774–5782, 1 nov. 2005.

TILL, B. G. et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2261–2271, 28 maio 2008.

TILL, B. G. et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. **Blood**, v. 119, n. 17, p. 3940–3950, 3 fev. 2012.

TIVOL, E. A. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 541–547, nov. 1995.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 2012.

TRAN, E. et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. **Science**, v. 344, n. 6184, p. 641–645, 9 maio 2014.

VAN ROOIJ, N. et al. Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 32, p. e439–42, 10 nov. 2013.

VINAY, D. S.; KWON, B. S. Immunotherapy of cancer with 4-1BB. **Molecular cancer therapeutics**, v. 11, n. 5, p. 1062–1070, maio 2012.

WATANABE, N. et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nature**, 2003.

WATTS, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 23–68, 2005.

WEINER, L. M.; MURRAY, J. C.; SHUPTRINE, C. W. Antibody-based immunotherapy of cancer. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081–1084, 16 mar. 2012.

WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 8, p. 486–499, ago. 2015.

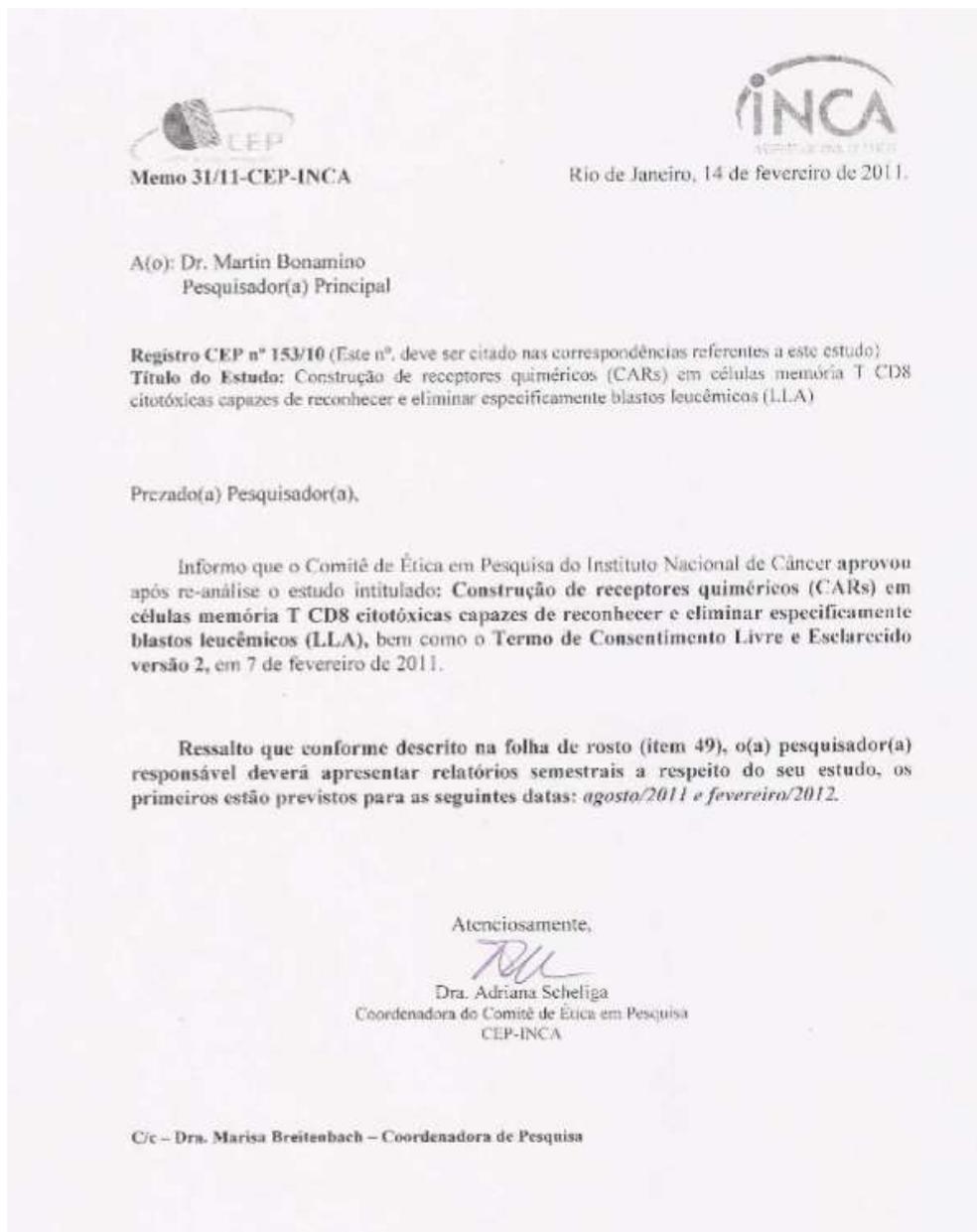
- WIEMANN, B.; STARNES, C. O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. **Pharmacology & therapeutics**, v. 64, n. 3, p. 529–564, 1994.
- WOLCHOK, J. D. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 2, p. 122–133, 11 jul. 2013.
- WOO, S.-R. et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. **Cancer research**, v. 72, n. 4, p. 917–927, 15 fev. 2012.
- WORKMAN, C. J.; DUGGER, K. J.; VIGNALI, D. A. A. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. **Journal of immunology**, v. 169, n. 10, p. 5392–5395, 15 nov. 2002.
- WORKMAN, C. J.; VIGNALI, D. A. A. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). **Journal of immunology**, v. 174, n. 2, p. 688–695, 15 jan. 2005.
- WU, X. et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. **Cancer letters**, v. 340, n. 1, p. 124–133, 28 out. 2013.
- WU, C.-Y. et al. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. **Science**, 24 set. 2015.
- XU, F. et al. LSEctin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. **Cancer research**, v. 74, n. 13, p. 3418–3428, 1 jul. 2014.
- YEE, C. et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16168–16173, 10 dez. 2002.
- YEH, S. et al. Ocular and systemic autoimmunity after successful tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy for recurrent, metastatic melanoma. **Ophthalmology**, v. 116, n. 5, p. 981–989.e1, maio 2009.
- ZHANG, H. et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. **Journal of immunology**, v. 179, n. 7, p. 4910–4918, 1 out. 2007.

ZHAO, Y. et al. A Herceptin-Based Chimeric Antigen Receptor with Modified Signaling Domains Leads to Enhanced Survival of Transduced T Lymphocytes and Antitumor Activity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5563–5574, nov. 2009.

ZHOU, J. et al. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. **Journal of immunology**, v. 175, n. 10, p. 7046–7052, 15 nov. 2005.

8) Anexos

Anexo I: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA; registro nº153/10



Anexo II: Artigo publicado:

CHICAYBAM, L. et al. An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes.

PloS one, v. 8, n. 3, p. e60298, mar. 2013.

An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes

Leonardo Chicaybam^{1,2}, Andressa Laino Sodre¹, Bianca Azevedo Curzio¹, Martin Hernan Bonamino^{1*}

1 Programa de Carcinogênese Molecular, Coordenação de Pesquisa (CPQ), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, **2** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Gene transfer to T lymphocytes has historically relied on retro and lentivirus, but recently transposon-based gene transfer is rising as a simpler and straight forward approach to achieve stable transgene expression. Transfer of expression cassettes to T lymphocytes remains challenging, being based mainly on commercial kits.

Aims: We herein report a convenient and affordable method based on *in house* made buffers, generic cuvettes and utilization of the widely available Lonza nucleofector II device to promote efficient gene transfer to T lymphocytes.

Results: This approach renders high transgene expression levels in primary human T lymphocytes (mean 45%, 41–59%), the hard to transfect murine T cells (mean 38%, 36–42% for C57/BL6 strain) and human Jurkat T cell line. Cell viability levels after electroporation allowed further manipulations such as *in vitro* expansion and Chimeric Antigen Receptor (CAR) mediated gain of function for target cell lysis.

Conclusions: We describe here an efficient general protocol for electroporation based modification of T lymphocytes. By opening access to this protocol, we expect that efficient gene transfer to T lymphocytes, for transient or stable expression, may be achieved by an increased number of laboratories at lower and affordable costs.

Citation: Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA, Bonamino MH (2013) An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. PLoS ONE 8(3): e60298. doi:10.1371/journal.pone.0060298

Editor: Deyu Fang, Northwestern University Feinberg School of Medicine, United States of America

Received: January 22, 2013; **Accepted:** February 25, 2013; **Published:** March 26, 2013

Copyright: © 2013 Chicaybam et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants of CNPq, Instituto do Milênio de Terapia Gênica, CAPES, Fundação do Câncer, INCa and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mbonamino@inca.gov.br

Introduction

The genetic modification of T lymphocytes is a usual approach to study the biology of these cells and recently it has been largely used to generate tumor-specific effector cells. However, T cells have been proven difficult to modify using non-viral methods such as lipid-based plasmid transfection reagents, like Lipofectamine. These methods have been associated with high toxicity and low efficiency [1]. The development of retroviral/lentiviral vector based transduction led to efficient gene transfer when using T lymphocytes [2–6] and other hematopoietic cells [5,7], being the method of choice for clinical trials using transgene-modified T cells. [6,8–11]. However, such cell modification protocols are time-consuming and expensive, limiting a broader application in the clinical setting [12].

Electroporation has emerged as a powerful tool for the genetic modification of diverse cell types [13–15]. This technique is based on the transient disruption of cell membrane after exposure to an electric field, allowing charged molecules to enter the cell. The main potential disadvantages of this methodology are the excessive cell death and the low transfection efficiency, although these phenomena depend on the cell type used and electroporation conditions (including voltage and wave profile, time of the pulse and buffer composition). Indeed, early attempts of electroporating

T cells with plasmid DNA resulted in low transgene expression [16,17]. Several reports showed a high efficiency when using RNA [18], but this prevents the selection of cells with stable expression of the transgene. Of particular interest are the square-wave pulse based new electroporation devices, such as the broadly used Lonza Nucleofector II electroporation system, which showed high efficiency in the genetic modification of T cells applying proprietary electroporation buffers and electric parameters [19]. Using this methodology, according to Nucleofector manufacturer, up to 80% of viability and 40–60% of expression was achieved in human T cells; in murine T cells, usually harder to transfect, 35–55% of viability and 20–40% of expression can be achieved, varying according to the mouse strain used.

The use of this platform in combination with a non-viral genetic modification system capable of inducing stable expression of the transgene, such as the Sleeping Beauty (SB) transposon, configures an interesting approach for the genetic modification of T cells. The SB system consists of a transposase that recognizes flanking repetitive sequences in the transposon plasmid containing the transgene and mediates its integration in the host genome [20]. It has emerged as a gene transfer system with potential to be broadly used in gene transfer and therapy protocols, accomplishing clinical grade requirements [21], with high efficiency in T cells. Due to a

random integration profile, it minimizes the chance of insertional mutagenesis when compared with other transposon systems [22].

The adoptive transfer of tumor-specific lymphocytes is a promising new strategy for cancer treatment [23,24]. However, this approach is largely dependent on tumor infiltrating lymphocyte expansion and/or T cell receptor (TCR) gene transfer [25]. More recently, T lymphocytes carrying Chimeric Antigen Receptor (CAR) molecules proved successful in clinical trials [9,10,26]. These receptors consist of an extracellular domain derived from an antibody that recognizes the antigen, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain capable of activating the lymphocyte. Such a receptor allows the recognition of the antigen in a HLA-independent fashion. Despite the poor response observed in early clinical trials, which used CARs containing only the CD3zeta signaling domain, the addition of costimulatory motifs such as CD28 or 4-1BB augmented the function and persistence of these cells *in vivo*, achieving objective clinical responses in several patients (reviewed in [27]). Importantly, it was recently showed that the transferred cells can persist for more than a decade after the infusion [28]. Recent reports showed efficient generation of CAR-expressing T cells using the SB system [29–31], and this approach is already being used in clinical trials [21].

Despite remarkable gene transfer rates [19], the high cost of Lonza compatible electroporation kits and the dependence on manufacturer reagents and devices may limit the application of this technology for large scale experiments, especially in the research settings where multiple electroporations may be required, for instance when testing different CAR constructs or modifying gene expression in T lymphocytes targeting several genes. We herein describe a new set of generic buffers optimized for the genetic modification of human and murine T lymphocytes using Lonza's Nucleofactor II device. The combined use of our buffers with the SB system allowed the generation of transgene expressing lymphocytes with high efficiency avoiding using commercial Lonza kits. This approach allows the extensive testing for best electroporation conditions and robust transient or stable gene expression for studies requiring gene transfer to T lymphocytes either for basic research or experimental immunotherapy protocols.

Materials and Methods

Donors

The use of peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) from healthy donors was approved by an IRB (Brazilian National Cancer Institute - INCa - Ethics Committee) and donors signed review board approved informed consents. Within 24 h after blood collection, leukocytes were harvested by filtration and washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x. A density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque[®]-1077 was performed. Cells were centrifuged for 20 min at 890 g (slow acceleration/deceleration off), washed three times with PBS and used for transfection.

Cell culture

Jurkat cell line (clone E6–1) was kindly provided by Dr. João Viola (INCa, Brazil). PBMC's were obtained from healthy donors, as described above. Mouse T lymphocytes were obtained from total lymph node (LN) removal (except mesenteric LN) of C57BL/6, BALB/c or B10A mice provided by INCa's animal facility. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Instituto Nacional de Cancer (Brazil). The protocol was

approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Instituto Nacional de Cancer (Brazil).

Human and mouse leukocytes were seeded in sterile 12-well plates and maintained in growth media. EBV-transformed B lymphoblastic cell line LAS 388 (L388) was provided by Dr. Alexandre Nowill (Unicamp, SP, Brazil) and expanded in sterile 75 cm² flasks. Human pre-B NALM-6 cell line was a kind gift of Dr. Andrea Biondi (Fondazione M Tettamanti, Monza, Italy) [32]. All cells were grown in RPMI medium (Sigma, cat. R5886) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS - Cultilab, Brazil), 2 mM L-Glu (Gibco cat. 25030-081), 2-Mercaptoethanol (55 μ M, Gibco, cat. 21985-023) and Penicillin/Streptomycin (Gibco, cat. 15070-063) at 37°C and 5% CO₂. For primary lymphocyte culture (murine and human), 50 UI/mL of human rIL-2 (Aldeleukin) was added to the medium.

Plasmids and Cloning

Transposon pT2-GFP and transposase SB100X [30] were kindly provided by Dr. Sang Wang Han (UNIFESP, Brazil). Transposon pT3-GFP [31] was provided by Dr. Richard Morgan (NIH, USA). The first generation CAR 20z, containing a CD20 antigen binding domain, a CD8 α hinge and a CD3 ζ signaling domains, was synthesized and codon-optimized by Genscript (NJ, USA) based on the sequence provided originally by Dr. Dario Campana (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA) for 20BBz CAR [33]. The sequence was linearized by AgeI and NotI digestion and inserted into pT3-GFP transposon backbone after GFP removal by the same enzymes.

T cell activation and expansion

After transfection with pT2-GFP, human T cells were activated by 1 μ g/mL OKT-3 (eBioscience, cat.: 16-0037) and 0.5 μ g/mL aCD28 (eBioscience, cat.: 16-0289). Alternatively, expansion of CAR-transfected human T lymphocytes was performed by stimulation with γ -irradiated (100Gy) L388 cells at a ratio of 1:5 (L388:T lymphocytes) and addition of 50 U/mL of human recombinant IL-2. Experiments using mouse cells were approved by our local (INCA) animal care and use committee. Mouse T cells were activated 24 h before electroporation using 2 μ g/mL aCD3 (clone 2C11; purified in house) and 1 μ g/mL aCD28 (clone 37.51, eBioscience, cat.: 16-0281) in the presence of 50 U/mL IL-2. After leukocyte transfection and stimulation, media was replaced every other day. Cells were expanded up to 12 days until all the analyses have been performed.

Primary T cell electroporation

Non-viral transfection of human cells was performed using unstimulated PBMC from healthy donors. Mouse T lymphocytes were activated before electroporation as described above. A total of 10⁷ PBMC or mouse T lymphocytes were pelleted (200 g, 10 min) and resuspended in 100 μ L pre-warmed electroporation buffer. The buffers used were provided from Lonza[®] Human T Cells Nucleofactor[®] Kit for human T cells (cat number VPA-1002), Mouse T Cell Nucleofactor[®] Kit for mouse T cells (cat number VPA-1006), or in house prepared buffer solutions for human and mouse lymphocytes (described in Table S1). For all the electroporations using in house buffers, generic cuvettes were used (Mirus Biotech[®], Madison, WI, USA cat.: MIR 50121). Plasmid masses varying from 0 to 20 μ g of the reporter gene or 20 μ g of the 20z CAR encoding plasmid DNA (pT2-GFP or pT3-20z transposons, respectively) and 0 to 2 μ g of SB100X transposase were added. The cells were immediately transferred to a sterile 0.2 cm cuvette and electroporated using the program U-14 for human T lymphocytes and X-001 for mouse T lymphocytes of

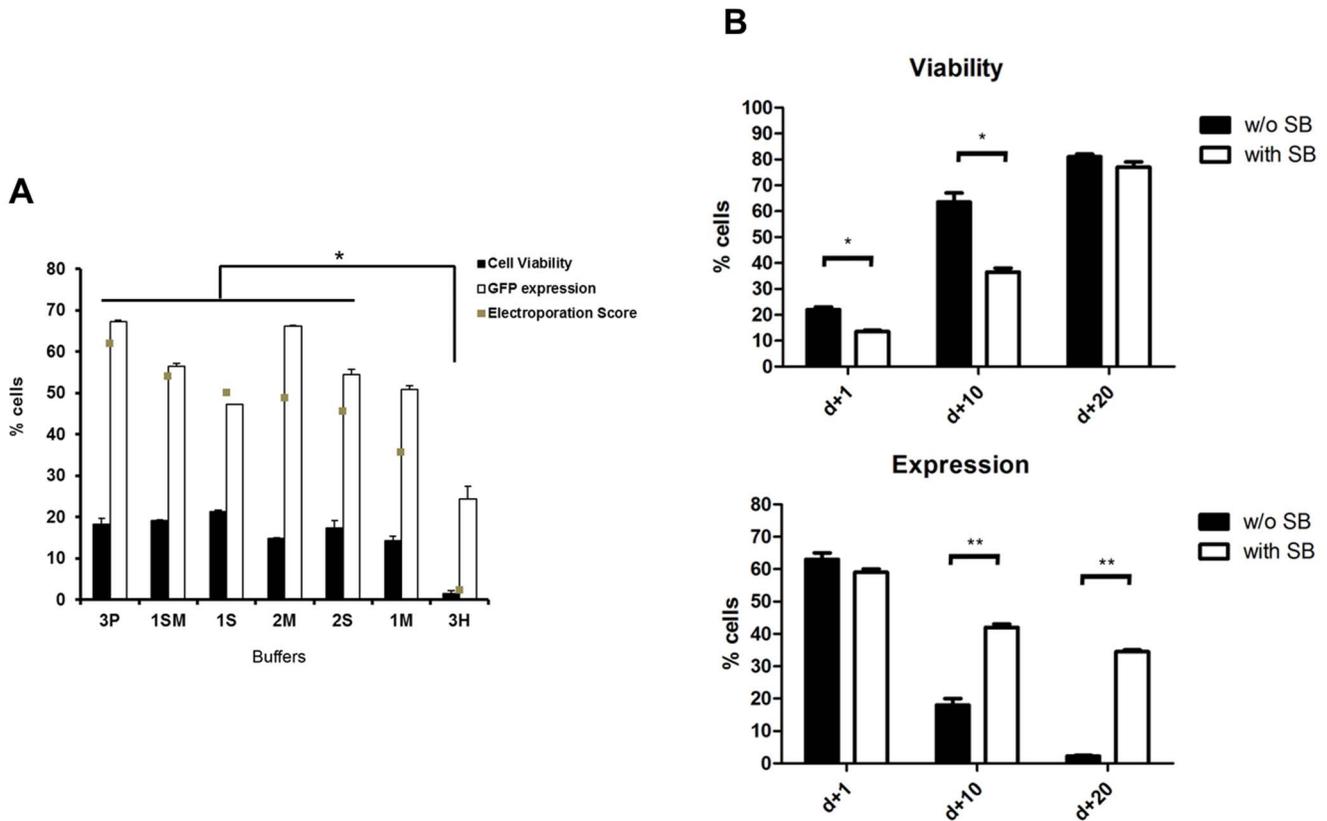


Figure 1. Electroporation of the Jurkat T cell line. (A) Jurkat cells were electroporated with pT2-GFP in the presence of each of the 7 different buffers. Viability and GFP expression were evaluated by flow cytometry after 24 h. Cell viability is expressed as % of the control mock electroporated condition (100%). Electroporation scores were determined as described in materials and methods. Statistical analysis was performed using One Way ANOVA and Tukey post test (* = $P < 0.05$). **(B)** Jurkat cells were electroporated with buffer 3P. Cell viability and GFP expression were observed until day 20. Values in this figure are the average of two separate experiments in triplicate and are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by unpaired Student t test; $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**). doi:10.1371/journal.pone.0060298.g001

Lonza® Nucleofector® II electroporation system. After transfection, mouse lymphocytes electroporated with Lonza's kit were gently resuspended in 1 mL of pre-warmed media supplied by the manufacturer and supplemented as described by the Lonza® kit manual. Mouse T cells transfected using in house solutions and all human T cells were gently resuspended in 1 mL of pre-warmed RPMI medium supplemented only with 2 mM L-Glu and 20% FCS. All cells were seeded in 12-well plates and grown overnight at 37°C and 5% CO₂. The media was replaced by complete RPMI medium the following day and cells were maintained as described previously. The "electroporation score" was calculated based on cell viability (based on trypan blue exclusion and/or determination of the % of cells displaying viable cell FSC vs SSC parameters by flow cytometry analysis) and transgene expression, and the score set to the formula "Viability (%) * Expression (%) / 50". A division factor was used in the score to fit the results in the graph scale.

Jurkat electroporation

Prior to electroporation, 1×10^6 Jurkat cells were centrifuged at 90 g for 10 minutes, resuspended in 100 μ L of the desired electroporation buffer and mixed with 4 μ g of pT2-GFP plasmid.

The resuspended cells were transferred to cuvettes and immediately electroporated using the program X-005. After electroporation, cells were incubated in the cuvette at room temperature for ten minutes and then 500 μ L of pre-warmed

RPMI medium supplemented with 20% FCS were added to the cuvette. Cells were transferred to a 12-well plate and incubated at 37°C 5% CO₂ overnight. The day after electroporation, cells were centrifuged and medium was replaced by RPMI supplemented with 10% FCS.

Cell viability and percentage of GFP+ cells were evaluated by flow cytometry on days 1 and 2 after electroporation by excluding cells from previously determined viable cells gate. The "electroporation score" was calculated based on cell viability and transgene expression values, and the score set to the formula "Viability (%) * Expression (%) / 20". A division factor was used in the score to fit the results in the graph scale.

Flow cytometry

FACSCalibur® (BD Bioscience) was used to perform morphologic evaluation of viability (FSC vs SSC) and transgene expression analysis. Cells were harvested the following days after transfection and resuspended in PBS 1x at a concentration of 10^6 cells/500 μ L. CAR-transfected T lymphocytes were stained using biotin-conjugated anti Fab goat mAb, (Jackson ImmunoResearch, cat. 115-065072) for 20 min at 4°C and then washed with PBS 1x before staining with streptavidin-PECy-5 (eBioscience; cat. 15431782) for flow cytometry analysis. CD20 staining was performed with anti-CD20 APC (eBioscience, cat. 17020942). 7AAD staining (eBioscience cat. 00-6693) was performed imme-

diately before FACS acquisition following manufacturer instructions.

***In vitro* cytotoxicity of T lymphocytes**

Cytotoxic T lymphocytes were incubated with CD20+ Nalm-6 GFP+ target cells (90% GFP+/85% CD20+; 10^5 per well) at different effector to target (E/T) ratios (6:1; 3:1, 1,5:1; 0,75:1; 0,375:1 and 0,18:1) in 96-well plates. After 4 hours at 37°C, the cells were harvested and the percentage of CD20+/GFP+ cells was analyzed by flow cytometry. The percentage of specific lysis was calculated dividing the %GFP+ cells observed by the % of GFP cells expected in each E/T ratio.

Statistical analysis

Results are shown as means \pm s.e.m. Comparisons between Lonza kit and in house buffers and conditions with or without SB (Fig 1B) were performed using unpaired Students *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

For figures comparing electroporation scores, statistical analysis was performed using One Way ANOVA and Tukey post test ($P < 0.05$).

Results

Jurkat cell line electroporation

To test our in house buffers (described in Table S1) in the genetic modification of a relevant cell line, we electroporated the cell line Jurkat, a model of T lymphocytes, with a transposon transfer cassette carrying GFP. Cell viability was based on viable FSC/SSC parameters gate throughout the manuscript since cells gated this way proved to be 7AAD negative in primary T lymphocytes (Figure S1). The percentage of GFP+ cells were evaluated by flow cytometry. We observed no statistically significant differences among cells electroporated with buffers 1M, 1SM, 1S, 2M, 2S and 3P for day +1 (Figure 1A). The program X-005 was used, as it resulted in better scores than program X-001 (data not shown). The highest electroporation score was obtained for 3P buffer. After 20 days in culture, Jurkat cell viability reached levels superior to 80% as evaluated by trypan blue exclusion (data not shown) and flow cytometry (Figure 1B), indicating that cell culture viability can recover after the electroporation protocol. Long term expression for buffer 3P was maintained, with 35% of cells expressing GFP on d+20 (Figure 1B).

High electroporation efficiency of primary human T cells can be achieved using in house solutions

We tested our in house transfection buffers in primary human T cells by GFP transfection of fresh PBMC from two healthy donors. To determine electroporation efficiency, cell viability and GFP expression were evaluated after transfection using 0.5 μ g of SB100X transposase [30] and 4 μ g of pT2-GFP transposon (plasmid mass recommended by Lonza). Figure 2A demonstrates that buffers 1M, 1SM, 2M and 3P maintained the viability of the cells above 50% and achieved superior expression of GFP at day 1 after transfection (representative plots are shown in Figure 2B); accordingly, high rates of expression were sustained up to 7 days with several buffers (Figure S2). As recommended by Lonza for unstimulated T cells, the program U-14 was used with better results than program V-024 (data not shown). Equivalent levels of transgene expression could be observed in CD4+ and CD8+ T lymphocytes after electroporation, while NK (CD56+) cells did not display transgene expression (data not shown and Figure 2C). Electroporation of lymphocytes with PT2-GFP (solution 1SM) followed by activation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies

proved that the expression of the transgene could be retained at levels around 30% until d+7 (Figure 3). Since T lymphocyte culture is known as highly sensitive to cell death, diminished viability after electroporation may impact the maintenance of the culture in the long term. Because electroporation results with solution 1SM showed slightly better viability until day 3 (Figure S2), which could be crucial for recovery of viable human T lymphocytes, this buffer was used in our following tests despite the highest electroporation scores obtained with buffers 1M and 2M.

Impact of plasmid mass used in electroporation on cell viability and transgene expression

To evaluate the impact of different amounts of transposase in GFP expression, transgene integration and cell viability, we determined the best ratio of transposon/transposase for electroporation of fresh PBMCs from two healthy donors. Figure 4 shows that 2 μ g of SB100X transposase maintained a high percentage of GFP (>50%) at the end of 9 days despite a loss (nearly 30%) of expression since day 1 after electroporation. Results obtained with these donors had lower initial viability probably due to the toxicity of higher mass of plasmid used (20 μ g in Figure 4 vs 4 μ g in Figure 2, also observed in Figure S3) and the percentage of viable cells increased at day 9. Increasing the amount of transposase up to 2 μ g is paramount to sustain transgene expression showing almost no impact in cell viability while the absence of transposase resulted in reduced GFP percentages on later days (Figure S3), indicating the crucial role of the enzyme in maintaining transgene expression. Increasing amounts of pT2-GFP plasmid also impacted the percentage of GFP positive cells and the levels of GFP fluorescence as indicated by higher mean fluorescence intensity according to pT2-GFP mass increase from 4 to 20 μ g. When 20 μ g of plasmid mass is used with 0.5, 1 or 2 μ g of SB100X, cell viability may be decreased until day 5 after electroporation (Figure S3).

When our electroporation buffer 1SM was compared to the commercially available Lonza[®] Kit specific for human T lymphocytes, it showed no significant difference in cell viability, but the levels of GFP expression were slightly lower. The electroporation scores for 1SM buffer and Lonza kit were 43,5 and 64,4 respectively (Figure 5).

Mouse T cells can be electroporated using in house buffers

To determine the possibility of electroporating murine T lymphocytes using our home made solutions, we first determined the impact of the activation status of T lymphocytes on the survival to the electroporation process. Pre activating lymph node isolated lymphocytes with anti CD3/CD28 antibodies led to remarkably better survival of cells of C57BL/6 mouse strain after electroporation (Figure 6). All activated lymphocytes reached superior cell viability than the non-activated populations (more than 30% compared to less than 10%), and GFP transfection was approximately four times higher among cells activated before electroporation. These data demonstrates that pre-activation is mandatory to obtain viable electroporated mouse T cells in our system.

We next tested our different buffers to determine the most appropriated for mouse T cells. Lymphocytes obtained from lymph nodes of C57BL/6 mice were electroporated using the buffers described in Table S1. Comparison between solutions demonstrated that higher GFP expression was achieved after electroporation with 1M and 2S buffers, with percentages of positive cells greater than 35% (Figure 7A). Since cell viability and

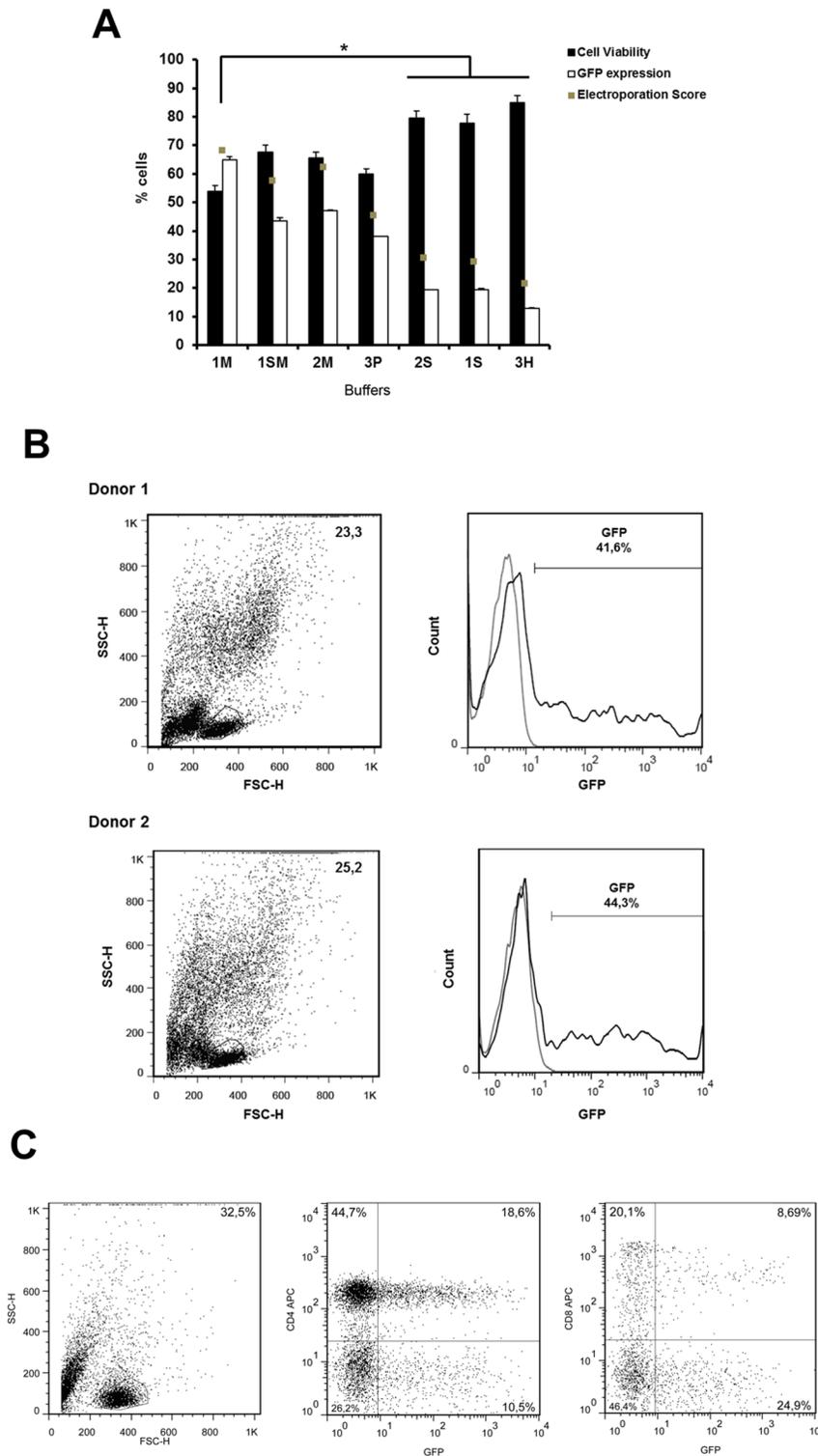


Figure 2. Electroporation efficiency of different buffers in primary human T lymphocytes. (A) PBMCs from two healthy donors were electroporated using in house buffers and 4 µg of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed after 24h by flow cytometry. Cell viability is normalized to control (not electroporated) cells. Electroplation scores were determined as described in materials and methods. Values are the average of two donors in triplicate and are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using One Way ANOVA and Tukey post test (* = P < 0.05). (B) Representative dot plots of GFP (pT2-GFP; 4 µg) expression 24 h after electroporation with 1SM buffer. Numbers in plots represents the percentage of cells in the gate. Gray line = negative control; black line = cells electroporated with pT2-GFP. (C) Electroplated lymphocytes were stained for CD4 and CD8 24 h after electroporation with 1SM buffer and 4 µg pT2-GFP plasmid. Data are representative of two donors. Numbers in plots represents the percentage of cells in the gate. doi:10.1371/journal.pone.0060298.g002

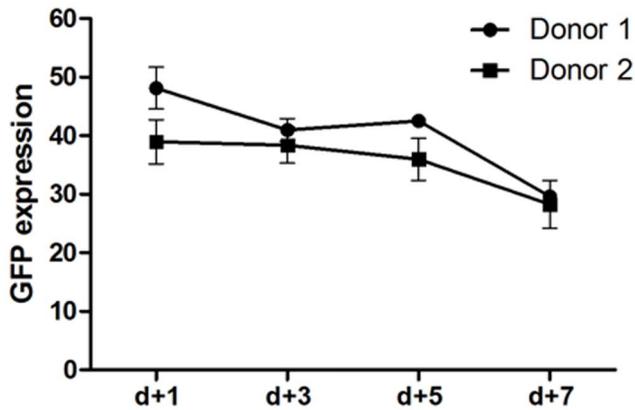


Figure 3. Long term expression of GFP after electroporation with buffer 1SM. PBMCs from two healthy donors were electroporated using 1SM buffer and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. After 24 h cells were activated with anti-CD3/anti-CD28 and GFP expression was evaluated for 7 days by flow cytometry. doi:10.1371/journal.pone.0060298.g003

the final electroporation score showed superior when using solution 2S, this buffer was selected to perform the following assays.

To compare the results of solution 2S with Lonza's kit, mouse lymphocytes from lymph nodes (C57BL/6 strain) were isolated, electroporated following Lonza's kit instruction using the recommended nucleofector II program and compared to results obtained using 2S solution. As demonstrated in Figure 7B, our buffer achieved superior cell viability while maintaining similar GFP expression and a slightly higher electroporation score (52,8) than the Lonza group (47,4). Since the manufacturer of the reference commercial electroporation kit indicates that different mouse strains can show wide variation in electroporation efficiencies, we tested the electroporation of 3 different mouse strain lymphocytes (C57BL/6, BALB/c and B10A) side by side. We observed no substantial variation when different mouse strains were compared using solution 2S (Figure 7C); as in C57BL/6, buffers 1M, 1S and 3P achieved a lower efficiency when compared to buffer 2S (data

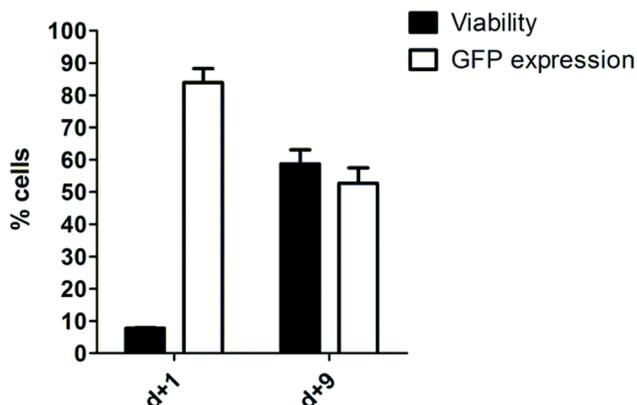


Figure 4. Electroporation of transposon and transposase maintains transgene expression after cell viability recovery. PBMCs from two healthy donors were electroporated using 1SM buffer, 20 μ g of pT2-GFP plasmid and 2 μ g of SB100x transposase. Cell viability and GFP expression were analyzed by flow cytometry on day 1 and 9. Values are the average of two donors in triplicate and are expressed as mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0060298.g004

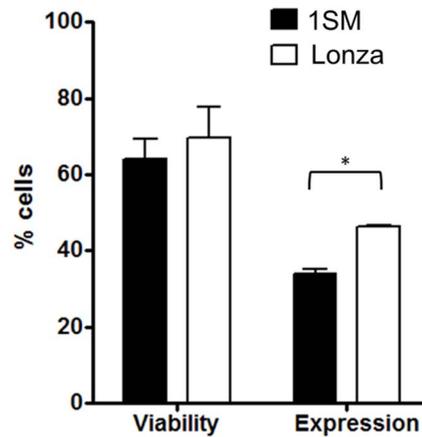


Figure 5. Comparison of in house vs commercial electroporation kit. PBMCs from two healthy donors were electroporated using either 1SM buffer or Lonza buffer and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed after 24 h by flow cytometry. Cell viability was normalized to control (not electroporated) cells. Values are the average of two donors in triplicate and are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by unpaired Student t test; $p < 0.05$ (*). doi:10.1371/journal.pone.0060298.g005

not shown). It is important to note that we were unable to achieve long term expression of the transgene when SB transposase was used under the conditions tested (data not shown).

Since Flanagan and colleagues have shown that certain polymers can boost the transfection efficiency for some cells [34], we asked whether different amounts of polyethylene glycol (PEG - 0.01, 0.1 and 1%) added to 2S buffer during electroporation could augment the number of viable cells and transgene expression in mouse T cells. We observed no positive impact on

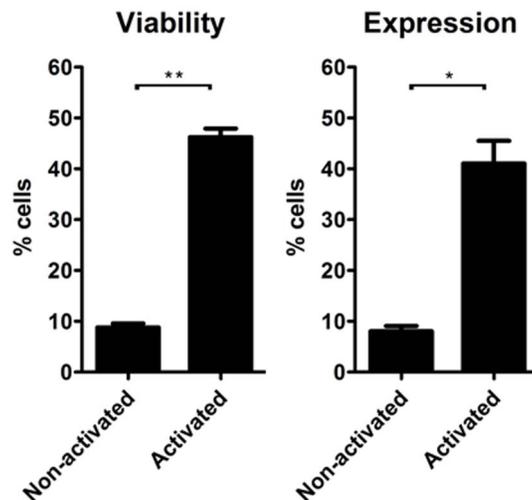


Figure 6. Electroporation of resting vs activated mouse primary T lymphocytes. Total lymphocytes from lymph nodes of C57BL/6 mice were isolated and either directly electroporated or activated for 24 h with anti-CD3/anti-CD28 and then electroporated. Buffer 2S and 4 μ g of pT2-GFP plasmid were used. Cell viability and GFP expression were analyzed after 24 h by flow cytometry. Cell viability is normalized to control (not electroporated) cells. Data are representative of two experiments in triplicate and expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by unpaired Student t test; $p < 0.0001$ (**) or $p = 0.002$ (*). doi:10.1371/journal.pone.0060298.g006

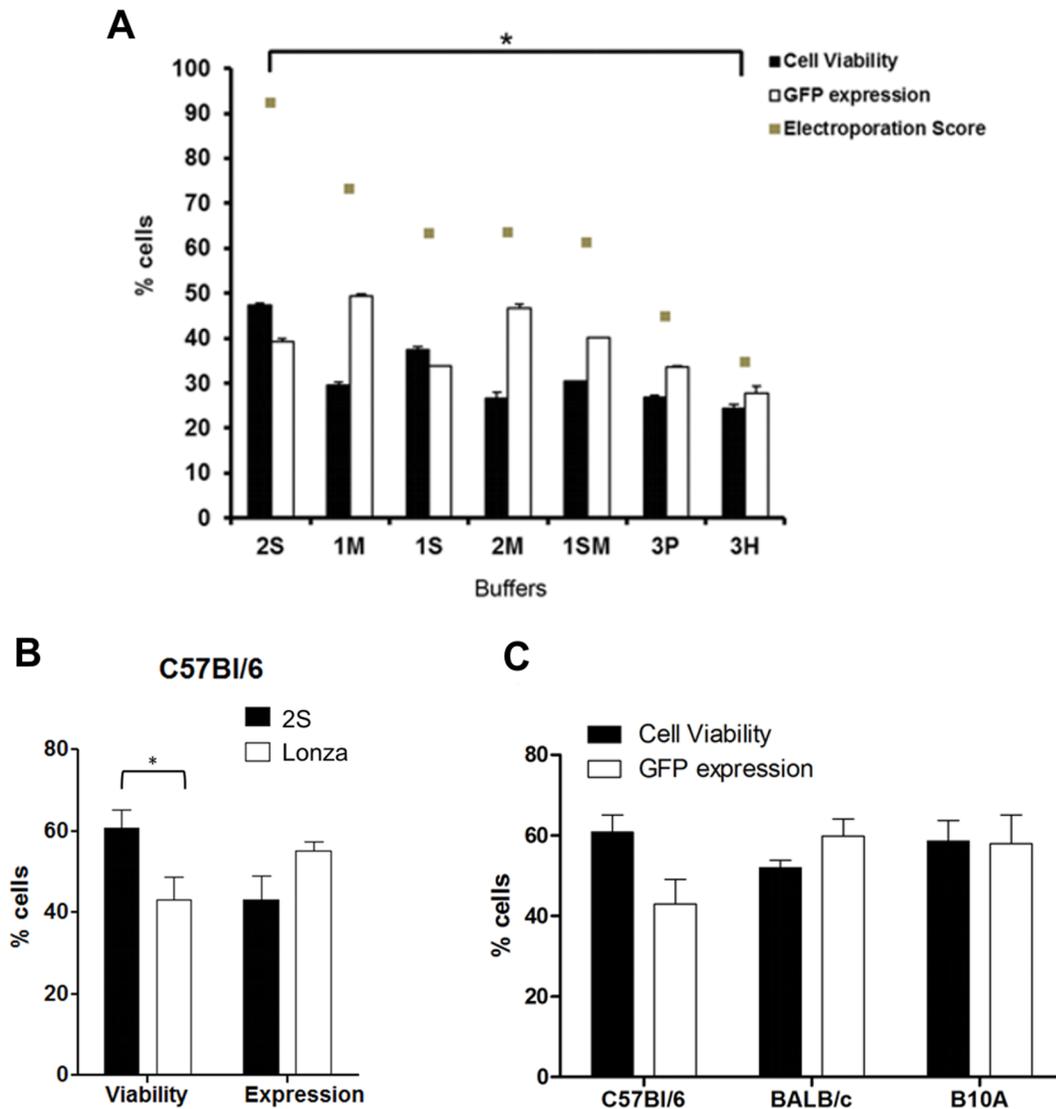


Figure 7. Efficiency of murine T lymphocyte electroporation is dependent on different buffer and mouse strain. (A) Total lymphocytes from lymph nodes of C57BL/6 mice were isolated and electroporated using in house buffers and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed after 24 h by flow cytometry. Electroporation scores were determined as described in materials and methods. Statistical analysis was performed using One Way ANOVA and Tukey post test. $P < 0.05$ (*). (B) Total lymphocytes from lymph nodes of C57BL/6 mice were isolated and electroporated using 2S buffer or Lonza buffer and 4 μ g of pT2-GFP. Analysis was performed 24 h later by flow cytometry. Data were analyzed by unpaired Student t test $p < 0.05$ (*). (C) Total lymphocytes from lymph nodes of C57BL/6, Balb/c and B10A mice were isolated and electroporated using 2S buffer and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability was normalized to control (not electroporated) cells. All values in this figure represent the average of two experiments in triplicate and are expressed as mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0060298.g007

cell viability whereas slight variations in GFP expression were observed; however, solution 2S achieved higher percentages of GFP positive cells in the absence of PEG (Figure S4). As in the control (solution 2S) condition, pre activation of T cells had deep impact in cell viability. Other polymer tested (Poloxamer-188) showed no significant impact in electroporation efficiency at 0.01, 0.1 or 1% concentrations and further appeared to slightly decrease the percentage of GFP-positive lymphocytes in the non-activated population, showing no effect on transfection of activated T cells (Figure S5).

Efficient CAR-transfection of human T cells

To test whether solution 1SM was able to efficiently transfect human cells with the clinically relevant CAR 20z, we transfected

fresh PBMC from a healthy donor and evaluated the percentage of transgene expression at 24 μ h and after the stimulation with irradiated EBV+ B lymphoblastic L388 cell line. Analysis at days +1, +10, +20 and +30 showed that the expression of CAR was 34.7%, 63.3, 66.4% and 83.8% respectively, with a progressive increase in the percentage and MFI of CAR+ cells (Figures 8A and 8B). At day 20 after CAR transfection, expansion of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) led to an absolute number of lymphocytes exceeding 5×10^7 cells, with 20z+ cells having a clear proliferative advantage over mock electroporated (Neg) cells (Figure 8C). As showed in Figure 8D, T lymphocytes expressing 20z CAR displayed a high cytotoxic activity against the engineered CD20+ NALM-6 cell line when compared to control cells expanded in the same way but expressing no CAR, showing the

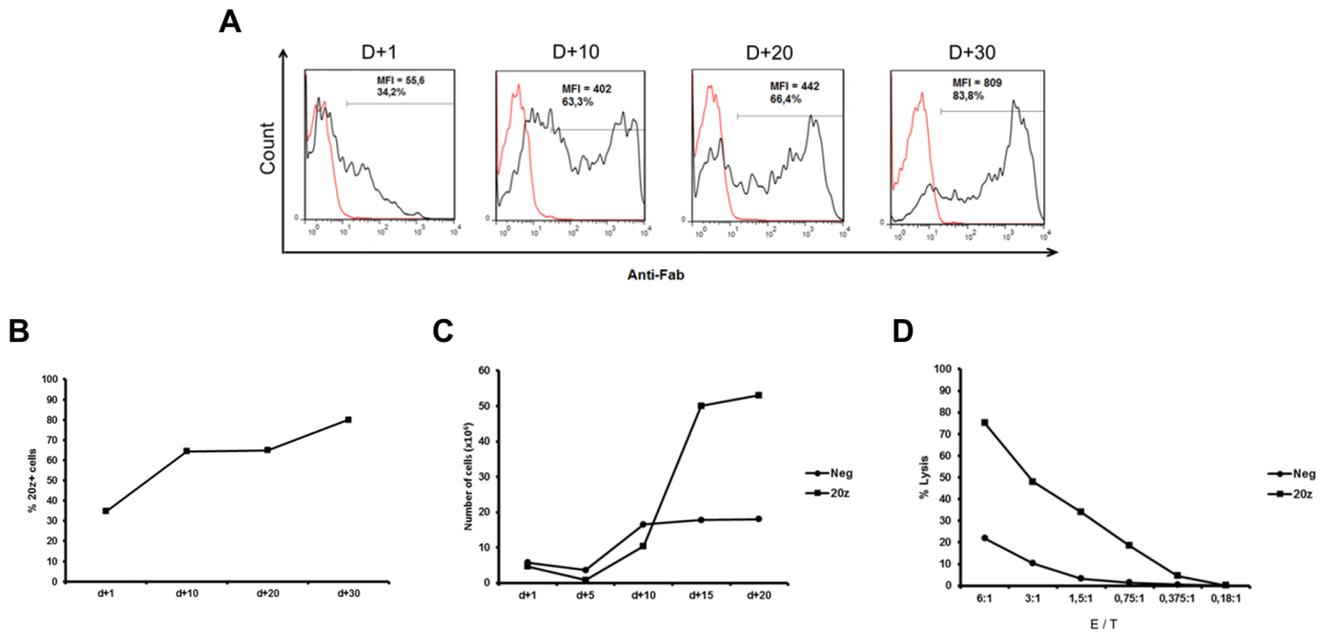


Figure 8. T cell electroporation with Chimeric Antigen Receptor (CAR) results in stable gene expression conferring target-specific cytotoxicity. PBMCs from one donor were electroporated using 15M buffer, 20 μ g of pT3-20z plasmid and 0.5 μ g of SB100x transposase plasmid. One day later, lymphocytes were stimulated with irradiated L388 cells and CAR expression was evaluated until d+30 by flow cytometry analysis using an anti-fab antibody. (A) Representative histograms of 20z CAR expression at d+1, d+10, d+20 and d+30 after electroporation (gray line=non electroporated cells stained anti-Fab; black line=lymphocytes electroporated with pT3-20z). (B) Analysis of 20z CAR expression until d+30 summarizing data of Figure 8A. (C) Kinetics of expansion of control mock electroporated (Neg) or 20z+ lymphocytes after stimulation with L388 cells. (D) Expanded cells were used in different effector/target (E/T) ratios in a cytotoxic assay against the CD19+/CD20+ Nalm-6 GFP+target cell line; Neg=CTLs not electroporated. doi:10.1371/journal.pone.0060298.g008

feasibility of this protocol for the generation of antitumor specific T lymphocytes.

Discussion

Given the importance of genetic modification of T cells for the study of T cell biology and immunotherapy, efficient and affordable methods to transfer genes to T lymphocytes are extremely useful to advance in these fields [12]. Human and, notably, mouse T lymphocytes are usually hard to electroporate and the emergence of systems like Lonza Nucleofactor significantly improved transfection results. When large number of electroporations must be performed, costs associated with the acquisition of the electroporation kits can potentially limit its broad application. We herein report the development of in house buffers for the nucleofection of T cells, comprising different compositions and osmolarities, which allowed optimization of protocols for each target cell to be genetically modified (the results are summarized in Table S2).

The Jurkat T cell line, a prototype CD4+ lymphocyte used in many cell signaling studies, could be efficiently electroporated with our protocol yielding high expression of the reporter gene but low viability. Although the initial level of cell viability precludes refined cell analysis in the first 72 hours, cells are able to recover, allowing long-term evaluation of gene expression when SB100x transposase was included. For human primary T cells, several buffers resulted in high electroporation scores, with expression in both CD4+ and CD8+ subpopulations (Figure 2C). Surprisingly, GFP expression was not detected in NK cells, despite the presence of this cell subset (data not shown), indicating that the main cell population receiving and expressing the transgene are T lymphocytes. NK

cells were previously described as hard to transfect and electroporate, but some protocols for exogenous gene expression in these cells – NK-92 cell line and primary NK cells – were described [35–38]. We have no explanation for the observed restriction of NK cells to electroporation under the conditions tested in this report and NK cell resistance is currently being addressed by our group.

Electroporation of activated human T cells was ineffective with all the buffers and programs tested resulting in large loss of cell viability due to electroporation (data not shown). These results suggest that, at least for the conditions we tested, activated T lymphocytes are extremely sensitive to the provided electric pulse and do not allow efficient genetic modification if activated. These results prompted us to explore resting T cell electroporation followed by activation.

For murine primary T cells, only anti-CD3 activated lymphocytes were effectively electroporated, with little difference between T cells from Balb/c, C57BL/6 and B10A mouse strains tested. These results suggest a complete different behavior and capacity to recover from the electric pulse for murine T cells if compared to their human counterparts. We compared our protocol to Lonza kits and found no major differences in electroporation efficiencies when testing both human and murine primary cells. These results establish the buffers described in our report as reliable alternatives to Lonza's kits. The attempt to increase electroporation efficacy by adding polymers (PEG and Poloxamer-188) to electroporation buffers showed no impact in the level of transgene expression or cell viability obtained. Testing of additional polymers may increase the efficiency of the protocol and is currently under evaluation.

The combined use of the in house buffers with the non-viral SB system consists in a valuable tool for stable genetic modification.

Although in this report we did not unequivocally demonstrate the integration of transgenes in host cell DNA, long term expression of GFP (Figure 1B) and CAR (Figures 8A and B) support the stable integration and expression of the transgenes transferred under the conditions tested. For mature T cells the risk of insertional mutagenesis is still theoretical [39,40] and the integration pattern of SB transposase in these cells seems fairly random, unlike *piggyBac* or Tol2 that have a γ retrovirus-like profile [22]. These particular aspects indicate that using SB based technology combined with electroporation protocols represents one of the safest ways to transfer new genes to T lymphocytes. One potential limitation of the SB system is the overproduction inhibition, causing low transposition rates at high transposase concentration [41]. Furthermore, when expressed at high levels, SB transposase exhibits a cytotoxic effect dependent of p53 and c-Jun [42], although we did not observe reductions in GFP expression due to this phenomenon despite the different proportions of pT2/SB tested (Figures 4 and S3) in primary human lymphocytes. The ideal proportion of pT2/SB must be empirically established for each plasmid and cell type.

Most of data reported so far describe the electroporation of RNA molecules in T lymphocytes [18,43–47] with very few reports addressing functional gene transfer with plasmids carrying the transgene [48]. The limited number of reports using plasmid electroporation into lymphocytes precludes consistent comparisons to the results reported here. The current conditions described for electroporation and cell expansion lead to an efficient long term maintenance of primary human T cells carrying and expressing functional transgenes. Singh and colleagues [48] recently described a similar nucleofection system based on SB carrying CARs. Amongst the results described here, levels of transgene expression at day one after electroporation, presence of transgene protein in both CD4 and CD8 cells and the expansion rate of T lymphocytes after electroporation were very similar to those described by Singh and colleagues, reinforcing the equivalence of our in house system and the commercial available kits.

Finally, the new buffers described in this report are extremely useful in the context of experimental adoptive immunotherapy, specifically for the generation of antitumoral lymphocytes. As showed in Figure 8(A–D), long term expression of 20z CAR was successfully achieved conferring high cytotoxic activity against the engineered CD20+ Nalm-6 cell line to gene modified lymphocytes. Ongoing clinical trials performed elsewhere using similar methodologies to generate SB-modified CAR+ T cells [19,21] reinforce the applicability of our method. Thus, the method presented here provides the researcher with independence over kits manufacturer, allowing functional studies under relevant conditions at similar efficiencies if compared to commercial kits, expanding the possibility of evaluating T cell function even in large scale experiments requiring multiple electroporations of primary T cells. Furthermore, the approach described here represents a viable alternative to more labor-intensive and time consuming retro/lentiviral vector based gene transfer methods, which usually require 2–3 weeks for vector production, titration and quality control testing. Moreover, our formulation provides low-income laboratories with an affordable protocol of nucleofection, making the genetic modification of T cells a straight forward and accessible method.

Supporting Information

Figure S1 Analysis of 7AAD staining after electroporation. PBMCs from three healthy (A, B and C) donors were

electroporated using 1SM buffer and 2 μ g of pT2-GFP plasmid. After 24 h, cells were stained with 7AAD and the viability was analyzed in gated (living cells as defined by scatter) or non-gated populations.

(TIF)

Figure S2 Electroporation efficiency of different buffers. PBMCs from two healthy donors were electroporated using in house buffers and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed until d+7 by flow cytometry. Values are the average of triplicates and expressed as mean \pm SEM. Viability of electroporated cells were normalized to the negative control (not electroporated) cells.

(TIF)

Figure S3 Impact of different transposon and transposase plasmid mass in viability and transgene expression. PBMCs from two healthy donors were electroporated using 1SM buffer, 4 μ g, 10 μ g or 20 μ g of pT2-GFP plasmid and/or 0.5 μ g, 1 μ g or 2 μ g of SB100x transposase plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed until d+9 by flow cytometry. Values are the average of two donors in triplicate and expressed as mean \pm SEM. Viability of electroporated cells were normalized to the negative control (not electroporated) cells.

(TIF)

Figure S4 Electroporation of mouse lymphocytes in the presence of PEG. Total lymphocytes from lymph nodes of C57Bl/6 mice were isolated and electroporated using 2S buffers (supplemented or not with PEG) and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed after 2 h by flow cytometry. Data is representative of two independent experiments in triplicate.

(TIF)

Figure S5 Electroporation of mouse lymphocytes in the presence of Poloxamer-188. Total lymphocytes from lymph nodes of C57Bl/6 mice were isolated and electroporated using 2S buffers (supplemented or not with Poloxamer-188) and 4 μ g of pT2-GFP plasmid. Cell viability and GFP expression were analyzed after 24 h by flow cytometry. Data is representative of two independent experiments in triplicate.

(TIF)

Table S1 Buffers used in electroporation experiments.

(DOCX)

Table S2 Summary of the results obtained with in house buffers in different cell types.

(DOC)

Acknowledgments

We thank Ilana Zalberg and Barbara Monte-Mor for critically revising the manuscript; Sang Wang Han (UNIFESP – Brazil) for pT2-GFP and SB100x plasmids; Richard Morgan (NIH) for pT3-GFP plasmid; Dario Campana for 20BBz CAR sequence (St. Jude Children’s Research Hospital) and Dr. Alexandre E Nowill (Unicamp – Brazil) for L388 cell line.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MHB LC ALS. Performed the experiments: LC ALS BAC. Analyzed the data: LC ALS BAC MHB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MHB. Wrote the paper: LC ALS MHB.

References

- Ebert O, Finke S, Salahi A, Herrmann M, Trojanek B, et al. (1997) Lymphocyte apoptosis: induction by gene transfer techniques. *Gene therapy* 4: 296–302.
- Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, et al. (2000) High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 96: 3392–3398.
- Serafini M, Bonamino M, Golay J, Introna M (2004) Elongation factor 1 (EF1alpha) promoter in a lentiviral backbone improves expression of the CD20 suicide gene in primary T lymphocytes allowing efficient rituximab-mediated lysis. *haematologica* 89: 86–95.
- Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Ponzoni M, et al. (2006) Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature Biotechnology* 24: 687–696. doi:10.1038/nbt1216.
- Cartier N, Haccin-Bey-Abina S, Bartholomae CC, Veres G, Schmidt M, et al. (2009) Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science* 326: 818–823. doi:10.1126/science.1171242.
- Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, et al. (1997) HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276: 1719–1724.
- Bonamino M, Serafini M, D'Amico G, Gaipa G, Todisco E, et al. (2004) Functional transfer of CD40L gene in human B-cell precursor ALL blasts by second-generation SIN lentivectors. *Gene Therapy* 11: 85–93. doi:10.1038/sj.gt.3302141.
- Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, et al. (2011) Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *New England Journal of Medicine* 365: 1673–1683.
- Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, et al. (2008) Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature Medicine* 14: 1264–1270. doi:10.1038/nm.1882.
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, et al. (2011) T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* 3: 95ra73–95ra73. doi:10.1126/scitranslmed.3002842.
- Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH (2011) Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine* 365: 725–733.
- Brenner MK (2012) Will T-cell therapy for cancer ever be a standard of care? *Cancer Gene Therapy*. Available: <http://www.nature.com/doi/10.1038/cgt.2012.74>. Accessed 17 October 2012.
- Apollonio F, Liberti M, Marracino P, Mir L (2012) Electroporation mechanism: Review of molecular models based on computer simulation. *Antennas and Propagation (EUCAP)*, 2012 6th European Conference on. pp. 356–358. Available: http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=6206719. Accessed 26 September 2012.
- Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavcic D, Tarek M (2012) Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *Electrical Insulation Magazine*, IEEE 28: 14–23.
- Murakami T, Sunada Y, others (2011) Plasmid DNA Gene Therapy by Electroporation: Principles and Recent Advances. *Current gene therapy* 11. Available: <http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/22023474>. Accessed 26 September 2012.
- Van Tendeloo VFI, Ponsaerts P, Lardon F, Nijls G, Lenjou M, et al. (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98: 49–56.
- Bell MP, Huntoon CJ, Graham D, McKean DJ (2001) The analysis of costimulatory receptor signaling cascades in normal T lymphocytes using in vitro gene transfer and reporter gene analysis. *Nat Med* 7: 1155–1158. doi:10.1038/nm1001-1155.
- Zhao Y, Zheng Z, Cohen C, Gattinoni L, Palmer D, et al. (2006) High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Molecular Therapy* 13: 151–159. doi:10.1016/j.ythc.2005.07.688.
- Huls MH, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Kebriaci P, et al. (2013) Clinical Application of Sleeping Beauty and Artificial Antigen Presenting Cells to Genetically Modify T Cells from Peripheral and Umbilical Cord Blood. *Journal of Visualized Experiments*. Available: <http://www.jove.com/video/50070/clinical-application-sleeping-beauty-artificial-antigen-presenting>. Accessed 21 February 2013.
- Hackett PB, Largaespada DA, Cooper LJ (2010) A Transposon and Transposase System for Human Application. *Molecular Therapy* 18: 674–683. doi:10.1038/mt.2010.2.
- Kebriaci P, Huls H, Jena B, Munsell M, Jackson R, et al. (2012) Infusing CD19-Directed T Cells to Augment Disease Control in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Advanced B-Lymphoid Malignancies. *Human Gene Therapy* 23: 444–450. doi:10.1089/hum.2011.167.
- Huang X, Guo H, Tammana S, Jung Y-C, Mellgren E, et al. (2010) Gene Transfer Efficiency and Genome-Wide Integration Profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and PiggyBac Transposons in Human Primary T Cells. *Molecular Therapy* 18: 1803–1813. doi:10.1038/mt.2010.141.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology* 12: 269–281. doi:10.1038/nri3191.
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, et al. (2011) Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 17: 4550–4557. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- Rosenberg SA, Dudley ME (2009) Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Current Opinion in Immunology* 21: 233–240. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002.
- Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, et al. (2010) Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood* 116: 4099–4102. doi:10.1182/blood-2010-04-281931.
- Chicaybam L, Laino Sodr  A, Bonamino M (2011) Chimeric Antigen Receptors in Cancer Immuno-Gene Therapy: Current Status and Future Directions. *International Reviews of Immunology* 30: 294–311. doi:10.3109/08830185.2011.595855.
- Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang W-T, Plesa G, et al. (2012) Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Science Translational Medicine* 4: 132ra53–132ra53. doi:10.1126/scitranslmed.3003761.
- Singh H, Manuri PR, Olivares S, Dara N, Dawson MJ, et al. (2008) Redirecting Specificity of T-Cell Populations For CD19 Using the Sleeping Beauty System. *Cancer Res* 68: 2961–2971. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5600.
- Jin Z, Maiti S, Huls H, Singh H, Olivares S, et al. (2011) The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Therapy* 18: 849–856. doi:10.1038/gt.2011.40.
- Peng PD, Cohen CJ, Yang S, Hsu C, Jones S, et al. (2009) Efficient nonviral Sleeping Beauty transposon-based TCR gene transfer to peripheral blood lymphocytes confers antigen-specific antitumor reactivity. *Gene Therapy* 16: 1042–1049. doi:10.1038/gt.2009.54.
- D'Amico G, Bonamino M, Dander E, Marin V, Basso G, et al. (2006) T cells stimulated by CD40L positive leukemic blasts-pulsed dendritic cells meet optimal functional requirements for adoptive T-cell therapy. *Leukemia* 20: 2015–2024.
- Imai C, Mihara K, Andreansky M, Nicholson IC, Pui C-H, et al. (2004) Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18: 676–684. doi:10.1038/sj.leu.2403302.
- Flanagan M, Gimble JM, Yu G, Wu X, Xia X, et al. (2011) Competitive electroporation formulation for cell therapy. *Cancer gene therapy* 18: 579–586.
- Sutlu T, Nyström S, Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, et al. (2012) Inhibition of Intracellular Antiviral Defense Mechanisms Augments Lentiviral Transduction of Human Natural Killer Cells: Implications for Gene Therapy. *Human Gene Therapy* 23: 1090–1100. doi:10.1089/hum.2012.080.
- Grund EM, Muise-Helmericks RC (2005) Cost efficient and effective gene transfer into the human natural killer cell line, NK92. *Journal of Immunological Methods* 296: 31–36. doi:10.1016/j.jim.2004.10.008.
- Imai C (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106: 376–383. doi:10.1182/blood-2004-12-4797.
- Tran J, Kung SK (2007) Lentiviral Vectors Mediate Stable and Efficient Gene Delivery into Primary Murine Natural Killer Cells. *Molecular Therapy* 15: 1331–1339. doi:10.1038/sj.mt.6300184.
- Newrzela S, Cornils K, Li Z, Baum C, Brugman MH, et al. (2008) Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood* 112: 2278–2286. doi:10.1182/blood-2007-12-128751.
- Westwood JA, Murray WK, Trivett M, Shin A, Neeson P, et al. (2008) Absence of retroviral vector-mediated transformation of gene-modified T cells after long-term engraftment in mice. *Gene Therapy* 15: 1056–1066. doi:10.1038/gt.2008.47.
- Geurts A (2003) Gene transfer into genomes of human cells by the sleeping beauty transposon system. *Molecular Therapy* 8: 108–117. doi:10.1016/S1525-0016(03)00099-6.
- Galla M, Schambach A, Falk CS, Maetzig T, Kuehle J, et al. (2011) Avoiding cytotoxicity of transposases by dose-controlled mRNA delivery. *Nucleic Acids Research* 39: 7147–7160. doi:10.1093/nar/gkr384.
- Lehner M, G tz G, Proff J, Schaft N, Dörrie J, et al. (2012) Redirecting T Cells to Ewing's Sarcoma Family of Tumors by a Chimeric NKG2D Receptor Expressed by Lentiviral Transduction or mRNA Transfection. *PLoS ONE* 7: e31210. doi:10.1371/journal.pone.0031210.

44. Mitchell DA, Karikari I, Cui X, Xie W, Schmittling R, et al. (2008) Selective Modification of Antigen-Specific T Cells by RNA Electroporation. *Human Gene Therapy* 19: 511–521. doi:10.1089/hum.2007.115.
45. Rabinovich PM, Komarovskaya ME, Wrzesinski SH, Alderman JL, Budak-Alpdogan T, et al. (2009) Chimeric receptor mRNA transfection as a tool to generate antineoplastic lymphocytes. *Human gene therapy* 20: 51–61.
46. Schaft N, Dörrie J, Müller I, Beck V, Baumann S, et al. (2005) A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55: 1132–1141. doi:10.1007/s00262-005-0098-2.
47. Van Driessche A, Ponsaerts P, Van Bockstaele DR, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN (2005) Messenger RNA electroporation: an efficient tool in immunotherapy and stem cell research. *Folia Histochem Cytobiol* 43: 213–216.
48. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, et al. (2011) Reprogramming CD19-Specific T Cells with IL-21 Signaling Can Improve Adoptive Immunotherapy of B-Lineage Malignancies. *Cancer Research* 71: 3516–3527. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3843.