

LUCILA NASSIF KERBAUY

**Expansão de células NK com atividade antitumoral:
aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos
imunológicos envolvidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade de
São Paulo / Instituto Butantan / IPT para a obtenção
do título de Doutor em Biotecnologia

**São Paulo
2021**

LUCILA NASSIF KERBAUY

**Expansão de células NK com atividade antitumoral:
aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos
imunológicos envolvidos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo / Instituto Butantan / IPT para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo
2021**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nassif Kerbauy, Lucila
Expansão de células NK com atividade
antitumoral: aplicações em imunoterapia adotiva e
mecanismos imunológicos envolvidos / Lucila Nassif
Kerbauy; orientador Oswaldo Keith Okamoto. -- São
Paulo, 2021.
84 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células NK expandidas. 2. Cordão umbilical.
I. Keith Okamoto, Oswaldo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: **LUCILA NASSIF KERBAUY**

Título da tese: Expansão de células NK com atividade anti-tumoral: aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos imunológicos

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública marcada a / / , considerou

() Aprovada () Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – USP



USP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expansão in vitro de células com atividade anti-tumoral.

Pesquisador: oswaldo keith okamoto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 13367419.7.0000.5464

Instituição Proponente: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IBUSP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.336.881

Apresentação do Projeto:

O presente projeto investiga a expansão in vitro de células NK com atividade anti-tumoral: aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos imunológicos envolvidos.

Objetivo da Pesquisa:

A exposição prévia de células NK a uma combinação de citocinas pode lhes conferir características de células de memória imunológica, potencializando benefícios clínicos do uso de células NK em imunoterapia anti-tumoral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos.

Benefícios: aumento do conhecimento à respeito do uso de células NK para tratamento do câncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Análise do projeto:

- amostra a ser analisada: células de cordão umbilical obtidas mediante TCLE aprovado pelo CEP-IBUSP;
- procedimentos a que as pessoas serão submetidas: não se aplica, pois trata-se de pesquisa básica com células;
- infraestrutura: disponível nos laboratórios do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva e

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 05.508-090

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



Continuação do Parecer: 3.336.881

- no Centro de Estudos do Genoma Humano-IBUSP;
- d) armazenamento de amostra: não se aplica;
- e) apoio financeiro: FAPESP

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador solicitou dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, tendo em vista que o material já foi coletado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a destacar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1293460.pdf	02/04/2019 17:50:30		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/03/2019 16:23:48	oswaldo keith okamoto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa.pdf	07/03/2019 16:22:51	oswaldo keith okamoto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Oficio.pdf	12/02/2019 15:45:50	oswaldo keith okamoto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Compromisso_do_Pesquisadorcolaborador.pdf	12/02/2019 15:41:49	oswaldo keith okamoto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadorresp.pdf	12/02/2019 15:41:26	oswaldo keith okamoto	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	12/02/2019 15:40:21	oswaldo keith okamoto	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/02/2019 15:35:28	oswaldo keith okamoto	Aceito

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



USP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.336.881

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	12/02/2019 15:23:46	oswaldo keith okamoto	Aceito
----------------	--------------------	------------------------	--------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Maio de 2019

Assinado por:
CELIA PRISZKULNIK KOIFFMANN
(Coordenador(a))

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-8761

E-mail: cepibusp@ib.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa “Expansão *in vitro* de células NK com atividade antitumoral: aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos imunológicos envolvidos”, a ser desenvolvido pela doutoranda Lucila Nassif Kerbauy sob a orientação do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto (Protocolo nº 242/2019), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, conforme Parecer Consubstanciado de 21/09/2019 (CAAE 1 336741 9.7.0000.5464).

São Paulo, 24 de novembro de 2021

Prof. Dra. Angela M. Vianna Morgante
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA – MDACC

THE UNIVERSITY OF TEXAS
MDAnderson
Cancer Center
Making Cancer History®

Office of Protocol Research
T 713-792-2933
F 713-794-4958
Unit 1637
7007 Bertner Avenue
Houston, Texas 77030

DATE: AUG 26, 2019

TO: Elizabeth Shpall M.D.
Box 423

FROM: Institutional Review Board IRB5
Office of Protocol Research
Box 198

SUBJECT: Expedited Continuing Review Approval of LAB03-0976

Title: Cord Blood Collection for Translational Research

The above named and numbered protocol was reviewed using the expedited review process in accordance with the Institutional Review Board (IRB) Policy for Continuing Review of Research and the federal regulations governing human subjects research [45 CFR 46.109(e) and 21 CFR 56.109(f)].

On AUG 19, 2019, the IRB chair or designee expeditedly approved the continuation of this protocol. All research related activities may continue on this protocol for another 365 days.

The IRB approval expiration date is 8/19/2020.

NOTE: This protocol does not meet any of the new and revised exemption categories. In keeping with the requirements outlined in 45CFR46.109 (e) continuing review still applies.

If you have any questions regarding this matter, please call the Office of Protocol Research at (713)792-2933 or send an email to IRB CONTINUING REVIEW@mdanderson.org.

Thank you for your cooperation.

FWA #: 00000363
OHRP IRB Registration Number: IRB 5 IRB00006023

Ao meu filho, **Lucas Kerbauy Souza**,
que me ensinou o verdadeiro sentido
da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Alberto** e **Marilena**, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, pelos incentivos e exemplos e pela dedicação para que eu conseguisse realizar os meus sonhos. Obrigado por terem acreditado tanto em mim.

Ao meu esposo, **Rodrigo**, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado. O sucesso na elaboração e no desenvolvimento deste doutorado pertence a ele também, pois, sem ele, nada seria possível.

À minha irmã, **Mariana**, pelo carinho, companheirismo e por constantes incentivos desde o início. Você é um grande exemplo pra mim. Hoje, compartilho este importante momento com ela também.

Ao meu orientador, **Dr. Oswaldo Keith Okamoto**, pelo incentivo e pela dedicação, orientação e paciência na realização deste projeto. Agradeço imensamente pelos constantes estímulos e pelo apoio nos momentos mais difíceis para que eu conseguisse chegar até aqui.

À minha mentora, **Dra. Katy Rezvani**, pela orientação, pelo ensino e por ter acreditado em mim. Nunca agradecerei o suficiente por nos acolher com tanto carinho e como parte da sua família nos Estados Unidos.

Ao Programa de **Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo** pela grande oportunidade.

Ao **MD Anderson Cancer Center** pelo suporte e auxílio nesse trabalho.

À diretoria do Hospital Israelita Albert Einstein e ao **Dr. Nelson Hamerschlak** por terem me dado todo o suporte durante o Postdoctoral Fellow em Terapia Celular no MD Anderson Cancer Center.

À minha avó **Lucila**, minha xará, madrinha e, hoje, minha protetora.

Agradeço, sobretudo, a **Deus** pela bênção da vida, pela proteção e por ter me guiado até aqui.

RESUMO

Kerbauly LN. Expansão de células NK com elevada atividade anti-tumoral: aplicações em imunoterapia adotiva e mecanismos imunológicos. 2021. 84 f. [tese em Biotecnologia]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2021.

Tem-se, atualmente, especial interesse pelo uso de células Natural Killer (NK) para imunoterapia celular no tratamento de pacientes com doença hematológica maligna e tumores sólidos. No entanto, a transferência adotiva de células NK apresenta limitações, como dificuldade em se obter número suficiente de células para tratamento, persistência inadequada, fraca expansão *in vivo* e limitada atividade antitumoral das células infundidas. Assim, um desafio nesse campo é a obtenção de células NK em quantidade e qualidade apropriadas para a imunoterapia adotiva. Aqui, apresentamos uma proposta inovadora para a produção em larga escala de células NK provenientes do sangue de cordão umbilical (CB-NK), com aumento de atividade antitumoral. Baseado no fato de que as células NK de sangue periférico apresentam propriedade de memória com aumento de resposta antineoplásica quando estimuladas previamente por uma combinação de citocinas, nós estudamos esse efeito em CB-NK com a intenção de se desenvolver um produto alogênico facilmente disponível para o uso clínico. CB-NK foram submetidas a um breve período de pré-ativação com uma combinação de interleucina-12 (IL-12), IL-15 e IL-18, seguido de expansão usando células “feeder” K562, expressando IL-21 e CD137 na presença de IL-2 exógena. Células NK pré-ativadas e expandidas (P+E CB-NK) apresentaram aumento da citotoxicidade contra linhagens tumorais mieloides, blastos de pacientes com leucemia mieloide aguda e linfóide após 14 dias de expansão. Por meio de sequenciamento de RNA, observou-se que as células P+E CB-NK apresentaram perfil transcriptômico compatível com ativação de vias de sinalização relacionadas ao aumento da função efetora, mesmo 14 dias após a ativação com a combinação de citocinas. As células P+E CB-NK apresentaram, ainda, aumento de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em relação às células somente expandidas sem a fase de pré-ativação. As células NK pré-ativadas e expandidas também exibiram aumento da atividade antitumoral com estimulação do anticorpo biespecífico chamado AFM13. Após estável ligação com AFM13, essas células exibiram resposta antitumoral aumentada contra células tumorais de linfoma CD30 + *in vitro* e *in vivo*,

em modelo experimental com camundongos NSG imunodeficientes. Coletivamente, esses dados identificaram a combinação de AFM13 com P+E CB-NK como uma estratégia promissora para o tratamento de doenças hematológicas CD30+.

Palavras-chave: Células NK. Células NK de memória. Cordão umbilical.

ABSTRACT

Kerbaay LN. Expansion of NK cells with high anti-tumor activity: applications in adoptive immunotherapy and involving immunologic mechanisms. 2021. 84 p. [thesis (Ph.D. thesis in Biotechnology)]. "Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo", São Paulo, 2021.

Currently there is a particular interest in using Natural Killer (NK) cells for cell immunotherapy in the treatment of patients with malignant hematologic disease and solid tumors. However, the adoptive transfer of NK cells has limitations such as difficulty in obtaining a sufficient number of cells for treatment, inadequate persistence, poor *in vivo* expansion, and limited antitumor activity of the infused cells. Thus, a challenge in this field is to obtain NK cells in adequate quantity and quality for adoptive immunotherapy. Here, we present an innovative proposal for the large-scale production of NK cells from umbilical cord blood (CB-NK) with increased anti-tumor activity. Based on the fact that peripheral blood NK cells have memory properties as an increased anti-neoplastic response when previously stimulated by a combination of cytokines, we studied this effect on CB-NK to develop a readily available allogeneic product for clinical use. CB-NK were pre-activated with a combination of interleukin-12 (IL-12), IL-15 and IL-18 for 16 hours, followed by expansion using K562 feeder cells expressing IL-21 and CD137 in the presence of exogenous IL-2. Pre-activated and expanded NK cells (P+E CB-NK) showed increased cytotoxicity against myeloid tumor lines, primary blasts from patients with acute myeloid leukemia and lymphoid cell line after 14 days of expansion. The P+E CB-NK cells displayed a transcriptomic profile compatible with activation of signaling pathways related to increased effector function, even 14 days after activation with the combination of cytokines in the RNA sequencing analysis. The P+E CB-NK cells also showed an increase in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) comparing to cells that were only expanded without the pre-activation phase. Pre-activated and expanded NK cells also exhibited increased anti-tumor activity when stimulated with a bispecific antibody called AFM13. After stable binding to AFM13, these cells showed increased anti-tumor response against CD30 + lymphoma cell line *in vitro* and *in vivo* in an xenogenic model with immunodeficient NSG mice. Collectively, these data identify the combination of AFM13 with P+E CB-NK as a promising strategy for treating CD30+ hematologic diseases.

Keywords: NK cell. Memory like NK cells. Cord blood.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADCC -	do inglês, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; citotoxicidade celular dependente de anticorpos
aAPC -	do inglês, artificial antigen-presenting cells; células apresentadoras de antígeno artificiais
CB -	do inglês, cord blood, cordão umbilical
CB-NK -	células NK provenientes de sangue do cordão umbilical
CAR -	do inglês, chimeric antigen receptor; receptor antigênico quimérico
Cr -	crômio
DECH -	doença do enxerto contra hospedeiro
E:T -	do inglês Effector:Target
Eomes -	eomesodermina
Exp CB-NK -	células NK expandidas provenientes de cordão umbilical
GSEA -	do inglês Gene set enrichment analysis, GSEA; análise de enriquecimento de conjunto de genes
GMP -	do inglês, good manufacturing practice; boas práticas de fabricação
h -	hora
IFN- γ -	interferon gama
IL -	interleucina
IU -	do inglês, international unit; unidade internacional
FDA -	do inglês, Food and Drug Administration
mL -	mililitro
μ m -	micrómetro
μ L -	microlitro
NK -	células natural killer
PB -	do inglês, peripheral blood; sangue periférico
PBS -	do inglês, phosphate buffered saline; solução salina tamponada com fosfato

P+E CB-NK -	células NK provenientes de cordão umbilical pré-ativadas e expandidas
TNF- α -	fator de necrose tumoral alfa
TRAIL -	do inglês, TNF-related apoptoses-inducing ligand; ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
PBS -	do inglês, phosphate buffered saline; solução salina tamponada com fosfato
rhIL -	interleucina recombinante humana
SBF -	soro bovino fetal
VS -	versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Como AFM13 atua com células NK	23
Figura 2 -	Esquema com as diferentes formas de cultivo de células NK provenientes de cordão umbilical	32
Figura 3 -	Diferente expressão fenotípica de células NK provenientes de cordão umbilical após pré-ativação com IL-12, IL-18 e IL15	42
Figura 4 -	Células pre-ativadas e expandidas apresentam maior capacidade proliferativa e produção de citocinas contra linhagem tumoral K562	44
Figura 5 -	Células pré-ativadas e expandidas apresentam maior atividade anti-tumoral contra linhagem tumoral e blastos primários de leucemia mielóide aguda.....	46
Figura 6 -	Diferença na expressão fenotípica de células P+E CB-NK vs células expandidas 14 dias após expansão	47
Figura 7 -	Expressão diferencial de genes de células P+E CB-NK	49
Figura 8 -	Células pré-ativadas e expandidas apresentam maior atividade anti-tumoral contra linhagem tumoral de neoplasia linfóide e maior citotoxicidade mediada por anticorpo	51
Figura 9 -	Células NK provenientes de pacientes com diagnóstico de linfoma não Hodgkin apresenta menor atividade anti-tumoral em comparação a pacientes saudáveis	52
Figura 10 -	O fenótipo de células NK de pacientes com linfoma de Hodgkin (LH) em comparação com doadores saudáveis.....	53
Figura 11 -	AFM13 aumenta citotoxicidade e secreção de citocinas de células P+E CB NK	55
Figura 12 -	Fenótipo de células P+E CB-NK com AFM13.....	56

Figura 13 - Estabilidade de ligação de AFM13 com células P+E CB-NK aumenta citotoxicidade contra CD30 positivo Karpas 299	58
Figura 14 - Retenção de AFM13 na superfície das células P+E CB-NK aumenta citotoxicidade contra CD30 positivo Karpas 299	60
Figura 15 - A adição de AFM13 não induziu apoptose de células Karpas 299 na ausência de células NK.....	61
Figura 16 - As células P + E CB-NK com AFM13 (complexo AFM13-NK) são seguras sem evidência <i>in vivo</i> de crescimento autônomo ou desregulado	63
Figura 17 - Atividade anti-tumoral <i>in vivo</i> de com AFM13 ligada às células P+E CB-NK	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos utilizados na citometria de massa para a caracterização de células CB-NK.....	37
Tabela 2 - Avaliação da condição corpórea dos camundongos	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Células NK	21
1.2 AFM13	22
1.3 Células NK alogênicas	24
1.4 Células NK de memória induzidas por citocinas	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Células	31
3.2 Imunofenotipagem para caracterização de células NK	33
3.3 Determinação de citocinas intracelulares para avaliar a funcionalidade das células NK	34
3.4 Citotoxicidade antitumoral	35
3.5 Sequenciamento de RNA	35
3.6 Citometria de massa	36
3.7 Modelo animal	38
3.8 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Caracterização fenotípica de células NK de cordão umbilical ativadas com combinação de citocinas	41
4.2 Atividade proliferativa e antitumoral de células pré-ativadas e expandidas	43
4.3 A pré-ativação de IL-12/15/18 das células CB-NK aumenta sua função efetora por meio da regulação de múltiplas vias inflamatórias	47
4.4 P+E CB-NK desempenham melhor citotoxicidade mediada por anticorpo	51
4.5 As células P+E CB-NK com AFM13 retêm sua citotoxicidade contra o linfoma de Karpas 299 após a lavagem	57
4.6 Atividade antitumoral das células P+E CB-NK com AFM13 em modelo animal de linfoma CD30+	62
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Células Natural Killer (NK) são atraentes para imunoterapia celular no tratamento de pacientes com doença hematológica maligna e tumores sólidos, uma vez que são células capazes de reconhecer e matar células estranhas ao organismo sem a apresentação antigênica prévia e por não causarem doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), o que permite o uso alogênico ^(1, 2). No entanto, a transferência adotiva de células NK apresenta limitações, como dificuldade em se obter número suficiente de células para tratamento, persistência inadequada, fraca expansão *in vivo* e limitada atividade antitumoral das células infundidas. Assim, um desafio nesse campo é a obtenção de células NK em quantidade e qualidade apropriadas para a imunoterapia adotiva.

1.1 Células NK

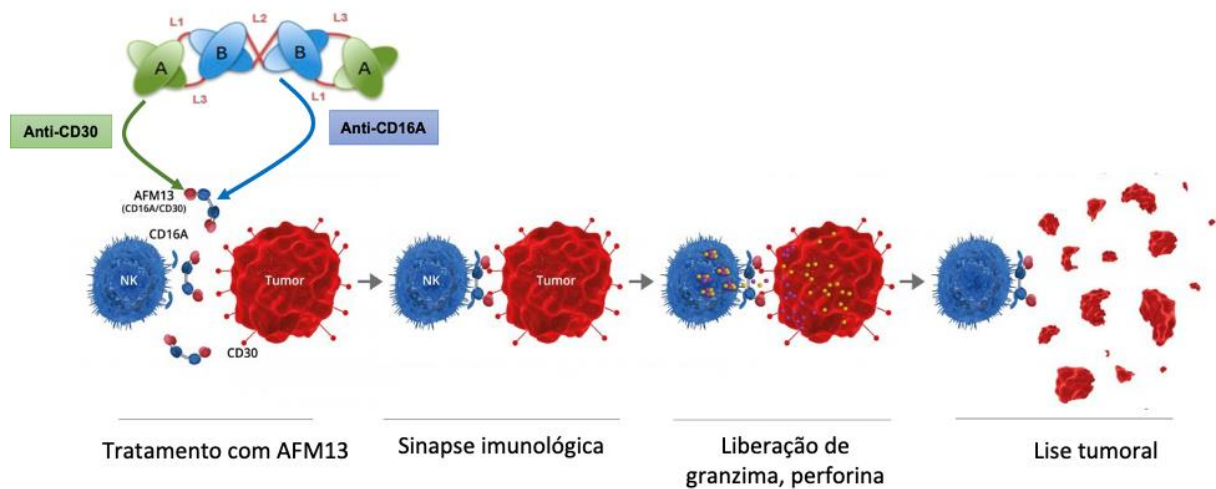
As células Natural Killer (NK) são potentes efetoras do sistema imune inato e constituem a primeira linha de defesa contra doenças malignas e infecciosas ⁽³⁾. São caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD56 e ausência de expressão de CD3 ⁽⁴⁾. Células NK CD56bright são menos diferenciadas, e a população CD56dim é conhecida como mais madura. Cerca de 90% das células NK circulantes são CD56dim, e esta população desempenha um papel fundamental na mediação da citotoxicidade, em resposta à estimulação de células-alvo, estando prontamente preparadas para atuar contra infecções, principalmente virais, e no combate de células tumorais ^(4, 5). Ao contrário das células B e T, células NK não são antígeno-dependentes e não possuem receptores de células T (TCRs). Isto permite que as células NK possam responder rapidamente aos sinais de estresse específicos, sem a necessidade de sensibilização prévia e expansão clonal ⁽⁶⁾. Curiosamente, os dados recentes questionam esse dogma e sugerem que as células NK possuem características de “memória”, com a especificidade de antígeno limitada, e possuem a capacidade de desenvolver uma resposta antígeno-específica anamnésica após um desafio antigênico ^(7, 8). Além disso, células NK secretam citocinas, como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), e estão envolvidas na regulação da função de outros linfócitos, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais ⁽⁹⁾.

A reatividade das células NK é determinada pelo balanço entre sinais ativadores e inibitórios ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾. Receptores ativadores, assim como receptores citotóxicos naturais (NKp30, NKp44 e NKp46), NKG2D e DNAM-1, interagem com ligantes nas células-alvo e direcionam as células NK à citotoxicidade. Receptores inibitórios como KIRs, receptor Ig-like leucocitário (LIR) e CD94/NKG2A interagem com MHC de Classe I molecular e protegem contra a autorreatividade ^(15, 16). Além disso, para células NK humanas, o CD16 (receptor Fc γ R11a) é um importante receptor ativador que reconhece a porção FC de imunoglobulinas e, assim, permite que as células NK desempenhem citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Uma vez ativadas pelo receptor CD16, as células NK são capazes de lisar as células-alvo e liberar citocinas como IFN- γ , recrutando células imunológicas adaptativas ^(17, 20).

Células NK utilizam dois mecanismos principais para lisar células tumorais após reconhecimento: exocitose granular e apoptose por meio de ativação de receptores de morte. Grânulos citotóxicos que contêm perforina, granzimas e outras proteínas efetoras de citotoxicidade são liberados em uma sinapse citotóxica ^(21, 22). A perforina facilita a entrada da granzima nas células-alvo, nas quais essas proteases de serina clivam alvos para induzir uma morte celular semelhante à apoptose. Um segundo caminho para induzir a morte celular é o uso de receptores de superfície, mais comumente FAS ligando e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF). Finalmente, TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN- γ (interferon-gama) podem induzir a morte de células tumorais senescentes, especialmente quando secretados de forma coordenada ⁽²³⁾. A ativação através de receptores de citocinas pode aumentar todos esses mecanismos de morte de células NK ⁽²⁴⁾.

1.2 AFM13

Anticorpos vêm sendo desenvolvidos para explorar a ADCC de células NK contra células cancerígenas, sendo uma opção atrativa para a imunoterapia. Entre os anticorpos desenvolvidos, AFM13 é um construto de anticorpo biespecífico tetravalente com dois sítios de ligação para cada CD30 e CD16A, projetado para o tratamento de doenças malignas CD30+. Ele se liga ao CD16A na superfície das células NK, ativando-as e recrutando-as para células tumorais que expressam CD30 para mediar a morte de células tumorais (Figura 1).



FONTE: Adaptado de Reusch *et al.* MABs 2014;6:727-38 e Rothe *et al.* Blood 2015;125:4024-31

Figura 1 - Como AFM13 atua com células NK

O AFM 13 foi utilizado no estudo clínico Fase 1 de escalonamento de dose. Vinte e oito pacientes com linfoma de Hodgkin (LH) recidivado ou refratário, com mediana de 6 linhas de tratamento prévio, receberam AFM13 em doses de 0,01 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal. Três dos 26 pacientes alcançaram remissão parcial (11,5%), e 13 pacientes obtiveram doença estável (50%), com uma taxa de controle geral da doença de 61,5%. Em 13 pacientes que receberam doses $\geq 1,5$ mg/kg de AFM13, a taxa de resposta geral foi de 23% e a taxa de controle da doença foi de 77%. O tratamento com AFM13 resultou em uma ativação das células NK e uma redução do CD30 solúvel no sangue periférico. Assim, AFM13 demonstrou ser bem tolerado, seguro, mas responsável por baixas taxas de resposta ⁽²⁵⁾.

AFM13 também foi utilizado em combinação com pembrolizumab, um anticorpo inibidor de anti-PD1 em um estudo clínico Fase 1b, de dose escalonada, para avaliar a segurança e eficácia no tratamento de pacientes com diagnóstico de LH recidivado ou refratário. O tratamento foi bem tolerado, com taxa de resposta de 88% com as doses mais elevadas ⁽²⁶⁾.

1.3 Células NK alogênicas

A deficiência no número e na função de NK está associada ao desenvolvimento do câncer ⁽²⁷⁾, visto que as células NK de pacientes com câncer têm função efetora prejudicada ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Os mecanismos envolvidos incluem regulação negativa de receptores ativadores, perda de expressão de CD16, regulação positiva de receptores inibitórios e indução de exaustão pelo microambiente tumoral ⁽³¹⁻³⁴⁾. Por essas razões, muitos pesquisadores exploraram o uso de células NK alogênicas para imunoterapia e mostraram que essas células são seguras e apresentam atividade antitumoral ⁽³⁵⁻³⁷⁾.

As fontes de células NK alogênicas incluem sangue periférico (PB, do inglês *peripheral blood*), medula óssea, células-tronco embrionárias humanas, células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, em inglês) ^(38, 39), cordão umbilical (CB, do inglês *cord blood*) ^(40, 41) ou linhagens celulares NK facilmente disponíveis como NK92 ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Tem-se um especial interesse por células NK provenientes de cordão umbilical por ser uma fonte alogênica prontamente disponível, uma vez que já se tem o produto congelado, de fácil obtenção, sem a necessidade de submeter doadores saudáveis aos riscos com a coleta ⁽⁴³⁾. Além disso, há uma grande quantidade de bancos públicos no mundo (mais de 800 mil unidades estocadas). As células provenientes de CB também oferecem menor risco de DECH, uma vez que apresentam um log a menos de células T em comparação com outras fontes ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾.

As frequências de células NK no CB (aproximadamente 15%-20%) são semelhantes às do PB (em torno de 10%-15%). No entanto, em razão do pequeno volume de sangue em uma unidade de CB, tornou-se difícil obter um número adequado de células NK para o uso clínico. Para superar essa limitação, foram desenvolvidas técnicas de expansão de células NK com células apresentadoras de antígenos artificiais (aAPCs) K562 manufaturadas em Boas Práticas de Fabricação (GMP), expressando ligantes à membrana, como IL-21 e 4-1BB, proporcionando a proliferação e a ativação de células NK de forma confiável e com doses suficientes para a imunoterapia adotiva ⁽⁴⁴⁾. Após a ativação e expansão *ex vivo*, as células NK derivadas de CB exibem o conjunto completo de receptores ativadores e inibitórios, expressam fortemente eomesodermina (Eomes) e o fator de transcrição T-bet, dois fatores necessários para a maturação das células NK, e exercem citotoxicidade semelhante às células de PB ⁽⁴⁸⁾. Há atualmente diversos estudos clínicos em andamento com o uso de células NK alogênicas com essa técnica de expansão,

utilizando células de CB ^(49, 50) ou de PB (PB) ^(51, 52). As células CB-NK expandidas foram utilizadas no estudo Fase I para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo com doença recaída ou em progressão; 10 dos 11 participantes de pesquisa tratados obtiveram pelo menos resposta parcial muito boa como melhor resposta, sendo que 8 obtiveram resposta completa. Após um seguimento médio de 21 meses, evidenciou-se que 4 participantes de pesquisa progrediram ou recidivaram e 2 foram a óbito. O tratamento foi seguro, e nenhum paciente apresentou doença do enxerto contra hospedeiro ou toxicidade relacionada à infusão das células NK, mas as células persistiram por pouco tempo (até 5 dias em 2 desses participantes, 12 dias em 1 deles e 26 dias no outro paciente) ⁽⁴⁹⁾.

1.4 Células NK de memória induzidas por citocinas

A memória imunológica é uma característica fundamental da imunidade adaptativa. Embora as células NK tenham sido consideradas linfócitos inatos de vida curta que respondem rapidamente às células tumorais e são infectadas por vírus sem sensibilização prévia, evidências recentes demonstraram que as células NK podem desenvolver memória de longa duração e antígeno-específica para haptenos e vírus ^(53, 54). Além disso, a estimulação por citocinas pode induzir o desenvolvimento de células NK com propriedades semelhantes à memória, com longevidade e competência funcional, levando ao interesse emergente em aproveitar a memória de células NK para a imunoterapia de câncer.

Vários estudos vêm corroborando a existência de células NK de memória induzidas por citocinas. Em 2009, o grupo do Dr. Yokoyama relatou que as células NK esplênicas murinas previamente ativadas por citocinas demonstraram respostas duradouras e aumentadas quando reexpostas novamente às citocinas. Células NK que foram ativadas com IL-12, IL-15 e IL-18 *in vitro* e, subsequentemente, transferidas para camundongos imunodeficientes demonstraram uma capacidade aumentada de produzir IFN- γ por estimulação com citocinas ou via ativação de receptor em comparação com o pré-tratamento com IL-15 isoladamente, e esta resposta aumentada poderia ser mantida por 12 semanas após a transferência adotiva ^(55, 56). Notavelmente, essa propriedade semelhante à memória mostrou-se intrínseca e foi passada para gerações que não haviam sido expostas às citocinas *in vitro*, sugerindo alterações de transcriptomas ou epigenéticas potenciais nessas células NK. O grupo

de Cerwenka também demonstrou que as células NK pré-ativadas por citocinas mantiveram funções antitumorais aumentadas *in vivo*. A transferência adotiva de células NK esplênicas murinas pré-tratadas com IL-12, IL-15 e IL-18, mas não com células NK pré-tratadas com IL-15 ou IL-2, reduziu efetivamente o crescimento tumoral ⁽⁵⁷⁾.

As respostas semelhantes à memória induzidas por estimulação prévia de citocinas foram também descritas em células NK humanas. Semelhantes às células NK murinas, as células NK humanas que foram pré-ativadas com IL-12, IL-15 e IL-18 também exibiram aumento na produção de IFN- γ após reestimulação com citocinas ou células-alvo em comparação com controle, e essa atividade elevada é mantida após extensa divisão celular ⁽⁵⁸⁾. Consistente com os resultados obtidos a partir de células NK murinas, células NK pré-ativadas por citocinas exibem aumento de expressão de CD25 e respondem a baixas doses de IL-2. Por isso, pré-clínicos vêm utilizando IL2 exógena para estimular a proliferação dessas células ⁽⁵⁹⁾.

Os resultados do uso de células NK com propriedades de memória induzidas por citocinas para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) recidivada ou refratária ⁽³⁵⁾ foram publicados. Nesse estudo clínico, células NK derivadas de doadores haploidênticos foram pré-ativadas com IL-12, IL-15 e IL-18 por 12 a 16 horas, seguidas por lavagem e subsequente infusão em pacientes com LMA tratados com os agentes quimioterápicos fludarabina/ciclofosfamida para linfodepleção. Após uma transferência adotiva, uma dose baixa de IL-2 foi administrada por duas semanas para suportar a expansão das células NK. Observou-se que células NK expandiram *in vivo*, com pico no sangue periférico e medula óssea em 7-14 dias após a infusão. Cinco dos nove pacientes avaliados apresentaram respostas clínicas, incluindo quatro remissões completas. Estes resultados indicam a superioridade das células NK tipo memória, induzidas por citocinas, em aplicações clínicas para a terapia do câncer.

Entretanto, em relação às células NK de memória induzidas por citocinas, muitas questões permanecem sem resposta, principalmente nos mecanismos envolvidos com a resposta das células. Além disso, os estudos que caracterizam a atividade de células NK pré-ativadas por IL-18, IL-15 e IL-12 utilizaram células NK isoladas de sangue periférico (PB) sem expansão *ex vivo*, necessitando de procedimentos complicados e custosos, como a leucaférese, para gerar números

adequados para o uso clínico. Pouco se sabe sobre o efeito da pré-ativação utilizando outras fontes de células NK, como o cordão umbilical.

Assim, teve-se interesse no estudo dos efeitos da estimulação por citocinas com o uso de células NK derivadas de cordão umbilical, com a possibilidade de desenvolver um produto prontamente disponível, “off-the-shelf”, para o tratamento de câncer. Com o objetivo de se desenvolver células com grande resposta antitumoral e também atividade proliferativa, explorou-se uma técnica inédita de produção de células NK associando pré-ativação por citocinas seguida de expansão com o uso de “células feeder”. Avaliamos o efeito da ativação prévia com citocinas no processo de expansão das células NK e os mecanismos envolvidos na maior eficácia antitumoral das células. Além disso, analisamos a combinação de anticorpo bidirecional, conhecido como AFM13, com células CB-NK expandidas com diferenciação semelhante à memória induzida por citocinas, para identificar estratégias promissoras para o tratamento de leucemias e linfomas CD30+.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Desenvolver células NK de cordão umbilical expandidas *ex vivo* com maior atividade antitumoral em relação às técnicas de expansão de células já estabelecidas, com vistas ao seu uso futuro para imunoterapia contra neoplasias hematológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar se células NK de cordão umbilical apresentam as características de memória quando expostas à pré-ativação por combinação de citocinas (rIL-12, rIL-18 e rIL15).
- Desenvolver o método de pré-ativação e expansão de células NK de cordão umbilical (P+E CB-NK) e comparar a taxa de crescimento *ex vivo*, atividade antitumoral e avaliação fenotípica com método de expansão de células NK sem fase de pré-ativação.
- Explorar os mecanismos envolvidos com a funcionalidade das células pré-ativadas e expandidas.
- Explorar o uso das células P+E CB-NK em combinação com drogas que estimulem citotoxicidade dependente de anticorpos (do inglês *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* – ADCC) para o desenvolvimento de novas opções de terapia celular contra neoplasias malignas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais do MD Anderson Cancer Center (Protocolo LAB03-0976) e na Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo (CAAE: 13367419.7.0000.5464). Os experimentos foram efetuados no Departamento de Transplante de Medula Óssea e Terapia Celular, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas.

3.1 Células

As células de CB foram obtidas de indivíduos saudáveis, destinados para pesquisa, provenientes do Banco de Cordão Umbilical do MD Anderson Cancer Center (MDACC). As amostras foram coletadas após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, pela mãe ou responsável, segundo a regulamentação do Comitê de Ética do MDACC.

Células mononucleares de CB a fresco foram isoladas por técnica de gradiente de densidade (Ficoll-Histopaque; Sigma, St Louis, MO, EUA). Células NK foram purificadas com um kit de isolamento de células NK (Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, EUA). Posteriormente, foram estimuladas por uma combinação de citocinas (rhIL-12 10ng/ml, rhIL-15 50ng/ml e rhIL-18 50ng/ml), por 16 horas, lavadas com PBS três vezes e, então, reestimuladas em cultura com célula apresentadora de antígenos artificiais (aAPC) K562, modificadas geneticamente, que expressam em sua superfície IL-21, irradiadas a 100 cG, na proporção de 2 células aAPC para 1 célula NK (2:1 aAPC:NK). A cada 2-3 dias, a cultura foi suplementada com IL-2 100 IU/ml, e, no 7º dia da expansão, as células NK foram reestimuladas com aAPC utilizando a mesma proporção (2:1 aAPC:NK). As células foram expandidas por no máximo 14 dias. Nos grupos de controle, utilizamos o mesmo processo de expansão já estabelecido previamente com aAPC (2:1 aAPC:NK), entretanto sem a fase de pré-estimulação por citocinas; células NK pré-ativadas com a combinação de citocinas e não expandidas, mantidas somente com suplementação de IL-2 100 IU/ml e células NK mantidas somente com IL-2 100 IU/ml (não pré-ativadas ou expandidas). O meio de cultura para células NK foi SCGM (CellGenix GmbH, Freiburg, Alemanha) suplementado com 10%

de soro fetal bovino inativado (SBF, Thermo Fisher Scientific), antibiótico penicilina (100 u/ml) e 2 mM l-glutamina. A Figura 2 descreve esquematicamente as diferentes formas de cultivo entre os grupos utilizados.

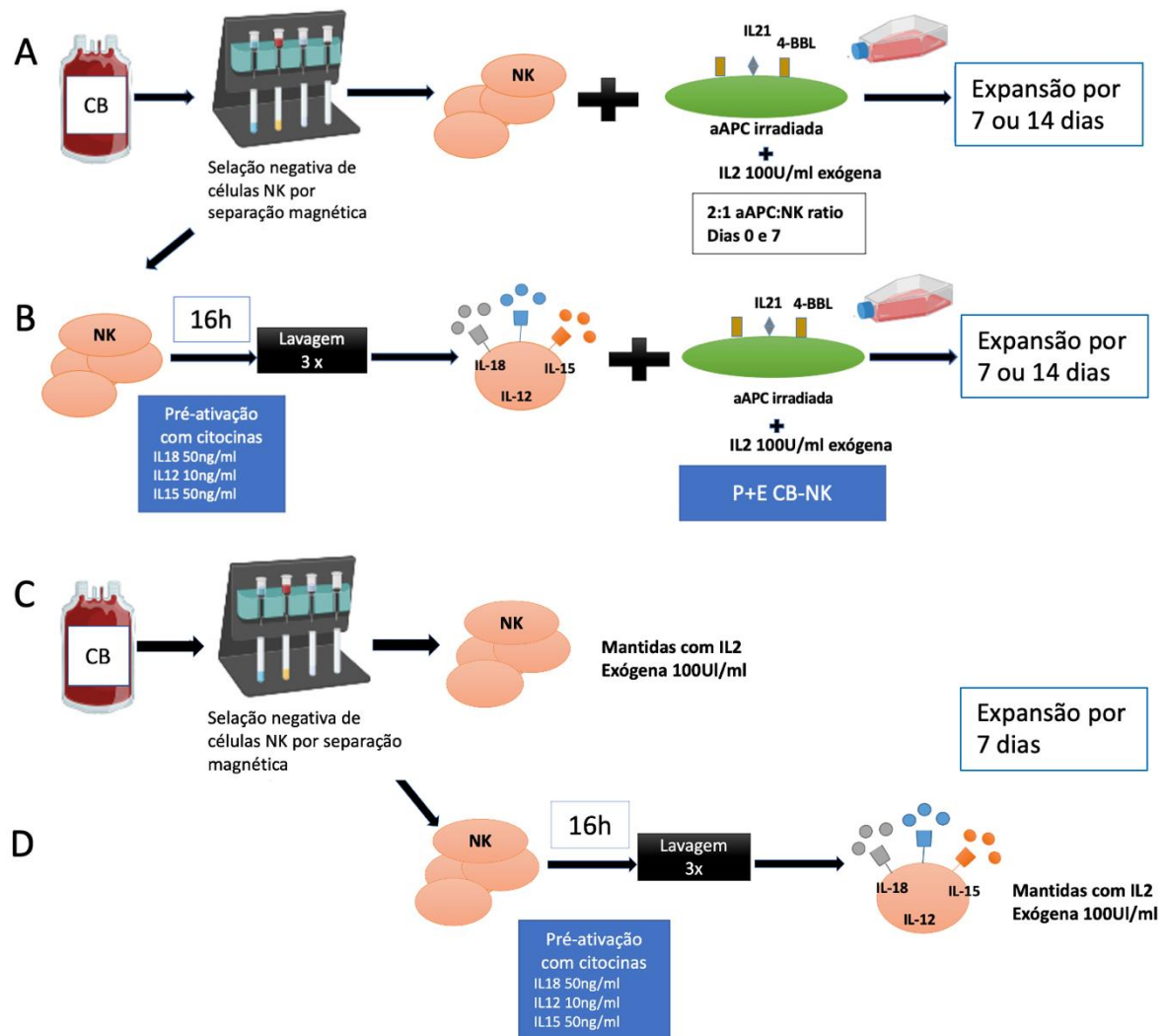


Figura 2 - Esquema com as diferentes formas de cultura de células NK provenientes de cordão umbilical. (A) Esquema representativo mostrando células NK expandidas com célula apresentadora de antígenos artificiais (aAPC) K562 sem a etapa de pré-ativação; (B) células NK pré-ativadas com a combinação de citocinas e após 16 horas, lavadas e expandidas com célula apresentadora de antígenos artificiais (aAPC) K562, cultivo inédito desenvolvido nesse estudo; (C) células NK mantidas somente com IL-2 100 IU/ml (não pré-ativadas ou expandidas); (D) células NK pré-ativadas com a combinação de citocinas e não expandidas, mantidas somente com IL-2 100 IU/ml.

Linhagens celulares humanas de leucemia mieloide aguda (K562, MOLM-14) e de linfoma não Hodgkin (Raji a qual é CD20 positivo, CD30 negativo e Karpas 299, CD30 positivo), de linfoma/leucemia de Burkitt (Daudi, CD30 negativo) e aAPC K562 ("feeder cell") foram utilizadas no projeto. Karpas 299 foi adquirida da empresa Sigma-

Aldrich e as demais linhagens da ATCC. As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-BRL) a 45%, suplementado com 10% FBS, antibiótico penicilina (100 ul/ml) e 2 mM l-glutamina. Os blastos de pacientes com leucemia mieloide aguda e as células de pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin foram adquiridos de pacientes tratados no MD Anderson Cancer Center que autorizaram o uso após a assinatura do termo de consentimento. Os blastos foram cultivados em meio SCGM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SBF, Thermo Fisher Scientific), antibiótico penicilina (100 u/ml) e 2 mM l-glutamina.

3.2 Imunofenotipagem para caracterização de células NK

A imunofenotipagem foi avaliada por citometria de fluxo (Fortessa, BD Biosciences). Os marcadores celulares específicos para células NK expandidas foram especificamente: CD3 (conjugado APC-C7), CD16 (conjugado BV650) e CD56 (conjugado BV605) para a identificação e pureza das células NK; NKp30 (conjugado BV450), NKp44 (conjugado PerCP-Cy5.6) e NKp46 (conjugado AF-700) para a avaliação de receptor de citotoxicidade; 2B4 (conjugado PERCP), DNAM-1 (conjugado BV785), NKG2D (conjugado PE) e NKG2C (conjugado APC) para a avaliação dos receptores de ativação; e NKG2A (conjugado PE-Cy7) e NKp80 (conjugado APC) como receptores inibitórios. Foram avaliados também fatores de transcrição, como T-Bet (conjugado BV711) e Eomes (conjugado APC); marcadores relacionados à exaustão, como PD-1 (conjugado BV420), PDL-1 (conjugado A700) e KLRG-1 (conjugado PE); e outros marcadores, como CD69 (conjugado AF700), CD25 (conjugado BUV379), TRAIL (conjugado PE), CD62L (conjugado FITC), CD94 (conjugado BV421), CD57 (conjugado PE-TX RED) e pan-KIR (conjugado FITC), CD11b (conjugado PE) e CXCR6 (Conjugado APC).

Para a detecção por imunofluorescência de AFM13 na superfície das células NK, após o cultivo com AFM-13, as células CB-NK foram coradas com anti-AFM13 (clone 7, Affimed), lavadas e coradas com anticorpo anti-IgG (H+L) de rato (Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch). As células foram lavadas e coradas com marcadores de superfície CD3 (conjugado APC-C7), CD56 (conjugado BV605) e CD16 (conjugado BV650). As imagens foram obtidas por meio de citometria de fluxo de imagem com a utilização de Amnis Image Stream Mark II e analisadas pelo

software Ideas (Luminex) e também por meio de citometria de fluxo com o instrumento Fortessa (BD Biosciences).

A retenção de AFM13 na superfície das células NK foi determinada pela colocalização dos sinais de CD16 e AFM13. A citometria de fluxo de imagem (Amnis Image Stream Mark II) também foi utilizada para avaliar a formação de sinapses imunológicas entre células CB-NK com AFM13 e Karpas 299 por meio da coloração das células com um anticorpo primário, antipericentrina biotinizado (Novusbio), seguido por APC-Cy7 conjugado com estreptavidina (BioLegend) e AF 488 faloidina conjugada (Thermo Fisher Scientific) para medir a actina F. As imagens foram analisadas com o *software* IDEAS (Miltenyi Biotec).

3.3 Determinação de citocinas intracelulares para avaliar a funcionalidade das células NK

Células NK foram cocultivadas com linhagens celulares neoplásicas mieloides ou linfoides na presença de BFA (Brefeldina A, Sigma UK), e, como controle positivo, utilizamos PMA (*phorbol myristate acetate*) e ionomicina (2 µg/mL, Sigma Aldrich). O anticorpo CD107 foi adicionado às culturas no início da incubação. As células foram lavadas e coradas com marcadores de superfície CD3 (conjugado APC-C7), CD56 (conjugado BV605) e CD16 (conjugado BV650), fixados e permeabilizados (BD, Biosciences, UK) e corados com anticorpos IFN- γ (conjugado BPE), TNF- α (conjugado PE-C7) e CD107a (conjugado PE-CF594). As células foram analisadas em citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, Biosciences). As citocinas IFN- γ , TNF- α e CD107a determinaram o perfil citotóxico potencial das células NK quando incubadas com células-alvo. Para avaliar citotoxicidade tumoral mediada por anticorpo, as células foram analisadas com a mesma técnica, mas com a presença ou a ausência de AFM13 e Karpas 299.

3.4 Citotoxicidade antitumoral

Para avaliar a citotoxicidade, as células CB-NK foram cocultivadas por 4 horas com alvos mieloides (MOLM-14, K562), linfoides Raji e Karpas 299 ou blastos primários com ^{51}Cr em múltiplas relações de células efetoras:células-alvo (do inglês Effector:Target - E:T). A citotoxicidade foi medida pela liberação de ^{51}Cr . Para avaliar a citotoxicidade tumoral mediada por anticorpo, células NK foram cultivadas com Rituximab e Raji (linhagem CD20+, CD30-), por 4 horas, Karpas 299 e AFM13 (anticorpo tetravalente biespecífico anti-CD30 e CD16A). Utilizando "IncuCyte live imaging", as células Karpas 299 foram marcadas com Vybrant® Dye Cycle™ Ruby (Essen BioScience). As células NK e as células Karpas 299 marcadas foram, então, incubadas com ou sem o reagente de detecção Caspase-3/7 Green (Thermo Fisher) a 37°C. O número de células-alvo viáveis foi monitorado por imagens de fluorescência ao longo de 24 horas usando um IncuCyte Live Cell Analysis System (Essen BioScience). O número de células vivas foi quantificado usando o *software* IncuCyte Zoom.

3.5 Sequenciamento de RNA

Foram realizados a extração, o sequenciamento e a análise de RNA. O RNA foi extraído de 5×10^6 células utilizando RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen. Os conjuntos de dados de RNA-seq foram sequenciados no laboratório especializado em manipulação de RNA no MD Anderson Cancer Center. Um bioestatístico especializado colaborou na análise das amostras. As bibliotecas de RNA-seq SmartSeq2 foram preparadas conforme descrito ⁽⁶⁰⁾. Os genes diferencialmente expressos foram identificados usando DEseq2 ⁽⁶¹⁾ e o pacote de biblioteca Bioconductor de análise GSEA (do inglês *gene set enrichment analysis*) com corte de FDR ⁽⁶²⁾ $<0,01$ e fold change $> 1,5$. O fluxo de trabalho ⁽⁶³⁾ do Toil RNA-seq foi usado para converter dados de sequenciamento de RNA em quantificação de expressão em nível de gene e transcrito. FastQC foi usado para controle de qualidade dos dados de sequenciamento. CutAdapt foi usado para remover adaptadores estranhos. As leituras de sequenciamento foram alinhadas ao genoma de referência humano (hg38) usando STAR. Os níveis de expressão gênica foram medidos pela contagem das leituras mapeadas usando RSEM com base em um modelo de gene hg38 GENCODE v25. Os genes expressos diferencialmente

foram realizados usando DEseq2, e os genes expressos diferencialmente foram identificados no valor p ajustado $<0,05$ e mudança absoluta de \log_2 vezes $> 1,5$. A análise GSEA foi realizada usando a biblioteca Bioconductor gage⁽⁶²⁾.

3.6 Citometria de massa

Para a realização de citometria de massa, as células CB-NK foram lavadas duas vezes com tampão de coloração de células (0,5% de albumina de soro bovino/PBS) e incubadas com 5 μ l de solução de bloqueio do receptor Fc humano (Trustain FcX, Biolegend, San Diego, CA) por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram, então, coradas com uma mistura de anticorpos CyTOF preparada contra marcadores de superfície celular, conforme descrito anteriormente⁽⁶⁴⁾. Os anticorpos utilizados são descritos na Tabela 1. As amostras foram adquiridas a 300 eventos/segundo em um instrumento Helios (Fluidigm) usando o *software* de aquisição Helios 6.5.358 (Fluidigm). Os dados de citometria de massa foram coletados em um citômetro de massa CyTOF2 (Fluidigm) e analisados usando Cytobank, conforme descrito anteriormente^(35, 65-67).

Tabela 1 – Lista de anticorpos utilizados na citometria de massa para a caracterização de células CB-NK

Nome	Anticorpos	Clone	Fonte
141Pr	KIR2DL1/S5	HP-MA4	Biologend
143Nd	KIR2DL2/L3	DX27	Biologend
146Nd	DAP12	406288	R&D
154Sm	TIGIT	MBSA43	Thermo Fisher
160Gd	KIR3DL2	539304	R&D
161Dy	T-bet	4B10	Biologend
162Dy	NKp46	BAB281	Fluidigm
163Dy	NKp44	P44-8	Biologend
166Er	NKG2D	1D11	R&D
168Er	Ki67	Ki-67	Biologend
171Yb	DNAM	DX11	BD Bioscience
173Yb	Granzima B	GB11	BD Bioscience
142Nd	EOMES	WD1928	Thermo Fisher
145Nd	CD62L	DREG-56	Biologend
149Sm	CD25	2A3	Miltenyi
150Nd	CD69	FN50	Biologend
155Gd	CD27	L128	BD Bioscience
156Gd	KLRG1	13F12F2	Thermo Fisher
158Gd	CD94	DX22	Biologend
159Tb	NKp30	Z5	Fluidigm
164Dy	CCR7	G043H7	Biologend
167Er	2B4	C1.7	Thermo Fisher
169Tm	NKG2A	Z199	Fluidigm
172Yb	Perforina	dG9	Biologend
174Yb	Granzima A	CB9	Biologend
209Bi	CD16	3G8	Fluidigm
194Pt	CD3	UCHT-1	Biologend
165Ho	TIM3	344823	R&D
148Nd	TRAIL	RIK-2	BD Bioscience
147Sm	NKG2C	134591	R&D
175Lu	KIR3DL1	DX9	BD Bioscience
176Yb	CD56	NCAM16.2	BD Bioscience
89Y	CD45	HI30	BD Bioscience
115In	CD57	HCD57	Biologend
152Sm	CD3z	6B10.2	Biologend
198Pt	Cisplatina		Fluidigm

3.7 Modelo animal

Os estudos animais foram realizados no Biotério do MD Anderson Cancer Center após aprovação ética. Para avaliar o efeito antitumoral *in vivo* de células NK associadas ao AFM13, foi utilizado um modelo xenogênico em camundongos NOD/SCID IL-2R γ null (NSG). Essa linhagem de camundongos foi escolhida porque permite a enxertia e o crescimento da maior parte dos tumores humanos hematológicos e das células do sistema imune humano, como demonstrado previamente (68). Além disso, o uso desse modelo animal possibilita a preservação das características dos tumores primários e das células humanas utilizadas para o tratamento. Após o período de quarentena, camundongos fêmeas NSG (10-12 semanas de idade; Jackson Laboratories, ME) foram irradiados com 300 cGy e receberam via intravenosa (iv) com células Karpas 299 marcadas com FFLuc (1×10^5) no dia 0. Os grupos de tratamento receberam 10×10^6 células P+E CB-NK ou P+E CB-NK células com AFM13 ou 100 μ g/ml de AFM13 somente por meio da injeção na veia caudal no dia 0. Os grupos com células NK receberam injeção de IL-2 humana intraperitoneal (ip) três vezes por semana (10 mil unidades/camundongo) e foram submetidos às imagens semanais de bioluminescência (BLI; Xenogen-IVIS 200 Imaging system; Caliper, Waltham, MA). Para a avaliação de toxicidade, os camundongos NSG (10-12 semanas de idade, mediana de peso de 20g; Jackson Laboratories, ME) foram irradiados com 300 cGy e receberam via intravenosa (iv) de células P+E CB-NK células com AFM13. Os camundongos foram acompanhados por mais de 1 ano, quando foram, então, sacrificados, e os órgãos pulmão, baço, rim, intestino delgado, pele e medula óssea foram avaliados por um patologista veterinário.

Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 22°C +/- 3°C e umidade relativa de 30 a 70% (registrada diariamente). O fotoperíodo foi de 12 horas de luz, 12 horas de escuro, com iluminação artificial das 7h às 19h. A alimentação foi *ad libitum* com ração comercial peletizada irradiada para roedores, água filtrada e esterilizada com adição de Bactrim, uma vez que utilizamos animais imunossuprimidos. Os camundongos foram acondicionados em caixas micro isoladores de polipropileno (32 x 20 x 21 cm) agrupadas em racks ventiladas com trocas de ar (45 trocas/hora) e mantidos em número de cinco animais por caixa (cinco animais do mesmo grupo, uma caixa por grupo). As caixas foram devidamente identificadas por etiqueta de papel contendo os seguintes dados: espécie animal,

linhagem, idade, origem, pesquisador responsável e contato, além de espaço reservado para anotações de eventuais ocorrências.

Os animais foram avaliados pelo menos duas vezes ao dia e pesados pelo menos 2 vezes por semana. Os sinais clínicos registrados foram: alterações na pele e no pelo; alterações da atitude, postura e reação à manipulação, bem como estereotípias (por exemplo, lambedura excessiva, movimentação repetitiva) ou comportamentos anormais (por exemplo, automutilação). A avaliação de condição corpórea foi realizada utilizando o escore padronizado na Tabela 2.

Tabela 2 – Avaliação da condição corpórea dos camundongos

Score	Descrição
1	Estrutura esquelética extremamente proeminente: pouca ou nenhuma carne, vértebras distintamente segmentadas.
2	O camundongo está subcondicionado: segmentação da coluna vertebral evidente, os ossos pélvicos dorsais são prontamente palpáveis.
3	O animal está bem condicionado: vértebras e pelve dorsal não estão proeminentes, palpáveis com leve pressão.
4	O animal está sobrecondicionado: a espinha é uma coluna contínua, vértebra palpável ou com pressão firme.
5	O animal é obeso: o corpo do animal é suave e volumoso, a estrutura do osso desaparece sob a gordura subcutânea.

Os animais foram submetidos à eutanásia se apresentassem sinais de desconforto ou preenchessem critérios pré-determinados pelo AAALAC.

3.8 Análise estatística

O teste t de Student foi usado para comparar variáveis quantitativas. Two-way ANOVA foi usado para a comparação entre amostras e pontos de tempo longitudinais (Bonferroni ou Sidak). As probabilidades de sobrevivência foram calculadas usando o método de Kaplan Meier. A significância estatística foi avaliada com o *software* Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica de células NK de cordão umbilical ativadas com combinação de citocinas

Com o objetivo de investigar se células CB-NK apresentam características fenotípicas semelhantes às células NK de sangue periférico consideradas de memória quando expostas à pré-ativação com citocinas, as CB-NK foram isoladas, purificadas e ativadas por 16 horas com a combinação de citocinas (IL-12 10 ug/ml, IL-15 50 ug/ml e IL-18 50 ug/ml). Após lavagem com PBS três vezes, foram avaliadas em relação à expressão fenotípica. Como controle, utilizaram-se células CB-NK não estimuladas, mantidas somente em meio de cultura SCGM. As células pré-ativadas expressaram aumento de receptores ativatórios e relacionados com citotoxicidade, como CD69, granzima B, perforina e aumento da expressão de CD94, CD25, semelhantes às células PB-NK com memória relacionada à citocina, conforme descrito previamente (Figura 3) ⁽³⁵⁾.

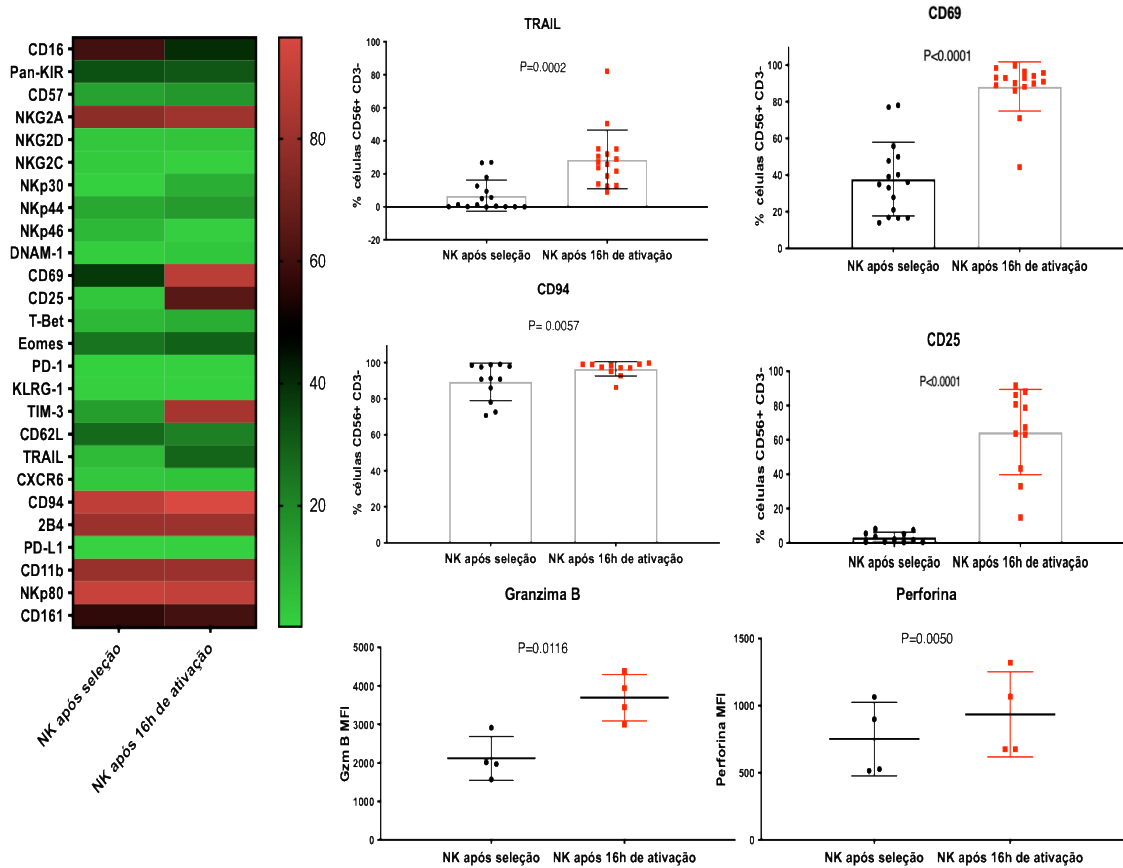
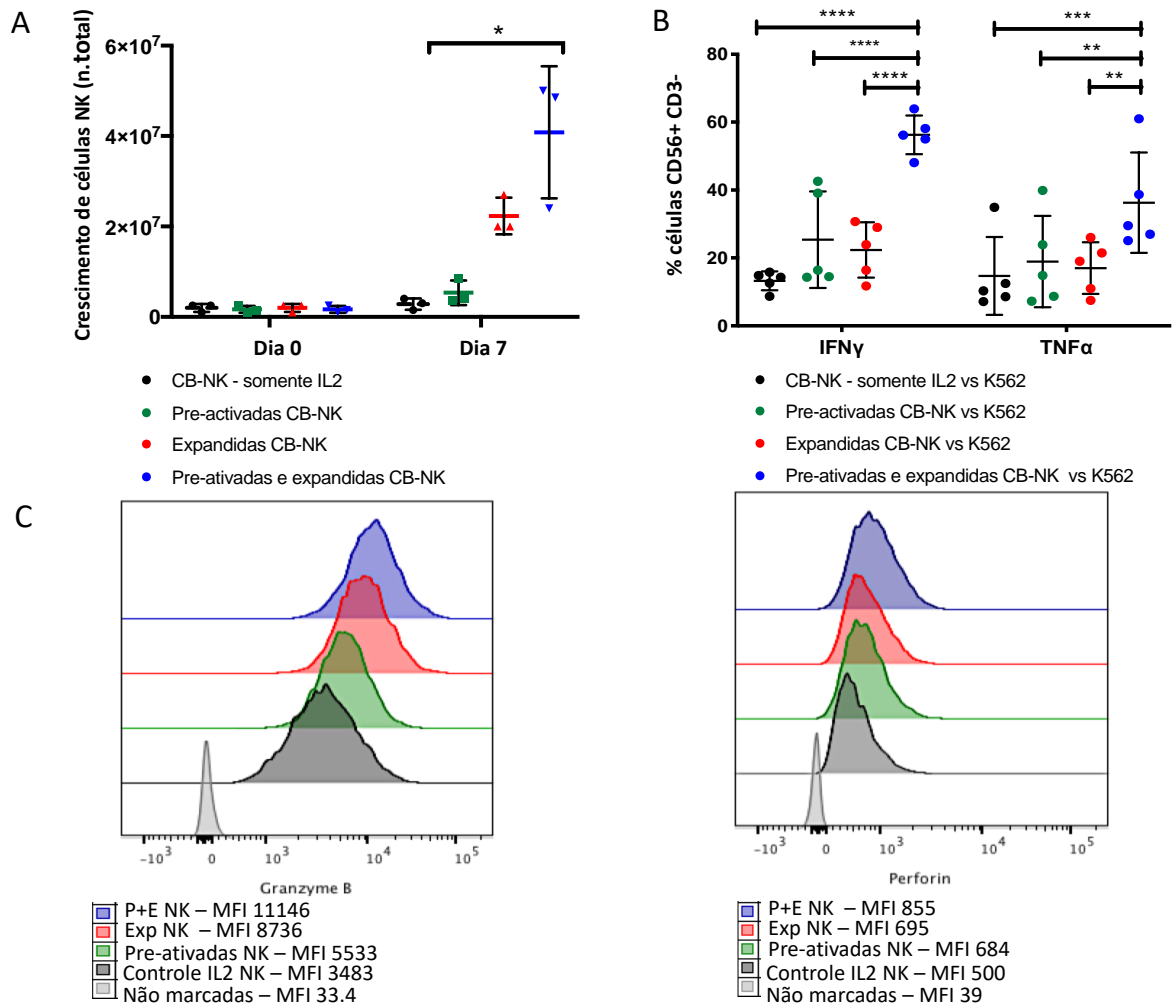


Figura 3 - Diferente expressão fenotípica de células NK provenientes de cordão umbilical após pré-ativação com IL-12, IL-18 e IL15. As diferenças na expressão de receptores em células NK pré-ativadas e não ativadas estão representadas no Heatmap. A escala de cor indica intensidade de expressão em %, expressão mais baixa (verde) para alta expressão (vermelho). As barras nos gráficos representam as médias em desvio-padrão

4.2 Atividade proliferativa e antitumoral de células pré-ativadas e expandidas

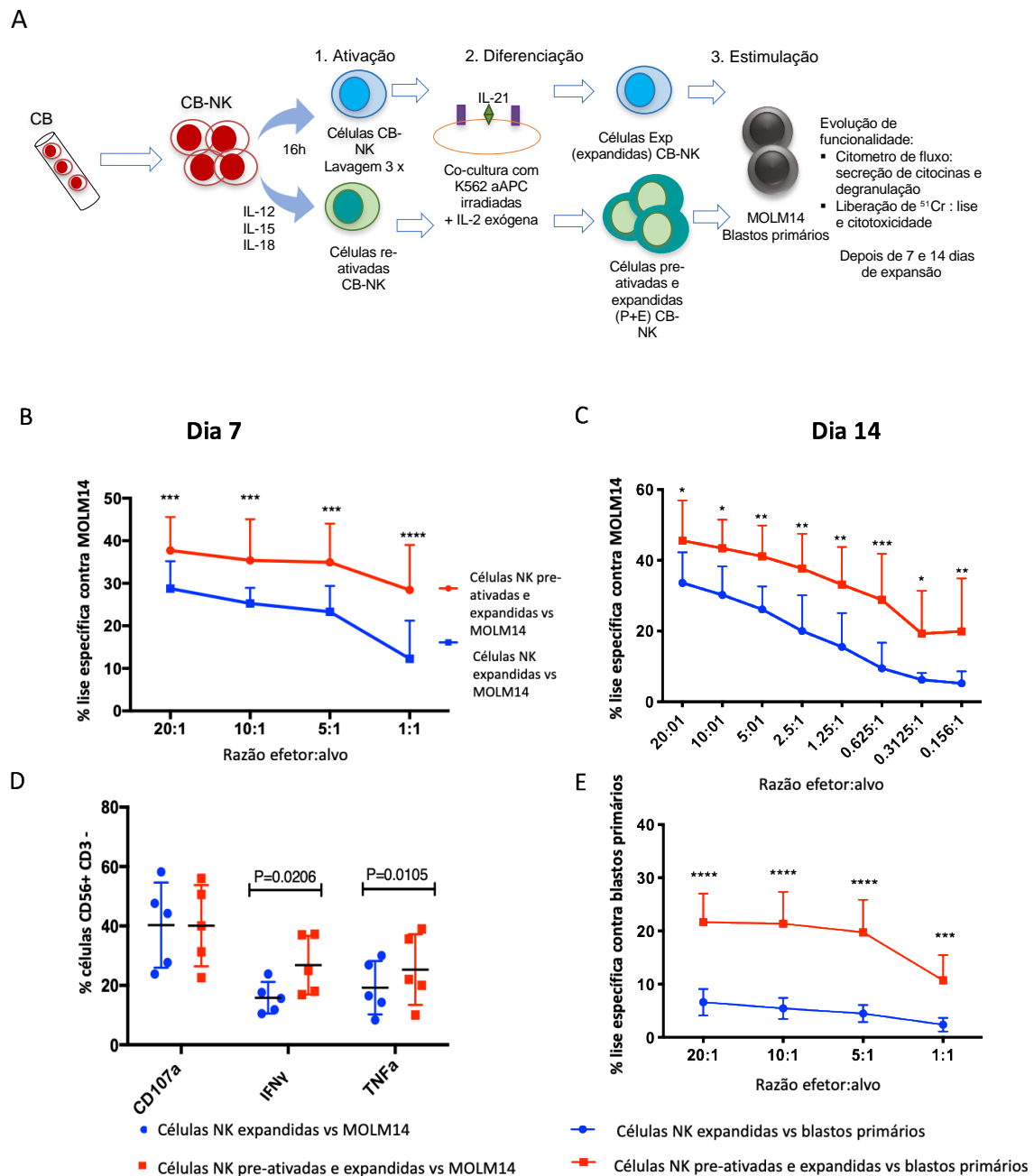
Com o objetivo de desenvolvimento de células com maior resposta antitumoral e atividade proliferativa, com número adequado para infusão em pacientes, foi desenvolvida uma nova técnica de produção de células NK com a fase de pré-ativação por citocinas seguida da expansão com o uso de aAPC. As células provenientes de cordão umbilical foram, então, chamadas de células NK pré-ativadas e expandidas (P+E CB-NK). Utilizamos, primeiramente como grupos de controle, células NK expandidas com o mesmo processo, mas sem a fase de pré-estimulação por citocinas (conhecidas como expandidas ou Exp CB-NK), células NK mantidas somente com IL-2 (não pré-ativadas ou expandidas) e células NK pré-ativadas com a mesma combinação de citocinas e mantidas somente com IL2 exógena (não expandidas) (Figura 4A). Células CB-NK pré-ativadas e expandidas demonstraram maior capacidade de expansão do que células NK somente expandidas ou somente pré-ativadas sem a fase de expansão com aAPC. Além disso, as células P+E CB-NK produziram maior quantidade de CD107a, IFN- γ , TNF- α , granzima B e perforina em comparação com os grupos de controle (Figura 4B,C) quando cocultivadas com a linhagem tumoral K562.



(* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$; barras representam as médias em desvio-padrão, 2way-Anova)

Figura 4 – Células pré-ativadas e expandidas apresentam maior capacidade proliferativa e produção de citocinas contra linhagem tumoral K562. (A) Expansão de células foi avaliada após 7 dias de cultivo. (B) Produção IFN- γ e TNF- α e (C) granzima B e perforina após cultivo com K562 E:T 1:1 por 5 horas

Para melhor avaliação de citotoxicidade, P+E CB-NK e as expandidas sem pré-ativação (Exp CB-NK) após 7 ou 14 dias em cultura, foram cocultivadas por 4 horas com outro alvo mieloide – MOLM-14 e blastos provenientes de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de leucemia mieloide aguda, conforme o esquema apresentado (Figura 5A). As células P+E CB-NK apresentaram maior atividade de citotoxicidade e produção de citocinas comparando somente as células expandidas pela técnica convencional (Figura 5B-E). Ou seja, a pré-ativação com a combinação de citocinas por 16 horas, 14 dias antes do início da expansão, foi responsável por manter o aumento da atividade antitumoral em comparação com controles, e esta performance foi mantida após extensa divisão celular, com comportamento semelhante ao apresentado por células NK de memória induzidas por citocinas provenientes de sangue periférico ^(35, 55, 58).



(*p<0.05, ** p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, **** p ≤ 0.0001; barras representam as médias em desvio-padrão) (N, número de cordões utilizados)

Figura 5 – Células pré-ativadas e expandidas apresentam maior atividade antitumoral contra linhagem tumoral e blastos primários de leucemia mieloide aguda. (A) Esquema representativo mostrando a geração das P+E CB-NK ou expandidas CB-NK. (B) Citotoxicidade (% liberação de ^{51}Cr) de células pré-ativadas e expandidas vs expandidas 7 dias após expansão (N=5, 2way-ANOVA) ou (C) 14 dias contra MOLM14 em diferentes proporções (N=3, 2way-ANOVA). (D) Produção de CD107a, IFN- γ e TNF- α após cultivo com MOLM14 E:T 1:1 por 5 horas, 14 dias após expansão (teste t Student entre variáveis para cada citocina). (E) Citotoxicidade de células pré-ativadas e expandidas vs expandidas contra blastos primários de pacientes com diagnóstico de leucemia mielóide aguda após 14 dias de expansão (n=4, 2way-ANOVA).

4.3 A pré-ativação de IL-12/15/18 das células CB-NK aumenta sua função efetora por meio da regulação de múltiplas vias inflamatórias

Uma vez que a pré-ativação de IL-12/15/18 não havia sido relatada anteriormente associada à expansão de células CB-NK, a seguir, avaliamos os potenciais mecanismos responsáveis pelo aumento de funcionalidade. A análise de citometria de fluxo evidenciou que as células P+E CB-NK mantiveram alterações fenotípicas relacionadas à ativação de células NK, semelhantes às observadas imediatamente após o contato com a combinação de citocinas antes da expansão, com aumento da expressão de CD69, TRAIL, granzima B e perforina (Figura 6).

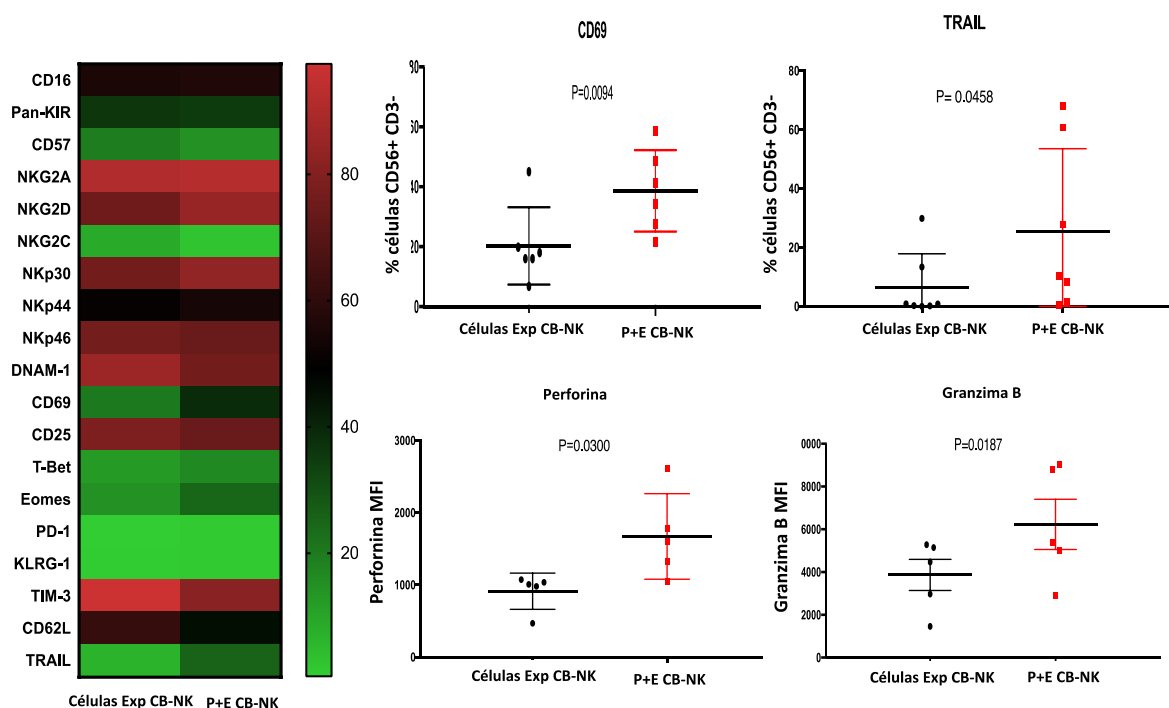


Figura 6 – Diferença na expressão fenotípica de células P+E CB-NK vs células expandidas 14 dias após expansão. As diferenças na expressão de receptores em células P+E CB-NK comparando com Exp-CB-NK estão representadas no Heatmap. A escala de cor indica intensidade de expressão em %, expressão mais baixa (verde) para alta expressão (vermelho). As barras nos gráficos representam as médias em desvio-padrão (N=6-7, número de cordões utilizados)

O sequenciamento de RNA de células CB-NK purificadas foi realizado comparando-se os perfis de transcriptoma de células P+E CB-NK *versus* células CB-NK expandidas após 14 dias de cultura (Figura 7A). As células P+E CB-NK apresentaram maior expressão de quimiocinas e genes de citocinas, como, CCL3, CCL4, CCR5 e TNF (Figura 7B,C). A análise de enriquecimento de conjunto de genes (do inglês *gene set enrichment analysis*, GSEA) confirmou o aumento da expressão de genes envolvidos na sinalização de resposta associada ao IFN- γ , sinalização de TNF, sinalização de IL-2/STAT5, sinalização de IL-6/JAK/STAT3 e via mTOR, bem como genes relacionados às respostas imunes inflamatórias (Figura 7 D,E). Em conjunto, esses dados sugerem que a pré-ativação de células CB-NK com IL-12, IL-15 e IL-18 antes da expansão resulta em vias de sinalização aumentadas que estão relacionadas à função efetora das células NK, mesmo 14 dias após expansão.

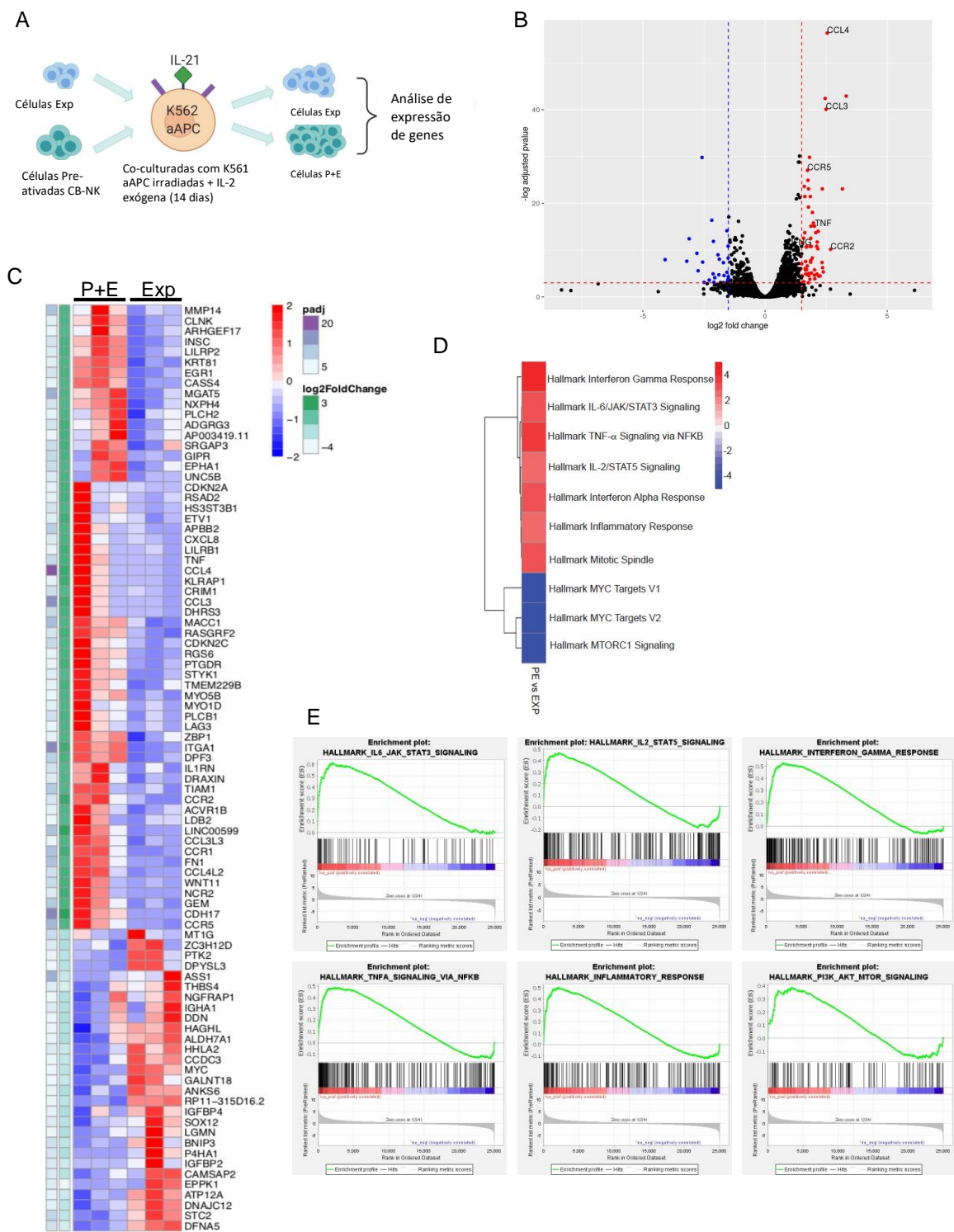
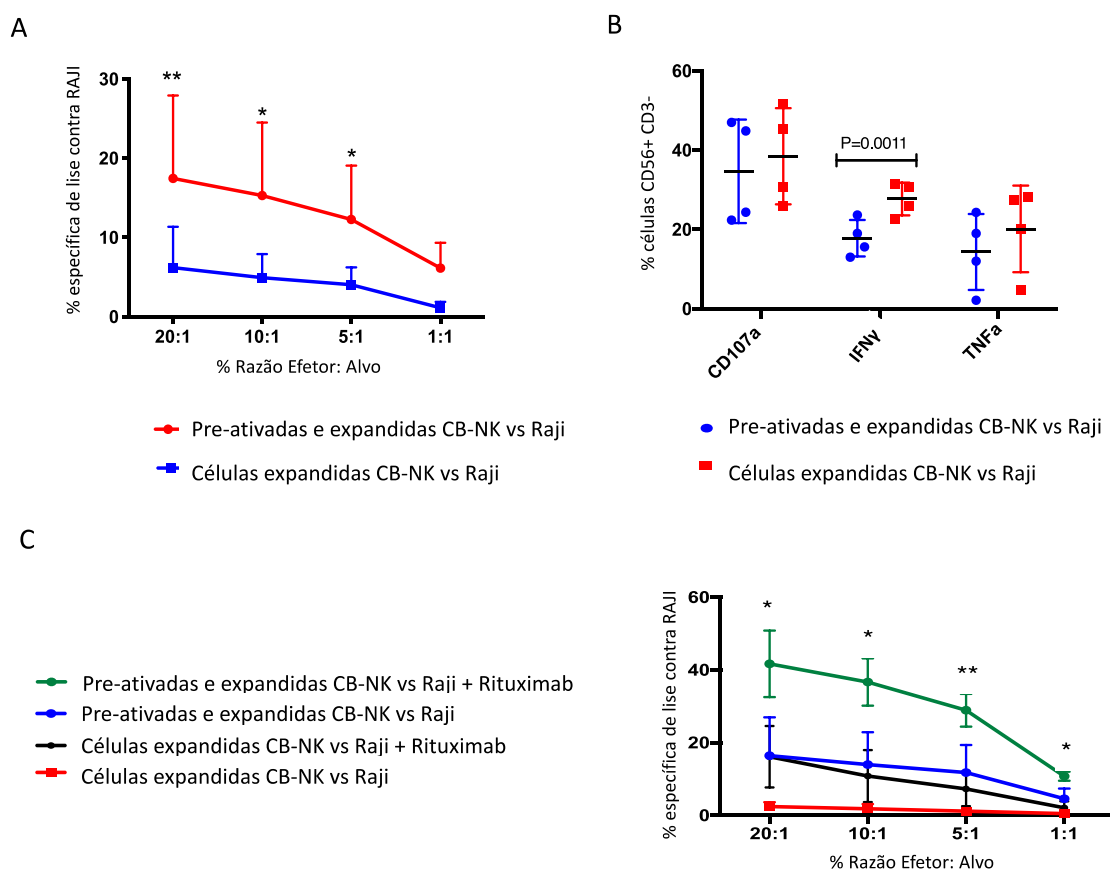


Figura 7 – Expressão diferencial de genes em células P+E CB-NK. (A) Esquema experimental descrevendo a estratégia para análise de expressão de genes nas células P+E CB-NK. (B) Volcano plot demonstrando significativo aumento na diferenciação de genes (pontos vermelhos representam genes com maior expressão; pontos azuis representam genes com menor expressão) em células P+E CB-NK, comparando com expandidas CB-NK. (C) Heatmap da diferença da expressão de genes em células P+E CB-NK comparando com Exp CB-NK (Diferenças foram identificadas em p -value < 0.05 ajustado e absoluto fold-change > 1.5 , $-\log_{10}$ ajustado p -value em anotação padj). (D) A análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) da diferente expressão de genes

entre células P+E CB-NK vs células expandidas CB-NK está representada no Heatmap. A escala de cor indica intensidade de sinal, expressão mais baixa (azul) para alta expressão (vermelho) (no Hallmark). (E) GSEA demonstrando genes expressos relacionados na resposta IFN- γ , sinalização TNF, sinalização IL-2/STAT5, sinalização IL-6/JAK/STAT3 e sinalização PI3K/AKT/MTOR nas células P+E CB-NK comparando com células exp NK; n=3 (número de cordões utilizados)

4.4 P+E CB-NK desempenham melhor citotoxicidade mediada por anticorpo

As células P+E CB-NK demonstraram maior atividade antitumoral não somente contra neoplasias mieloides, mas também contra linhagens linfoides (Raji) (Figura 8A,B). Assim, questionamos se as células P+E CB-NK poderiam exercer melhor desempenho em relação à citotoxicidade mediada por anticorpo do que as células somente expandidas. Para isso, as células NK foram cultivadas com Rituximab e a linhagem celular Raji (CD20 positivo) por 4 horas. Confirmamos que as células P+E apresentaram maior atividade antitumoral contra Raji quando expostas ao Rituximab (Figura 8C).



(* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$; barras representam as médias em desvio-padrão) (N, número de cordões utilizados)

Figura 8 – Células pré-ativadas e expandidas apresentam maior atividade antitumoral contra linhagem tumoral de neoplasia linfóide e maior citotoxicidade mediada por anticorpo. (A) Citotoxicidade (% liberação de ^{51}Cr) de células pré-ativadas e expandidas vs células expandidas (N=4, 2way-ANOVA) contra Raji em diferentes proporções (N=4, 2way-ANOVA). (B) Produção de CD107a, IFN- γ e TNF- α após cultivo com Raji E:T 1:1 por 5 horas (teste t Student entre variáveis para cada citocina). (C) Citotoxicidade mediada por anticorpo de células NK na presença ou na ausência de Rituximab contra Raji (N=3, 2way-ANOVA)

Muitos estudos demonstraram que células NK de pacientes com câncer são disfuncionais ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Foi confirmado que células NK de pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin também são disfuncionais (Figura 9).

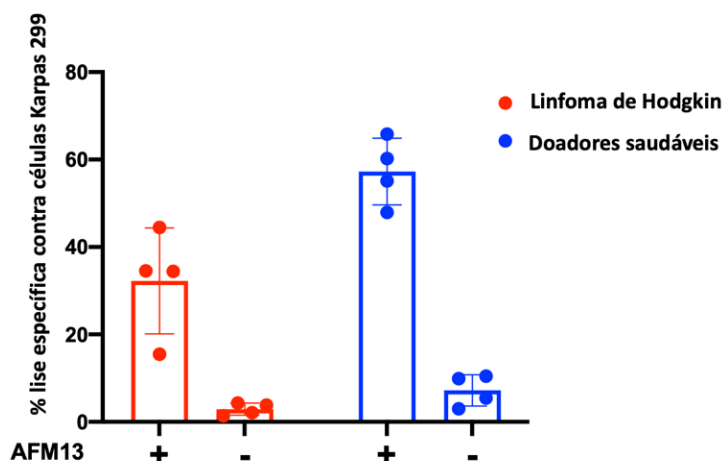
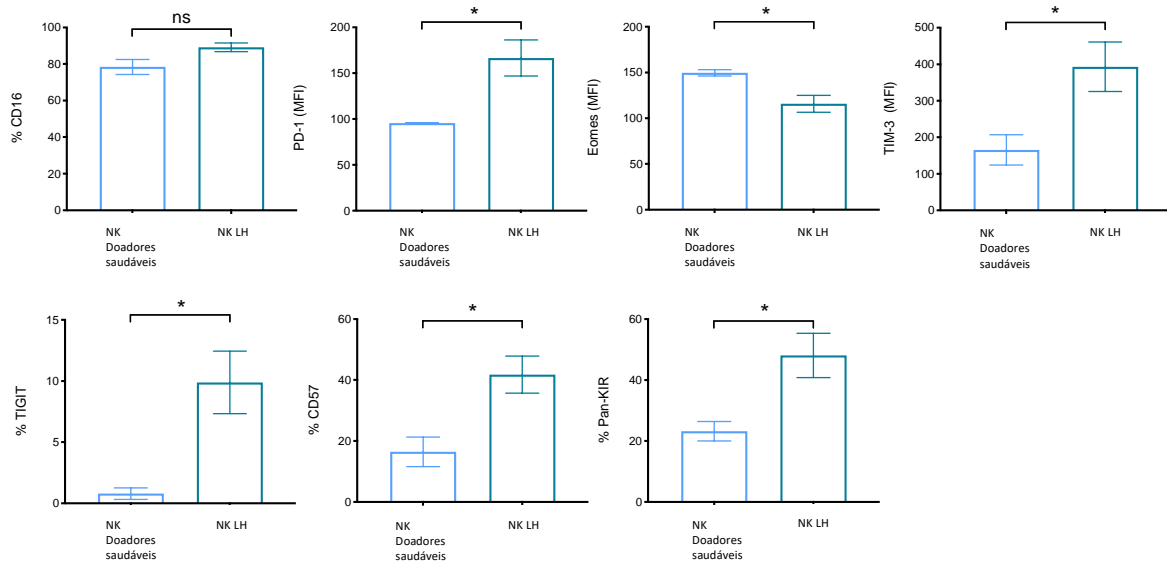


Figura 9 – Células NK provenientes de pacientes com diagnóstico de infoma não Hodgkin apresenta menor atividade anti-tumoral em comparação a pacientes saudáveis. As células NK de sangue periférico de pacientes com Linfoma não Hodgkin e de doadores saudáveis (n = 4) foram cultivadas com células da linhagem tumoral Karpas 299 na presença de AFM13 de AFM13 100 µg/ml por 4 horas para avaliar a (% liberação de ⁵¹Cr).

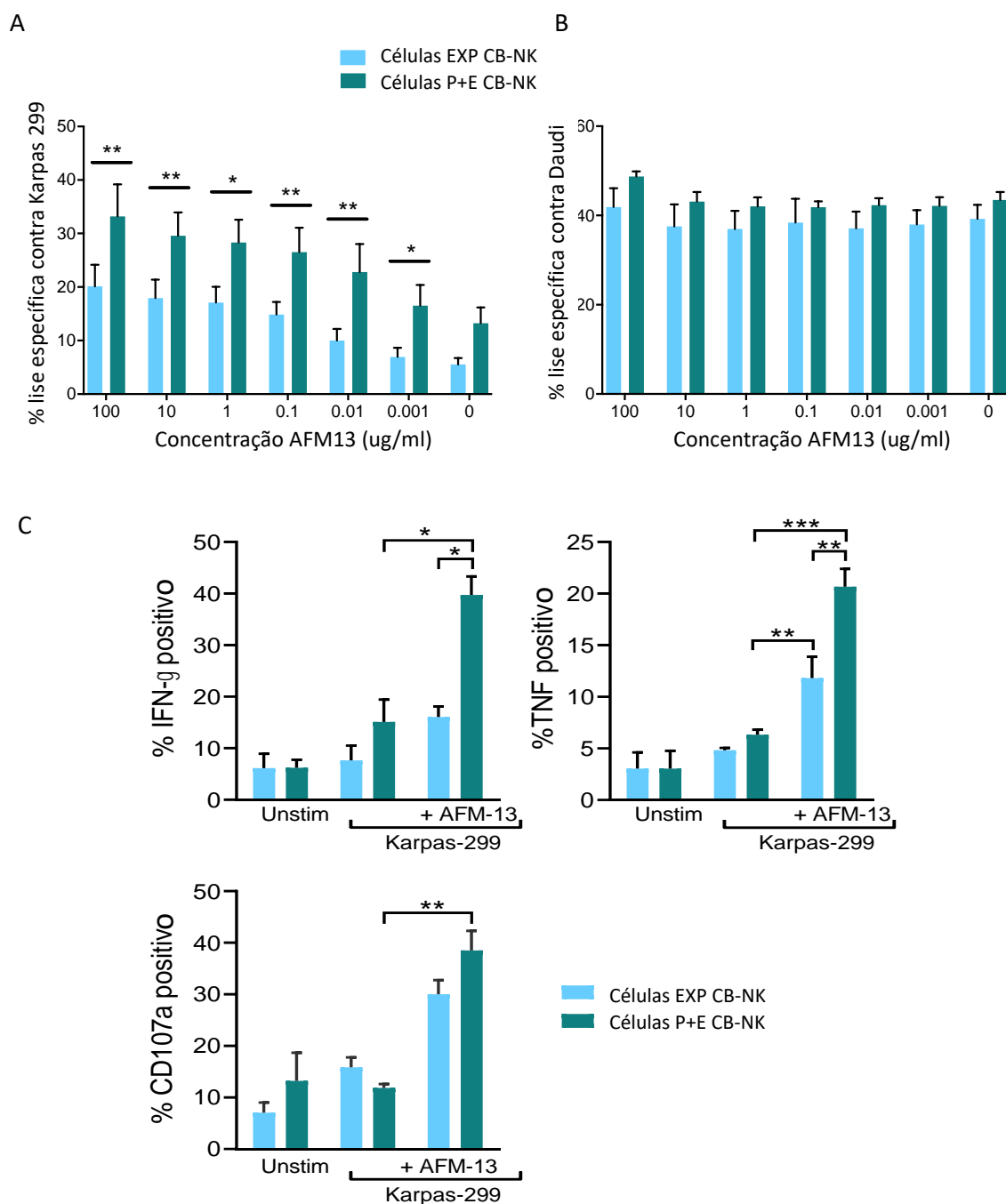
Também se evidenciou que as células NK de pacientes com linfoma de Hodgkin não apresentam redução da expressão de CD16, mas apresentam aumento da expressão de receptores inibitórios, como PD-1, TIM 3, TIGIT e Pan-KIR, e baixa expressão de Eomes, demonstrando características de exaustão, em comparação com células de sangue periférico provenientes de doadores saudáveis (Figura 10).



As barras representam a média + SEM, teste t; * $p < 0,05$; ns não significativo

Figura 10 – O fenótipo de células NK de pacientes com linfoma de Hodgkin (LH) em comparação com doadores saudáveis. As células NK de PB de LH ($n = 4$) de doadores saudáveis ($n = 3$) foram marcadas para avaliar a expressão de marcadores inibitórios. As células NK LH expressam níveis mais elevados de receptores inibitórios comparadas às células PB-NK

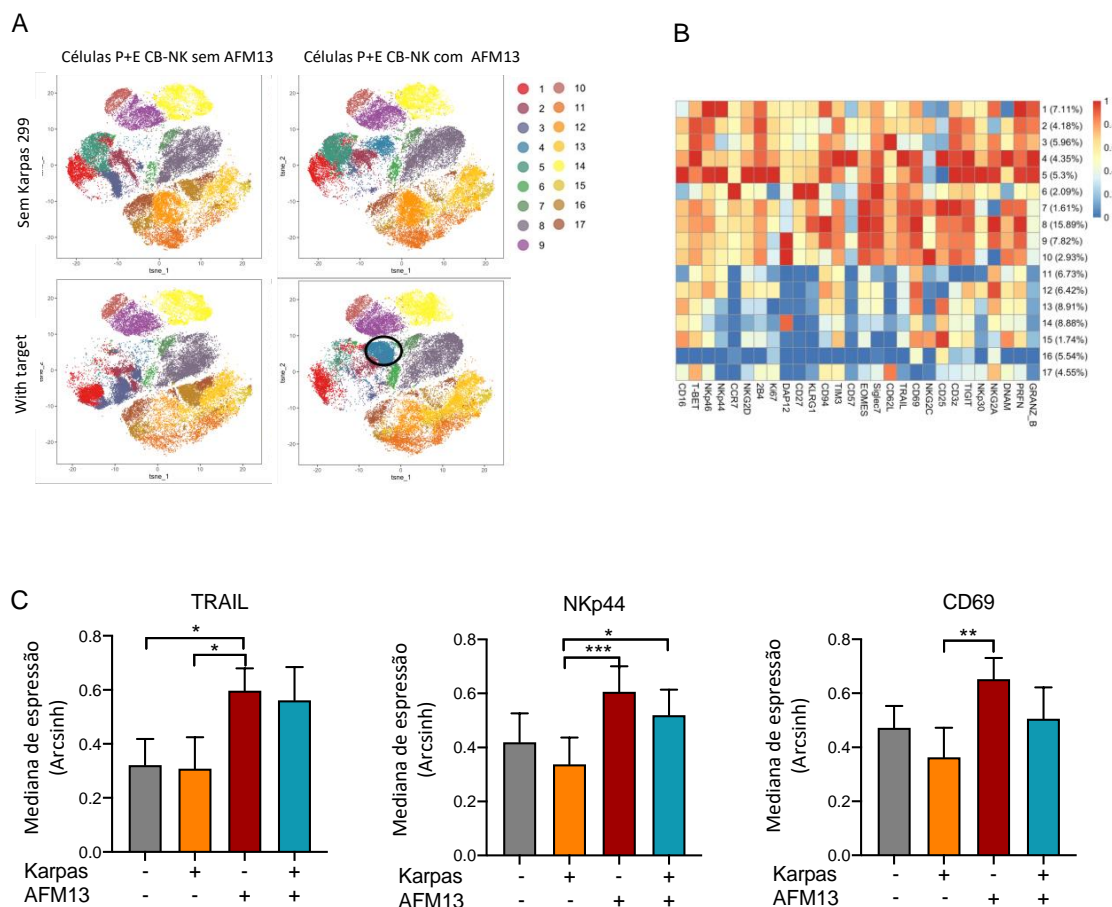
Assim, pensamos na possibilidade do uso de células NK alogênicas provenientes de cordão umbilical. Exploramos a funcionalidade das células P+E CB-NK com outro anticorpo bidirecional contra CD16 e CD30, conhecido como AFM13, utilizando a linhagem tumoral de linfoma conhecida como Karpas 299, a qual expressa CD30. Em todas as concentrações de AFM13 testadas, as células P+E exibiram maior atividade antitumoral em relação às células CB-NK expandidas, independentemente da concentração de AFM13 utilizada (Figura 11A). A adição de AFM13 não aumentou a citotoxicidade das células P+E CB-NK contra alvo CD30-(Daudi) (Figura 11B). Estes dados indicam que a ativação com IL-12/15/18 seguida por diferenciação semelhante à memória de células CB-NK intensificou a morte desencadeada por AFM13. Além disso, P+E CB-NK com AFM13 também produziram IFN- γ , TNF e CD107a de forma mais eficaz contra alvos CD30+ do que células Exp CB-NK (Figura 11C).



Representação de barras média + SEM. Two-way ANOVA com (A, B) e teste t Student entre variáveis para cada citocina (C); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; n=6-10 cordões umbilicais

Figura 11 – AFM13 aumenta citotoxicidade e secreção de citocinas de células P+E CB NK. (A) Células P+E CB-NK demonstraram aumento de citotoxicidade contra Karpas 299 comparando com somente expandidas (Exp) CB-NK na presença de diferentes concentrações de AFM13, E:T ratio 5:1. (B) Células P+E CB-NK não apresentaram aumento contra Daudi (linhagem CD30-, utilizada como controle) na presença de diferentes concentrações de AFM13. E:T ratio 5:1. (C) Produção de citocinas (IFN-γ e TNF) e degranulação CD107a por P+E CB-NK e Exp-NK na presença de AFM13 100 µg/ml com células Karpas 299 por 6 horas, razão E:T de 1:1.

Além disso, as células P+E CB NK foram cocultivadas com AFM13 e alvos tumorais por 4 horas e, em seguida, analisadas usando CyTOF. Observou-se que as células com AFM13 apresentaram evidência de marcadores de ativação associados à maturidade e função de células NK (expressão aumentada de TRAIL, NKp44 e CD69) (Figura 12). Estes dados confirmam a hipótese de que, por meio da ligação ao receptor CD16, o AFM13 pode ativar ainda mais as células P+E CB-NK.

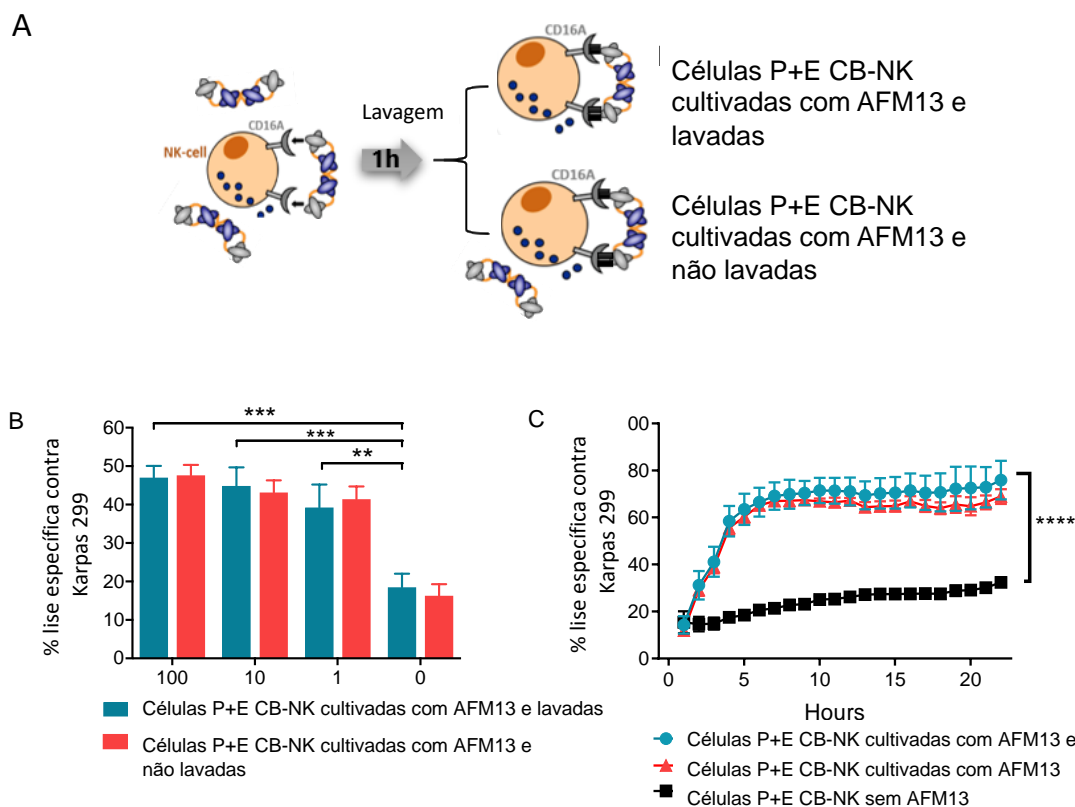


As barras representam médias + SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, One-way ANOVA; $n = 7$ cordões

Figura 12 – Fenótipo de células P+E CB-NK com AFM13. Células CB-NK foram estimuladas, ou não, com Karpas 299 por 4 horas com ou sem AFM13 (100 $\mu\text{g/ml}$) antes da marcação para CyTOF. (A) viSNE plots mostram 17 clusters de células NK somente (à esquerda), células NK com AFM13 (à direita) sem tumor (acima) ou com Karpas 299 (abaixo). Dezesete clusters foram identificados por R package Rphenograph e demonstrados em diferentes cores. (B) Heatmap de citometria de massa demonstra a expressão de receptores e fatores individuais de células NK, incluindo fatores de transcrição e relacionados à citotoxicidade. Os valores representam expressão com a normalização [0, 1] para cada marcação. Cada linha representa o cluster separado, e cada coluna representa a expressão de certo marcador. Escala de cores demonstram o nível de expressão de cada marcador, com vermelho representando alta expressão e azul, baixa expressão para células NK. (C) Os dados resumidos mostram a expressão mediana de marcadores relacionados à função ativatória TRAIL, NKp44, e CD69, com valores normalizados

4.5 As células P+E CB-NK com AFM13 retêm sua citotoxicidade contra o linfoma de Karpas 299 após a lavagem

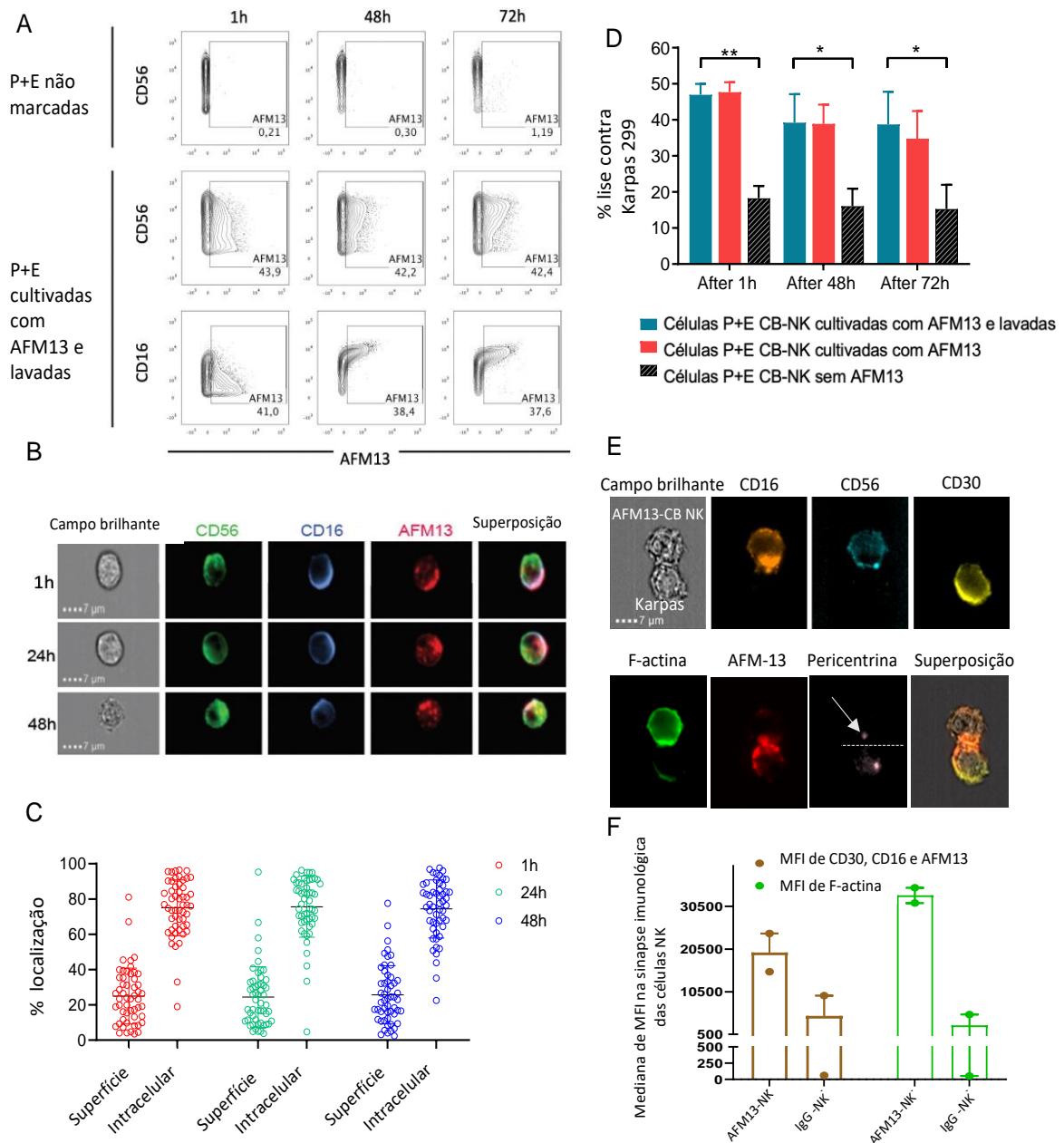
Ao combinar AFM13 com a terapia de células NK alogênicas, uma abordagem para maximizar o desempenho das células NK seria a associação das células efetoras com AFM13 antes da infusão, semelhante ao efeito exercido das células T ou NK quando expressam receptor antigênico quimérico contra um determinado receptor tumor (CAR, do inglês *Chimeric Antigen Receptor*, CAR-T ou CAR-NK). Investigamos, então, a viabilidade e a atividade de células AFM13-NK ao analisar a estabilidade da ligação de AFM13 em células P+E CB-NK ao longo do tempo. Para essa avaliação, as células NK foram incubadas com diferentes concentrações de AFM13 (1-100 µg/ml) por 1 hora e, depois, lavadas duas vezes com PBS antes de realizar estudos funcionais (Figura 13A). A lavagem teve como objetivo a retirada de AFM13 não ligado às células NK. Independentemente da concentração de AFM13 utilizada, as células NK ligadas com AFM13 e lavadas foram tão eficientes quanto as células NK com AFM13 e não lavadas em relação à morte de alvos CD30+, Karpas 299 (Figura 13B). Além disso, observou-se que a cinética de morte de células NK com AFM13 lavadas ou não lavadas foi semelhante contra Karpas 299 avaliada por IncuCyte (Figura 13C). Assim, a ligação de AFM13 à superfície de células P+E CB-NK demonstrou ser estável, com a manutenção da capacidade de reconhecimento tumoral e a morte de células CD30+.



Barras representam médias \pm SEM. Two-way ANOVA com Sidak post-hoc test ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$; n=4 cordões umbilicais

Figura 13 – Estabilidade de ligação de AFM13 com células P+E CB-NK aumenta citotoxicidade contra CD30 positivo Karpas 299. (A) Esquema com células utilizadas, P+E CB-NK incubadas com AFM13 e não lavadas ou incubadas e lavadas. (B) Citotoxicidade (% liberação de ^{51}Cr) de P+E CB-NK com AFM13 (0-100 $\mu\text{g/ml}$) que foram lavadas duas vezes com PBS (barras azuis) ou não lavadas (barras vermelhas) contra células Karpas 299 com E:T ratio 10:1. (B) Morte de Karpas 299 no período de 24 horas com AFM13 (100 $\mu\text{g/ml}$) lavadas (linhas azuis), ou não lavadas (linhas vermelhas), ou sem AFM13 (linha preta) avaliado por incuCyte.

A retenção de AFM13 na superfície das células P+E CB-NK ao longo do tempo foi avaliada utilizando um anticorpo monoclonal direcionado ao AFM13. A citometria de fluxo mostrou que as células NK ligadas incubadas com AFM13 100 µg/ml por uma hora e, então, lavadas mantiveram o AFM13 em sua superfície por pelo menos 72 horas (Figura 14A). Como esperado, AFM13 foi detectado principalmente na população de células NK CD16+. Curiosamente, AFM13 foi parcialmente internalizado para o citoplasma observado por Image Stream (Figura 14B,C). Para avaliar se a internalização de AFM13 afetaria a capacidade das células NK de matar alvos tumorais, as células NK foram cultivadas com AFM13, lavadas ou não, e incubadas a 37°C por 1h, 48h ou 72h em meio contendo rhIL-2. Foi observado que todos os grupos cultivados com AFM13 (lavados e não lavados) exibiram citotoxicidade significativamente maior contra células Karpas 299 em comparação com células P+E CB não cultivadas com AFM13, sugerindo que a internalização parcial de AFM13 não afeta a atividade citotóxica aumentada das células P+E CB-NK (Figura 14D). Para fornecer dados sobre mecanismos adicionais dando suporte à importância do envolvimento combinado de CD16/AFM13 na mediação da resposta antitumoral, observamos a presença significativamente maior de CD16 na sinapse imunológica entre células CB-NK e células Karpas 299 na presença de AFM13 em comparação com um anticorpo IgG utilizado como controle (Figura 14 E,F). Além disso, foi confirmado que, na ausência das células NK, a adição de AFM13 não provoca apoptose de células da linhagem tumoral Karpas 299 (Figura 15).



As barras horizontais representam a média, e as barras de erro indicam o intervalo. As barras representam a média \pm SEM. ANOVA de duas vias com teste post-hoc de Sidak; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$; $n = 3-4$ CB

Figura 14 – Retenção de AFM13 na superfície das células P+E CB-NK aumenta citotoxicidade contra CD30 positivo Karpas 299. (A) Para avaliar a retenção de AFM13 na superfície das células P+E CB-NK, 1×10^6 P+E CB-NK, foram incubadas com $100 \mu\text{g/ml}$ de AFM13 a 37°C por uma hora, então, lavadas e incubadas novamente a 37°C . Nos tempos indicados, a presença de AFM13 foi mensurada por anticorpo anti-AFM13 seguido de anticorpo anti-rat IgG conjugado com APC. A retenção de AFM13 foi avaliada por citometria de fluxo. (B) A retenção de AFM13 foi observada por Image Stream nos diferentes tempos. Um exemplo representativo de células NK nos diferentes pontos marcando CD56 (verde), CD16 (azul) e AFM13 (vermelho) junto com a sobreposição de todos os canais fluorescentes é demonstrado. Escala= $7 \mu\text{m}$. (C) A distribuição percentual do sinal fluorescente de AFM13 é resumida a partir de 50 imagens de células, amostras aleatórias dos tempos, 1 hora (vermelho), 24 horas (verde) e 48 horas (azul). Cada ponto representa uma célula, a linha horizontal representa a média, e as barras indicam as médias \pm SD. (D)

Células P+E CB-NK foram cultivadas com ou sem AFM13 (100 ug/ml) por 1 hora a 37°C, seguido por etapa de lavagem ou não. As células foram cultivadas em meio com 100 IU/mL de rhlL-2 por 1 hora, 48 horas, ou 72 horas, e a citotoxicidade foi testada contra Karpas 299 com E:T ratio de 5:1. As barras representam médias \pm SEM. (E) Imagem demonstra AFM13 nas células NK conjugadas com células Karpas 299. Marcação de CD16 (laranja), CD56 (azul), CD30 (amarelo), F-actin (verde), AFM-13 (vermelho), pericentrina (rosa), e a sobreposição das imagens com AFM13, CD30 e CD16 foi demonstrada. A linha pontilhada define a sinapse, e a ponta da seta aponta para a pericentrina nas células NK. Os conjugados foram avaliados sob uma objetiva de 60x no Image Stream; barra de escala = 7 μ m. (F) A localização sináptica de CD30, CD16 e AFM13 (marrom), juntamente com a polimerização de F-actina (verde) na sinapse imune entre células NK e células Karpas 299 na presença de AFM13 ou anticorpo de controle IgG, é demonstrada

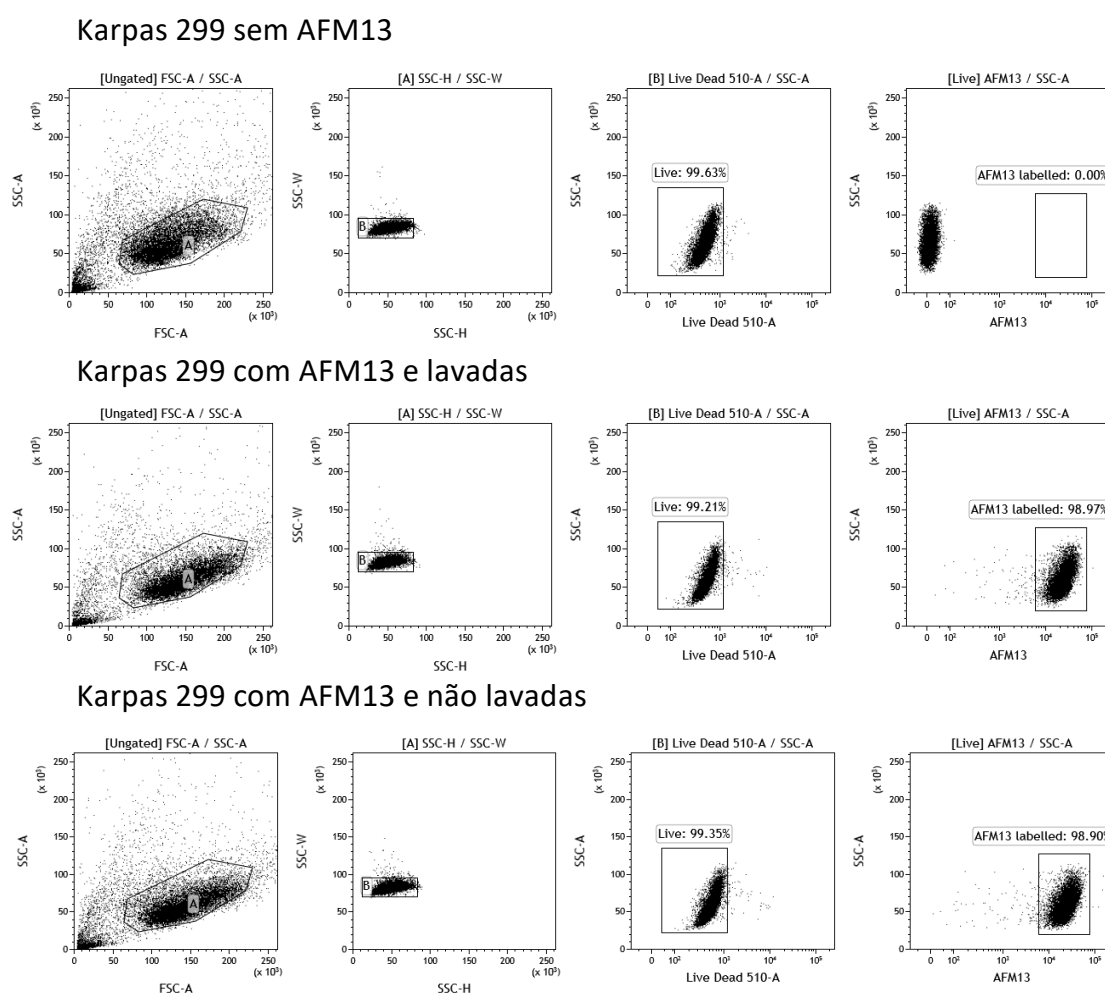


Figura 15 – A adição de AFM13 não induziu apoptose de células Karpas 299 na ausência de células NK. Karpas 299 cells foram marcadas com 100 ug/ml do anticorpo anti-AFM13 a 37°C e foram lavadas 1 hora após a exposição do anticorpo, ou não lavadas. Foi avaliada a viabilidade utilizando marcador Live/Dead por citometria de fluxo. AFM13 sozinho não induziu morte de células Karpas 299 cells

4.6 Atividade antitumoral das células P+E CB-NK com AFM13 em modelo animal de linfoma CD30+

Para avaliar inicialmente a segurança da P+E CB-NK ligada ao AFM13 *in vivo* formando um complexo, camundongos NSG foram injetados iv com 10×10^6 células P+E CB-NK com AFM13 (AFM13-NK), e as toxicidades foram monitoradas com as medições de peso diário, avaliação de pele, pelos, alteração de postura e comportamento por mais de 10 meses. Não encontramos nenhuma evidência de toxicidade durante o acompanhamento, sinais de doença do enxerto contra hospedeiro e alteração de peso (Figura 16A). No exame histológico dos órgãos após necrópsia procedida um ano após a infusão das células, não foi evidenciada lesão nos órgãos ocasionada pelas células NK ou crescimento desregulado dessas células (Figura 16B).

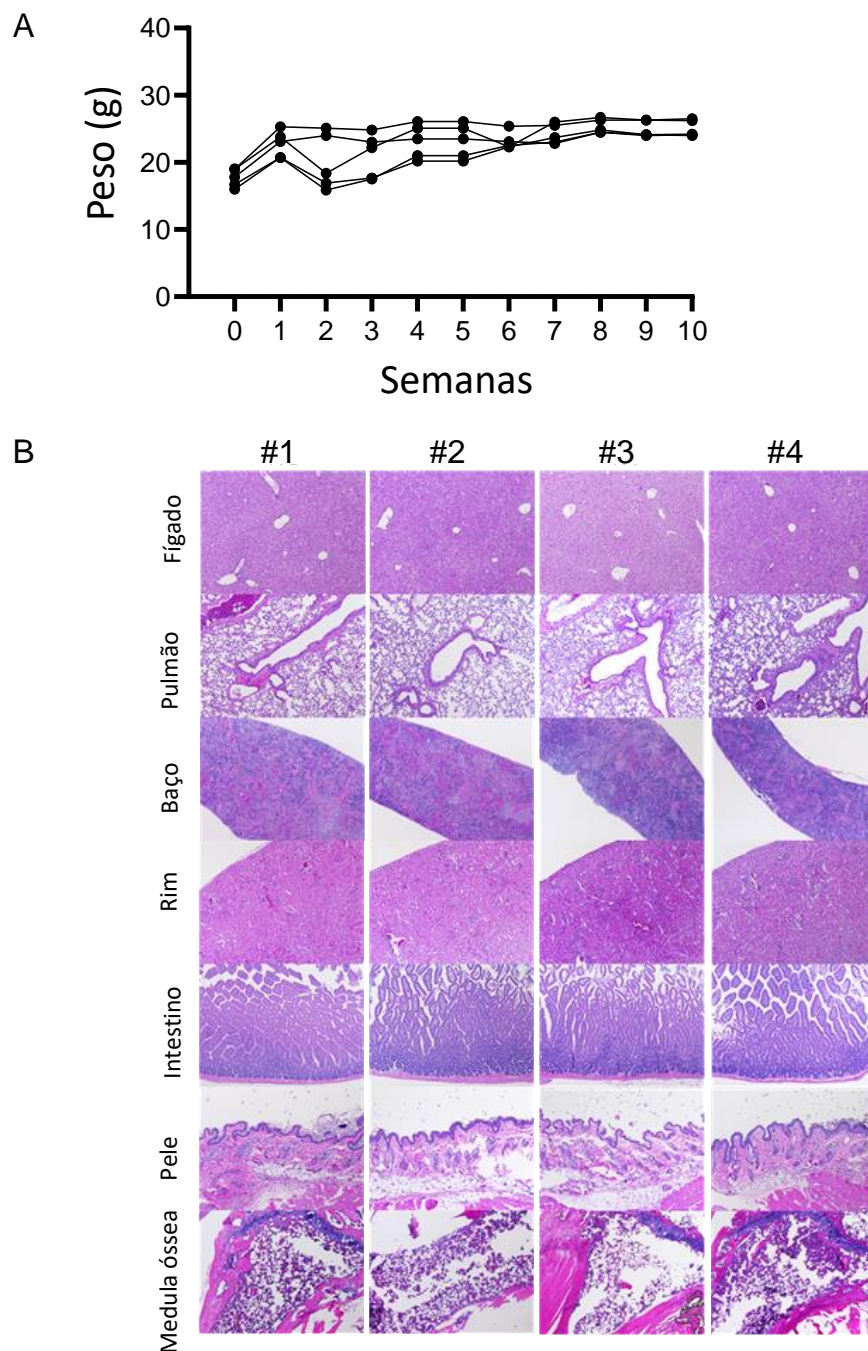


Figura 16 – As células P + E CB-NK com AFM13 (complexo AFM13-NK) são seguras sem evidência *in vivo* de crescimento autônomo ou desregulado. (A) Os camundongos NSG tratados com complexo de células 10×10^6 AFM13-NK (células P + E CB NK incubadas com $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ de AFM13 por 1 hora e lavadas) mostraram peso estável por mais de 10 meses de acompanhamento. Cada linha sólida representa um animal. (B) Os camundongos NSG com mais de 1 ano de idade, após o tratamento com 10×10^6 de células AFM13-NK, foram sacrificados e examinados quanto ao crescimento desregulado de células NK ou danos aos órgãos. Fotomicrografias de coloração H&E de pulmão, baço, rim, intestino delgado, pele e medula óssea não demonstram evidências de patologias relacionadas à infusão das células. Todas as imagens estão com ampliação de 5x

Em seguida, a atividade antitumoral do complexo de células AFM13-NK em camundongos com linfoma foi testada. Os camundongos receberam 1) células Karpas 299 sozinhas, 2) Karpas 299 + células P+E CB-NK (10×10^6 células), 3) Karpas 299 + AFM13 ligadas às P+E CB-NK (complexo AFM13-NK, (10×10^6 células) ou 4) Karpas 299 + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AFM13 (via iv sem células NK) (Figura 17A). Em comparação com os camundongos controle, a infusão do complexo AFM13-NK apresentou melhor controle do crescimento tumoral medido por meio de bioluminescência e melhor sobrevida (Figura 17B,C). Nenhuma diferença no peso dos camundongos foi observada entre as diferentes condições dos camundongos, sugerindo liberação mínima de citocinas e ausência de doença do enxerto contra o hospedeiro (Figura 17D). Quando um camundongo do grupo que recebeu o complexo AFM13-NK foi sacrificado após 21 dias para análise de órgãos, observou-se a presença de células NK em fígado, medula óssea e sangue (Figura 17E). Coletivamente, esses dados asseguram que a associação entre AFM13 e P+E CB-NK é capaz de controlar com segurança as células tumorais *in vivo*.

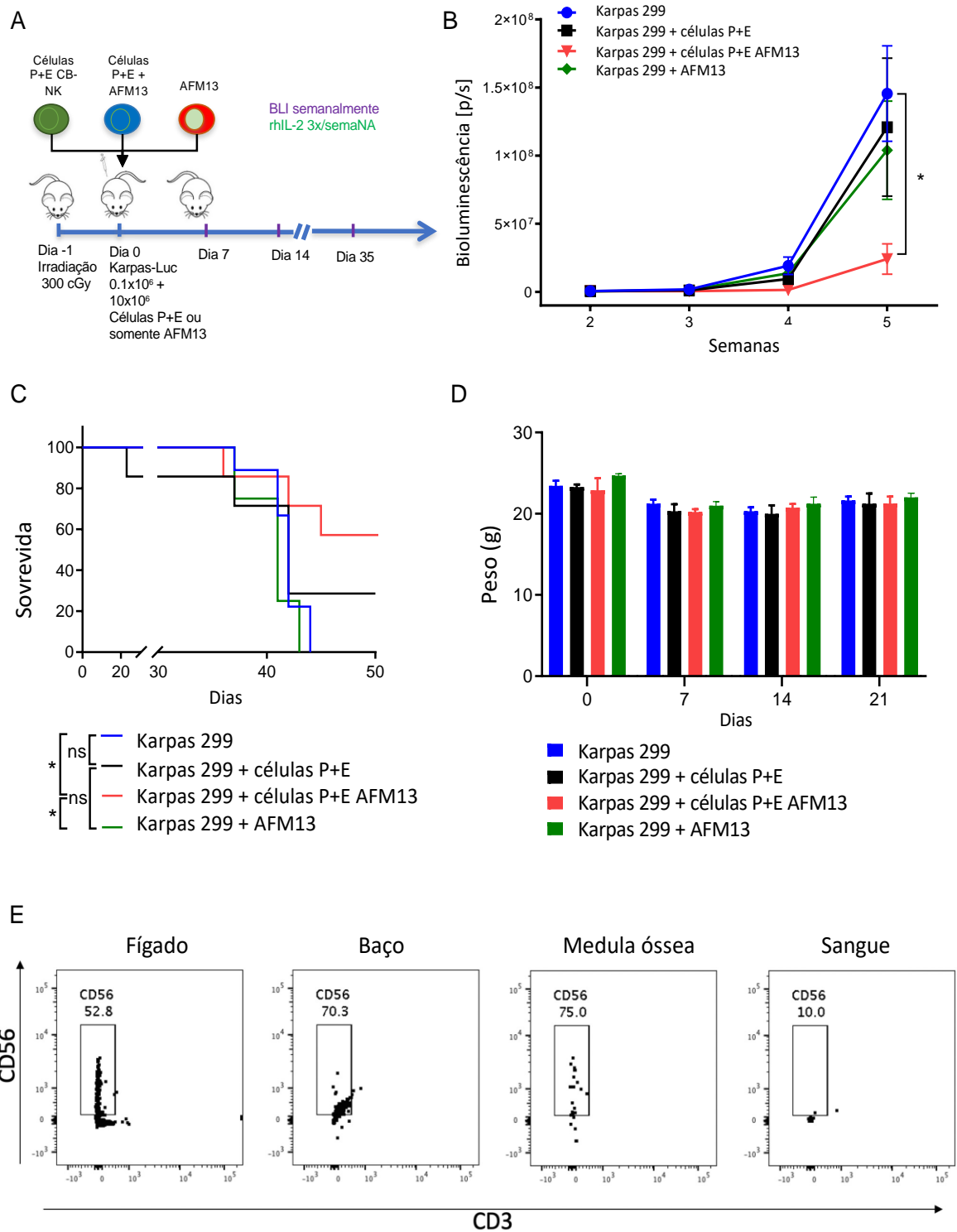


Figura 17 – Atividade antitumoral *in vivo* de AFM13 ligado às células P+E CB-NK. (A) Esquema experimental para evoluir a atividade *in vivo* de AFM13-NK. (B) Imagem bioluminescente (Bioluminescence imaging – BLI) foi utilizada para monitorizar o crescimento de células tumorais FFluc Karpas 299 em camundongos NSG. O gráfico resume os dados de bioluminescência de quatro grupos de camundongos tratados, Karpas 299 sozinha, Karpas 299 mais células NK sem AFM13 (10x10⁶), Karpas 299 com uma dose de complexo de células AFM13-NK (10x10⁶) ou Karpas 299 e uma injeção de AFM13 (100 µg/ml). (C) Gráfico de Kaplan-Meier demonstra a sobrevivência dos camundongos descritos no Painel A. Os camundongos tratados com uma dose única de complexo de células 10x10⁶

AFM13-NK (linha azul) tiveram melhor sobrevivência do que os grupos de controle. (D) Os gráficos de barras resumem o peso dos animais ao longo do tempo como uma medida de toxicidade. As barras representam a média \pm SD. ANOVA de dois fatores com teste post-hoc de Tukey, * $p \leq 0,05$; ns não significativo; n = 4-9 ratos por grupo, 2 experiências independentes. (E) Representação por citometria de fluxo de células CD45+ humanas de um camundongo do grupo Karpas 299 com uma dose de complexo de células AFM13-NK, o qual foi sacrificado no 21º dia para análise da presença de células NK nos órgãos

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No estudo, foi desenvolvida a produção inédita de células NK provenientes de cordão umbilical que apresentam maior atividade antitumoral e foram identificadas novas estratégias imunoterapêuticas, como a diferenciação semelhante à memória induzida por citocinas em células CB-NK. Demonstramos que AFM13, um anticorpo biespecífico tetravalente dirigido contra CD16A e CD30, potencializa a citotoxicidade das células P+E CB-NK contra células tumorais de linfoma que expressam CD30 *in vitro* e *in vivo*. Assim, este é o primeiro estudo que identifica que a combinação da ativação por meio dos receptores rhIL-12, rhIL-15 e rhIL-18 de células NK de cordão umbilical com AFM13 pode ser explorada para tratar neoplasias CD30+. Além disso, a combinação de células P+E CB-NK com AFM13 antes da infusão seria uma abordagem inovadora, transformando o receptor CD16 em um receptor com função semelhante ao de um receptor quimérico de antígeno (CAR, no inglês), com a vantagem de não necessitar da modificação genética das células.

Trabalhos anteriores definiram a indução de células NK com propriedades semelhantes à memória após ativação combinada de citocinas. Células PB-NK humanas brevemente ativadas com rhIL-12, rhIL-15 e rhIL-18 exibiram função antitumoral aumentada quando reestimuladas com citocinas ou alvos tumorais ⁽⁵⁸⁾. Vários estudos pré-clínicos demonstraram que células NK humanas e murinas apresentam propriedades antitumorais aumentadas semelhantes à memória ^(35, 57-59, 72). A terapia celular com PB-NK com memória associada à ativação por citocinas mostrou induzir remissões completas com segurança ⁽³⁵⁾. Entretanto, até o momento, não haviam sido reportadas as características de memória induzida por citocinas em células de cordão umbilical.

Observamos que células NK de cordão umbilical pré-ativadas e expandidas mantêm algumas de suas características fenotípicas apresentadas logo após a ativação, antes da expansão, mesmo após extensa proliferação e divisão celular, como o aumento da expressão de CD69, TRAIL e de citocinas como granzima B e perforina. Apresentaram também aumento de IFN- γ , TNF- α quando expostas aos alvos mieloides e linfoides, além do aumento da citotoxicidade, 14 dias após a ativação. Apesar da utilização de técnicas de produção diferentes, esses achados são semelhantes aos observados pelas NK provenientes de sangue periférico com memória induzida por citocina ^(35, 58).

Os dados de sequenciamento de RNA demonstraram que a ativação com IL-12/15/18 antes da expansão das células CB-NK induz a regulação de genes ativadores de vias de sinalização associadas à maior atividade citotóxica, como regulação positiva da sinalização de IFN- γ e TNF, bem como as vias STAT5 e mTOR, 14 dias após ativação, e também se assemelham às células NK do tipo memória induzidas por citocinas ^(58, 73). Pouco se tem na literatura sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação e função das células NK semelhantes à memória induzida por citocinas. Foi demonstrado que a pré-ativação das células NK com IL12, IL15, IL18 aumenta e prolonga a responsividade das células NK às células tumorais, o que foi associado ao remodelamento epigenético do locus IFN- γ ⁽⁷²⁾. Semelhante às nossas descobertas, outro estudo demonstrou que as células NK de memória de citocinas provenientes de sangue periférico aumentaram as respostas de IFN- γ e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos *in vitro* ⁽⁵⁹⁾.

Comparações de tipos distintos de células NK revelaram um perfil de resposta quando expostas ao AFM13 dependente da fonte. Enquanto as células NK de sangue de doadores saudáveis exibiram citotoxicidade aumentada em resposta ao AFM13 ⁽⁶⁴⁾, a atividade antitumoral exercida por células NK provenientes de pacientes com linfoma de Hodgkin com AFM13 é menor *in vitro*. Vários estudos demonstraram que as células NK de pacientes com câncer, incluindo pacientes com LH, têm função citotóxica prejudicada (69-71). De fato, nós confirmamos a regulação positiva de múltiplos receptores inibitórios, incluindo PD-1, TIM 3, TIGIT e Pan-KIR, e menor expressão de Eomes em células de pacientes com LH em comparação com células NK provenientes de doadores saudáveis. Por sua vez, os níveis de CD16 foram equivalentes, sugerindo que o déficit funcional observado em pacientes com LH está predominantemente relacionado à expressão de múltiplos inibidores, ao invés da baixa ligação de AFM13 secundária à redução da expressão de CD16. Isso pode explicar, em parte, os resultados do estudo de escalonamento de dose de Fase 1 com monoterapia com AFM13, no qual apenas 3 dos 26 pacientes com linfoma de Hodgkin pré-tratados alcançaram remissão parcial (11,5%) e os demais pacientes não apresentaram resposta ⁽²⁵⁾. Esses dados asseguram a hipótese de que AFM13 seria mais eficaz quando combinado com células NK alogênicas de doadores saudáveis. A ativação de rhIL-12/15/18 seguida da expansão de células CB-NK demonstra aumento da citotoxicidade desencadeada por AFM13. Nossa descoberta de que as células CB-

NK pré-ativadas com IL-12, IL-15 e IL-18 antes da expansão aumentaram a morte mediada por AFM13 pode também ser explicada pela falta de maturação completa das células CB-NK expandidas ⁽⁷⁴⁾. Na verdade, enquanto a IL-2 pôde conduzir a proliferação de células CB-NK, a IL-15 foi necessária para que as células adquirissem a função efetora completa ⁽⁶⁰⁾.

O uso de células NK provenientes de cordão umbilical é atraente. Assim, desenvolvemos células CB-NK pré-ativadas, expandidas e ligadas com AFM13 e confirmamos sua citotoxicidade contra tumores CD30+ *in vitro* e *in vivo*. As células NK associadas ao AFM13 retêm o anticorpo em sua superfície por pelo menos três dias. Isso deve fornecer tempo suficiente para que as células NK complexadas com AFM13 possam encontrar e matar as células neoplásicas, conforme confirmado em nosso modelo de camundongo pré-clínico. Assim, prevemos a utilização clínica de um produto inédito que é constituído por AFM13 ligado às células P+E CB-NK e a infusão do produto complexado ao paciente, ao invés de infundir as células e o AFM13 como dois produtos separados.

Diversos estudos atuais vêm demonstrando o benefício de células T ou NK para expressar CAR específico contra um antígeno tumoral ⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾. Nós publicamos, no ano de 2020, um estudo Fase I com uso de células CAR-NK contra o antígeno CD19 para tratamento de pacientes com neoplasias hematológicas refratárias e recidivadas ⁽⁷⁸⁾. O tratamento com células NK provenientes de cordão umbilical transduzidas para expressar CAR foi realizado em 11 pacientes e demonstrou ser seguro: nenhum paciente apresentou síndrome de liberação de citocina, neurotoxicidade ou doença do enxerto contra hospedeiro (DECH). Nenhum paciente foi admitido na Unidade de Tratamento Intensivo em razão de toxicidades relacionadas à terapia. O efeito colateral mais comumente apresentado e que também pode ser relacionado à quimioterapia linfodepletiva foi a toxicidade hematológica com anemia, plaquetopenia, neutropenia e linfopenia, mas esse efeito foi reversível, sem maiores repercussões clínicas. Dos 11 pacientes, 8 tiveram resposta (73%) com 64% de resposta completa. Cabe citar que 2 pacientes receberam células de cordão sem nenhuma compatibilidade e não apresentaram DECH, mostrando que um mesmo produto pode ser utilizado em pacientes diferentes. Uma das justificativas para os bons resultados apresentados neste estudo é a de que as células NK maduras têm um tempo de vida relativamente limitado, permitindo uma atividade antitumoral eficaz, reduzindo simultaneamente a probabilidade de acontecimentos adversos a longo prazo, tais

como citopenias prolongadas devido ao reconhecimento em alvo não tumoral (tecidos normais), como aplasia de células B (no caso do CAR CD19), que pode durar até 3 anos, e outras toxicidades⁽⁷⁵⁾. Além disso, células CAR-NK mantêm a sua capacidade intrínseca para reconhecer as células tumorais por meio de seus receptores nativos. Dessa forma, quando comparadas com células T, no tratamento com CAR, teoricamente é menos provável que as células tumorais escapem da vigilância imunológica de NK mesmo que regulem negativamente o antígeno alvo de CAR^(43, 79). O sucesso do efeito antitumoral das células CAR-NK vem sendo confirmado também em diversos estudos pré-clínicos, principalmente com a incorporação de IL-15 na construção para a melhoria da proliferação das células *in vivo*^(40, 41, 80). Esses resultados animadores incentivam o uso de células CAR-NK expandidas, inclusive provenientes de cordão umbilical, para o tratamento de neoplasias malignas. Mas uma desvantagem da modificação genética das células para expressar CAR é que essa tecnologia exige que seja realizada em laboratório especializado, com grande complexidade do processo de manufatura, o que resulta em um custo elevado e pode dificultar o acesso a essa tecnologia⁽⁸¹⁾. A opção inovadora e inédita apresentada neste estudo, com o uso do receptor CD16 ligado ao anticorpo específico contra alvo tumoral, atuando como CAR-like, é uma opção atraente à imunoterapia, uma vez que não necessita da modificação genética, reduzindo os gastos e as dificuldades com a manufatura, além de possibilitar o uso contra outros tipos de neoplasia maligna.

Optamos por estudar células NK derivadas de CB como fonte de células para combinar com AFM13 por uma série de razões, incluindo sua facilidade de disponibilidade, considerando que já se tem unidades de cordão umbilical estocadas e congeladas, sem a necessidade de expor um doador saudável aos riscos de doação, como no uso de células NK provenientes de sangue periférico. Além disso, observa-se que as células NK derivadas de CB podem ser usadas com segurança na clínica, mesmo na ausência de correspondência de HLA^(49, 78).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta Tese permitem concluir que:

- Células CB-NK pré-ativadas com a combinação de citocinas IL-12 (10 µg/mL), IL15 (50 µg/mL) e IL-18 (50 µg/mL) apresentam aumento de expressão de receptores relacionados com citotoxicidade, como CD69, granzima B, perforina, bem como de CD94 e CD25, atingindo um perfil imunofenotípico semelhante ao de células PB-NK de memória induzida por citocina;
- Células CB-NK pré-ativadas com citocinas e expandidas por *ex vivo* (P+E CB-NK) demonstram maior capacidade de expansão do que células NK somente expandidas ou somente pré-ativadas. Além disso, as células P+E CB-NK produzem maior quantidade de CD107a, IFN- γ , TNF- α , granzima B e perforina em comparação com os grupos controle, quando co-cultivadas com células leucêmicas de linhagens tumorais ou blastos primários de leucemia mieloide aguda, indicando superior atividade antitumoral após 14 dias de expansão;
- A pré-ativação de células CB-NK com IL-12, IL-15 e IL-18 resulta em ativação de vias de sinalização relacionadas à função efetora das células NK, envolvendo maior expressão de genes codificadores de quimiocinas e citocinas, como CCL3, CCL4, CCR5 e TNF, além de genes envolvidos na sinalização de resposta associada ao IFN- γ , sinalização de TNF, sinalização de IL-2/STAT5, sinalização de IL-6/JAK/STAT3, via mTOR e resposta imune inflamatória;
- Células P+E CB-NK acopladas ao anticorpo bidirecional AFM13 (o qual reconhece CD16 e CD30), demonstram aumento de citotoxicidade contra linhagem de linfoma Karpas 299, comparativamente às células sem AFM13. A interação estável com AFM13 resulta no aumento da produção de citocinas (IFN- γ e TNF), maior expressão do marcador de degranulação CD107a e de marcadores de ativação associados à maturidade e função de células NK (TRAIL, NKp44 e CD69), nas células P+E CB-NK. Além disso, a infusão do complexo AFM13-NK em modelo murino de linfoma resultou em melhor controle do crescimento tumoral e melhor sobrevida, comparativamente aos grupos controles, sem evidências de toxicidade e patologias relacionadas à infusão das células AFM13-NK.

Em conclusão, desenvolvemos células CB-NK pré-ativadas e expandidas com maior atividade antitumoral e confirmamos pré-clinicamente a eficácia do uso de células P+E CB-NK ligadas ao AFM13. Esses dados foram publicados recentemente⁽⁸²⁾, e os achados motivaram um ensaio clínico de Fase I com células CB-NK pré-ativadas ligadas ao AFM13 para tratamento de pacientes com neoplasias CD30+ recidivadas/refratárias, o qual está em andamento no MD Anderson Cancer Center (NCT04074746).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Caligiuri MA, Velardi A, Scheinberg DA, Borrello IM. Immunotherapeutic approaches for hematologic malignancies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004;337-53.
2. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-100.
3. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(1):41-9.
4. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1986;136(12):4480-6.
5. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcR3-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989;143(10):3183-91.
6. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett*. 2005;100(1):7-13.
7. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-61.
8. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
9. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-10.
10. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(3):308-14.
11. Vely F, Vivier E. Natural killer cell receptor signaling pathway. *Sci STKE*. 2005;2005(292):cm6.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. 2011 [acesso em 15 de dezembro de 2019]. Disponível em: www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

12. Freud AG, Yu J, Caligiuri MA. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin Immunol.* 2014;26(2):132-7.
13. Rezvani K, Rouce R, Liu E, Shpall E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther.* 2017;25(8):1769-81.
14. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:359-93.
15. Shah N, Shpall EJ. NK antibody therapy: KIR-active intent. *Blood.* 2009;114(13):2567-8.
16. Alten J, Klapper W, Leuschner I, Eckert C, Beier R, Vallo E, et al. Secondary histiocytic sarcoma may cause apparent persistence or recurrence of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(9):1656-60.
17. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015;6:368.
18. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood.* 2002;99(3):754-8.
19. Ernst D, Williams BA, Wang XH, Yoon N, Kim KP, Chiu J, et al. Humanized anti-CD123 antibody facilitates NK cell antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) of Hodgkin lymphoma targets via ARF6/PLD-1. *Blood Cancer J.* 2019;9(2):6.
20. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3):461-9.
21. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(9):713-25.
22. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:323-70.
23. Braumuller H, Wieder T, Brenner E, Assmann S, Hahn M, Alkhaled M, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature.* 2013;494(7437):361-5.
24. Romee R, Leong JW, Fehniger TA. Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:205796.
25. Rothe A, Sasse S, Topp MS, Eichenauer DA, Hummel H, Reiners KS, et al. A phase 1 study of the bispecific anti-CD30/CD16A antibody construct AFM13 in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2015;125(26):4024-31.

-
26. Bartlett NL, Herrera AF, Domingo-Domenech E, Mehta A, Forero-Torres A, Garcia-Sanz R, et al. A phase 1b study of AFM13 in combination with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2020;136(21):2401-9.
 27. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000;356(9244):1795-9.
 28. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, et al. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2016;30(4):800-11.
 29. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):7-19.
 30. Bi J, Tian Z. NK Cell Dysfunction and Checkpoint Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10:1999.
 31. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3609-22.
 32. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res*. 2011;71(16):5412-22.
 33. Peng YP, Zhu Y, Zhang JJ, Xu ZK, Qian ZY, Dai CC, et al. Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J Transl Med*. 2013;11:262.
 34. Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, et al. High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1264562.
 35. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 2016;8(357):357ra123.
 36. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051-7.
 37. Bjorklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, et al. Complete Remission with Reduction of High-Risk Clones following Haploidentical NK-Cell Therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res*. 2018;24(8):1834-44.

-
38. Ni Z, Knorr DA, Bendzick L, Allred J, Kaufman DS. Expression of chimeric receptor CD4zeta by natural killer cells derived from human pluripotent stem cells improves in vitro activity but does not enhance suppression of HIV infection in vivo. *Stem Cells*. 2014;32(4):1021-31.
39. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(4):274-83.
40. Kerbauy LN AS, Enli Liu, Banerjee PP, Wu Y, Shaim H, et al. Cord Blood NK Cells Engineered to Express a Humanized CD123-Targeted Chimeric Antigen Receptor (CAR) and IL-15 As Off-the-Shelf Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2017:4453.
41. Liu E, Tong Y, Dotti G, Shaim H, Savoldo B, Mukherjee M, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia*. 2018;32(2):520-31.
42. Matsuo Y, Drexler HG. Immunoprofiling of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia-lymphoma. *Leuk Res*. 2003;27(10):935-45.
43. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:283.
44. Shah N, Martin-Antonio B, Yang H, Ku S, Lee DA, Cooper LJ, et al. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of natural killer cells with anti-myeloma activity. *PLoS One*. 2013;8(10):e76781.
45. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*. 2007;369(9577):1947-54.
46. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(22):2265-75.
47. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med*. 2004;351(22):2276-85.
48. Gill S, Vasey AE, De Souza A, Baker J, Smith AT, Kohrt HE, et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood*. 2012;119(24):5758-68.

-
49. Shah N, Li L, McCarty J, Kaur I, Yvon E, Shaim H, et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2017;177(3):457-66.
50. Shah N, Mehta R, Li L, Mccarty J, Kaur I, Orłowski RZ, et al. Phase II study of ex vivo expanded cord blood natural killer cells for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15_suppl):8006-.
51. Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, Denman CJ, Cao K, Willis D, et al. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*. 2017;130(16):1857-68.
52. Ciurea SO, Bassett R, Soebbing D, Rondon G, Cao K, Olson AL, et al. Improved Outcomes for Patients Receiving High-Doses of IL-21 Ex Vivo Expanded NK Cells after Haploidentical Transplantation (haploSCT): Long-Term Follow-up of a Phase 1/2 Clinical Trial with Comparison to CIBMTR Controls. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):700-.
53. Peng H, Tian Z. Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. *Front Immunol*. 2017;8:1143.
54. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(2):112-23.
55. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(6):1915-9.
56. Keppel MP, Yang L, Cooper MA. Murine NK cell intrinsic cytokine-induced memory-like responses are maintained following homeostatic proliferation. *J Immunol*. 2013;190(9):4754-62.
57. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med*. 2012;209(13):2351-65.
58. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*. 2012;120(24):4751-60.
59. Leong JW, Chase JM, Romee R, Schneider SE, Sullivan RP, Cooper MA, et al. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(4):463-73.

-
60. Li L, Chen H, Marin D, Xi Y, Miao Q, Lv J, et al. A novel immature natural killer cell subpopulation predicts relapse after cord blood transplantation. *Blood Adv.* 2019;3(23):4117-30.
61. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
62. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:161.
63. Vivian J, Rao AA, Nothhaft FA, Ketchum C, Armstrong J, Novak A, et al. Toil enables reproducible, open source, big biomedical data analyses. *Nat Biotechnol.* 2017;35(4):314-6.
64. Pahl JHW, Koch J, Gotz JJ, Arnold A, Reusch U, Gantke T, et al. CD16A Activation of NK Cells Promotes NK Cell Proliferation and Memory-Like Cytotoxicity against Cancer Cells. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(5):517-27.
65. Diggins KE, Ferrell PB, Jr., Irish JM. Methods for discovery and characterization of cell subsets in high dimensional mass cytometry data. *Methods.* 2015;82:55-63.
66. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A.* 2015;87(7):636-45.
67. Kordasti S, Costantini B, Seidl T, Perez Abellan P, Martinez Llordella M, McLornan D, et al. Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood.* 2016;128(9):1193-205.
68. Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014;2014(7):694-708.
69. Reiners KS, Kessler J, Sauer M, Rothe A, Hansen HP, Reusch U, et al. Rescue of impaired NK cell activity in hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. *Mol Ther.* 2013;21(4):895-903.
70. Frydecka I. Natural killer cell activity during the course of disease in patients with Hodgkin's disease. *Cancer.* 1985;56(12):2799-803.
71. Chiu J, Ernst DM, Keating A. Acquired Natural Killer Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. *Front Immunol.* 2018;9:267.

-
72. Ni J, Holsken O, Miller M, Hammer Q, Luetke-Eversloh M, Romagnani C, et al. Adoptively transferred natural killer cells maintain long-term antitumor activity by epigenetic imprinting and CD4(+) T cell help. *Oncoimmunology*. 2016;5(9):e1219009.
73. Sabry M, Zubiak A, Hood SP, Simmonds P, Arellano-Ballester H, Cournoyer E, et al. Tumor- and cytokine-primed human natural killer cells exhibit distinct phenotypic and transcriptional signatures. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218674.
74. Verneris MR, Miller JS. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol*. 2009;147(2):185-91.
75. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1507-17.
76. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-44.
77. Killock D. CAR T cells are active in Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(10):592.
78. Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med*. 2020;382(6):545-53.
79. Sotillo E, Barrett DM, Black KL, Bagashev A, Oldridge D, Wu G, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(12):1282-95.
80. Daher M, Basar R, Gokdemir E, Baran N, Uprety N, Mendt MC, et al. Combining CAR Engineering and CIS Checkpoint Deletion in NK Cells for the Treatment of B Cell Hematologic Malignancies. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):1936-.
81. Bach PB, Giralt SA, Saltz LB. FDA Approval of Tisagenlecleucel: Promise and Complexities of a \$475000 Cancer Drug. *JAMA*. 2017;318(19):1861-2.
82. Kerbauy LN, Marin ND, Kaplan M, Banerjee PP, Berrien-Elliott MM, Becker-Hapak M, et al. Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30(+) Malignancies. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3744-56.

ANEXOS

ANEXOS

Apresentação oral no Congresso Internacional SITC.

→ sitc.sitcancer.org/2020/abstracts/titles/index.php?filter=Immune+Cell+Biology+*****

Apps <https://negociaca...> Condomínio On-Li...

ATTENDEE RESOURCES ▾ PROGRAM ▾ ABSTRACTS ▾ FACULTY RESOURCES AWARDS ▾ EXHIBIT AND SUPPORT ▾ PRESS ▾

530	Poster Presentation	T-cell immunoglobulin- and mucin domain-containing (TIM)-3 downregulation in response to ex vivo activation and cancer targets correlates to NK cell functionality.	Tram N. Dao, BS; Sandro Matosevic, PhD; Sagar Ullurkar, PhD; Nadia A. Lanman, PhD; Sandro Matosevic, PhD;	Immune Cell Biology	Cytokine; NK/NK T cell; Solid tumors; Tumor infiltrating lymphocytes (TILs)
531	Oral Presentation	AFM13-targeted blood and cord-blood-derived memory-like NK cells as therapy for CD30+ malignancies	Lucila Kerbauy; Nancy D. Marin, PhD; Mecit Kaflan; Pinaki Banerjee; Melissa Berrien-Elliott; Michelle Becker-Hapak; Pafet Basar; Mark Foster; Luciana Garcia Melo; Carly Neal; Ethan McClain; May Daher, MD; Ana Karen Nunez Cortes; Sweta Desai; Francesca Wei Inng Lim; Mayela Carolina Mendt; Timothy Schappe; Li Li; Hila Shaim; Mayra Hernandez Sanabria; Pamela Wong; Enli Liu; Sonny Ang; Rong Cai; Vandana Nandivada; Vekul Mohanty; Yifei Shen; Natalia Baran; Natalie Fowlkes; Ken Chen; Luis Muniz-Feliciano; Joachim Koch, PhD; Martin Tredler; Wolfgang Fischer; Oswaldo Keith Okamoto; Yago Nieto, MD PhD; Richard E. Champlin, MD; Elizabeth J. Shpall, MD; Todd A. Fehniger; Katy Razvani, MD, PhD;	Immune Cell Biology	Antibody; Bispecifics; NK/NK T cell; Targeted therapy
532	Poster Presentation	SOCS3 deficiency blocked autophagy-dependent myeloid differentiation of early-stage myeloid-derived suppressor cells via the miR-155/C/EBPβ/Wnt axis	Jinpu Yu, Ph.D.; Wenwen Zhang;	Immune Cell Biology	Carcinogenesis; Immune suppression; MDSC; Tumor evasion; Tumor microenvironment

531 AFM13-TARGETED BLOOD AND CORD-BLOOD-DERIVED MEMORY-LIKE NK CELLS AS THERAPY FOR CD30+ MALIGNANCIES

¹Lucila Kerbauy, ²Nancy Marin*, ¹Meit Kaplan, ¹Prateek Banerjee, ²Melissa Barrien-Elliott, ²Michelle Becker-Hapak, ¹Refael Bassar, ²Mark Foster, ³Luciana Garcia Melo, ²Carly Neal, ²Ethan McClain, ¹May Daher, ¹Ana Karen Nunez Cortes, ²Siveta Desai, ¹Francessca Wei Inng Lim, ¹Mayela Carolina Mendt, ²Timothy Schappe, ¹Li Li, ¹Hila Shaim, ¹Mayra Hernandez Sanabria, ²Pamela Wong, ¹Ehili Liu, ¹Somy Ang, ¹Rong Cai, ¹Vandana Nandivada, ¹Vakul Mohanty, ¹Yifei Shen, ¹Natalia Baran, ¹Natalie Fowlkes, ¹Ken Chen, ¹Luis Muniz-Feliciano, ⁴Jachrim Koch, ⁵Martin Tieder, ⁴Wolfgang Fischer, ⁶Oswaldo Keith Okamoto, ¹Yago Nieto, ¹Richard Champlin, ¹Elizabeth Spill, ²Todd Fehniger, ¹Katy Rezvani, ¹The University of Texas MDACC, Houston, USA; ²Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA; ³The University of Texas MD, Houston, USA; ⁴Affimed GmbH, Heidelberg, Germany; ⁵Ajuna Therapeutics, Santiago de Compostela, Spain; ⁶Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil

Background Natural killer (NK) cells are a nascent cellular immunotherapy for hematologic malignancies. Target recognition of NK cell-resistant cancers remains a substantial barrier to broad application of NK cell therapy. One solution are bispecific engagers that trigger NK cells via an NK activating receptor when simultaneously engaging a tumor-specific antigen.

Methods Here, we investigated single NK cell responses stimulated by the tetravalent bispecific innate cell engager (ICE[®]) AFM13 that binds CD30 on leukemia/lymphoma targets and CD16A on several types of NK cells.

Results Multidimensional mass cytometry revealed heterogeneity within AFM13-directed conventional (c)NK cell responses, as well as consistent polyfunctional activation of mature, functionally differentiated NK cells across donors. The source of NK cells also impacted the AFM13 response, with cNK cells from healthy donors exhibiting superior responses to those from Hodgkin lymphoma patients. IL-12, IL-15, and IL-18 induce memory-like NK cells from peripheral blood that exhibited enhanced killing of CD30+ lymphoma targets directed by AFM13, compared to cNK cells. Cord-blood expanded NK cells that were pre-activated with IL-12, IL-15, and IL-18 also exhibited enhanced killing with AFM13 stimulation, via upregulation of signaling pathways related to NK cell receptor function. These cells were not pre-loaded with AFM13 enhancing responses to CD30+ lymphomas *in vitro* and *in vivo* in immunodeficient NSG mouse models.

Conclusions Collectively, these data identify promising combinations of AFM13 with *in vitro*-activated adult blood or cord blood NK cells against CD30+ hematologic malignancies, warranting clinical trials with these novel combinations.

<https://doi.org/10.1136/jitc-2020-STC2020.0531>

Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30⁺ Malignancies



Lucila N. Kerbauy^{1,2,3}, Nancy D. Marin⁴, Mecit Kaplan¹, Pinaki P. Banerjee¹, Melissa M. Berrien-Elliott⁴, Michelle Becker-Hapak⁴, Rafet Basar¹, Mark Foster⁴, Luciana Garcia Melo¹, Carly C. Neal⁴, Ethan McClain⁴, May Daher¹, Ana Karen Nunez Cortes¹, Sweta Desai⁴, Francesca Wei Inng Lim¹, Mayela Carolina Mendt¹, Timothy Schappe⁴, Li Li¹, Hila Shaim¹, Mayra Shanley¹, Emily L. Ensley¹, Nadima Uprety¹, Pamela Wong⁴, Enli Liu¹, Sonny O. Ang¹, Rong Cai¹, Vandana Nandivada¹, Vakul Mohanty⁵, Qi Miao⁵, Yifei Shen⁵, Natalia Baran⁶, Natalie W. Fowlkes⁷, Ken Chen⁵, Luis Muniz-Feliciano¹, Richard E. Champlin¹, Yago L. Nieto¹, Joachim Koch⁸, Martin Treder⁹, Wolfgang Fischer⁸, Oswaldo Keith Okamoto^{2,3}, Elizabeth J. Shpall¹, Todd A. Fehniger⁴, and Katayoun Rezvani¹

ABSTRACT

Purpose: Natural killer (NK)-cell recognition and function against NK-resistant cancers remain substantial barriers to the broad application of NK-cell immunotherapy. Potential solutions include bispecific engagers that target NK-cell activity via an NK-activating receptor when simultaneously targeting a tumor-specific antigen, as well as enhancing functionality using IL12/15/18 cytokine pre-activation.

Experimental Design: We assessed single-cell NK-cell responses stimulated by the tetravalent bispecific antibody AFM13 that binds CD30 on leukemia/lymphoma targets and CD16A on various types of NK cells using mass cytometry and cytotoxicity assays. The combination of AFM13 and IL12/15/18 pre-activation of blood and cord blood-derived NK cells was investigated *in vitro* and *in vivo*.

Results: We found heterogeneity within AFM13-directed conventional blood NK cell (cNK) responses, as well as consistent AFM13-directed polyfunctional activation of mature NK cells

across donors. NK-cell source also impacted the AFM13 response, with cNK cells from healthy donors exhibiting superior responses to those from patients with Hodgkin lymphoma. IL12/15/18-induced memory-like NK cells from peripheral blood exhibited enhanced killing of CD30⁺ lymphoma targets directed by AFM13, compared with cNK cells. Cord-blood NK cells preactivated with IL12/15/18 and *ex vivo* expanded with K562-based feeders also exhibited enhanced killing with AFM13 stimulation via upregulation of signaling pathways related to NK-cell effector function. AFM13–NK complex cells exhibited enhanced responses to CD30⁺ lymphomas *in vitro* and *in vivo*.

Conclusions: We identify AFM13 as a promising combination with cytokine-activated adult blood or cord-blood NK cells to treat CD30⁺ hematologic malignancies, warranting clinical trials with these novel combinations.

Introduction

Cancer progression is associated with an ineffective antitumor response, mediated by multiple mechanisms, including downregulation of HLA antigens (1), upregulation of checkpoints, and secretion of suppressive cytokines (2–4). Therefore, promising immunotherapy strategies have been developed to enhance the activity of T and natural killer (NK) cells against cancer targets, including the use of cytokines, checkpoint inhibitors, genetic engineering of cells to express a chimeric antigen receptor, or the use of bispecific antibodies (5–12).

NK cells are cytotoxic innate lymphoid cells that play an important role in immunosurveillance and display potent effector responses against infected, stressed, and malignant cells (13). Unlike T cells, NK cells do not express antigen-specific receptors to recognize their target; instead, their activation and effector functions are mediated either by interactions between germline encoded activating or inhibitory receptors and their respective ligands on target cells (14, 15), including CD16A (FcγRIIIa)-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and cytokine production (16, 17). NK-cell

¹Department of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ²Departments of Stem Cell Transplantation and Hemotherapy/Cellular Therapy, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil. ³Human Genome and Stem Cell Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Biosciences Institute, University of Sao Paulo (USP), Sao Paulo, Brazil. ⁴Department of Medicine, Division of Oncology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri. ⁵Department of Bioinformatics and Computational Biology, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ⁶Department of Leukemia, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ⁷Department of Veterinary Medicine and Surgery, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas. ⁸Affimed GmbH, Heidelberg, Germany. ⁹Arijuna Therapeutics, Santiago de Compostela, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

L.N. Kerbauy and N.D. Marin contributed equally to this article.

Corresponding Authors: Katayoun Rezvani, Department of Stem Cell Transplantation and Cellular Therapy, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd, Houston, TX 77030. E-mail: krezvani@mdanderson.org; and Todd A. Fehniger, Department of Medicine, Division of Oncology, Washington University School of Medicine. E-mail: tfehnige@wustl.edu

Clin Cancer Res 2021;XX:XX-XX

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0164

©2021 American Association for Cancer Research.