

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

SARAH CAROLINE GOMES DE LIMA

**Otimização de uma plataforma baseada na edição gênica por CRISPR/Cas9
para a produção de células T alogênicas expressando o receptor quimérico de
antígeno (CAR)**

Ribeirão Preto

2023

SARAH CAROLINE GOMES DE LIMA

**Otimização de uma plataforma baseada na edição gênica por CRISPR/Cas9
para a produção de células T alogênicas expressando o receptor quimérico de
antígeno (CAR)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Oncologia Clínica, Células-tronco e Terapia Celular
Concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima, Sarah Caroline Gomes de

Otimização de uma plataforma baseada na edição gênica por CRISPR/Cas9 para a produção de células T alogênicas expressando o receptor quimérico de antígeno (CAR). Ribeirão Preto, 2023.

135 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Souza, Lucas Eduardo Botelho de.

1. Receptor quimérico de antígeno. 2. CRISPR/Cas9. 3. Receptor de células T. 4. Nocaute gênico. 5. Inserção gênica direcionada.

Nome: LIMA, Sarah Caroline Gomes de

Título: Otimização de uma plataforma baseada na edição gênica por CRISPR/Cas9 para a produção de células T alogênicas expressando o receptor quimérico de antígeno (CAR)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

O caminho foi longo e a trajetória só foi possível através da contribuição de todos que estiveram ao meu redor.

Agradeço primeiramente a Deus, o meu Pai! Detentor de todo o conhecimento, me abençoou e conduziu na jornada até aqui.

À minha família toda a minha gratidão e amor! Vocês são a razão da minha persistência. À minha mãe, Marilena, minha inspiração! Sua força, amor e dedicação pela família me proporcionam a motivação diária para enfrentar o mundo. Obrigada por não medir esforços para me apoiar em cada decisão. Agradeço às minhas irmãs Fernanda e Ana Paula, e cunhados Cleyton e Daniel, por serem minhas mães e pais substitutos, que sempre cuidaram e buscaram o melhor para mim. Agradeço aos meus sobrinhos, Fernando, Arthur, Lívia, Bernardo e Manu por serem responsáveis pelos deliciosos momentos de lazer e descontração.

Sou grata às minhas amigas Natália, Graziela, Rafaela e Keity por apoiarem a minha decisão de retornar ao mundo acadêmico e por me ajudarem para que isso acontecesse. Obrigada pelo companheirismo e apoio genuíno.

Ao meu orientador, Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza, agradeço por todos os ensinamentos, apoio, paciência e pelas oportunidades valiosas que me concedeu.

A todos do Laboratório Transferência Gênica, agradeço a amizade e espírito de cooperação. Obrigada, Andreza, Caio, Daianne, Jessica, Izadora, Karolina, Matias, Milena, Rafaela e Roberta pela ótima convivência. Obrigada, Heloísa e Laís, pela recepção e por todos os ensinamentos durante o período inicial no laboratório.

Agradeço à Karolina e à Rafaela pela valiosa ajuda na finalização deste documento e pela extensa colaboração no planejamento e execução dos experimentos.

Sou grata a todas do laboratório de citometria de fluxo, Patrícia, Camila e Rita, pela orientação e auxílio durante as análises que foram imprescindíveis para este trabalho.

Agradeço às Dras. Virgínia e Simone, por possibilitarem o acesso aos seus laboratórios e pelas sugestões durante a realização dos experimentos. Agradeço também às suas equipes pela colaboração e compartilhamento de experiências sempre que solicitado.

À Evandra e Débora, agradeço a generosidade em auxiliar no sequenciamento NGS e análise dos dados.

Ao Mário, agradeço por realizar as análises de micoplasma das amostras do cultivo celular.

Sou grata à Cleide, coordenadora do Laboratório de Experimentação Animal, por todos os ensinamentos sobre o cuidado com os animais. Agradeço também à Beatriz, Henrico e Laís pelos treinamentos e ajuda nos procedimentos, bem como por proverem todo o cuidado necessário aos animais de experimentação.

Agradeço à Julianne pela ajuda com as análises de bioluminescência, por ser prestativa e gentil ao atender os alunos.

Obrigada, Carmen, Dalva e Renata por todo apoio na resolução das questões burocráticas durante o mestrado.

Sou grata aos amigos do Hemocentro, Daianne, Karolina, Mara, Péricles, Rafaela e Renata, pela convivência agradável, apoio e motivação em diversos momentos.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP–USP) e à Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto minha gratidão pela possibilidade de acesso ao conhecimento, fornecendo uma infraestrutura primorosa, um quadro de funcionários atencioso e um corpo docente qualificado.

Obrigada, Rosana e Silvia, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular, pela atenção e ajuda com todos os trâmites de documentos ao longo do mestrado.

Ao Dr. Krishanu Saha, da Universidade de Wisconsin-Madison (EUA), agradeço pela recepção e orientação durante o período em que estive em seu laboratório. Agradeço também ao Dan Cappabianca por todos os ensinamentos técnicos sobre a metodologia de knock-in gênico e ao Dr. Matthew Forsberg pelo auxílio nas análises de cocultivo.

Agradeço ao Prof. Geraldo Aleixo Passos e ao Pedro Tanaka pelas sugestões e incentivo a este trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora o meu agradecimento pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, processo nº 88887.500143/2020-00), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2020/02043-2 e 2021/09900-0) e

ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo nº 381563/2023-5) pelo apoio financeiro concedido através das bolsas de estudos.

RESUMO

LIMA, S. C. G. **Otimização de uma plataforma baseada na edição gênica por CRISPR/Cas9 para a produção de células T alogênicas expressando o receptor quimérico de antígeno (CAR)**. 2023, 135 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A terapia alogênica com células T expressando receptores quiméricos de antígeno (CARs) é uma estratégia promissora para aumentar a acessibilidade ao tratamento. Essa abordagem possui inúmeras vantagens, como a disponibilidade de um produto pronto para o uso, padronizado e com custo reduzido devido ao escalonamento da produção. No entanto, a implementação desta abordagem em larga escala suscita preocupação pelo desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, uma complicação potencialmente fatal causada pelo reconhecimento de aloantígenos pelo receptor de células T (TCR) dos linfócitos T-CAR. Uma solução para contornar este obstáculo é a depleção do TCR da superfície das células T-CAR por meio de ferramentas de edição gênica. Neste trabalho, foi descrito o processo de estabelecimento de uma plataforma de produção de células T-CAR anti-CD19 alogênicas baseada na depleção do TCR por nocaute ou inserção gênica direcionada utilizando CRISPR/Cas9. Primeiramente, avaliou-se a eficiência de dois RNAs guia (gRNAs) na depleção do TCR, tendo como alvo o gene codificante da região constante da cadeia α do TCR (*TRAC*). Foi utilizado um modelo de células T eletroporado com o plasmídeo codificante da Cas9 e identificado um gRNA capaz de gerar até 80% de células CD3⁻, sendo este escolhido para as etapas subsequentes. Para a estratégia de produção por nocaute gênico, células T foram transduzidas com partículas lentivirais para a expressão do CAR e eletroporadas para a entrega dos complexos ribonucleoproteicos (RNPs) de Cas9 e gRNA. Foi observada uma maior eficiência de edição e recuperação celular quando a ativação celular precedeu a eletroporação. A eficiência de nocaute foi superior a 86%, sendo que ~39% das células apresentaram o fenótipo de interesse (CAR⁺CD3⁻). A viabilidade celular alcançou 75% após dois dias da transdução e permaneceu acima de 60% após a eletroporação. Comparadas às células T-CAR convencionais, as editadas mantiveram a citotoxicidade seletiva ao antígeno CD19 e apresentaram níveis aumentados de secreção de interferon- γ . Em seguida, redirecionamos a ferramenta

CRISPR/Cas9 para a inserção dirigida (*knock-in*) do CAR e o nocaute do TCR em uma estratégia de etapa única, eliminando a necessidade do uso de vetores virais. O *knock-in* no locus *TRAC* foi feito através do fornecimento de um *template* de DNA de fita dupla, que foi entregue em conjunto com as RNPs via eletroporação, para direcionar o reparo por homologia. Observamos porcentagens elevadas de nocaute do TCR (~91,5%) e de *knock-in* do CAR (~83,7%) 5 dias após a eletroporação. O crescimento celular moderado foi um reflexo da queda na viabilidade, a qual correspondeu a 27% no dia 3 e ~60% no dia 7 de manufatura. Embora tenhamos confirmado a integração do transgene CAR no alvo por ensaio de PCR “in-out”, observamos uma queda na frequência de células CAR⁺ em tempos de cultura prolongados. Apesar disso, nesse estágio, as células T-CAR editadas apresentaram atividade contra células tumorais alvo. Ainda que promissor, este protocolo requer otimizações. Por outro lado, a produção de células T-CAR editadas por nocaute gênico se mostrou uma metodologia robusta, permitindo a obtenção de uma elevada eficiência de edição e um rendimento celular satisfatório.

Palavras-chave: Receptor de antígeno quimérico; CRISPR/Cas9; receptor de células T; nocaute gênico; inserção gênica direcionada.

ABSTRACT

LIMA, S. C. G. **Optimization of a CRISPR/Cas9-based platform to produce allogeneic chimeric antigen receptor (CAR) T cells.** 2023, 135 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Allogeneic chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy represents a promising strategy to increase treatment accessibility. This approach has numerous advantages, such as the availability of an off-the-shelf, standardized product at a reduced cost due to production scaling. However, the large-scale implementation of this approach raises concerns for the graft-versus-host disease development, a potentially fatal complication caused by antigen recognition by the T cell receptor (TCR) on CAR T cells. A solution to overcome this challenge is the TCR deletion from CAR T cell surface using gene editing tools. This work described the establishment process of a platform for allogeneic anti-CD19 CAR T-cell production based on TCR depletion by gene knockout or targeted insertion using CRISPR/Cas9. First, the efficiency of two guide RNAs (gRNAs) in depleting the TCR was evaluated by targeting the TCR alpha-chain constant region (*TRAC*) gene. A T cell model was electroporated with the Cas9-encoding plasmid and a gRNA capable of generating up to 80% of CD3⁻ cells was selected for the subsequent steps. For the gene knockout strategy, T cells were transduced with lentiviral particles for CAR expression and electroporated for delivering Cas9-gRNA ribonucleoprotein complexes (RNPs). Higher cell editing efficiency and recovery were observed when cell activation preceded the electroporation. Knockout efficiency was greater than 86%, with ~39% of the cells showing the phenotype of interest (CAR⁺CD3⁻). Cell viability reached 75% two days after transduction and remained above 60% after electroporation. Compared to conventional CAR T-cells, the edited ones maintained selective cytotoxicity to the CD19 antigen and showed increased levels of interferon- γ secretion. We then repurposed the CRISPR/Cas9 tool for targeted CAR knock-in and TCR knockout in a single-step approach, eliminating the need for viral vectors. Knock-in at the *TRAC* locus was performed by providing a double-stranded DNA template, co-delivered with the RNPs via electroporation, to direct the homology repair. We observed high percentages of TCR knockout (~91.5%) and CAR knock-in (~83.7%) 5 days post-electroporation. The moderate cell growth reflected the viability

drop, reaching 27% of viable cells on day 3 and ~60% on day 7 of manufacturing. Although we did confirm the integration of the CAR transgene into the *TRAC* locus using an “in-out” PCR assay, we observed a drop in the frequency of CAR⁺ cells at prolonged culture times. Nevertheless, at this stage, edited CAR T cells exhibited activity against target tumor cells. Despite its potential, the knock-in approach requires refinements. On the other hand, the production of edited CAR T cells through gene knockout has proven to be a robust methodology, allowing for high editing efficiency and satisfactory cell yield.

Keywords: Chimeric antigen receptor; CRISPR/Cas9; T cell receptor; knock-out; knock-in.