

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES COM
LINFOMAS NÃO HODGKIN RECIDIVADOS E OU REFROTÁRIOS**

MOEMA NENÊ SANTOS

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES COM
LINFOMAS NÃO HODGKIN RECIDIVADOS E OU REFRATÁRIOS**

MOEMA NENÊ SANTOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Mariano da Rocha Silla.

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

SANTOS, MOEMA NENE
AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES
COM LINFOMAS NÃO HODGKIN RECIDIVADOS E OU REFRATÁRIOS
/ MOEMA NENE SANTOS. -- 2024.
84 f.
Orientador: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Celulas Natural Killer. 2. Linfoma Não Hodgkin.
I. Mariano da Rocha Silla, Lucia, orient. II. Título.

RESUMO

Linfomas Não Hodgkin (LNH) são doenças malignas que surgem de células do sistema imunológico e manifestam-se predominantemente como linfadenopatia ou tumores sólidos relacionados a conglomerados linfonodais. Os tratamentos para os LNH incluem poliquimioterapia com ou sem imunoterapia medicamentosa e transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) em alguns casos. Novas abordagens de tratamento também são necessárias para pacientes com recidiva após a terapia de primeira linha e ou para pacientes que não são considerados candidatos elegíveis para quimioterapia de alta dose e TCTH e é com este objetivo que a terapia celular vem ganhando espaço no tratamento destes tipos de doenças. Em relação a terapia celular NK, observou-se uma potente capacidade de tais células matar linhagens celulares tumorais *in vitro* sem sensibilização prévia. A restauração ou potencialização dessa atividade antitumoral natural das células NK tornou-se uma abordagem terapêutica relevante progressivamente estudada no tratamento contra diversos tipos de câncer, mais frequentemente leucemia mielóide aguda com resultados promissores. Ainda há poucos dados sobre sua atividade no linfoma, a eficácia encorajadora observada para essas terapias celulares, como CAR T cell em pacientes fortemente pré-tratados levanta a questão relacionada a terapia NK nestes pacientes a partir de células Natural Killer (NK) de doadores que podem ser expandidas “*in vitro*” sem um custo tão elevado como a terapia do Car T cell no momento. Para avaliarmos este perfil de pacientes realizamos um estudo pré-clínico utilizando para este fim amostras de sangue periférico de pacientes previamente tratados com 2 ou mais linhas de tratamento para LNH. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade de expansão de células NK em grau clínico nos pacientes com LNH recidivado e ou refratários a terapias prévias e sua atividade anti-tumoral. **Métodos:** Neste contexto, avaliamos em seis pacientes com LNH recidivado ou refratários a terapias prévias em acompanhamento e tratamento no Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre -RS, o crescimento (número, tempo através de *fold expansion* e *doubling time*) e a efetividade das células NK (capacidade de lise da célula *feeder*/célula alvo) em comparação com indivíduos saudáveis, utilizando nossa plataforma tecnológica de expansão baseada na expansão celular na presença de células apresentadoras de antígeno (*feeders*) mbIL21K562, já aprovada e utilizada no tratamento da leucemia mielóide aguda neste Serviço. **Resultados:** Nesta amostra de pacientes estudada, ou seja, de pacientes portadores de LNH recidivados e ou refratários politratados, conseguimos demonstrar a viabilidade de cultivo e expansão das células NK em nível clínico e sem diferença estatisticamente significativa em relação a amostra de doadores saudáveis nas mesmas condições de cultura e expansão. **Conclusão:** Desta forma leva-nos a concluir que nesta amostra de pacientes, mesmo obtendo um número de células suficientes para várias infusões, estas são deficitárias quanto à sua capacidade citotóxica e da necessidade de buscarmos fontes alogênicas de doadores para este perfil de paciente.

Palavras-chave: células-natural killer; linfomas não Hodgkin; citotoxicidade; crescimento celular.

ABSTRACT

Non-Hodgkin Lymphomas (NHL) are malignant diseases that arise from cells of the immune system and manifest predominantly as lymphadenopathy or solid tumors related to lymph node conglomerates. Treatments for NHL include polychemotherapy with or without drug immunotherapy and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in some cases. New treatment approaches are also needed for patients who relapse after first-line therapy and/or for patients who are not considered eligible candidates for high-dose chemotherapy and HSCT, and it is with this objective that cell therapy is gaining ground in the treatment of these types of diseases. Regarding NK cell therapy, a potent ability of such cells to kill tumor cells “in vitro” without prior sensitization was observed. The restoration or enhancement of this natural antitumor activity of NK cells has become a relevant therapeutic approach progressively studied in the treatment against different types of cancer and more frequently acute myeloid leukemia with promising results. activity in lymphoma, the encouraging efficacy observed for these cell therapies, such as CAR T cell in heavily pre-treated patients raises the question related to NK therapy in these patients, using NK (Natural Killer) cells from donors who can be expanded “in vitro” without as high a cost as Car T cell therapy at the moment. To evaluate this patient profile, we carried out a pre-clinical study using peripheral blood samples from patients previously treated with 2 or more lines of treatment for NHL. **Objective:** To evaluate the feasibility of expanding Natural Killer cells at a clinical level in patients with relapsed NHL and/or refractory to previous therapies and its anti-tumor activity. **Methods:** In this context, we evaluated the growth (number, time through fold expansion and doubling time) and the effectiveness of natural killer cells (feeder cell/target cell lysis capacity) in six patients with relapsed NHL or refractory to previous therapies in follow-up and treatment at the Hematology Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre -RS, Brazil. using our technological expansion platform based on cell expansion in the presence of mbIL21K562 antigen-presenting cells (feeders), already approved and used in the treatment of acute myeloid leukemia in this Hematology Service. **Results:** In this sample of patients studied, relapsed and/or polytreated refractory NHL patients, we were able to demonstrate the feasibility of culture and expansion of NK cells at the clinical level and without statistically significant difference in relation to the sample of healthy donors under the same culture and expansion conditions. **Conclusion:** Thus, it leads us to conclude that in this sample of patients, even obtaining a sufficient number of cells for several infusions, they are deficient in terms of their cytotoxic capacity and the need to seek allogeneic sources from donors for this patient profile.

Keywords: natural killer cells; non-Hodgkin lymphomas; cytotoxicity; cell growth.

LISTA DE FIGURAS

Parte teórica

Figura 1. Fluxograma no processo de busca e revisão de literatura.....	15
Figura 2. Resistência à imunoterapia mediada por células natural killer (NK). A base genética que modula a biologia das células NK, a resistência das células cancerosas à apoptose e a complexa interação entre o tumor e seu microambiente com o sistema imunológico – um processo conhecido como imunoeedição, que pode reduzir a imunogenicidade do câncer, promovendo assim a imunossupressão —são fatores cruciais de resistência tumoral às terapias baseadas em células NK.....	17
Figura 3. Células NK.....	20
Figura 4. aAPC/feeder: células alimentadoras K562 geneticamente modificadas para expansão de células NK.....	23
Figura 5. Marco conceitual.....	24

Artigo

Figure 1. Cell count (number of NK cells x 10 ⁶) at baseline and at 7, 14, and 21 days of follow-up of lymphoma patients (n = 6).	47
Figure 2. Fold expansion (n = 9: 3 healthy donors + 6 lymphoma patients).	48
Figure 3. Growth of NK cells/kg of body weight in days (n = 9: 3 healthy donors and 6 patients with lymphoma). Note: lymphoma patient 4 showed discrepant growth cell.	49
Figure 4. Doubling time (n = 9: 3 healthy donors and 6 lymphoma patients).	50
Figure 5. Cell lysis throughout the follow-up period, according to different dilutions, for healthy donors 1, 2, and 3.....	50
Figure 6. Cell lysis throughout the follow-up period, according to different dilutions, for lymphoma patients 1 to 6.	51
Figure 7. Cytotoxicity (% cell lysis) on day 14 of cell culture, according to different dilutions, in healthy donors (n = 3) and lymphoma patients (n = 6).	53

LISTA DE TABELAS

Table 1. Characteristics of included with non-Hodgkin's lymphoma patients (n = 6).	46
Table 2. Comparison of healthy donors with non-Hodgkin's lymphoma patients on day 14 of cell culture.	47
Table 3. Cytotoxicity – percentage of NK cell lysis in relation to target cells (K562 cl9.mbIL-21).....	52
Table 4. Nested BCR-ABL polymerase chain reaction (PCR) testing in cultures from non-Hodgkin's lymphoma patients (n = 6).	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aAPCs	Antígenos artificiais geneticamente modificadas
ADCC	Citotoxicidade Celular Mediada por Células Anticorpo Dependente
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCR-ABL	Gene de fusão, oncoproteína BCR ABL
CAR T Cell	Célula CAR-T é um Linfócito T que passou por uma modificação genética
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPCA	Centro de Processamento Celular Avançado
CR	Remissão Completa
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos
CTTC	Centro de Tecnologia e Terapia Celular
DCs	Células Dendríticas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno linfocitário humano
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IPI	Índice prognóstico internacional
LNH	Linfomas Não Hodgkin
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PCR	Polymerase chain reaction
PFS	Sobrevida Livre de Progressão
R-CHOP	Protocolo de quimioterapia e imunoterapia que consiste em Rituximabe, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona
R-DHAP	Protocolo de quimioterapia e imunoterapia que consiste em Rituximabe, Dexametasona, Citarabina em altas doses, Platina
R-GDP	Protocolo de quimioterapia e imunoterapia que consiste em Rituximabee, Gencitabina, Oxaliplatina e Dexametasona

R-ICE	Protocolo de quimioterapia e imunoterapia que consiste em Rituximabe, Ifosfamida, Carboplatina, Mesna e Etoposide
RS	Estado do Rio Grande do Sul
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	14
2.2 Fisiologia das células natural killer	15
2.3 Células NK	19
2.4 APCs/célula feeder	20
2.4.1 aAPCs	22
3. MARCO CONCEITUAL	24
4. JUSTIFICATIVA	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo principal	26
5.2 Objetivo secundário	26
6. MATERIAL E MÉTODOS	27
7. DESCRIÇÃO DO DESENHO DO ESTUDO	28
7.1 População do estudo e tamanho amostral	28
7.2 Centro participante	29
7.3 Critérios de inclusão	29
7.4 Critérios de Exclusão	29
7.5 Forma de avaliação da célula NK	29
7.5.1 Preparação do produto celular NK	29
7.5.2 Citometria de fluxo	30
7.5.3 Citotoxicidade da célula NK.....	30
7.5.4 PCR para a oncoproteína BCR-ABL	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
9. ARTIGO EM PROCESSO DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO DE PUBLICAÇÃO	37
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
11. PERSPECTIVAS FUTURAS	63
12. APÊNDICES	64
Apêndice I – Orçamento	64
Apêndice II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67

Apêndice III – STROBE guideline—checklist dos itens:	70
Apêndice IV – Carta de aprovação do Comitê de Ética.....	71

1. INTRODUÇÃO

Linfoma Não Hodgkin (LNH) são doenças malignas que surgem de células do sistema imunológico e se manifestam predominantemente como linfadenopatia ou tumores sólidos que são os conglomerados linfonodais. A classificação dos LNH é complexa e em constante evolução, com mais de 50 subtipos diferentes listados na classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS).¹

Os tratamentos para LNH incluem poliquimioterapia com ou sem imunoterapia, e transplante de célula tronco hematopoiética (TCTH) em alguns casos. Protocolos com o uso de poliquimioterapia como Rituximabe, ciclofosfamida, cloridrato de doxorubicina, sulfato de vincristina e prednisona (protocolo R-CHOP)² curam a maioria dos pacientes no cenário de linha de frente nos subtipos mais comuns embora aproximadamente 30% a 45% dos pacientes apresentem recidiva e necessitem de segunda linha terapia.

Poucos pacientes com recidiva após R-CHOP atingirão remissão completa (CR) para regimes de segunda linha e imunoterapias medicamentosas como rituximabe associado a poliquimioterapia como ifosfamida, carboplatina, etoposídeo (R-ICE), ou com dexametasona, citarabina em altas doses, platina (R-DHAP) ou rituximabe, gencitabina, dexametasona, platina (R-GDP), e mais de 25% dos pacientes terão uma sobrevida livre de progressão durável (PFS). Subconjuntos de pacientes com características relacionadas a doença, estadiamento, índice prognóstico internacional (IPI) podem ser identificados quanto a resposta e evolução relacionada aos tratamentos,³⁻⁶ mesmo aqueles que ainda têm uma boa chance de remissão durável com uma abordagem baseada em tratamento de resgate com quimioterapia de alta dose e TCTH, sendo o padrão de tratamento para pacientes jovens e em boa forma, considerados “elegíveis” com base em taxas de respostas mais elevadas na era pós Rituximab,⁷ mas alternativas de tratamentos para pacientes considerados não elegíveis para o resgate com TCTH⁸⁻¹¹ ou mesmo que recidivaram após Transplante é que são necessários e vem sendo estudados nas doenças hematológicas.

Novas abordagens de tratamento também são necessárias para pacientes com recidiva após a terapia de primeira linha e que não são considerados candidatos para quimioterapia de alta dose e transplante de medula óssea e desta forma a terapia celular vêm ganhando espaço no tratamento destes tipos de doenças, terapias com CAR T Cell (“CAR” é um acrônimo em inglês para *chimeric antigen receptor* – em português, receptor quimérico de antígeno). O “T” refere-se ao linfócito T, um tipo de célula do sistema imunológico que consegue reconhecer antígenos existentes na superfície celular de agentes externos ou internos infecciosos e de tumores, produzindo anticorpos para combater tais invasores. Ou seja, atua como defesa do corpo. Então,

uma célula CAR-T é um linfócito T que passou por uma modificação genética)¹²⁻¹⁴ e Células NK de doadores que podem ser expandidas *in vitro*¹⁵⁻¹⁸ sem um custo tão elevado atualmente como a terapia do Car T cell.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão está baseada nas principais características das células NK e na capacidade de expansão das células natural killer (NK) “in vitro” e a sua utilização na imunoterapia adotiva, terapia com células NK autólogas. A procura de informações, dados, citações foi realizada nas bases de dados: Library of Medicine (PubMed) e Scientific Electronic Library Online (SciELO) além da consulta de livros on-line no período de publicação entre 1975 e 2023. Foram realizadas buscas utilizando os termos: “human natural killer cells”, “cellular immunotherapy”, “Non Hodgkin treatment”, “immune therapy for lymphoma non Hodgkin treatment”, “cell culture techniques”, “cell grown”, “immunotherapy adoptive” e suas combinações para selecionar os 50 artigos em que continham dados relacionados a terapia celular NK, crescimento celular NL a partir de células feeders/células apresentadoras de antígenos (APCs) bem como perspectivas futuras de fabricação e de uso da imunoterapia celular NK no tratamento de doenças neoplásicas.

Na Figura 1 é apresentado o fluxograma no processo de busca e revisão de literatura em que foram utilizados os termos abaixo citados:

- 1) Natural killer cells;
- 2) Cellular immunotherapy;
- 3) Non Hodgkin lymphoma;
- 4) Cell culture techniques;
- 5) Cell grown;
- 6) Immunotherapy adoptive.

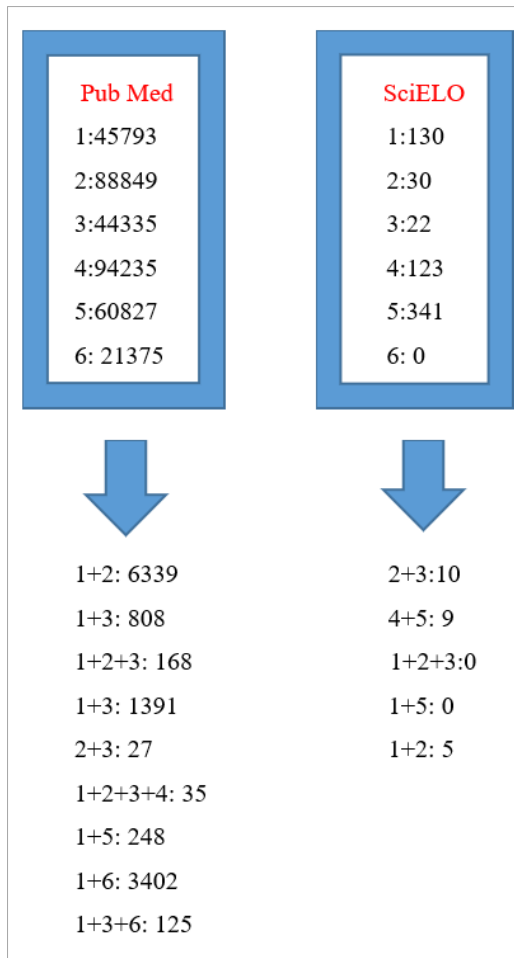


Figura 1. Fluxograma no processo de busca e revisão de literatura

2.2 Fisiologia das células natural killer

Células NK são células do nosso sistema imune linfóide inato que desempenham um papel fundamental na resposta a infecção virais e progressivamente vem sendo estudadas no tratamento contra diversos tipos de câncer.¹⁷⁻²⁵

As células NK estão envolvidas não apenas na eliminação de células infectadas por vírus ou tumorais, mas também na regulação da resposta imune, produzindo citocinas e quimiocinas que podem ativar outros componentes celulares da imunidade inata e adaptativa. O ambiente não hematopoiético como o que encontra-se nos quadros tumorais, em situações fisiológicas como no envelhecimento ou circunstâncias de imunossupressão é um contribuidor importante para a maturação e função prejudicadas das células NK.²⁶

Para recordarmos alguns tópicos sobre as células NK, elas representam cerca de 10–20% dos linfócitos do sangue periférico. As células NK humanas podem ser subdivididas em duas populações com base na densidade do antígeno CD56 da superfície celular. A maioria (~ 90%) expressa níveis elevados de FC γ RIII (CD16) e são CD56dim, embora uma subpopulação

CD16dim / neg CD56bright com atributos funcionais distintos também tenham sido descrita.²⁶ As respostas funcionais NK ocorrem nos tecidos e dependem do equilíbrio dos sinais ativadores e inibitórios. A inibição, sinalizada principalmente por meio da interação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) com os receptores NK inibitórios na superfície das células NK, evita a autoagressão. A perda da expressão de superfície dessas moléculas, que é frequentemente causada por infecção viral ou transformação maligna, resulta na “perda do auto reconhecimento”²⁷ pelas células NK e leva à ativação das células NK e à morte das células-alvo.^{27,28}

Uma vez ativadas, as células NK são citolíticas e, portanto, apresentam semelhanças funcionais com os linfócitos T citotóxicos (CTLs). Para populações de células NK, a proliferação e a expansão precedem principalmente a ativação, enquanto para os linfócitos T CD8 + na maioria das vezes a expansão segue a ativação^{25,27,29} e a função e a dinâmica das células NK podem ser afetadas por estados fisiológicos ou patológicos, como por exemplo o envelhecimento, infecção viral^{25,26,29,30} e no caso das doenças hematológicas malignas, o microambiente tumoral³¹, onde as células NK atuam na imunovigilância, e encontrar-se-ão alteradas por uma série de fatores e mesmo pelas próprias células tumorais, e que desta forma conseguem evadir da resposta imune levando ao desenvolvimento dos tumores.

Posteriormente a sua ativação como já discutido acima, as células NK adquirem a capacidade de lisar uma ampla gama de alvos tumorais cultivados normalmente incluindo linhagens celulares de linfoma.^{15-17,32,33} A atividade antitumoral das células NK pode ser potencializada por citocinas, particularmente IL-2, que foi inicialmente considerada uma droga antineoplásica promissora por sua capacidade de aumentar a atividade antitumoral das células T e NK³⁴. Posteriormente foi demonstrado que altas doses de IL-2 são sinérgicas com o anticorpo monoclonal rituximabe e atuam contra linhagens celulares resistentes ao rituximabe, desta forma sugerindo que a IL-2 fornece um forte estímulo para a citotoxicidade celular NK dependente de anticorpos (ADCC).^{20,28,32-34} Vários estudos têm apoiado um papel da IL-2 na terapia e para manutenção de remissão, mas a eficácia clínica ainda tem sido limitada conforme os dados publicados até o momento.^{19,27,32-36}

Mesmo sendo constantemente estudado, os mecanismos de resistência tumoral ao rituximabe permanecem pouco compreendidos. No entanto, foram relatados mecanismos de resistência que dificultam as três principais vias de ação do rituximabe – ADCC, citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e a indução de apoptose.³⁷

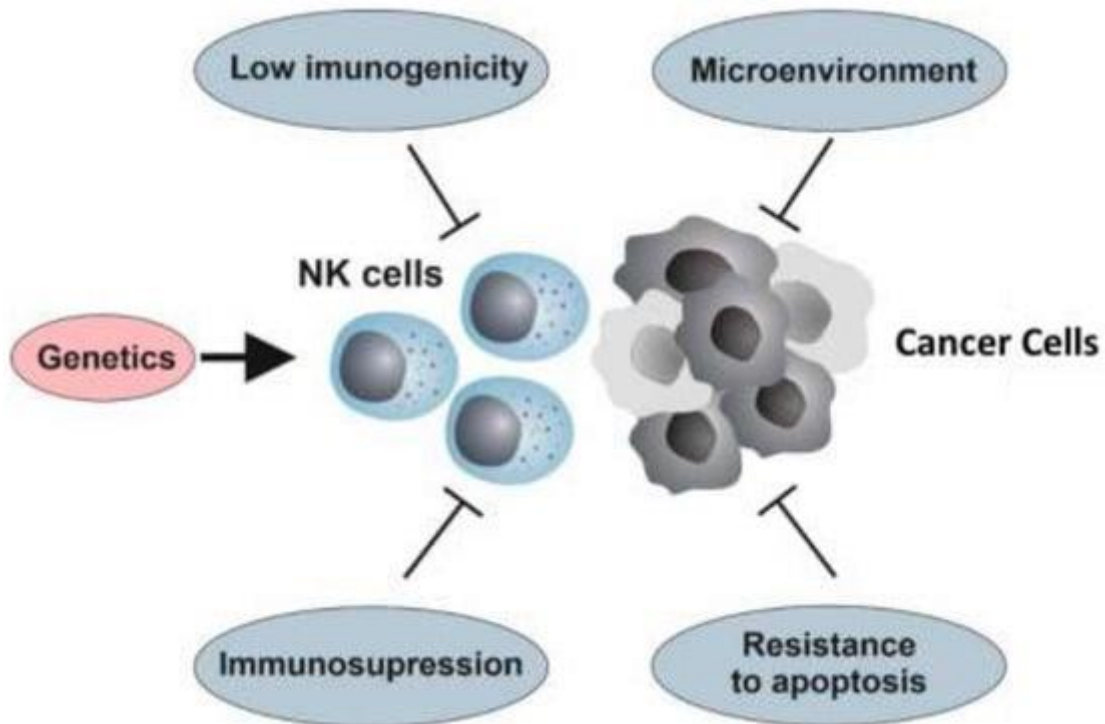


Figura 2. Resistência à imunoterapia mediada por células natural killer (NK). A base genética que modula a biologia das células NK, a resistência das células cancerosas à apoptose e a complexa interação entre o tumor e seu microambiente com o sistema imunológico – um processo conhecido como imunoedição, que pode reduzir a imunogenicidade do câncer, promovendo assim a imunossupressão —são fatores cruciais de resistência tumoral às terapias baseadas em células NK.³³

O processo de imunoedição exercido durante a transformação e progressão tumoral leva ao surgimento de clones tumorais resistentes ao ataque imunitário. Esses mecanismos de evasão imunológica adquiridos durante o desenvolvimento do câncer em indivíduos munocompetentes fornecem amplamente resistência intrínseca à imunoterapia. A imunoterapia exerce adicionalmente uma pressão seletiva sobre as células tumorais, gerando “mutantes de fuga”, claramente exemplificados pela perda ou modulação da expressão de CD20 em pacientes sob terapêutica com rituximabe, o que pode levar ainda ao desenvolvimento de resistência adquirida conforme já descrito.^{11,33,38} Alguns polimorfismos genéticos envolvidos na regulação das funções das células NK têm sido associados à eficácia das terapias com células NK em relação a sua afinidade pelo rituximabe, e desta forma respondendo na qualidade da eficácia da atividade de ADCC mediada por células NK e consequentemente refletindo na resposta clínica. Anticorpo monoclonal anti CD-20 de segunda geração e com maior afinidade ao CD16, como o obinutuzumabe, demonstrou uma eficácia antitumoral aumentada em comparação com a do rituximabe na leucemia linfocítica crônica e nos linfomas indolentes, foliculares, embora os dados clínicos ainda sejam mais iniciais e baseados em doses mais elevadas de obinutuzumabe.^{11,39,40}

Apesar das evidências descritas na literatura, os dados relativos à arquitetura genética que modula a vida e a função das células NK e, especialmente, a sua implicação na eficácia/resistência

às terapias baseadas em células NK, ainda são escassos e não muito claros. Algumas informações sugerem claramente que a formação genética do indivíduo pode ser um determinante intrínseco para o grau de sucesso da terapia com células NK³³ e com base neste pensamento que a experiência clínica mostra que as células NK alogênicas são mais eficazes que as células NK autólogas, pois podem tirar vantagem do reconhecimento do “eu perdido”(missing-self²⁷) devido à falta de interação KIR-HLA classe I. Os genes KIR são altamente poligênicos e polimórficos, com diferentes números de genes KIR ativadores e inibitórios em diferentes indivíduos, cada um deles variando em expressão e atividade funcional.⁴⁰ Os genes KIR (cromossomo 19) e HLA classe I (cromossomo 6) segregam independentemente, o que resulta em combinações variáveis de KIR-HLA classe I nos indivíduos. Para estabelecer a autotolerância, os alelos inibitórios KIR e HLA classe I de cada indivíduo constituem o repertório de células NK durante o desenvolvimento. Assim, o envolvimento de KIRs inibitórios com moléculas próprias de HLA-I educa ou “licencia” as células NK para a sua função.⁴¹ As combinações KIR-HLA classe I afetam significativamente a atividade das células NK, ADCC e prognóstico e têm um impacto significativo nos resultados da ação destas diante de infecção, na suscetibilidade a doenças autoimunes,^{41,42} e possivelmente nas doenças neoplásicas.

Foi demonstrado que as células NK humanas exibem propriedades semelhantes às da memória,^{24,25} com uma resposta de recordação aprimorada após a pré-ativação de citocinas ou mesmo c em combinações destas incluindo interleucina-12 (IL-12), IL-15, IL-18 ou células de leucemia K562 fornecendo então a justificativa para a integração da pré-ativação em estratégias de imunoterapia de células NK. Estratégia esta que exibiria respostas antitumorais potentes, induzindo remissões completas e mantendo segurança na sua utilização, em termos de toxicidade e ou reações adversas secundárias, e como foi demonstrado pelo nosso grupo no tratamento de pacientes portadores de leucemia mielóide aguda.²²

Da mesma maneira, foi relatado que há segurança e viabilidade da terapia com células NK alogênicas em pacientes com linfoma;¹⁹ no entanto, o Treg do hospedeiro e a imunodepleção inadequada podem contribuir para um ambiente hostil a sobrevivência e expansão das células NK, assim sendo, relatou-se a necessidade de incorporar novas estratégias para limitar a expansão das células Treg,¹⁸ em terapias celulares NK, desta forma tal manobra vem sendo abordada com resultados gratificantes e encorajadores no tratamento de pacientes portadores de Leucemia Mielóide Aguda com terapia celular NK associada a terapêutica prévia visando a Linfodepleção e melhor resposta clínica,²¹⁻²³ mas há poucos dados sobre sua atividade nos pacientes portadores de linfoma,^{18,19,43} a eficácia encorajadora observada para essas terapias celulares, como o uso de CAR T cell¹²⁻¹⁴ em pacientes fortemente pré-tratados levanta a questão relacionada a terapia NK

neste perfil de pacientes com o uso de células NK de doadores que possam ser expandidas “*in vitro*”¹⁵⁻¹⁸ através da utilização de *feeders* /APCs artificiais (aAPCs) sem um custo tão elevado como a terapia do Car T cell vista atualmente, então desta forma buscamos avaliar e talvez buscar informações mais claras do nosso perfil de paciente e do comportamento das células NK dos mesmos quando expandidas “*in vitro*” em um estudo primariamente pré clínico.

2.3 Células NK

As células NK são os principais efetores da resposta antitumoral e dirigem os braços inato e adaptativo do sistema imunológico:

- a) As células NK são as primeiras respondentes do sistema imunológico e podem reconhecer e lisar diretamente as células tumorais. Os receptores ativadores nas células NK reconhecem ligantes que são expressos principalmente em células comprometidas, enquanto os receptores inibitórios se ligam a autoligantes que marcam células normais e saudáveis;
- b) As células NK também expressam o receptor CD16 Fc γ RIII que se liga a anticorpos e desencadeia ADCC. Esta resposta contribui para a eficácia de muitas das terapêuticas contra o câncer baseadas em anticorpos monoclonais;
- c) As células NK não apenas lisam diretamente as células comprometidas causando a liberação de antígenos tumorais, mas quando ativadas liberam citocinas como TNF- α e IFN- γ , este último conhecido por induzir a expressão de PD-L1, que pode recrutar outras células do sistema imunológico e inflamar ou “aquecer” o microambiente do tumor, preparando-o para a imunoterapia;
- d) As células NK intratumorais produzem CCL5 e XCL1(5), bem como FLT3LG, a citocina formativa de raras células dendríticas estimuladoras intratumorais (cDC1) que podem ativar a resposta imune adaptativa. Também foi demonstrado que as células NK recrutam diretamente células T, liberando citocinas como IL-8, CCL3 e CCL5;
- e) Além disso, as células NK podem liberar exossomos com atividade citotóxica e podem conter miRNAs efetores, citocinas e exibir receptores de superfície de células NK.

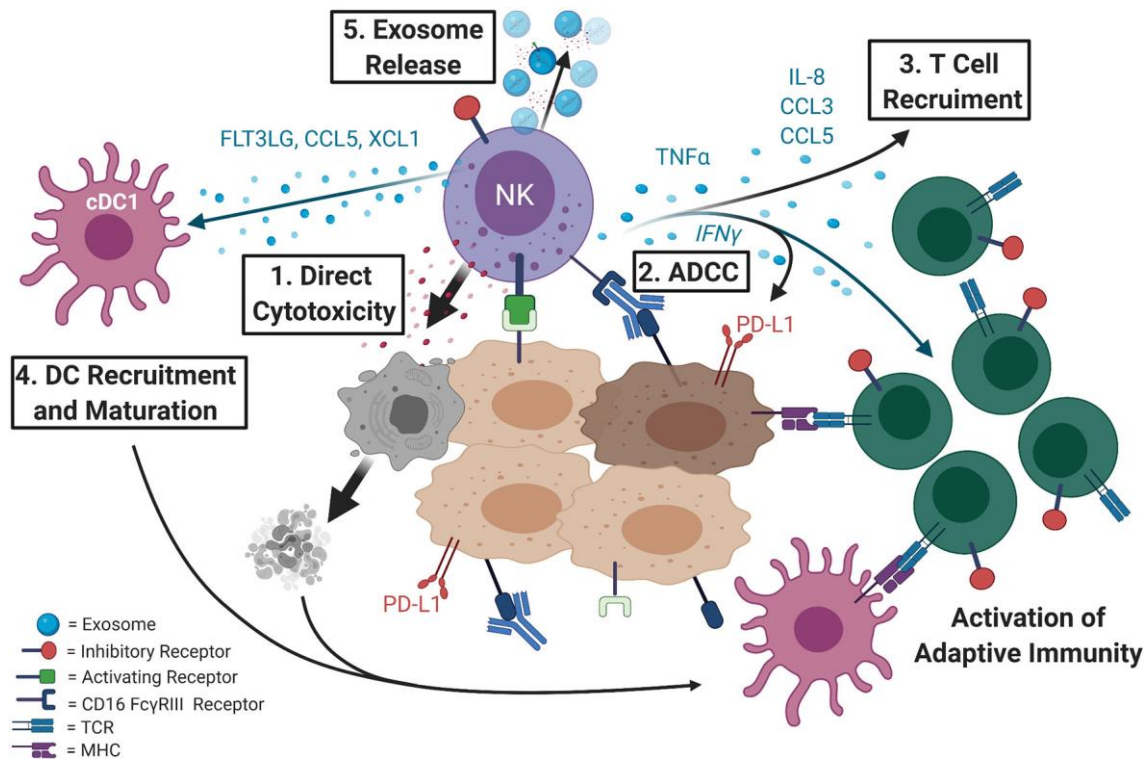


Figura 3. Células NK.³⁵

2.4 APCs/célula feeder

As APCs, como as células dendríticas (DCs) e os linfócitos, são compostas por diversos subgrupos com funções efetoras específicas. Duas linhagens principais de DCs são reconhecidas: a linhagem mielóide, que inclui células de Langerhans e DCs intersticiais, e a linhagem plasmocitóide.

Foi demonstrado previamente que há a expansão bem-sucedida de linfócitos humanos usando APCs artificiais (aAPCs) no lugar de APCs naturais. Foi escolhido a linhagem celular K562, derivada da eritroleucemia humana como arcabouço porque as células não expressam moléculas importantes do complexo de histocompatibilidade, o que impede respostas alogênicas. As células também contêm moléculas de adesão que aumentam as interações célula T-aAPC. Foi criado um sistema aAPC melhorado para expressar uma gama diversificada de moléculas co-estimulatórias e de antígeno linfocitário humano (HLA).

Após foi descrito a utilização da tecnologia de vetor lentiviral para demonstrar a expressão estável na superfície de pelo menos sete genes nas aAPCs baseados em células K562. As aAPCs têm uma eficiência comparável a das DCs naturais para impulsionar a expansão de células T; são especialmente eficientes para a ativação de células T CD8 humanas, para a manutenção da expressão superficial de CD28 e para a expansão de células T geneticamente modificadas.

Finalmente, os ligantes co-estimulatórios nas aAPCs permitem a proliferação e expansão eficiente de células T CD8 sem o uso de citocinas exógenas ou células alimentadoras, como usado nos processos atuais de cultura celular.⁴⁴

Como células NK têm potencial terapêutico para o tratamento de uma grande variedade de neoplasias humanas, mas se expandem pouco *in vitro*, têm tempo de vida limitado *in vivo* e representam uma pequena fração de glóbulos brancos periféricos, a obtenção de números suficientes de células é o principal obstáculo para a imunoterapia com células NK.

Células de apresentação de aAPCs expressando IL-15 ligada à membrana (mbIL15) têm sido usadas para propagar células NK de grau clínico para testes em humanos de imunoterapia adotiva, mas a proliferação *ex vivo* tem sido limitada pelo encurtamento dos telômeros. Também foi desenvolvido previamente aAPCs à base de K562 com IL-21 ligada à membrana (mbIL21) e avaliado sua capacidade de suportar a proliferação de células NK humanas. Em contraste com mbIL15, as aAPCs que expressam mbIL21 promoveram expansão log-fásica de células NK sem evidência de senescência por até 6 semanas de cultura.¹⁵ No dia 21, a expansão paralela de células NK de 22 doadores demonstrou uma expansão média de 47.967 vezes (mediana de 31.747) quando co-cultivadas com APCs expressando mbIL21 em comparação com expansão de 825 vezes (mediana de 325) com mbIL15 conforme descrito por Denman et al.¹⁵

O aumento significativo na proliferação, as células NK expandidas por mbIL21, estas também apresentaram citotoxicidade significativa contra todas as linhagens de células tumorais testadas, mantiveram a responsividade aos ligantes KIR inibitórios e demonstraram maior matança via citotoxicidade celular dependente de anticorpos, apoiando seu uso clínico na propagação de células NK para imunoterapia adotiva.¹⁵

Desta forma foram utilizadas para a expansão das células NK a nível clínico o protocolo de padronização de Cultivo Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rio Grande do Sul (RS), já estabelecido e em Cooperação com o M.D. Anderson Cancer Center da Universidade do Texas (Estados Unidos), com as células K562 que derivam da linhagem celular K562 de eritroleucemia humana e apresentam a translocação t(9;22) (Cromossomo Filadélfia) expressando o gene de fusão BCR-ABL. Estas células foram modificadas geneticamente (mIL21-K562 Clone 9) e atuam como APCs, expressando os marcadores linfocitários para a ativação dos linfócitos.

2.4.1 aAPCs

- a) Representação esquemática de células alimentadoras K562/41BBL/mb15 e K562/41BBL/mb15/mb21 que expressam fatores pró-NK ligados à membrana ligante 4-1BB (4-1BBL), IL-15 (mb15) e IL-21 (mb21);
- b) Células K562/41BBL/mb15/mb21 foram geradas por transdução de células K562/41BBL/mb15 com vetor lentiviral pS-21.TM-IRW, que codifica sob o controle do vírus formador de foco no baço promotor (SFFV), uma fusão de IL-21 ligada através de uma região de dobradiça CD8 α flexível ao domínio intracelular transmembranar e truncado de CD28 (TM), seguido por um local de entrada de ribossomo interno (IRES) e proteína fluorescente de infravermelho próximo codificando cDNA (iRFP) como marcador. SP, peptídeo sinal de imunoglobulina; M, etiqueta Myc; LTR, repetição terminal longa 5' do HIV-1; Ψ , sinal de empacotamento do HIV-1; RRE, elemento de resposta HIV-1 Rev; WPRE, elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite animal (espécie: marmota); LTR/ Δ U3, HIV-1 3' LTR em configuração de autoinativação (SIN);
- c) Posteriormente a transdução, células K562/41BBL/mb15/mb21 com expressão de proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) e iRFP (linha sólida vermelha) foram enriquecidas por classificação de células a nível do citometro de fluxo e analisadas quanto à expressão superficial de IL-21, IL-15 e 4-1BBL usando antígenos específicos.

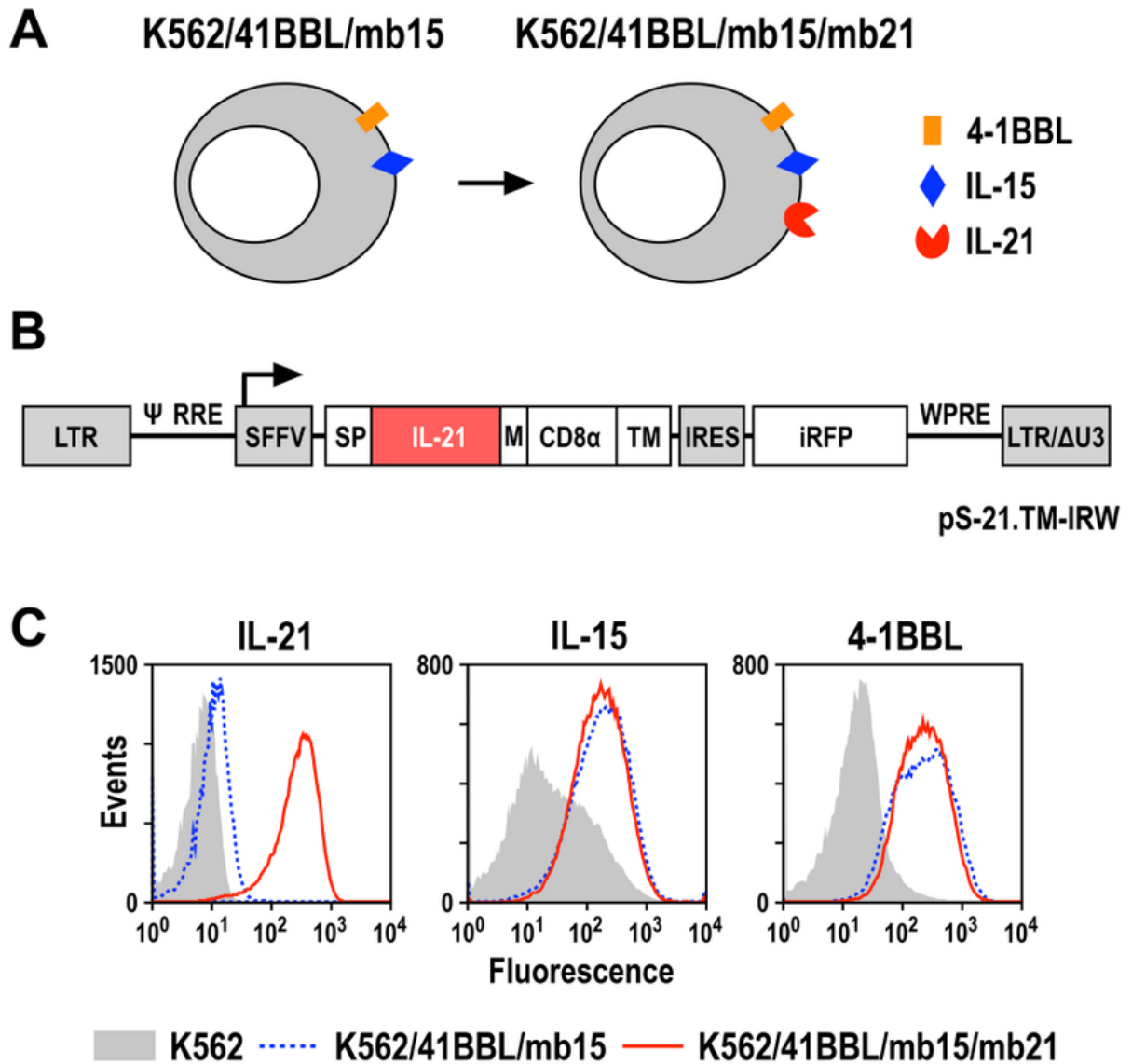


Figura 4. aAPC/feeder: células alimentadoras K562 geneticamente modificadas para expansão de células NK.⁴⁵

3. MARCO CONCEITUAL

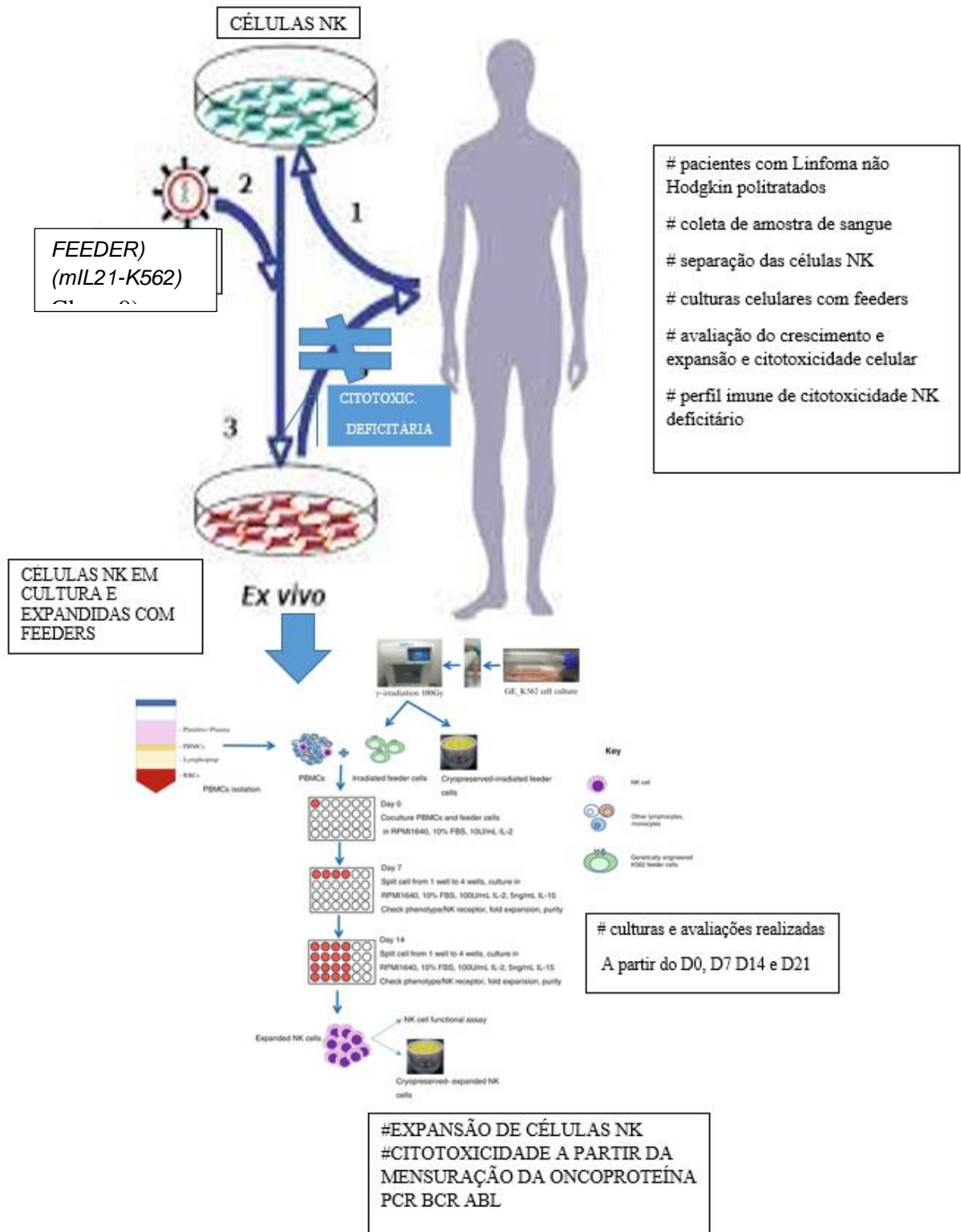


Figura 5. Marco conceitual. 46-48 (adaptação)

4. JUSTIFICATIVA

Como amplamente discutido as células NK têm capacidade significativa na vigilância imunológica de tumores e, de forma mais adequada, tem seu papel no tratamento de alguns tumores recidivados e refratários, podendo ser mais amplamente explorada por ter mais factível em nosso sistema de saúde.

A capacidade de lisar células transformadas imediatamente de uma maneira independente do antígeno as torna candidata atraente para a terapia com células tumorais, mas precisávamos primeiramente analisar se as células NK ainda eram viáveis nos pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários.

Desta forma buscamos analisar a capacidade de expansão e crescimento das células NK em nível clínico, neste perfil de pacientes, ou seja, pacientes imunocomprometidos pela doença e seus tratamentos, esta análise foi feita *in vitro*, e também avaliamos a citotoxicidade desta célula NK expandida, ou seja, capacidade desta de lisar a oncoproteína (BCR-ABL) presente na célula aAPC/feeder, em outros termos, seu efeito anti-tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo principal

Avaliar a viabilidade de expansão de células NK em grau clínico nos pacientes com LNH recidivado e ou refratários a terapias prévias.

5.2 Objetivo secundário

Avaliar destes doadores-pacientes com LNH recidivados e ou refratários o crescimento (número, tempo através de *fold expansion* e *doubling time*) e a efetividade das células NK (capacidade de lise da célula *feeder*/célula alvo).

6. MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes com linfoma não Hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias foram selecionados para testar em 50ml de sangue venoso quanto a possibilidade de expandir células NK, em grau clínico – suficiente para realizar 6 infusões/paciente de aproximadamente 10^7 células NK/Kg utilizando nossa plataforma tecnológica de expansão já aprovada e utilizada no tratamento da leucemia mielóide aguda recaída ou refrataria. As células NK serão isoladas e expandidas conforme as Boas Práticas de Manufatura definidas na RDC 508 de 27 de maio de 2021.

O presente projeto foi submetido à apreciação na Plataforma Brasil/ Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). A criação do termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo, colocar número do anexo) atendeu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos contidas na Resolução nº. 466, de 12 de dezembro de 2012, e resolução de nº. 251, de 07 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde, bem como na Declaração de Helsinki VI e Código de Nuremberg.

Os pacientes receberam informações claras e objetivas dentro de sua compreensão, a fim de que pudessem ser esclarecidas as finalidades, os propósitos, bem como os riscos e benefícios diretos da pesquisa com a qual iriam contribuir.

7. DESCRIÇÃO DO DESENHO DO ESTUDO

Estudo pré-clínico *in vitro* para avaliação da população das células NK.

Para a coleta de amostra de sangue visando análise das células NK:

- a) Foram incluídos pacientes com Pacientes com LNH recidivado ou refratários a terapias prévias, aqueles que não se beneficiaram do tratamento padrão (poliquimioterapia, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas) bem como pacientes não elegíveis para transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas;
- b) Foram incluídos pacientes que atendiam aos critérios de inclusão e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

7.1 População do estudo e tamanho amostral

O cálculo amostral não foi possível de ser realizado tendo em vista tratar-se de um estudo pré clínico, e de acordo com a dados da bibliografia os estudos para análise de células NK autólogas em pacientes portadores de LNH, ou outros tumores, foram realizados “*in vitro*” sendo através de amostras de células tumorais de pacientes e avaliação das células NK dos mesmos foi feita posteriormente após uso de Interleucina-2 “*in vivo*” ou mesmo estudos com avaliação das células NK utilizadas de doadores saudáveis em modelos murinos com neoplasias diversas, ou terapias adotivas com células NK mas de doadores, ou seja, alogênicas.^{16-23,41,45,48,49}

Como não havia o conhecimento do desvio padrão ou as frequências populacionais da variável, e não conseguimos dispor de dados semelhantes na literatura é que buscamos fazer este estudo pré-clínico visando esta análise no nosso perfil de paciente.

A população estudada foi de seis pacientes que preenchiam aos critérios de inclusão, estes pacientes tinham seguimento e acompanhamento no ambulatório de Doenças Linfoproliferativas/Linfomas do Serviço de Hematologia do HCPA, RS, Brasil.

A população controle, ou seja, de doadores saudáveis, utilizada para a comparação, foi a partir de três doadores saudáveis, os quais as amostras de sangue foram coletadas e analisadas previamente e utilizadas para validação deste método de expansão celular NK no Centro de Processamento Celular Avançado (CPCA) do HCPA – RS, e que contemplavam a mesma técnica de avaliação de células NK.

7.2 Centro participante

HCPA, RS, Brasil.

7.3 Critérios de inclusão

A avaliação de células NK foi feita em:

- Pacientes com LNH recidivado e ou refratários a terapias prévias, aqueles que não se beneficiaram do tratamento padrão (poliquimioterapia com ou sem imunoterapia não celular, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas) foram incluídos neste estudo, bem como pacientes não elegíveis para transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas;
- Todos os pacientes precisam ter 18 anos ou mais e com linfoma do tipo não Hodgkin confirmados histologicamente por exame anatomopatológico e imunohistoquímico;
- Escala de Desempenho de Karnofsky > 70 ou Status de Desempenho do Eastern Cooperative Oncology Group de 0 a 2 com pelo menos 3 meses de sobrevida esperada;
- Assinatura TCLE.

7.4 Critérios de Exclusão

Não foi avaliada células NK em pacientes que não preenchiam os critérios de inclusão, ou portadores de outras neoplasias associadas, distúrbios alérgicos graves e ou soropositivos para o HIV.

7.5 Forma de avaliação da célula NK

7.5.1 Preparação do produto celular NK

O produto NK deste ensaio foi produzido no Centro de Tecnologia e Terapia Celular (CTTC) do HCPA e todos os procedimentos foram validados de acordo com seu regimento.

O produto das células NK foi obtido inicialmente pelo isolamento de células mononucleares do sangue periférico com Ficoll-Hypaque. A seguir, a suspensão de mononucleares foi depletadas de células T CD3+ usando o sistema Miltenyi - MidiMACS®

(Miltenyi Biotec, Auburn, CA) com MACS coloidal super-paramagnético CD3 MicroBeads, conjugado com anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano contra CD3 (Miltenyi Biotec), de acordo com os POPs desenvolvidos para este fim. O laboratório tem procedimentos bem estabelecidos para este sistema.

7.5.2 Citometria de fluxo

O produto celular foi analisado por citometria de fluxo usando BD Pharmingen™ conjugado com fluorocromo anticorpos: anti-CD3 APCH-7, anti-CD16 Pe-Cy7, anti-CD56 BB515, anti-CD19 PE, anti-CD32 APC, e 7AAD. Um total de 100.000 eventos foram adquiridos utilizando o equipamento FACS Canto II através do Software de aquisição BD FACS Diva™ TM Infinicyt™ versão 1.8 foi utilizado para a análise dos dados.

As células NK foram isoladas e expandidas conforme as Boas Práticas de Manufatura definidas na RDC 508 de 27 de maio de 2021 e de acordo com os procedimentos descritos no Procedimento Operacional Padrão (POP). Resumidamente, os PBMC depletados de células T são colocados em cultura com K562 cl9.mbIL-21 em uma proporção de 2:1 (K562 cl9.mbIL-21: PBMC). As culturas foram mantidas em RPMI1640 suplementado com soro bovino fetal a 10%, glutamina 1%, antibiótico 1% e 100 UI/mL de Interleucina-2 (IL-2), com reposição dos meios, conforme necessário, em estufas de CO₂. Após sete, quatorze e vinte e um dias, as culturas foram reestimuladas com feeders (K562 cl9.mbIL-21).⁴⁰

A partir destas contagens foi também avaliado o *doubling time*, o tempo em dias que leva para a população celular dobrar em tamanho/valor em cada condição de cultura. O *doubling time* foi calculado utilizando a calculadora on-line de tempo de duplicação⁵⁰ e o *fold expansion* foi calculado dividindo o número absoluto de células NK viáveis presentes no final da cultura dos respectivos dias da cultura (dia 7, 14 e 21) pelo número absoluto de células NK viáveis no início da cultura (dia 0).

7.5.3 Citotoxicidade da célula NK

A citotoxicidade significa a capacidade das células NK do doador paciente com Linfoma e dos doadores saudáveis de lisar, ou seja, destruir, as células-alvo e foi examinada usando uma liberação padrão de cromo no ensaio de citotoxicidade. Células feeders (K562 cl9.mbIL-21): K562 ($2 \cdot 10^6$) foram marcadas com 100 μ Ci 51 Cr por 1 hora a 37°C, 5% CO₂ e após as células NK dos pacientes e células K562 marcadas com Cr foram plaqueadas na proporção NK: K562

(K562 cl9.mbIL-21) de 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.10:1, 1.5:1 e 0.75:1. O sobrenadante foi colhido após 4 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂. Cr foi medido usando MicroBeta2 LumiJET (PerkinElmer Life and Analytical Science).

A citotoxicidade das células NK foi avaliada por citometria de fluxo no qual as células NK foram incubadas em diferentes concentrações a 37°C e 5% CO₂ por 4 horas em presença das células alvo (K562 cl9.mbIL-21). Após a incubação as células foram marcadas com CD13, CD15, CD33, CD34, CD71, CD56 e 7AAD. Para verificar a porcentagem de lise celular das células K562 e para isso foi avaliada a porcentagem de células 7AAD positivo. Um outro método de avaliação da citotoxicidade, ou seja, efetividade das células NK dos doadores pacientes com Linfoma foi também realizado através de *polymerase chain reaction* (PCR), da análise BCR-ABL, que se encontra presente na célula feeder, desenvolvidas a partir da linhagem celular K562 - eritroleucemia humana que apresenta a translocação (9,22) e expressam o gene de fusão BCR-ABL como já descrito previamente e que no caso deste estudo é a célula alvo a ser lisada, em outras palavras, destruída.

7.5.4 PCR para a oncoproteína BCR-ABL

Alíquotas das culturas do doadores pacientes com linfoma foram obtidas nos dias 7, 14 e 21 (final da cultura) e foram testadas quanto à presença da oncoproteína BCR-ABL, presente nas células feeders/alvo, utilizando o método de detecção através de PCR, pesquisa do gene de fusão BCR-ABL [translocação(9;22) (p190 e p210)].

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
2. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):379-91. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70664-7.
3. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, Anderson LA, Brenner H, Holleccek B, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):931-42. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70282-7.
4. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017 ;130(16):1800-1808. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620.
5. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccuini W, Hirschaud E, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4079-87. doi: 10.1200/JCO.2011.35.4423.
6. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17(4): 1244. doi: 10.1200/JCO.1999.17.4.1244.
7. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90. doi: 10.1200/JCO.2010.28.1618.
8. El Gnaoui T, Dupuis J, Belhadj K, Jais JP, Rahmouni A, Copie-Bergman C, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Ann Oncol*. 2007;18(8):1363-8. doi: 10.1093/annonc/mdm133.
9. Corazzelli G, Capobianco G, Arcamone M, Ballerini PF, Iannitto E, Russo F, et al. Long-term results of gemcitabine plus oxaliplatin with and without rituximab as salvage

- treatment for transplant-ineligible patients with refractory/relapsing B-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 Oct;64(5):907-16. doi: 10.1007/s00280-009-0941-9.
10. Hong JY, Yoon DH, Suh C, Kim WS, Kim SJ, Jo JC, et al. Bendamustine plus rituximab for relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Ann Hematol.* 2018;97(8):1437-43. doi: 10.1007/s00277-018-3317-6.
 11. Pierpont TM, Limper CB, Richards KL. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front Oncol.* 2018;8:163. doi: 10.3389/fonc.2018.00163.
 12. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol.* 2019;20(1):31-42. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
 13. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2019;380(1):45-56. doi: 10.1056/NEJMoa1804980.
 14. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang ML, Arnason JE, et al. Pivotal safety and efficacy results from transcend NHL 001, a multicenter phase 1 study of lisocabtagene maraleucel (liso-cel) in relapsed/refractory (R/R) large B cell lymphomas. *Blood.* 2019;134 (Supplement_1):241. doi: 10.1182/blood-2019-127508.
 15. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. A IL-21 ligada à membrana promove a proliferação ex vivo sustentada de células assassinas naturais humanas. *PLoS One.* 2012;7(1):e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264.
 16. Lee DA. Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev.* 2019;290(1):85-99. doi: 10.1111/imr.12793.
 17. Lamb MG, Rangarajan HG, Tullius BP, Lee DA. Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):211. doi: 10.1186/s13287-021-02277-x.
 18. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(11):1739-44. doi: 10.1007/s00262-010-0896-z.
 19. Gonzalez-Rodriguez AP, Villa-Álvarez M, Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez S. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J Clin Med.* 2019;8(10):1557. doi: 10.3390/jcm8101557.

20. Lim O, Lee Y, Chung H, Her JH, Kang SM, Jung MY, et al. GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(1):e53611. doi: 10.1371/journal.pone.0053611.
21. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. 2010;28(6):955-9. doi: 10.1200/JCO.2009.24.4590.
22. Silla L, Valim V, Pezzi A, da Silva M, Wilke I, Nobrega J, et al. Adoptive immunotherapy with double-bright (CD56bright/CD16bright) expanded natural killer cells in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a proof-of-concept study. *Br J Haematol*. 2021;195(5):710-21. doi: 10.1111/bjh.17751.
23. Vela M, Corral D, Carrasco P, Fernandez L, Valentin J, Gonzalez B, et al. Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett*. 2018;422:107-17. doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.033.
24. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(6):1915-9. doi: 10.1073/pnas.0813192106.
25. 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. doi: 10.1182/blood-2012-04-419283.
26. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, et al. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol*. 1999;34(2):253-65. doi: 10.1016/s0531-5565(98)00076-x.
27. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-s.
28. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8. doi: 10.1038/319675a0.
29. Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell*. 2004;3(4):177-84. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00107.x.
30. Albright JW, Albright JF. Age-associated impairment of murine natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(20):6371-5. doi: 10.1073/pnas.80.20.6371.

31. Malmberg KJ, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol.* 2017;31:20-9. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.002.
32. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(2):177-86. doi: 10.1038/sj.bmt.1704086.
33. Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Gonzalez S. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):893. doi: 10.3390/cancers12040893.
34. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(6):e1163462. doi: 10.1080/2162402X.2016.1163462.
35. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med.* 2019;7(5):105. doi: 10.21037/atm.2019.01.42.
36. Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, Ye H, Kunich JC, Garrett EN, et al. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother.* 2007;30(1):64-74. doi: 10.1097/01.cji.0000211315.21116.07.
37. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(2):203-16. doi: 10.1016/j.beha.2011.02.009.
38. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* 2018;19(7):723-732. doi: 10.1038/s41590-018-0132-0.
39. Umaña P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol.* 1999;17(2):176-80. doi: 10.1038/6179.
40. Prica A, Crump M. Improving CD20 antibody therapy: obinutuzumab in lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(3):573-582. doi: 10.1080/10428194.2018.1498490.
41. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetyneck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 2006;25(2):331-42. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.013.

42. Shaver KA, Croom-Perez TJ, Copik AJ. Natural Killer Cells: The Linchpin for Successful Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:679117. doi: 10.3389/fimmu.2021.679117.
43. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6287-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1347.
44. Roth V. Doubling time computing. In: *Doubling Time* [Internet]. 2006 [cited 2024 Mar 11]. Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
45. Oberoi P, Kamenjarin K, Ossa JFV, Uherek B, Bönig H, Wels WS. Directed Differentiation of Mobilized Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Functional NK cells with Enhanced Antitumor Activity. *Cells.* 2020;9(4):811. doi: 10.3390/cells9040811.
46. Menck CFM, Ventura AM. Manipulating genes in search of a cure: the future of gene therapy. *Rev USP.* 2007;(75):50-61.
47. Phan MT, Lee SH, Kim SK, Cho D. Expansion of NK Cells Using Genetically Engineered K562 Feeder Cells. *Methods Mol Biol.* 2016;1441:167-74. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7_14.
48. Somanchi, SS. *Natural killer cells: methods and protocols.* London: Springer; 2016.
49. Holmberg LA, Maloney D, Bensinger W. Immunotherapy with rituximab/interleukin-2 after autologous stem cell transplantation as treatment for CD20+ non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2006;7(2):135-9. doi: 10.3816/CLM.2006.n.051.
50. Chu Y, Lamb M, Cairo MS, Lee DA. The Future of Natural Killer Cell Immunotherapy for B Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B Cell NHL). *Curr Treat Options Oncol.* 2022;23(3):381-403. doi: 10.1007/s11864-021-00932-2.

**9. ARTIGO EM PROCESSO DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO DE
PUBLICAÇÃO**

**LOOKING TO EVALUATE NATURAL KILLER CELLS IN A PATIENTS PROFILE
WITH RELAPSED OR REFRACTORY NON-HODGKIN'S LYMPHOMA**

Santos MN^a, Pezzi A^{b,c}, Valim V^c, Soares TB^d, Tognon A^e, Fogliatto LM^d, Silla L^{b,d}

^a Hematology Service, Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, Brazil.

^b Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^c Advanced Cell Processing Center, Department of Clinical Hematology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil .

^d Hematology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

^e Education and Research Manager, Hospital São Vicente de Paulo, Passo Fundo, RS, Brazil.

Corresponding author:

Moema Nenê Santos

Serviço de Hematologia Hospital São Vicente de Paulo, Rua Teixeira Soares, 808

Zip code: 99010-080 Passo Fundo Brasil, Brasil Phone: 55 54 991555686 55 54 33112578

email:moemanene@gmail.com

ABSTRACT

Patients with Non-Hodgkin lymphoma (NHL) or cancer patients in general are immunocompromised. Natural Killer (NK) cells, cells of our innate immune system with recognized antitumor activity, can be cultured and expanded from blood samples from patients and healthy donors, as previously demonstrated. It has been reported that autologous NK cells cultured in the presence of interleukins for cellular immunotherapy of NHL, when expanded *ex vivo*, do not show antitumor efficacy. The use of an NK cell expansion platform, already established by our group, which uses genetically modified feeder cells [expressing IL-21 and 4-1BB (mbIL-21 or clone 9), with chromosome translocation (9,22) and express the BCR-ABL fusion protein)] results in significant expansion and activation of NK cells obtained from healthy donors, and could perhaps overcome the suppressed state of autologous NK cells from patients with NHL, thus promoting their expansion to scale for clinical use and perhaps restore its cytotoxic activity, which in turn could represent a therapeutic option for these patients. In this preclinical study, we tested this hypothesis by expanding cells from patients with relapsed or refractory NHL to available therapies. Six patients with relapsed or refractory NHL were tested and compared with healthy donors. Although we obtained cell numbers and culture kinetics comparable to those obtained from healthy donors, cells from patients with NHL showed decreased cytotoxic capacity and were unable to lyse the target cell (feeder/APC) effectively in *in vitro* culture, making it unviable the use of autologous cells expanded on our technological platform for these patients.

Keywords: NK cells; Antibody-dependent direct cytotoxicity; Non-Hodgkin lymphoma; feeder cells.

INTRODUCTION

According to data from the National Institute of Cancer in Brazil (INCA), the number of 12040 new cases of NHL is estimated for each year of the 2023/2025 triennium. Among the subtypes of non-Hodgkin's lymphomas, the most common is type B Cell.¹ Immunotherapy in the treatment Non-Hodgkin lymphoma (NHL) has been increasingly evaluated in recent years and NK cells in this setting have been very important, particularly after the introduction of rituximab and other second-generation monoclonal antibodies.²⁻⁵ Although the survival rate of newly diagnosed with B-cell NHL treated with chemotherapy and antibody-based regimens has greatly improved, but the prognosis is grim in patients with relapsed/refractory B-cell NHL with or without bone marrow transplantation.⁶⁻¹¹

The use of CAR T cells has been observed in patients with refractory and/or relapsed disease,¹²⁻¹⁴ but with its production time and cost still high for some patients in our Brazilian reality where there are still many patients without health insurance and added to in this condition we must remember that in this type of therapy there is a representative toxicity, unlike NK cell therapy in this aspect. Without such a high cost as currently seen with Car T cell therapy, NK cells from donors can be expanded in vitro¹⁵⁻²³ and thus can be used to treat various types of malignant neoplasms.^{16-18,24-31}

To remind us, NK cells are involved not only in the elimination of virus-infected or tumor cells, but also in the regulation of the immune response, producing cytokines and chemokines that can activate other cellular components of innate and adaptive immunity and even have the ability to retain an intrinsic memory, of prior activation, a function attributed until now only to antigen-specific adaptive immune cells,³² however the non-hematopoietic environment, such as that found in tumors, in physiological situations such as aging or circumstances of immunosuppression, is an important contributor to the impairment of maturation and function of NK cells.³³

Functional NK cell-mediated responses occur in tissues and depend on the balance of activating and inhibitory signaling. Inhibition, signaled primarily through major histocompatibility complex (MHC) interaction with inhibitory NK-cell receptors on the surface of NK cells, avoids self-aggression. Loss of surface expression of these molecules, often caused by viral infection or malignant transformation, results in loss of NK cell recognition (“missing-self recognition”),³⁴ leading to NK cell activation and target cell death.³⁵

Once activated, NK cells are cytolytic and therefore show functional similarities to cytotoxic T lymphocytes (CTLs). For NK cell populations, proliferation and expansion mainly

precede activation, while for CD8 + T lymphocytes expansion most often follows activation^{34,36,37} and NK cell function and dynamics can be affected by states physiological or pathological, such as aging,^{33,36-38} viral infection and in the case of malignant hematological diseases, the tumor microenvironment,²⁹ where NK cells act in immunosurveillance, and will be altered by a series of factors and even by the tumor cells themselves, which in this way manage to evade the immune response, leading to the development of tumors.

It was also demonstrated that the human NK cells have been shown to exhibit memory-like properties,^{32,36} with an enhanced recall response following pre-activation of cytokines or even combinations thereof including interleukin-12 (IL-12), IL-15, IL-18 or K562 leukemia cells thus providing the rationale for integrating preactivation into NK cell immunotherapy strategies. This strategy would exhibit potent antitumor responses, inducing complete remissions and maintaining safety in its use, in terms of toxicity and/or secondary adverse reactions, and as demonstrated by our group in the treatment of patients with acute myeloid leukemia.²⁷

After their activation as discussed above, NK cells acquire the ability to lyse a wide range of normally cultured tumor targets including lymphoma cell lines.^{15-17,39,40} The antitumor activity of NK cells can be enhanced by cytokines, particularly IL-2, which was initially considered a promising antineoplastic drug for its ability to enhance the antitumor activity of T and NK cells⁴⁴. It was later shown that high doses of IL-2 are synergistic with the monoclonal antibody rituximab and act against rituximab-resistant cell lines, thus suggesting that IL-2 provides a strong stimulus for antibody-dependent NK cell cytotoxicity (ADCC).^{25,35,39-42} Several studies have supported a role for IL-2 in therapy and maintenance of remission, but clinical efficacy has still been limited according to data published to date.^{24,30,34,39-41,43}

Methods of immune evasion in the lymphoma tumor microenvironment (TME) include immune checkpoints and thus hypoxia-induced altered modulation and aberrant expression of the NK cell receptor/ligand and thereby modification of their response. Similar to what has been described regarding the graft versus tumor effect in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for leukemia, early and robust NK cell recovery after autologous and allogeneic HSCT in lymphoma is associated with improved survival. To facilitate improvement in NK cell function after autologous HSCT in lymphoma, several studies have administered low doses of recombinant IL-2 as maintenance immunotherapy to prevent relapse.⁴⁴⁻⁴⁶

Similarly, it has been reported that there is safety and feasibility of allogeneic NK cell therapy in patients with lymphoma,²⁴ however, host Treg and inadequate immunodepletion may contribute to a hostile environment for NK cell survival and expansion, therefore, the need to incorporate new strategies to limit Treg cell expansion,¹⁸ in NK cell therapies has been reported,

in this way, this maneuver has been approached with gratifying and encouraging results in the treatment of patients with Acute Myeloid Leukemia with NK cell therapy associated with previous therapy aimed at Lymphodepletion and better clinical response,²⁶⁻²⁸ but there is little data on its activity in patients lymphoma patients,^{18,24,47} the encouraging efficacy observed for these cell therapies, such as the use of CAR T cell¹²⁻¹⁴ in heavily pretreated patients raises the question related to NK therapy in this profile of patients with the use of NK cells of donors that can be expanded “in vitro”¹⁵⁻¹⁸ through the use of artificial feeders/APCs (aAPCs) without as high a cost as Car T cell therapy currently seen, so in this way we seek to evaluate and perhaps seek clearer information of our patient profile and the behavior of their NK cells when expanded “in vitro” in a primarily pre-clinical study.

The safety and feasibility of allogeneic NK cell therapy has also been described in patients with lymphoma, but host regulatory T cells (Treg) and inadequate immunodepletion may contribute to a hostile environment for NK cell survival and expansion.¹⁸ Therefore, NK cell therapy trials have been suggested to incorporate novel strategies to limit Treg expansion, which would be related to patient response to this type of therapy, but such approach has already been evaluated in studies of treatments for other types of cancer through pretreatment aimed at lymphodepletion.²⁶⁻²⁸

In this vein, donor NK cell therapy has been explored for acute myeloid leukemia with promising results.^{39,40,48} However, data on its activity in lymphoma are scarce, and the encouraging efficacy observed for these cell therapies, such as the chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy,¹²⁻¹⁴ in heavily pretreated patients raises the question about the use of donor NK cell therapy in patients with lymphoma, as these cells can currently be expanded in vitro without having a cost as high as that of CAR T-cell therapy. To evaluate this patient profile, we conducted a preclinical study using peripheral blood samples from patients pretreated with 2 or more lines of treatment for NHL.

According to bibliographic data, studies to analyze autologous NK cells were carried out in patients with Non-Hodgkin's Lymphoma, or other tumors, with assessments of NK cells in vitro using tumor cell samples from patients or considering the expansion and/or effectiveness of NK cells from the use of Interleukin 2 in patients in vivo, or in various types of neoplasms,^{43,45,46,49} likewise, observations of expanded NK cells from healthy donors used in murine models¹⁶ and adoptive therapies with NK cells from donors or that is, allogeneic.^{24-28,50,51}

According to the bibliography, studies to analyze autologous NK cells in patients with Non-Hodgkin's Lymphoma, or other tumors, were carried out in vitro using samples of tumor cells from patients and collected autologous NK cells, or evaluation of NK cell expansion from

the use of Interleukin 2 in patients with various neoplasms,^{43,45,46,49} or even expanded NK cells from healthy donors used in murine models⁵² and adoptive therapies with allogeneic NK cells currently and we would like to evaluate in the setting of our service the growth of NK cells from patients immunosuppressed due to being polytreated and also their efficiency in this patient profile.

In this study, the evaluation was carried out differently from other previous studies, that is, NK cells were evaluated from patients treated multiple times with more than one line of treatment for Non-Hodgkin's Lymphoma, patients with active disease and under treatment at the time of data collection. sample in some situations and all were relapsed and/or refractory, as well as the feeder cells used for its expansion were also used to evaluate its effectiveness, that is, cytotoxicity in relation to oncoproteins present in it, according to data evaluated in this sample of patients from the our Hemato-logy Service and maintaining the same cell culture and evaluation conditions.

MATERIALS AND METHODS

Patients donors and healthy donors

Donors patients were all with relapsed or primary refractory CD20⁺ NHL with adequate performance function who had at least 2 failed salvage therapies. The study protocol and consent procedures were approved by the institutional review board of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, and all procedures complied with the guidelines and regulatory standards for research involving human participants provided for in resolution no. 466, of December 12, 2012, and resolution no. 251, of August 7, 1997, of the Brazilian National Health Council, as well as in the Declaration of Helsinki and Nuremberg Code. The study was registered on *Plataforma Brasil* and approved by the local research ethics committee and the National Research Ethics Committee.

The control population, of healthy donors, used for comparison, was from 3 samples from healthy donors previously collected and analyzed that had been used to validate this NK cell expansion method at the Advanced Cellular Therapy Center of the HCPA -RS, Brazil.

Preparation of the NK cell product

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) patients were collected from a 50 mL venous blood sample using our NK-cell expansion platform already in use at our center.³⁹ The NK cell product was produced at the Advanced Cell Processing Center of the HCPA, and all procedures were validated in accordance with its regulations. NK cells were isolated and expanded according to Good Manufacturing Practices defined in resolution no. 508 of May 27, 2021, of the Brazilian National Health Surveillance Agency.

Briefly, the NK cell product was initially obtained by isolating PBMCs using Ficoll-Hypaque. Subsequently, the PBMC suspension was depleted from CD3⁺ T cells using the Miltenyi – MidiMACS® system (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) and colloidal super-paramagnetic CD3 microbeads, conjugated with mouse monoclonal anti-human antibodies against CD3 (Miltenyi Biotec), in accordance with the standard operating procedures developed for this purpose. The T cell-depleted PBMCs were then co-cultured with K562.mbIL-21 feeder cells for 21 days. Every 7 days, an aliquot of the culture was tested for the presence of BCR-ABL using nested polymerase chain reaction (PCR). Because this oncogene is found in K562 cells, it must be absent in the final product of feeder cells for the product to be considered suitable for clinical use.

Culture cell yield

Based on the number of cells obtained in each culture, the doubling time was calculated (time in days it takes for the cells to double in number) using an online doubling time calculator.⁵³ The fold expansion was calculated by dividing the absolute number of viable NK cells present at the end of the culture on the respective culture days (days 7, 14, and 21) by the absolute number of viable NK cells at the beginning of the culture (day 0).

Flow cytometry

The cell product was analyzed by flow cytometry using BD Pharmingen™ fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD3-APC-H7, anti-CD16-Pe-Cy7, anti-CD56-BB515, anti-CD19-PE, anti-CD32-APC, and 7-AAD. A total of 100,000 events were acquired with the FACS Canto II cytometer using BD FACSDiva™ software, and using Infinicyt™ software version 1.8 for data analysis.

Cytotoxicity

NK cell cytotoxicity was determined by flow cytometry, in which NK cells were incubated at different concentrations at 37 °C and 5% CO₂ for 4 hours in the presence of target cells (K562 cl9.mbIL-21). After incubation, the cells were labeled with CD13, CD15, CD33, CD34, CD71, CD56, and 7-AAD. The percentage of 7-AAD positive cells was determined to calculate the percentage of K562 cell lysis. Another method of evaluating cytotoxicity, that is, the effectiveness of NK cells from donor patients with Lymphoma, was also carried out through the analysis of the BCR-ABL PCR that is present in the feeder cell, developed from the K562 cell line - human erythroleukemia that presents the translocation (9,22) and expresses the BCR-ABL fusion gene and which in the case of this study is the target cell to be lysed, destroyed.

PCR for the BCR-ABL oncoprotein

Culture aliquots were obtained on days 7, 14, and 21 (end of culture) and were tested for the presence of the BCR-ABL oncoprotein using nested PCR, present em feeders cell.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS, version 22 for Windows. Numerical variables were expressed as median (25th–75th percentile). A comparative analysis was performed with samples from healthy donors, which were collected and analyzed using the same techniques described earlier in this paper and according to the database of the Advanced Cell Therapy Laboratory of the HCPA. The Mann-Whitney U test was used to compare numerical variables between groups of cells from healthy donors vs patients with NHL. Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Between February and July 2023, 6 patients with advanced NHL were included in the study. The median age was 49 (IQR, 49–80) years, and 5 patients (83.33%) were men. Treatments consisted of multidrug therapy regimens, and all patients had received immunotherapy non-cellular with rituximab (monoclonal antibody anti-CD20).

All patients had relapsed or refractory B-cell NHL and had received more than 1 line of treatment. At the time of peripheral blood sample collection for cell cultures, 4 patients (66.66%) were receiving chemotherapy, and 4 patients (66.66%) had already received more than 2 lines of previous treatment as well as radiotherapy. Patient and treatment characteristics are described in Table 1.

Table 1. Characteristics of included with non-Hodgkin's lymphoma patients (n = 6).

Variable	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Age (years)	61	73	49	49	71	80
Sex	Male	Female	Male	Male	Male	Male
Weight (kg)	72	66	78	56	112	67
ECOG	1	2	1	1	1	2
Type of lymphoma	B cell	B cell	B cell	B cell	B cell	B cell
Number of previous therapies	3 + RT	3 + RT	3 + RT	3 + RT	2	2
REGIMENS						
First line	R-CHOP	R-MAD	R-CHOP	R-CHOP	R-CHOP	R-CHOP
Second line	R-GEMOX	RT + DEXA	OFATUMUMAB	ICE	R-BENDA	R-GEMOX
Third line	R-ICE	TEMOZOLOMIDE	R2	RT	-	-
Number of relapses	2	2	2	2	1	1
Disease stage	Advanced	Advanced	Advanced	Advanced	Advanced	Advanced
Collection time	Rituximab immunotherapy and chemotherapy: ICE	Temozolomide	Immunotherapy: Ofatumumab	Off treatment	Off treatment	Rituximab immunotherapy and chemotherapy: GEMOX
RT	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No

P: patient; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group scale; R-CHOP: rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; R-ICE: rituximab plus ifosfamide, carboplatin, and etoposide; R-MAD: rituximab plus methotrexate, cytarabine, and dexamethasone; RT: radiotherapy; DEXA: dexamethasone R2: rituximab, lenalidomide; R-BENDA: rituximab plus bendamustine; R-GEMOX: rituximab plus gemcitabine and oxaliplatin.

On day 14 of cell culture, in this sample, there was no significant difference between donors healthy and NHL patients in the number of total NK cells (2686.6 vs 2253.4; $P = 0.905$) (Table 2, Figure 1), in fold expansion (10.9 vs 16.9; $P = 1.000$) (Table 2, Figure 2), in the number of NK cells per kg of body weight (46.3 vs 22.7; $P = 0.714$) (Table 2, Figure 3), or in doubling time (2.2 vs 2.1; $P = 0.714$) (Table 2, Figure 4).

Table 2. Comparison of healthy donors with non-Hodgkin's lymphoma patients on day 14 of cell culture.

Variable	Healthy donors	Lymphoma patients	P^*
Total number of NK cells	2686.6 (2088.4 – 3826.8)	2253.4 (839.3 – 6085.6)	0.905
Fold expansion	10.9 (10.2 – 16.0)	16.9 (9.2 – 20.5)	1.000
NK cells/kg of body weight	46.3 (33.8 – 54.7)	22.7 (11.7 – 90.8)	0.714
Doubling time	2.2 (2.0 – 2.2)	2.1 (2.1 – 2.2)	0.714

NK: natural killer. Values express median (25th – 75th percentile).

* P value by the Mann-Whitney U test.

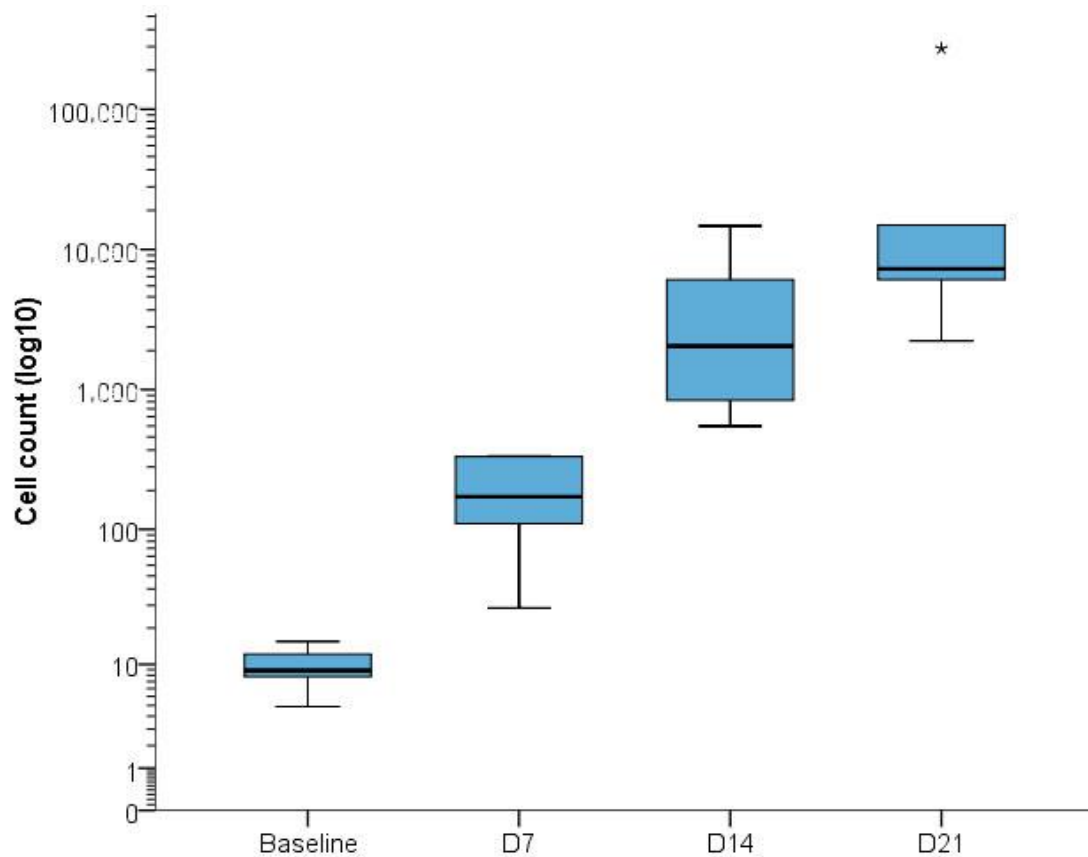


Figure 1. Cell count (number of NK cells x 10⁶) at baseline and at 7, 14, and 21 days of follow-up of lymphoma patients (n = 6).

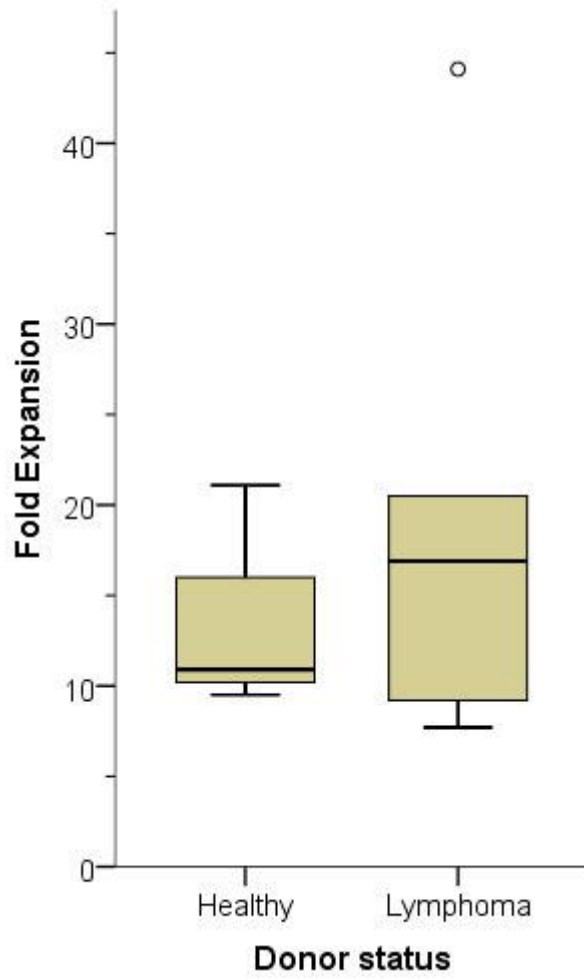


Figure 2. Fold expansion (n = 9: 3 healthy donors + 6 lymphoma patients).

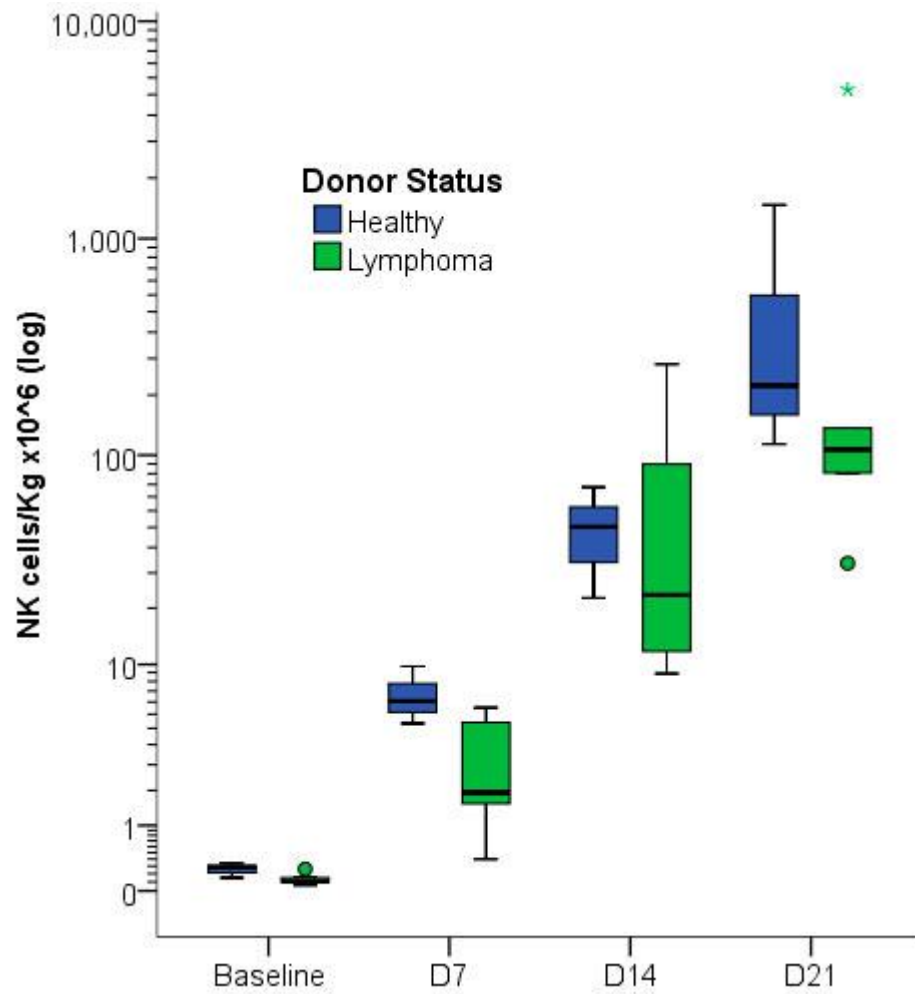


Figure 3. Growth of NK cells/kg of body weight in days (n = 9: 3 healthy donors and 6 patients with lymphoma). Note: lymphoma patient 4 showed discrepant growth cell.

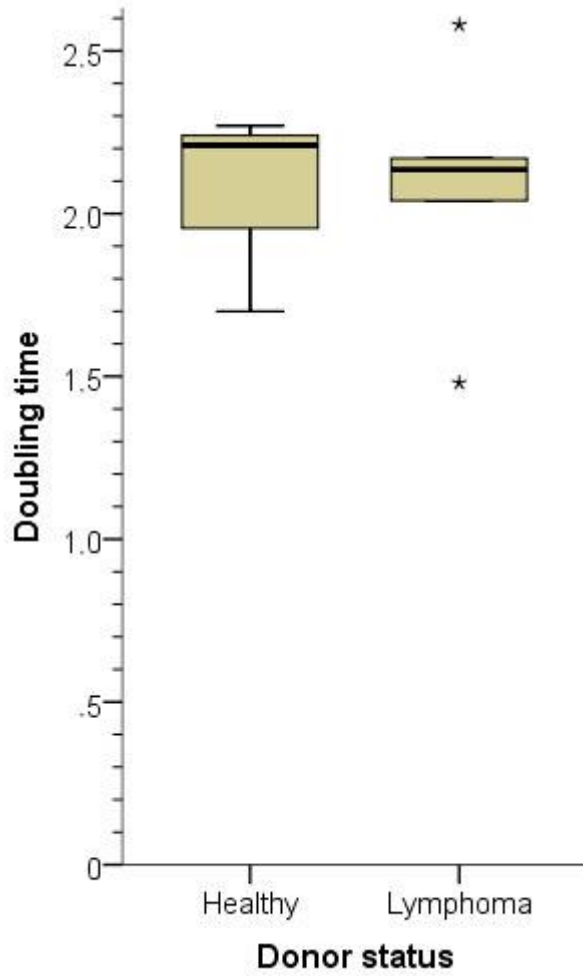


Figure 4. Doubling time (n = 9: 3 healthy donors and 6 lymphoma patients).

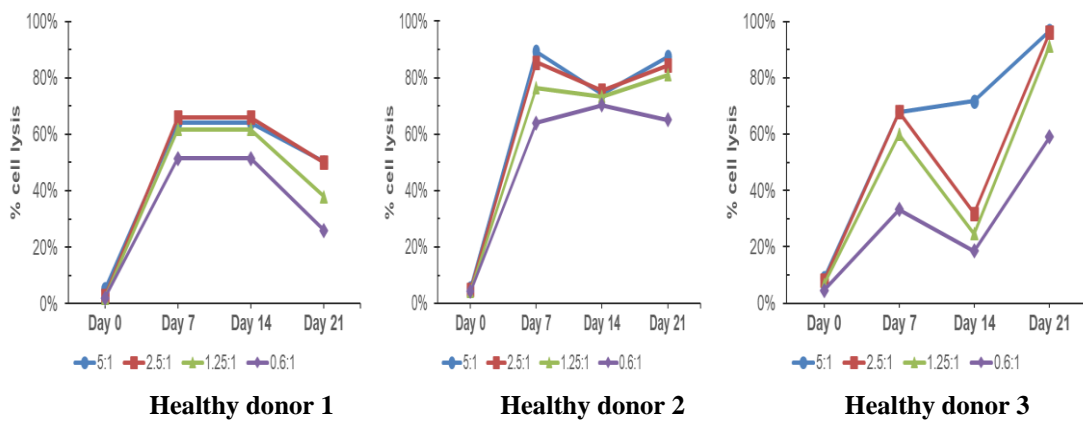


Figure 5. Cell lysis throughout the follow-up period, according to different dilutions, for healthy donors 1, 2, and 3.

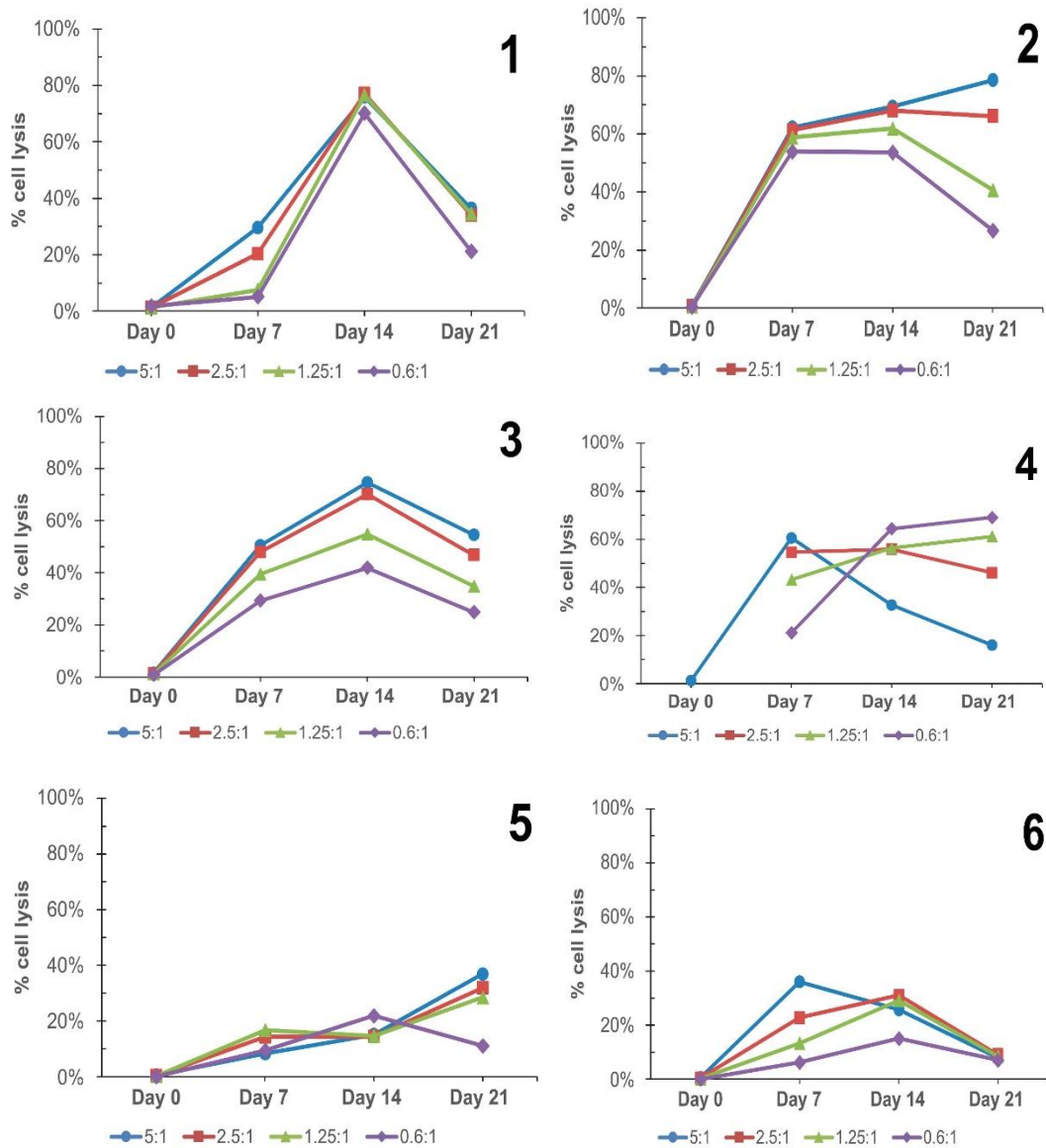


Figure 6. Cell lysis throughout the follow-up period, according to different dilutions, for lymphoma patients 1 to 6.

A subanalysis evaluated NK cell cytotoxicity with the percentage of cell lysis in relation to target cells (K562 c19.mbIL-21) between healthy donors and patients with NHL, demonstrating positivity on day 14 of cell culture (Figure 5,6), but with no statistical difference in cytotoxicity between the groups (Table 3, Figure 7).

Table 3. Cytotoxicity – percentage of NK cell lysis in relation to target cells (K562 cl9.mbIL-21).

Dilution per cell culture day	Healthy donors	Lymphoma patients	<i>P</i>*
Day 0			
5:1	5.7 (5.4 – 7.3)	0.9 (0.5 – 1.2)	0.024
2.5:1	5 (3.9 – 6.5)	0.6 (0.4 – 1.3)	0.036
1.25:1	4.4 (3.2 – 5.6)	0.5 (0.2 – 1.2)	0.036
0.6:1	4.3 (3.1 – 4.5)	0.4 (0 – 0.8)	0.036
Day 7			
5:1	68 (66.1 – 78.7)	36 (29.6 – 50.4)	0.024
2.5:1	68 (67 – 76.7)	22.8 (20.3 – 48)	0.024
1.25:1	61.8 (60.8 – 69.1)	16.7 (13.3 – 39.4)	0.024
0.6:1	51.4 (42.3 – 57.7)	9.4 (6.2 – 29.3)	0.095
Day 14			
5:1	71.8 (69 – 73.1)	69.4 (25.7 – 74.6)	0.714
2.5:1	65 (48.4 – 70.3)	68.1 (31 – 70.1)	0.905
1.25:1	58.7 (41.7 – 66)	54.8 (29.1 – 61.8)	0.905
0.6:1	59.5 (39 – 64.9)	41.9 (21.9 – 53.6)	0.714
Day 21			
5:1	87.4 (68.8 – 92.1)	36.9 (36.3 – 54.5)	0.095
2.5:1	84.3 (67.2 – 90.2)	34 (31.9 – 46.7)	0.048
1.25:1	81.1 (59.5 – 86.2)	34.6 (28.5 – 34.8)	0.095
0.6:1	59 (42.5 – 62)	21.2 (11.1 – 24.8)	0.262

NK: natural killer. Values express median (25th – 75th percentile).

**P* value by the Mann-Whitney U test.

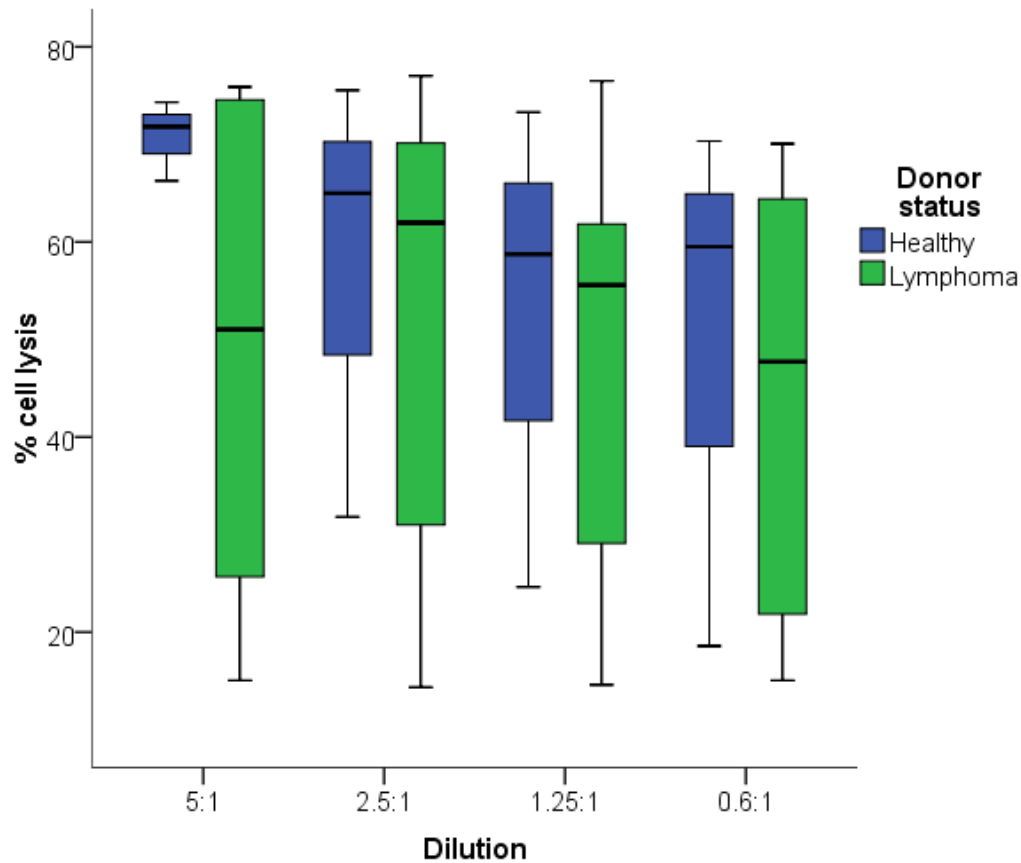


Figure 7. Cytotoxicity (% cell lysis) on day 14 of cell culture, according to different dilutions, in healthy donors (n = 3) and lymphoma patients (n = 6).

The presence of the BCR-ABL oncoprotein was detected in most culture in lymphoma patients as described in table below (Table 4).

Table 4. Nested BCR-ABL polymerase chain reaction (PCR) testing in cultures from non-Hodgkin's lymphoma patients (n = 6).

Form of BCR-ABL per cell culture day	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Day 7						
p190	neg	neg	neg	neg	neg	neg
p210	neg	pos	neg	neg	neg	neg
Day 14						
p190	neg	neg	neg	neg	neg	neg
p210	neg	neg	pos	neg	neg	neg
Day 21						
p190	neg	neg	neg	neg	neg	neg
p210	pos	pos	neg	neg	pos	pos

P: patient; neg: negative; pos: positive.

DISCUSSION

In this preclinical study, performed on a sample of patients, we demonstrated the feasibility of NK cell culture and expansion in immunocompromised patients with relapsed or refractory NHL who received multiple treatments at the clinical level and who did not differ significantly from healthy donors under the same culture and expansion conditions in this profile of patients studied. Likewise, the comparison of doubling time and fold expansion showed no significant difference between the groups, which leads us to believe that it is possible to expand NK cells even in immunocompromised patients.

In the original characterization of NK cells, and their ability to expand *ex vivo* through appropriate culture techniques, it was demonstrated that these cells possess a potent ability to kill tumor cells *in vitro* without prior sensitization.¹⁵⁻¹⁷ Subsequently, although numerous studies have suggested that NK cells can mediate antitumor responses, it has been observed that cancer cells can acquire the ability to evade the immune response, thus leading to malignancies.³⁷ The restoration or enhancement of this natural antitumor activity of NK cells has become a relevant and progressively investigated approach in the treatment of various types of cancer.^{24-28,32,36,51}

Even though it is constantly studied, the mechanisms of tumor resistance to rituximab remain poorly understood. However, resistance mechanisms have been reported that hinder the three main routes of action of rituximab – ADCC, complement-dependent cytotoxicity (CDC) and the induction of apoptosis.⁵⁴

The immunoediting process carried out during tumor transformation and progression leads to the emergence of tumor clones resistant to immune attack. These immune evasion mechanisms acquired during cancer development in immunocompetent individuals largely provide intrinsic resistance to immunotherapy. Immunotherapy additionally exerts selective pressure on tumor cells, generating “escape mutants”, clearly exemplified by the loss or modulation of CD20 expression in patients undergoing rituximab therapy, which can also lead to the development of acquired resistance, as already described.^{11,40,53} Some genetic polymorphisms involved in the regulation of NK cell functions have been associated with the effectiveness of NK cell therapies in relation to their affinity for rituximab, and thus responding to the quality of the efficacy of ADCC-mediated activity by NK cells and consequently reflecting on the clinical response. Second-generation anti-CD-20 monoclonal antibodies with greater affinity to CD20, such as obinutuzumab, have demonstrated increased antitumor efficacy compared to rituximab in chronic lymphocytic leukemia and indolent, follicular lymphomas, although clinical data are still more initial. and based on higher doses of obinutuzumab.^{11,55,56}

Despite the evidence described in the literature, data regarding the genetic architecture that modulates the life and function of NK cells and, especially, their implication in the efficacy/resistance to NK cell-based therapies, are still scarce and not very clear. Some information clearly suggests that the genetic makeup of the individual may be an intrinsic determinant of the degree of success of NK cell therapy⁴⁰ and based on this thought that clinical experience shows that allogeneic NK cells are more effective than autologous NK cells, as they can take advantage of the recognition of the “missing-self”³⁴ due to the lack of KIR-HLA class I interaction. KIR genes are highly polygenic and polymorphic, with different numbers of activating and inhibitory KIR genes in different individuals, each of them varying in expression and functional activity.⁵⁶

Previous studies of adoptive therapy with autologous NK cells, these have been done with tumor cell lines in vitro, or use of IL2 in vivo and evaluation of NK cell response or clinical disease response, but there are still few data on the clinical-level expansion of autologous NK cells from immunosuppressed or polytreated patients with ex vivo expanded lymphoma and their evaluation directly to target/feeder cells through direct cytotoxicity among these.

However, when comparing the cytotoxic capacity of NK cells between patients with NHL and healthy individuals, we observed that the majority of patients exhibited a decreased cytotoxic activity at the end of culture, as determined both by the cytotoxicity test and by the remaining cells found in APC culture represented by the detection of oncoprotein in the final product. Cells from healthy donors are capable of eliminating APCs/feeder and or target cells—an absolute requirement for their clinical use.

Our data are in agreement with some data in the literature, because, although we obtained a sufficient number of cells for several infusions, they exhibited low cytotoxic capacity in this profile of patients evaluated.

There are several approaches to NK cell therapy currently in Non-Hodgkin's Lymphomas, such as CAR NK, NK expansion without feeders, NK cells can also be ex vivo activated and expanded T with feeder-free systems.¹⁸ in patients with NHL using rituximab

and haploidentical donor peripheral blood (PB) NK cells activated with IL2, Combinatorial therapy of NK cells with bispecific or trispecific killer engagers.⁵⁷ The engager substitutes for traditional antibody-Fc (crystallizable fragment) interactions in mediating the immunological synapse between tumor cells and NK cells to stimulate NK activation and killing of the target cell.²¹

Therefore, NK cell-based immunotherapy emerges as a promising treatment for some types of cancer, particularly hematologic malignancies.

FUTURE PERSPECTIVES

Although there are several studies highlighting the importance not only of the number of NK cells but also of their functional capacity in the context of cancer immunosurveillance and survival, the parameters that define the optimal NK cell regarding phenotype, function, proliferative potential, and long-term persistence remain ill-defined.²¹ Studies have searched for models that can accurately reflect clinical conditions, tumor micro-environment, trafficking, and cross-talk with other immune cells, as well as combinations with non-cellular immunotherapies, immunologic checkpoint inhibitors, and cytokines to improve cell activation. Ultimately, there are several options that arise from these extremely promising cell therapies that are within our reach.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
2. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):379-91. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70664-7.
3. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, Anderson LA, Brenner H, Holleczeck B, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):931-42. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70282-7.
4. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017 ;130(16):1800-1808. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620.
5. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccuini W, Hirschaud E, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol*. 2011;29(31):4079-87. doi: 10.1200/JCO.2011.35.4423.

6. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17(4): 1244. doi: 10.1200/JCO.1999.17.4.1244.
7. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4184-90. doi: 10.1200/JCO.2010.28.1618.
8. El Gnaoui T, Dupuis J, Belhadj K, Jais JP, Rahmouni A, Copie-Bergman C, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Ann Oncol*. 2007;18(8):1363-8. doi: 10.1093/annonc/mdm133.
9. Corazzelli G, Capobianco G, Arcamone M, Ballerini PF, Iannitto E, Russo F, et al. Long-term results of gemcitabine plus oxaliplatin with and without rituximab as salvage treatment for transplant-ineligible patients with refractory/relapsing B-cell lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Oct;64(5):907-16. doi: 10.1007/s00280-009-0941-9.
10. Hong JY, Yoon DH, Suh C, Kim WS, Kim SJ, Jo JC, et al. Bendamustine plus rituximab for relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Ann Hematol*. 2018;97(8):1437-43. doi: 10.1007/s00277-018-3317-6.
11. Pierpont TM, Limper CB, Richards KL. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front Oncol*. 2018;8:163. doi: 10.3389/fonc.2018.00163.
12. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):31-42. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30864-7.
13. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380(1):45-56. doi: 10.1056/NEJMoa1804980.
14. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang ML, Arnason JE, et al. Pivotal safety and efficacy results from transcend NHL 001, a multicenter phase 1 study of lisocabtagene maraleucel (liso-cel) in relapsed/refractory (R/R) large B cell lymphomas. *Blood*. 2019;134 (Supplement_1):241. doi: 10.1182/blood-2019-127508.

15. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. A IL-21 ligada à membrana promove a proliferação ex vivo sustentada de células assassinas naturais humanas. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264.
16. Lee DA. Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev*. 2019;290(1):85-99. doi: 10.1111/imr.12793.
17. Lamb MG, Rangarajan HG, Tullius BP, Lee DA. Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):211. doi: 10.1186/s13287-021-02277-x.
18. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(11):1739-44. doi: 10.1007/s00262-010-0896-z.
19. Menck CFM, Ventura AM. Manipulating genes in search of a cure: the future of gene therapy. *Rev USP*. 2007;(75):50-61.
20. Phan MT, Lee SH, Kim SK, Cho D. Expansion of NK Cells Using Genetically Engineered K562 Feeder Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:167-74. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7_14.
21. Somanchi, SS. Natural killer cells: methods and protocols. London: Springer; 2016.
22. Chu Y, Lamb M, Cairo MS, Lee DA. The Future of Natural Killer Cell Immunotherapy for B Cell Non-Hodgkin Lymphoma (B Cell NHL). *Curr Treat Options Oncol*. 2022;23(3):381-403. doi: 10.1007/s11864-021-00932-2.
23. Roth V. Doubling time computing. In: Doubling Time [Internet]. 2006 [cited 2024 Mar 11]. Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
24. Gonzalez-Rodriguez AP, Villa-Álvarez M, Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, Gonzalez S. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J Clin Med*. 2019;8(10):1557. doi: 10.3390/jcm8101557.
25. Lim O, Lee Y, Chung H, Her JH, Kang SM, Jung MY, et al. GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(1):e53611. doi: 10.1371/journal.pone.0053611.
26. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. 2010;28(6):955-9. doi: 10.1200/JCO.2009.24.4590.
27. Silla L, Valim V, Pezzi A, da Silva M, Wilke I, Nobrega J, et al. Adoptive immunotherapy with double-bright (CD56bright/CD16bright) expanded natural killer cells in patients with

- relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a proof-of-concept study. *Br J Haematol.* 2021;195(5):710-21. doi: 10.1111/bjh.17751.
28. Vela M, Corral D, Carrasco P, Fernandez L, Valentin J, Gonzalez B, et al. Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett.* 2018;422:107-17. doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.033.
 29. Malmberg KJ, Carlsten M, Björklund A, Sohlberg E, Bryceson YT, Ljunggren HG. Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol.* 2017;31:20-9. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.002.
 30. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med.* 2019;7(5):105. doi: 10.21037/atm.2019.01.42.
 31. Shaver KA, Croom-Perez TJ, Copik AJ. Natural Killer Cells: The Linchpin for Successful Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2021;12:679117. doi: 10.3389/fimmu.2021.679117.
 32. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(6):1915-9. doi: 10.1073/pnas.0813192106.
 33. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, et al. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol.* 1999;34(2):253-65. doi: 10.1016/s0531-5565(98)00076-x.
 34. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990;11(7):237-44. doi: 10.1016/0167-5699(90)90097-s.
 35. Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319(6055):675-8. doi: 10.1038/319675a0.
 36. 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. doi: 10.1182/blood-2012-04-419283.
 37. Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell.* 2004;3(4):177-84. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00107.x.
 38. Albright JW, Albright JF. Age-associated impairment of murine natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80(20):6371-5. doi: 10.1073/pnas.80.20.6371.

39. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32(2):177-86. doi: 10.1038/sj.bmt.1704086.
40. Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Gonzalez S. Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):893. doi: 10.3390/cancers12040893.
41. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(6):e1163462. doi: 10.1080/2162402X.2016.1163462.
42. Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, Ye H, Kunich JC, Garrett EN, et al. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother.* 2007;30(1):64-74. doi: 10.1097/01.cji.0000211315.21116.07.
43. Khan KD, Emmanouilides C, Benson DM Jr, Hurst D, Garcia P, Michelson G, et al. A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(23):7046-53. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1571.
44. Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 2006;25(2):331-42. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.013.
45. Eisenbeis CF, Grainger A, Fischer B, Baiocchi RA, Carrodegua L, Roychowdhury S, et al. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res.* 2004;10(18 Pt 1):6101-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0525.
46. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med.* 1987;316(15):889-97. doi: 10.1056/NEJM198704093161501.
47. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res.* 2011;17(19):6287-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1347.

48. Oberoi P, Kamenjarin K, Ossa JFV, Uherek B, Bönig H, Wels WS. Directed Differentiation of Mobilized Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Functional NK cells with Enhanced Antitumor Activity. *Cells*. 2020;9(4):811. doi: 10.3390/cells9040811.
49. Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, Ye H, Kunich JC, Garrett EN, et al. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother*. 2007;30(1):64-74. doi: 10.1097/01.cji.0000211315.21116.07.
50. Berg M, Lundqvist A, McCoy P Jr, Samsel L, Fan Y, Tawab A, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11(3):341-55. doi: 10.1080/14653240902807034.
51. 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. doi: 10.1182/blood-2004-07-2974.
52. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):117-21. doi: 10.1002/eji.1830050209.
53. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol*. 2018;19(7):723-732. doi: 10.1038/s41590-018-0132-0.
54. Rezvani AR, Maloney DG. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24(2):203-16. doi: 10.1016/j.beha.2011.02.009.
55. Umaña P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol*. 1999;17(2):176-80. doi: 10.1038/6179.
56. Prica A, Crump M. Improving CD20 antibody therapy: obinutuzumab in lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(3):573-582. doi: 10.1080/10428194.2018.1498490.
57. Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, Miller JS, Vallera DA. Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:333-46. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7_28.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, pré clínico, foi possível estabelecer a viabilidade de cultivo e expansão das células NK em nível clínico nesta amostra de pacientes e sem diferença estatisticamente significativa em relação a doadores saudáveis no grupo estudado nas mesmas condições de cultura e expansão, em paciente imunocomprometidos, portadores de LNH recidivados e ou refratários após tratamentos e neste e da mesma forma não denotou também diferença significativa na comparação do doubling time e fold expansion nas populações estudadas comparativamente.

Porém, no que concerne a capacidade citotóxica das células NK obtidas dos doadores pacientes com Linfoma em comparação com a obtida de doadores saudáveis, houve uma capacidade citotóxica diminuída neste perfil de pacientes doadores portadores de LNH.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora tenhamos vários estudos sobre a importância não apenas do número das células NK mas da sua capacidade funcional no contexto da sua atividade de imunovigilância e sobrevivência ao câncer, os parâmetros que definem a célula NK ideal em relação ao fenótipo, função, potencial proliferativo e persistência a longo prazo não estão bem definidas.⁴⁹

Estudos buscam modelos que possam vir refletir/refletem com precisão condições clínicas, do microambiente tumoral, tráfico e conversa cruzada com outras células imunológicas são muito necessárias, bem como as combinações com imunoterapias não celulares, inibidores de check point imunológicos, uso de citocinas para buscar melhor ativação da célula, enfim, são várias as opções que provem destas terapias celulares extremamente promissoras e ao nosso alcance.

12. APÊNDICES

Apêndice I – Orçamento

Materiais de Ensaio de células NK por citometria de fluxo e análise de cariótipo:

	Valor Unitário	Valor Total
Anticorpo CD13	1098,40	1098,40
Anticorpo CD15	965,91	965,91
Anticorpo CD33	2149,41	2149,41
Anticorpo CD34	1894,55	1894,55
Anticorpo CD71	138,05	138,05
Corante 7AAD	590,35	590,35
Anticorpo CD56	1724,30	1724,30
Anticorpo CD3	1525,40	1525,40
Anticorpo CD16	1312,20	1312,20
Anticorpo CD19	1457,00	1457,00
Anticorpo CD32	1312,20	1312,20
Ponteiras p200 sem barreiras (uma caixa por ensaio)	0,12	384,00
Placa de 96 poços fundo em U (1 por ensaio)	3,04	121,60
Canaleta para pipeta multicanal (3 por ensaio)	1,58	189,6
Análise de cariótipo	898,00	8980,00
Total		

Materiais necessários para isolamento e expansão das células NK:

Materials	Quantidade para 10 pacientes	Valor unitário	Valor total
Isolamento e expansão de células NK			
Ficoll-Hipaque (100 mL)	4 frascos	R\$ 270,00	R\$ 1.080,00
Solução Tampão PBS 500ml	2 frascos	R\$ 137,54	R\$ 275,08
Versene	3 frascos	R\$ 70,94	R\$ 212,82
Coluna de separação Magnética cx c/25 uni	15 colunas	R\$ 226,00	R\$ 3.390,00
Anticorpo Anti-CD3 Bead	1 frasco	R\$ 8.173,00	R\$ 8.173,00
Meio RPMI 1640	10 frascos	R\$ 179,70	R\$ 1.797,00
Soro Fetal Bovino	1 frasco	R\$ 1.340,00	R\$ 1.340,00
Antibiótico Penicilina/Estreptomicina	1 frasco	R\$ 142,00	R\$ 142,00
Glutamax	1 frasco	R\$ 221,00	R\$ 221,00
Interleucina 2 Humana Recombinante	2,5 mL	R\$ 138,40	R\$ 138,40
Tubos para centrífuga 50ml	300 unidades	R\$ 4,72	R\$ 1.416,00
Tubos para centrífuga 15ml	100 unidades	R\$ 1,72	R\$ 172,00
Frasco de cultivo T 300 c/filtro na tampa	10 unidades	R\$ 38,00	R\$ 380,00
Pipeta sorológica descartável 2ml	50 unidades	R\$ 1,37	R\$ 68,50
Pipeta sorológica descartável 5ml	50 unidades	R\$ 2,44	R\$ 122,00
Pipeta sorológica descartável 10ml	100 unidades	R\$ 3,06	R\$ 306,00
Pipeta sorológica descartável 25 ml	300 unidades	R\$ 5,00	R\$ 1.500,00
Sub Total por Amostra			R\$ 2.073,38
Sub Total 10 Amostras			R\$ 20.733,80

Tabela do orçamento:

	Valor unitário	Valor para 10 amostras
Material para coleta (agulha)	R\$ 45,60 (caixa com 100): 0,456 unidade	10 x 0,456: R\$ 4,56
Material para coleta (seringa)	R\$ 10,71 unidade	10 x: R\$ 107,1
Painel de anticorpos	R\$ 14.167,77	R\$ 14.167,77
Ponteiras p200 sem barreiras (uma caixa por ensaio)	R\$ 0,12	R\$ 384,00
Placa de 96 poços fundo em U (1 por ensaio)	R\$ 3,04	R\$ 121,60
Canaleta para pipeta multicanal (3 por ensaio)	R\$ 1,58	R\$ 189,6
Análise de cariótipo	R\$ 898,00	R\$ 8980,00
Materiais necessários p/ isolamento e expansão em grau clínico da células NK	R\$ 2.078,38	R\$ 20.738,80
Vouchers para irradiação de bolsas de APCs: 30	R\$ 55 por voucher	30x 55: R\$ 1.650,00
		R\$ 46.343,43

Fonte de verba: verba de pesquisa do CPCA-HCPA e FIPE-HCPA.

Apêndice II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Avaliação das células Natural Killer em pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada: **Avaliação das células Natural Killer em pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários**

Estudo pré clínico, in vitro, coordenado pela Dra Lucia Mariano da Rocha Silla e médica hematologista Moema Nenê Santos, agora denominada pesquisadora. Para poder participar é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você ou a pessoa pela qual você é responsável está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo será avaliar a viabilidade de expansão de células Natural Killer em grau clínico nos pacientes com LNH recidivado ou refratários a terapias prévias, as células natural killer (NK), um tipo de linfócito (glóbulo branco) com papel importante no combate a infecções virais e células tumorais e elas serão cultivadas em laboratório na tentativa de que elas expandam-se e possam vir a ser uma nova alternativa de tratamento para os pacientes com LNH. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Você está sendo convidado a participar ou autorizar a participação. Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: primeiramente será coletada amostra de 50 ml de sangue por meio de punção venosa para a obtenção das células NK. Estas células NK serão multiplicadas em laboratório, atendendo a todas as exigências legais e de segurança.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa serão relacionados apenas a coleta da amostra de sangue. Caso você tenha dúvidas sobre estes possíveis riscos você pode a qualquer momento pedir mais explicações aos pesquisadores. Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa será buscar nova alternativa para o tratamento dos pacientes com Linfoma Não Hodgkin.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que recebido ou que possa vir a receber na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente.

Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

PARTICIPACÃO VOLUNTÁRIA

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

DECLARAÇÃO DE RISCOS PARA O PACIENTE

Os riscos antecipados pelos pesquisadores se referem a punção de acesso venoso para coleta de 50ml de sangue venoso.

BENEFÍCIO DO ESTUDO

Os benefícios antecipados pelos pesquisadores se referem a possibilidade de posteriormente termos uma nova terapia em pacientes com uma doença em que as possibilidades terapêuticas padrões já foram utilizadas e o paciente encontra-se com doença em atividade.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTRO, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS

O pesquisador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para avaliação do estudo, tendo acesso às pessoas diretamente ligadas a este estudo (pesquisador, orientador da pesquisa, comitê de ética em pesquisa, autoridades regulatórias). Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Você tem direito de acesso aos seus dados.

CONTATO

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o pesquisador do estudo ou sua equipe através dos seguintes números:

Moema Nenê Santos - (54) 991555686 ou pelo telefone (51) 33598317, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste documento de consentimento.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante ou seu responsável e outra para os pesquisadores.

NOME DO PESQUISADOR: _____

ASSINATURA: _____ DATA: __/__/__

NOME DO PACIENTE _____

ASSINATURA: _____ DATA: __/__/__

Foi entregue ao voluntário uma cópia deste TCLE contendo na íntegra todas as informações aqui descritas e necessárias.

Apêndice III – STROBE guideline—checklist dos itens:

	Página
Introduction	
Background/rationale	28
Objectives	28,29
Methods	
Study design	29
Setting	29
Participants	29
Variables	29,30
Data sources/ measurement	29,30
Bias	29,30
Study size	29,30
Quantitative variables	29,30
Statistical methods	30,31
Results	
Descriptive data	31,32
Outcome data	32
Main results	32, 40
Other analyses	33,34,35,36,37,38,39
Discussion	
Key results	40
Limitations	40
Interpretation	40
Generalisability	40
Other information	
Funding	40

Apêndice IV – Carta de aprovação do Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:
Avaliação das células Natural Killer em pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF/Documento: 509.194.660-87	Nome: Lúcia Mariano da Rocha Silla
Telefone: 5133312558	E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

Instituição Proponente

CNPJ: 87.020.517/0001-20	Nome da Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
--------------------------	---

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF/Documento	Nome
891.941.360-68	Moema Nene Santos

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
010.446.350-37	Annelise Pezzi
005.445.910-97	Vanessa de Souza Valim
891.941.360-68	Moema Nene Santos

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Clínico

Título Público da Pesquisa: Avaliação das células Natural Killer em pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários

Acrônimo do Título Público:

Acrônimo: Linfoma não-Hodgkin

Contato Científico: Lúcia Mariano da Rocha Silla

Desenho de Estudo / Apoio Financeiro

Desenho do Estudo: Intervenção/Experimental

Condições de saúde ou problemas

Condição de saúde ou Problema
Linfoma não-Hodgkin

Descritores Gerais para as Condições de Saúde

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
C85	Linfoma nao-Hodgkin de outros tipos e de tipo nao especificado

Descritores Específicos para as Condições de Saúde

CID1-10:Classificação Internacional de Doenças

Código CID	Descrição CID
C85	Linfoma nao-Hodgkin de outros tipos e de tipo nao especificado

Tipo de Intervenção: Sem intervenção

Natureza da Intervenção

- Outro Pré clínico

Descritores da Intervenção

Descritores da Intervenção

Intervenções
Sem intervenção

Fase

- Pré clínico

Desenho:

Para a coleta de amostra de sangue visando análise das células NK: Serão incluídos pacientes com Pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias, aqueles que não se beneficiaram do tratamento padrão (poliquimioterapia, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas) bem como pacientes não elegíveis para transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. Serão incluídos pacientes que atendam aos critérios de inclusão e após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
87.020.517/0001-20	Hospital de Clínicas de Porto Alegre	cephopa@hcpa.ufrgs.br	5133597640	Institucional Principal

Palavra Chave

Palavra-chave
Natural Killer, Linfomas recidivados e ou refratários

Data de Submissão do Projeto: 17/11/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf

Versão do Projeto: 2

Detalhamento do Estudo

Resumo:

Linfoma não-Hodgkin são doenças malignas que surgem de células do sistema imunológico e se manifestam predominantemente como linfadenopatia ou tumores sólidos. Os tratamentos para Linfoma Não Hodgkin incluem poliquimioterapia com ou sem imunoterapia e transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) em alguns casos. Novas abordagens de tratamento também são necessárias para pacientes com recidiva após a terapia de primeira linha e que não são considerados candidatos para quimioterapia de alta dose e TCTH e desta forma a terapia celular vêm ganhando espaço no tratamento destes tipos de doenças, terapias com CAR T Cell e Células NK (Natural Killer). Sendo que após a ativação, as células NK adquirem a capacidade de lisar uma ampla gama de alvos tumorais em cultura e são normalmente sensíveis à lise NK, incluindo linhas de células de linfoma. Vários avanços tem sido estudados em relação as fontes de células NK bem como método de expansão e com isto melhoraram o potencial para terapia com células NK, com um número maior de células NK utilizados como terapêutica. As células NK têm capacidade significativa na vigilância imunológica de tumores e de forma mais adequada tem seu papel no tratamento de alguns tumores recidivados e refratários, e podendo ser mais amplamente explorada por ter mais factível em nosso sistema de saúde. A capacidade de lisar células transformadas imediatamente de uma maneira independente do antígeno as torna candidatas atraentes para a terapia do cancer. Neste contexto, seria interessante testar a viabilidade, segurança e eficácia do uso de células Natural Killer em pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias, aqueles que não se beneficiaram do tratamento padrão (poliquimioterapia e/ou TCTH). Pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias serão selecionados para testar, a partir de 50ml de sangue venoso, se será possível expandir células NK, em grau clínico – suficiente para realizar 6 infusões/paciente de aproximadamente 107 células NK/Kg utilizando nossa plataforma tecnológica de expansão baseada na expansão celular na presença de células apresentadoras de antígeno (feeders) mblL21K562, já aprovada e utilizada no tratamento da leucemia mieloide aguda recaída ou refrataria.

Introdução:

Linfoma Não Hodgkin são doenças malignas que surgem de células do sistema imunológico e se manifestam predominantemente como linfadenopatia ou tumores sólidos. A classificação do linfoma não Hodgkin é complexa e em constante evolução, com mais de 50 subtipos diferentes listados na classificação mais recente da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os tratamentos para Linfoma Não Hodgkin incluem poliquimioterapia com ou sem imunoterapia e transplante de célula tronco hematopoiética (TCTH) em alguns casos. Rituximabe padrão, ciclofosfamida, cloridrato de doxorubicina (hidroxidaurorubicina), sulfato de vincristina (oncovin) e prednisona (R-CHOP) curam a maioria dos pacientes no cenário de linha de frente nos subtipos mais comuns, embora aproximadamente 30% a 45% dos pacientes apresentem recidiva e necessitem de segunda linha terapia.82-84 Quimioterapia de segunda linha à base de platina seguida por quimioterapia de alta dose com ASCT tem sido o padrão de tratamento para pacientes jovens e em boa forma com base em taxas de cura de aproximadamente 50% na era pré-rituximabe. No entanto,85 desde a introdução do rituximabe como terapia de primeira linha, o potencial curativo para esquemas de resgate tradicionais e TCTH autólogo na primeira recaída diminuiu significativamente.85. Poucos pacientes com recidiva após R-CHOP atingirão CR (remissão completa) para regimes de segunda linha, como R-ICE (rituximabe, ifosfamida, carboplatina, etoposídeo), R-DHAP (rituximabe, dexametasona, citarabina em altas doses, platina) ou R-GDP (rituximabe, gencitabina, dexametasona, platina), e mais de 25% dos pacientes terão uma sobrevida livre de progressão durável (PFS).86-88 Subconjuntos de pacientes podem ser identificados que ainda têm uma boa chance de remissão durável com um tradicional abordagem baseada em transplante, particularmente pacientes com recidiva mais de um ano de sua terapia inicial, mas pacientes com doença refratária primária, doença PET-positiva após terapia de resgate, doença recidivada precocemente e linfoma com rearranjo por MYC89,90 têm uma chance extremamente baixa de cura com TCTH, portanto, tratamentos melhores de segunda linha são desesperadamente necessários.16-88, 91-96 Historicamente, os pacientes que recaíram após a quimioimunoterapia de segunda linha tiveram um prognóstico ruim, com uma sobrevida global mediana (SG) de aproximadamente 4 meses. 1 Pacientes com DLBCL (Linfoma Não Hodgkin Difuso de Grandes Células B) refratário à quimioterapia, que é definida como uma falta de resposta a um segundo ou mais tarde linha de terapia ou progresso com 1 ano de transplante autólogo de células-tronco (TCTH), apresentam resultados particularmente ruins, com apenas 7% de chance de atingir uma resposta completa (CR) à terapia convencional e OS (Sobrevida Global) pequena.97 Novas abordagens de tratamento também são necessárias para pacientes com recidiva após a terapia de primeira linha e que não são considerados candidatos para quimioterapia de alta dose e ASCT e desta forma a terapia celular vêm ganhando espaço no tratamento destes tipos de doenças, terapias com CAR T Cell e Células NK (Natural Killer). Células Natural Killer são células do nosso sistema imune linfóides inato que desempenham um papel fundamental na resposta a infecção viral e progressivamente vem sendo estudada no tratamento contra diversos tipos de câncer. As células NK do tipo memória induzidas por citocinas diferenciam-se após a ativação com interleucina-12 (IL-12), IL-15 e IL-18, exibem respostas antitumorais potentes e induzem remissões completas com segurança em pacientes com leucemia como já demonstrado. No entanto, muitos tipos de câncer não são totalmente reconhecidos por meio de receptores de células NK.1 Desta forma tais células, NK, são uma imunoterapia celular promissora para o tratamento de alguns tipos de câncer atualmente. De uma forma geral sobre a fisiologia as células NK elas representam cerca de 10–20% dos linfócitos do sangue periférico. A maioria (90%) expressa níveis elevados de FCRIII (CD16) e são CD56dim, embora uma subpopulação CD16dim / neg CD56bright com atributos funcionais distintos também tenham sido descrita. As respostas funcionais NK ocorrem nos tecidos e dependem do equilíbrio dos sinais ativadores e inibitórios. A inibição, sinalizada principalmente por meio da interação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) com os receptores NK inibitórios na superfície das células NK, evita a autogressão. Uma vez ativadas, as células NK são citolíticas e, portanto, apresentam semelhanças funcionais com os linfócitos T citotóxicos (CTLs). No entanto, ao contrário dos CTLs, elas não progredem por meio de um estágio anterior de ativação e proliferação antes de adquirir potencial citolítico. Para populações de células NK, a proliferação e a expansão precedem principalmente a ativação, enquanto para os linfócitos T CD8 + a maioria (clonal) a expansão segue a ativação (embora, é claro, a geração de populações de células T CD8 + virgens dependa da proliferação de células imaturas). Assim, na fisiologia celular NK, a regulação da proliferação pode ser considerada um evento chave “a montante”, cujo papel é manter células NK suficientes na circulação e nos tecidos para fornecer uma resposta não específica rápida.2 Como outras populações de linfócitos, as células NK apresentam também uma homeostase aparente. Quando transferidas para camundongos com deficiência de NK, conforme já estudado, por exemplo, as células NK maduras e imaturas sofrem proliferação, mas tais células não proliferam quando transferidas para um hospedeiro com um pool de células NK endógeno.3 Assim, parece que fatores como “espaço” (a disponibilidade de nichos fisiológicos), a disponibilidade de fatores promotores de crescimento ou a presença de citocinas que limitam a proliferação, operam para regular o número de células NK.3,4 A homeostase é consequência não apenas da proliferação, mas também da perda celular. As células NK desaparecem do sangue pela entrada nos tecidos, predominantemente no baço e no fígado,5,6 ou pela morte celular. Relativamente poucas células NK são encontradas em nódulos linfáticos e há pouca evidência de recirculação, embora as células da pequena subpopulação CD56 bright de células NK sejam encontradas em áreas de células T parafooliculares de nódulos linfáticos, onde podem desempenhar um papel nas interações entre respostas inatas e imunes adaptativas.6 A sobrevivência de células NK maduras é dependente de citocinas; em camundongos, a interleucina-15 (IL-15) parece prolongar a sobrevivência por meio do fator antiapoptótico Bcl-2.7 Experimentos de transferência ativa e estudos de longo prazo em camundongos demonstraram meia-vida circulante curta de cerca de 7 a 10 dias para células NK maduras.8 Em camundongos, portanto, o pool de células NK é mais dinâmico do que o pool de linfócitos T, mas pouco se sabia sobre a cinética paralela em humanos. A função e a dinâmica das células NK podem ser afetadas por estados fisiopatológicos, como envelhecimento e infecção viral. O envelhecimento prejudica a atividade NK humana.

Vários estudos mostraram reduções relacionadas à idade na atividade citotóxica mediada por células NK (revisado por Mocchegiani e Malavolta) 9 que parecem ser clinicamente relevantes, pois estão associadas a um risco aumentado de infecção ou morte em coortes de idosos. 9,10, esse comprometimento funcional não está relacionado a uma redução no número de células NK. 9-14 Ao contrário das células T, as células NK distinguem as células infectadas por vírus e as células cancerosas de suas contrapartes saudáveis por meio de uma série de receptores ativadores e inibitórios codificados pela linha germinativa. Os receptores inibitórios evitam a ativação das células NK e a subsequente morte de células saudáveis por meio da ligação a proteínas próprias de superfície, como moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade expresso de forma ubíqua (MHC-I). A perda da expressão de superfície dessas moléculas, que é frequentemente causada por infecção viral ou transformação maligna, resulta na "perda do auto-reconhecimento" pelas células NK e leva à ativação das células NK e à morte das células-alvo. 16 Os receptores inibitórios que reconhecem moléculas MHC de classe I, como os receptores semelhantes à imunoglobulina de células Killer (KIRs) e o heterodímero CD94-Natural Killer Group 2A (NKG2A), foram estudados mais extensivamente. 18-20 A morte celular programada 1 (PDCD1, mais conhecida como PD-1) e outros receptores de checkpoints imunológicos podem inibir a ativação das células NK, particularmente em infecções virais e câncer. 20-23 Os receptores ativadores, incluindo o grupo Natural Killer 2D (NKG2D), a molécula acessória DNAX-1 (DNAM-1) e os receptores naturais de citotoxicidade NKp46, NKp44 e NKp30, reconhecem ligantes induzíveis que são especificamente regulados positivamente em células infectadas, cancerosas e fortemente ativadas. 17,18 NKG2D é o receptor de ativação de células NK mais extensamente estudado e se liga a um grupo de ligantes induzíveis por estresse denominado sequência A e B relacionada ao polipeptídeo MHC classe I (MICA e MICB) e proteínas de ligação UL16 (ULBP1-6). 24,25 Os ligantes NKG2D são expressos de forma restrita em células saudáveis, mas sua expressão é induzida em resposta a vias de sinalização comumente associadas à transformação e infecção viral. Assim, danos ao DNA, estresse oxidativo ou vias de sinalização de estresse proliferativo induzem a expressão de ligantes NKG2D, iniciando uma resposta imune contra as células-alvo. 24,27,28 Um balanço positivo dos sinais fornecidos pelos receptores ativadores e inibitórios promove a ativação das células NK, resultando na eliminação das células-alvo por meio da exocitose de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas. As células alvo também podem ser mortas por uma segunda via envolvendo o ligante Fas (FasL) e os sinais indutores de apoptose relacionados ao fator de necrose tumoral (TNF). 4 Além disso, como as células NK humanas expressam o receptor FcγRIIIa (também conhecido como CD16), que reconhece anticorpos humanos IgG1 e IgG3, desta forma permite a eliminação mediada por células NK de células opsonizadas por IgG por meio da liberação de seus grânulos citotóxicos, um processo conhecido como anticorpo citotoxicidade celular dependente (ADCC). O ADCC demonstrou contribuir para a defesa contra a infecção viral e a eficácia terapêutica de alguns anticorpos monoclonais (mAbs) amplamente usados para tratar o câncer, como o rituximabe (anticorpo monoclonal utilizado em alguns tipos de Linfomas). Também foi relatado que alguns inibidores do ponto de verificação imunológico, como ipilimumabe (usado em Melanoma) também podem desencadear ADCC. 19,26,29,30 A atividade das células NK é regulada por interferons tipo I e citocinas, e as células NK também regulam as respostas imunes inatas e adaptativas por meio da secreção de citocinas, como o interferon-gama (IFN-γ), com potentes anti-atividades virais e antitumorais. 18 No entanto, a fraca infiltração de células NK em tumores sólidos, alterações na sinalização de ativação / inibição e o microambiente tumoral diminuem a morte mediada por NK de algumas células malignas. 19 Desta maneira, gradativamente tem sido cada vez mais estudada a terapia de células NK na área da hematologia e oncologia visando torná-la mais eficaz e acessível. Embora a capacidade das células NK de reconhecer e matar células leucêmicas já tenha sido descrita há 45 anos, 31 um papel clinicamente relevante para as células NK no tratamento da leucemia foi demonstrado pela primeira vez quase 20 anos depois. 32-35-106 A recuperação precoce das células NK após o transplante de células-tronco e o aumento das células NK no enxerto estão associados a melhores resultados na leucemia. 36-38 Evidências adicionais de GVL (graft x leucemia) mediado por células NK foram demonstradas no contexto de transplante de células-tronco hematopoiéticas incompatíveis com HLA (HSCT). 39,40 Ruggeri e colaboradores observaram que os pacientes com LMA submetidos ao TCTH haploideótica diminuíram as taxas de recidiva quando as diferenças de HLA entre o doador e o receptor estavam presentes na direção GVL em um modelo de ligante ausente para células NK. 39 Este conceito foi denominado "ligando-ligante incompatível" e estudos semelhantes confirmaram a importância da alorreatividade das células NK em pacientes com LMA submetidos ao TCTH. 39,41-43 Da mesma forma, diminuição da recidiva e aumento da sobrevivência foram observados em pacientes que receberam transplantes HLA incompatíveis, nos quais o par doador-receptor também foi incompatível para genes KIR. 44-46 Apoiado por esta evidência clínica inicial, a terapia adotiva com células NK para aumentar o efeito GVL foi investigada nos últimos anos. Os primeiros ensaios foram realizados com células NK isoladas de produtos de leucóferese de doadores saudáveis usando seleção de células imunomediadas e ativação de IL-2. 47-49 Usando essa abordagem, Miller e colaboradores demonstraram que a infusão de células NK haploideóticas após a quimioterapia pode induzir a remissão de LMA de mau prognóstico. 50 Em um estudo semelhante, Rubnitz e colaboradores relataram a segurança da infusão de células NK incompatíveis com KIR como terapia de consolidação pós-remissão para crianças com LMA, sem recidivas relatadas nos 10 pacientes tratados. 51 Uma abordagem semelhante foi usada para a transferência adotiva de células NK em pacientes com linfoma refratário. 52,53 É importante ressaltar que o GVHD (doença do enxerto x hospedeiro) não foi relatado em nenhum desses estudos utilizando células NK alogênicas portanto sendo promissor com baixos riscos de efeitos colaterais severos em terapia celular. Outros estudos usando células NK no contexto de TCTH alogênico em pacientes com neoplasias linfóides e mielóides também demonstraram que as infusões de células NK eram seguras e não estavam associadas a reações graves à infusão, GVHD ou rejeição de enxerto. 54-57 No entanto, as taxas de resposta nesses estudos foram variáveis (OS de 29% a 73%) e as doses de células NK produzidas por esta abordagem foram tipicamente limitadas a uma dose única de 107 / kg. Vários avanços tem sido estudados em relação as fontes de células NK bem como métodos de expansão e com isto melhoraram o potencial para terapia com células NK, com um número maior de células NK utilizados como terapêutica. Foram desenvolvidos métodos de expansão que usaram citocinas sozinhas ou em combinação com anticorpos coestimuladores ou agonistas. 58,59 O desenvolvimento de células alimentadoras irradiadas geradas a partir de células monocleares autólogas, linhas de células linfoblastóides transformadas por EBV ou linhas de células tumorais levou a uma melhor maturação e proliferação de células NK ex vivo. 41-48 As células alimentadoras também foram geneticamente modificadas para expressar citocinas ligadas à membrana e moléculas coestimulatórias, como 4-1BB, MICA, IL-15 e IL-21, que podem resultar em expansão >1000 vezes em um período de semanas. O crescimento das células NK pode estabilizar, no entanto, devido à exaustão e/ou senescência proliferativa atribuída a telômeros encurtados. 65,68,69 Em experiências com células alimentadoras K562 irradiadas que expressam 4-1BB e IL-21 ligada à membrana, a IL-21 leva à indução mediada por STAT3 da transcriptase reversa da telomerase e aumento do comprimento do telômero. As células NK expandidas com este método são altamente funcionais e não mostram senescência proliferativa, atingindo uma expansão média de 3.000 vezes em 2 semanas e 20-80.000 vezes em 3 semanas como relatados em estudos prévios. 51,63 Como a vigilância imunológica por células natural killer (NK) e linfócitos T desempenha um papel fundamental no controle de células leucêmicas residuais após quimioterapia ou após transplante de células-tronco na leucemia mielóide aguda (LMA). Para eliminar tais células AML residuais, as células NK e células T usam suas propriedades citotóxicas e imunomoduladoras, isto é, citotoxicidade antileucêmica e secreção de citocinas. 56,57 Vários estudos evidenciaram e sugerem que o risco de recidiva e, portanto, mau prognóstico em pacientes com LMA são parcialmente devido a deficiências funcionais das células NK, principalmente relacionadas a uma baixa expressão de receptores ativadores e atividade citotóxica prejudicada. 58-60 As opções de tratamento para LMA incluem quimioterapia com ou sem transplante de células-tronco hematopoiética (TCTH). 61,62 Visando a remissão completa com a erradicação permanente da doença, os efeitos do enxerto mediado pelas células T e NK versus leucemia após o TCTH são importantes. 63,64 Em particular, as células NK alogênicas possuem um efeito potente contra as células de leucemia com combinações de HLA compatíveis. 65,66 e, além disso, uma recuperação rápida e eficiente de células NK após o transplante está associada a um melhor resultado clínico ao tratamento da doença. 67 No contexto do TCTH, a alorreatividade das células NK supostamente eliminam as células AML residuais e, portanto, diminuindo o risco de recidiva. 68 Em uma abordagem diferente para reduzir o risco de recidiva da LMA, o tratamento com IL-2

após quimioterapia bem-sucedida foi proposto, com a ideia de desencadear as propriedades antileucêmicas das células NK e T. Isso foi avaliado em vários estudos⁶¹⁻⁶⁴, mas o resultado mostrou que a monoterapia com IL-2 não teve eficácia clínica significativa na LMA e esta modalidade de tratamento, portanto, não foi mais utilizada. Nestas linhas de terapias celulares novas formas de tratamentos utilizando terapia com células NK haploidenticas (haplo-NK) ativadas por interleucina-2 (IL-2) mostraram indução de remissão completa (RC) em 30% a 50% dos pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) recidivada e ou refratária e como uma ponte eficaz para o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênicas potencialmente curativas (alloHSCT).^{16,17} No entanto, o uso de IL-2 é limitado pela morte celular induzida por ativação e indução de células T reguladoras do hospedeiro imunossupressor (Tregs).¹⁸⁻²¹ Estratégias para aumentar a expansão in vivo de células NK do doador incluem linfodepleção com ciclofosfamida / fludarabina (Cy / Flu) antes da infusão células NK, depleção de Tregs com uma proteína de fusão de toxina da difteria IL-2 e uso in vivo de citocinas recombinantes.¹⁷ Esta estratégia, no entanto, revelou-se ter toxicidade importante. Neste pensamento de evolução do tratamento de doenças tonco-hematológicas veio o sucesso do transplante alogênico de células hematopoéticas (TCTH) em pacientes com linfoma sugerindo que há um efeito enxerto potente contra linfoma (GVL) exercendo proteção contra recidiva⁶⁵ a partir de linfócitos T e células NK derivados de doadores.⁷¹⁻⁷⁴ O reconhecimento de moléculas de classe 1 de histocompatibilidade principais em células-alvo por células assassinas naturais (NK) confere proteção seletiva contra lise mediada por NK.^{75,76} A terapia com células NK do doador foi explorada em várias publicações já citadas previamente para leucemia mieloide aguda com resultados promissores, mas há dados ainda limitados sobre sua atividade no linfoma. Sendo que após a ativação, as células NK adquirem a capacidade de lisar uma ampla gama de alvos tumorais em cultura e são normalmente sensíveis à lise NK, incluindo linhas de células de linfoma. Doses altas de IL-2 são sinérgicas com o anticorpo monoclonal rituximabe contra linhas celulares resistentes ao rituximabe. Isto sugere que IL-2 fornece um forte estímulo para citotoxicidade celular dependente de anticorpo mediada por NK eficaz (ADCC) Vários estudos têm apoiado um papel da IL-2 na terapia e na manutenção da remissão do LNH, no entanto, a eficácia clínica foi limitada.⁷⁷⁻⁷⁹ No estudo de Bachanova e colaboradores⁸⁰ foram avaliados pacientes com Linfoma não Hodgkin refratários e recidivados tratados com terapia celular a partir do uso de células NK alogênicas expandidas ex vivo com IL-15 e nicotinamida com resultados promissores. Células T CAR anti-CD19 estão sendo avaliadas atualmente em pacientes com linfomas de células B agressivos refratários primários ou recidivas precoces em não menos que três estudos randomizados em comparação com a terapia de resgate tradicional e ASCT (TRANSFORM, NCT03575351; BELINDA, NCT03570892; e ZUMA-7, NCT03391466). As taxas altas e duráveis de CR vistas com células T CAR em DLBCL pré-tratado mais pesadamente prometem que esses produtos podem transformar o padrão de tratamento para esses pacientes de alto risco na primeira recaída. Novas abordagens de tratamento vêm sendo avaliadas, estudadas e são necessárias para pacientes com recidiva após a terapia de primeira linha, recidivados, refratário e que não são considerados candidatos para quimioterapia de alta dose e ASCT. Esses pacientes têm sido historicamente tratados com regimes de intenção paliativa, como R-GemOx (rituximabe, gencitabina, oxaliplatina) ou bendamustina-rituximabe (BR), mas as respostas duráveis são raras. Foi relatado que R-GemOx induz remissões completas em 44% dos indivíduos ineligiáveis para o transplante, mas apenas 13% permanecem livres de progressão em 1 ano.⁹⁸ BR foi amplamente utilizado em pacientes não elegíveis para transplante por causa de sua tolerabilidade favorável, mas a taxa de remissão completa é baixa em 15% e a PFS mediana é inferior a 4 meses.⁹⁹ Opções adicionais estão disponíveis para subconjuntos de pacientes selecionados, como lenalidomida¹⁰⁰ ou ibrutinib¹⁰¹ em células B de centro não germinativo (GCB) DLBCL, ou pembrolizumabe em linfoma de células B mediastinal primário recidivado¹⁰², mas mesmo entre pacientes selecionados, as taxas de remissão completa com essas abordagens direcionadas são baixas e respostas duráveis são incomuns. As células T CAR anti-CD19 poderiam, portanto, representar uma opção atraente para pacientes considerados ineligiáveis para o TCTH e fornecer a primeira opção de intenção curativa para esses pacientes que antes recebiam apenas terapia com intenção paliativa. Ao contrário do TCTH, não há limite máximo de idade para se submeter à terapia com células T CAR, e a quimioterapia de depleção linfática necessária antes que as células T CAR sejam menos tóxicas do que o condicionamento de quimioterapia de alta dose de um ASCT.¹⁰³⁻¹⁰⁵ A seleção do paciente ainda é essencial e, portanto, a candidatura para células T CAR deve ser informada pelo status de desempenho, comorbidades médicas e função do órgão e da medula óssea. O estudo TRANSCEND de lisocabtagene maraleucel incluiu pacientes de até 86 anos, bem como pacientes com um status de desempenho de 2 e comorbidades médicas moderadas, incluindo depuração de creatinina tão baixa quanto 30 mL / min e fração de ejeção ventricular esquerda tão baixa quanto 40%.⁵ Estes os dados sugerem que os produtos de células T anti-CD19 CAR podem ser administrados com segurança a pacientes ineligiáveis para o transplante, validando assim a investigação deste tratamento potencialmente curável como terapia de segunda linha para pacientes considerados ineligiáveis para quimioterapia de alta dose. A eficácia encorajadora observada para essas terapias celulares, terapia NK assim como CAR T cell em pacientes fortemente pré-tratados levanta a questão de se elas devem ser usadas mais cedo no cenário de tratamento, como o tempo da primeira recaída após a quimioimunoterapia de linha de frente, ou potencialmente até mesmo como terapia inicial em pacientes de alto risco. Ao considerar a promessa de tais abordagens, devemos considerar o desempenho dos padrões de atendimento atualmente disponíveis e as áreas existentes de necessidades médicas não atendidas.

Hipótese:

Como amplamente discutido as células NK têm capacidade significativa na vigilância imunológica de tumores e de forma mais adequada tem seu papel no tratamento de alguns tumores recidivados e refratários, e podendo ser mais amplamente explorada por ter mais factível em nosso sistema de saúde. A capacidade de lisar células transformadas imediatamente de uma maneira independente do antígeno as torna candidata atraente para a terapia com células tumorais, mas precisaremos primeiramente analisar se as células NK ainda estão viáveis nos pacientes com Linfomas recidivados e ou refratários. Desta forma buscaremos analisar se há comprometimento nas células NK neste perfil de pacientes buscando expandir in vitro, em nível de grau clínico, a célula NK autóloga destes pacientes visando sua posterior utilização em terapia celular autóloga como método de tratamento em pacientes com Linfoma Não Hodgkin recidivado e ou refratário.

Objetivo Primário:

Avaliar a viabilidade de expansão de células Natural Killer em grau clínico nos pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias.

Objetivo Secundário:

Promover futuramente a possibilidade de uma nova modalidade terapêutica neste perfil de pacientes caso haja expansão em quantidade e qualidade adequadas.

Metodologia Proposta:

Este será um estudo pré clínico in vitro para avaliação da população das células NK. Pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias serão selecionados para testar em 50ml de sangue venoso se será possível expandir células NK, em grau clínico – suficiente para realizar 6 infusões/paciente de aproximadamente 107 células NK/Kg utilizando nossa plataforma tecnológica de expansão já aprovada e utilizada no tratamento da leucemia mieloide aguda recaída ou refratária. Este é um estudo pré-clínico com vistas a futuramente testar em um ensaio clínico a utilização destas células neste perfil de pacientes acima citado. As células Natural Killer serão isoladas e expandidas conforme as Boas Práticas de Manufatura definidas na RDC 508 de 27 de maio de 2021. O presente projeto será submetido à apreciação na Plataforma Brasil/ Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).¹⁰ A criação do termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo, colocar número do anexo) atendeu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos contidas na resolução n.º 466, de 12 de dezembro de 2012, e resolução de n.º 251, de 07 de agosto de 1997 do Conselho Nacional de Saúde, bem como na Declaração de Helsinki VI e Código de Nuremberg. O indivíduo receberá informações claras e objetivas dentro de sua compreensão, a fim de que possam ser esclarecidas as finalidades, os propósitos, bem como os riscos e benefícios diretos da pesquisa com a qual irão contribuir.

Data de Submissão do Projeto: 17/11/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf

Versão do Projeto: 2

Critério de Inclusão:

Para a avaliação de células NK será feita em: -Pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias, aqueles que não se beneficiaram do tratamento padrão (poliquimioterapia, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas) serão incluídos neste estudo, bem como pacientes não elegíveis para transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. Todos os pacientes precisam ter 18 anos ou mais e com linfoma do tipo não hodgkin ou hodgkin confirmados histologicamente por exame anatomopatológico e imunohistoquímico. - Escala de Desempenho de Karnofsky > 70 ou status de desempenho do Eastern Cooperative:- Oncology Group de 0 a 2 com pelo menos 3 meses de sobrevida esperada.

Critério de Exclusão:

Não será avaliada células NK em pacientes com:

- Doenças que afetam o sistema imune e que desta forma irão interferir na avaliação celular como deficiência imunológica, doenças autoimunes, outras neoplasias malignas associadas, distúrbios alérgicos graves.
- Escala de desempenho Zubrud 2 ou Lansky 60.
- Sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).
- Ter sido submetido a terapias investigacionais nas quatro semanas anteriores a coleta da amostra
- Não assinatura do termo consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Riscos:

Os riscos antecipados pelos pesquisadores se referem a punção de acesso venoso para coleta de 50ml de sangue venoso.

Benefícios:

Os benefícios antecipados pelos pesquisadores se referem a possibilidade de posteriormente termos uma nova terapia em pacientes com uma doença em que as possibilidades terapêuticas padrões já foram utilizadas e o paciente encontra-se com doença em atividade.

Metodologia de Análise de Dados:

- Mais de 90% de pureza, de acordo com a imunofenotipagem.
- Mais de 90% de viabilidade celular, após o descongelamento.
- Atividade citotóxica maior de 40% na relação 12.5 células NK: alvo.
- No produto final o número de células T CD3+ poderá ser inferior a 1x10⁵/kg peso do paciente doador.
- Ausência de micobactérias, endotoxina ou crescimento microbiológico.
- Avaliação de cariótipo da célula NK visando exclusão de célula comprometida pela doença de base.

Desfecho Primário:

Viabilidade de expansão de células Natural Killer em grau clínico nos pacientes com linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias prévias.

Tamanho da Amostra no Brasil: 10

Países de Recrutamento

País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	10

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Sim

Detalhamento:

A população estudada será de 10 pacientes portadores de linfoma não hodgkin recidivado ou refratários a terapias serão incluídos neste estudo, bem como em pacientes não elegíveis para TCTH.

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

10

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Avaliação da população das células NK	10	Sem intervenção

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Não

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Avaliação das células NK	03/10/2022	30/11/2023
Inclusão dos pacientes	26/09/2022	29/09/2023
Elaboração e publicação de relatório e artigos científicos	01/09/2023	30/11/2023

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Tabela do orçamento:	Bolsas	R\$ 46.343,43
Total em R\$		R\$ 46.343,43

Bibliografia:

- Margery Gang, Nancy D Marin, Pamela Wong, Carly C Neal, Lynne Marsala, Mark Foster, Timothy Schappe, Wei Meng, Jennifer Tran, Maximilian Schaettler, Marco Davila, Feng Gao, Amanda F Cashen, Nancy L Bartlett, Neha Mehta-Shah, Brad S Kahl, Miriam Y Kim, Matthew L Cooper, John F DiPersio, Melissa M Berrien-Elliott, Todd A Fehniger 2020 Nov 12;136(20):2308-2318. doi: 10.1182/blood.2020006619. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas. Affiliations expandPMID: 32614951 PMID: PMC7702478 (available on 2021-11-12). 2. Christian Sordo-Bahamonde, Massimo Vitale, Seila Lorenzo-Herrero, Alejandro López-Soto, and Segundo Gonzalez, Cancers (Basel). 2020 Apr, 12(4): 893. Published online 2020 Apr. doi: 10.3390/cancers12040893 PMID: PMC7226138 PMID: 32272610 Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. 3. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. J Exp Med. 2003;197:967-76. 4. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulat DH. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. J Immunol. 2004;172:864-70. 5. Dokun AO, Chu DT, Yang L, Bendelac AS, Yokoyama WM. Analysis of in situ NK cell responses during viral infection. J Immunol. 2001;167:5286-93. 6. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood. 2003;101:3052-7. 7. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, Aguila HL, Caligiuri MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. Blood. 2002;100:3633-8. 8. Wang JW, Howson JM, Ghansah T, et al. Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. Science. 2002;295:2094-7. 9. Mocchegiani E, Malavolta M. NK and NKT cell functions in immunosenescence. Aging Cell. 2004;3:177-84. 10. Gonzalez-Rodriguez A.P., Villa-Alvarez M., Sordo-Bahamonde C., Lorenzo-Herrero S., Gonzalez S. NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. J. Clin. Med. 2019;8 doi: 10.3390/jcm8101557. 11. Lo Nigro C., Macagno M., Sangiolo D., Bertolaccini L., Aglietta M., Merlano M.C. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: Biological evidence and clinical perspectives. Ann. Transl. Med. 2019;7:105. doi: 10.21037/atm.2019.01.42. 12. Nayyar G., Chu Y., Cairo M.S. Overcoming Resistance to Natural Killer Cell Based Immunotherapies for Solid Tumors. Front. Oncol. 2019;9:51. doi: 10.3389/fonc.2019.00051. 13. Giles A.J., Hao S., Padgett M., Song H., Zhang W., Lynes J., Sanchez V., Liu Y., Jung J., Cao X., et al. Efficient ADCC killing of meningioma by avelumab and a high-affinity natural killer cell line, haNK. JCI Insight. 2019;4 doi: 10.1172/jci.insight.130688 14. Weiner L.M., Surana R., Wang S. Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 2010;10:317-327. doi: 10.1038/nri2744. 15. Pierpont T.M., Limper C.B., Richards K.L. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. Front. Oncol. 2018;8:163. doi: 10.3389/fonc.2018.00163. 16. Karre K., Ljunggren H.G., Piontek G., Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests

alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319:675–678. doi: 10.1038/319675a0. 17. Veronika Bachanova, Sarah Cooley, Todd E. Defor, Michael R. Verneris, Bin Zhang, David H. McKenna, Julie Curtsinger, Angela Panoskaltis-Mortari, Dixie Lewis, Keli Hippen, Philip McGlave, Daniel J. Weisdorf, Bruce R. Blazar, and Jeffrey S. Miller Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using LL-2 diphtheria toxin fusion protein *Blood*. 2014 Jun 19; 123(25): 3855–3863. Prepublished online 2014 Apr 9. doi: 10.1182/blood-2013-10-532531 18. Moretta L., Locatelli F., Pende D., Sivori S., Falco M., Bottino C., Mingari M.C., Moretta A. Human NK receptors: From the molecules to the therapy of high risk leukemias. *FEBS Lett*. 2011;585:1563–1567. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.061. 19. *Cancers* (Basel). 2020 Apr; 12(4): 893. Published online 2020 Apr 7. doi: 10.3390/cancers12040893 PMID: PMC7226138 PMID: 32272610 Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy Christian Sordo-Bahamonde, Massimo Vitale, Seila Lorenzo-Herrero, Alejandro López-Soto, and Segundo Gonzalez 20. Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: Surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol*. 2019;16:430–441. doi: 10.1038/s41423-019-0206-4. 21. Muntasell A., Ochoa M.C., Cordeiro L., Berraondo P., Lopez-Diaz de Cerio A., Cabo M., Lopez-Botet M., Melero I. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol*. 2017;45:73–81. doi: 10.1016/j.coi.2017.01.003. 22. Hsu J., Hodgins J.J., Marathe M., Nicolai C.J., Bourgeois-Daigneault M.C., Trevino T.N., Azimi C.S., Scheer A.K., Randolph H.E., Thompson T.W., et al. Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *J. Clin. Invest*. 2018;128:4654–4668. doi: 10.1172/JCI99317. 23. Quatrini L., Wieduwild E., Escaliere B., Filijns J., Chasson L., Laprie C., Vivier E., Ugolini S. Endogenous glucocorticoids control host resistance to viral infection through the tissue-specific regulation of PD-1 expression on NK cells. *Nat. Immunol*. 2018;19:954–962. doi: 10.1038/s41590-018-0185-0. 24. Huergo-Zapico L., Acebes-Huerta A., Lopez-Soto A., Villa-Alvarez M., Gonzalez-Rodriguez A.P., Gonzalez S. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front. Immunol*. 2014;5:106. doi: 10.3389/fimmu.2014.00106. 25. Lopez-Soto A., Huergo-Zapico L., Acebes-Huerta A., Villa-Alvarez M., Gonzalez S. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. *Int. J. Cancer*. 2015;136:1741–1750. doi: 10.1002/ijc.28775. 26. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C., Biassoni R., Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol*. 2001;19:197–223. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197. 27. Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., Raulet D.H. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005;436:1186–1190. doi: 10.1038/nature03884. 28. Zingoni A., Cecere F., Vulpis E., Flonda C., Molfetta R., Soriani A., Petrucci M.T., Ricciardi M.R., Fuerst D., Amendola M.G., et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *J. Immunol*. 2015;195:736–748. doi: 10.4049/jimmunol.1402643. 29. Laurent S., Queirolo P., Boero S., Salvi S., Piccoli P., Boccardo S., Minghelli S., Morabito A., Fontana V., Pietra G., et al. The engagement of CTLA-4 on primary melanoma cell lines induces antibody-dependent cellular cytotoxicity and TNF-alpha production. *J. Transl. Med*. 2013;11:108. doi: 10.1186/1479-5876-11-108. 30. Romano E., Kusio-Kobialka M., Foukas P.G., Baumgaertner P., Meyer C., Ballabeni P., Michielin O., Weide B., Romero P., Speiser D.E. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015;112:6140–6145. doi: 10.1073/pnas.1417320112. 31. Margaret G. Lamb, Hemalatha G. Rangarajan, Brian P. Tullius, and Dean A. Lee Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12: 211. Published online 2021 Mar 25. doi: 10.1186/s13287-021-02277-x PMID: PMC7992329 PMID: 33766099 32. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975;16(2):230–239. doi: 10.1002/ijc.2910160205. 33. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*. 1975;16(2):216–229. doi: 10.1002/ijc.2910160204. 34. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):117–121. doi: 10.1002/eji.1830050209. 35. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*. 1975;5(2):112–117. doi: 10.1002/eji.1830050208. 36. Savani BN, Mielke S, Adams S, Uribe M, Rezvani K, Yong AS, et al. Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(10):2145–2152. doi: 10.1038/sj.leu.2404892. 37. Yamasaki S, Hengan H, Ohno Y, Yamanaka T, Iino T, Ito Y, et al. Infusion of transplanted dose of CD56+ cells on development of graft-versus-host disease in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(5):505–510. doi: 10.1038/sj.bmt.1704165. 38. Kim DH, Sohn SK, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Won DI, et al. Transplantation with higher dose of natural killer cells associated with better outcomes in terms of non-relapse mortality and infectious events after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from HLA-matched sibling donors. *Eur J Haematol*. 2005;75(4):299–308. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00514.x. 39. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassonni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097–2100. doi: 10.1126/science.1068440. 40. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333–339. doi: 10.1182/blood.V94.1.333.413a31_333_339. 41. Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassonni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 2003;102(3):814–819. doi: 10.1182/blood-2003-01-0091. 42. Ruggeri L, Mancusi A, Perruccio K, Burchielli E, Martelli MF, Velardi A. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother*. 2005;28(3):175–182. doi: 10.1097/01.cji.0000161395.88959.1f. 43. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010;116(14):2411–2419. doi: 10.1182/blood-2010-05-283051. 44. Giebel S, Nowak I, Dziaczkowska J, Czerw T, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Holowiecki J, Holowiecka-Goral A, Markiewicz M, Kopera M, Karolczyk A, Kyrccz-Krzemien S, Kusnierczyk P. Activating killer immunoglobulin-like receptor incompatibilities enhance graft-versus-host disease and affect survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2009;83(4):343–356. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01280.x. 45. Symons HJ, Leffell MS, Rossiter ND, Zahurak M, Jones RJ, Fuchs EJ. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(4):533–542. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.11.022. 46. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Marsh SG, et al. Donor killer cell Ig-like receptor B haplotypes, recipient HLA-C1, and HLA-C mismatch enhance the clinical benefit of unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *J Immunol*. 2014;192(10):4592–4600. doi: 10.4049/jimmunol.1302517. 47. Klingemann HG, Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy*. 2004;6(1):15–22. doi: 10.1080/14653240310004548. 48. Iyengar R, Handgretinger R, Babarin-Dorner A, Leimig T, Otto M, Geiger TL, Holladay MS, Houston J, Leung W. Purification of human natural killer cells using a clinical-scale immunomagnetic method. *Cytotherapy*. 2003;5(6):479–484. doi: 10.1080/14653240310003558. 49. Meyer-Monard S, Passweg J, Siegler U, Kalberer C, Koehli U, Rovó A, Halter J, Stern M, Heim D, Alois Gratwohl JR, Tichelli A. Clinical-grade purification of natural killer cells in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion*. 2009;49(2):362–371. doi: 10.1111/j.1537-2995.2008.01969.x. 50. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-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):3051–3057. doi: 10.1182/blood-2004-07-2974. 51. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):955–959. doi: 10.1200/JCO.

2009.24.4590. 52. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltsis-Mortari A, Lindgren BR, et al. Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(11):1739–1744. doi: 10.1007/s00262-010-0896-z. 53. Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, Moreno A, DuPont B, Hsu KC, Baxter-Lowe LA, Cottler-Fox M, Shaughnessy Jr JD, Barlogie B, van Rhee F. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;143(5):641–653. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07340.x. 54. Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kühne T, Favre G, Gratwohl A. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004;18(11):1835–1838. doi: 10.1038/sj.leu.2403524. 55. Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, Paulussen M, Gratwohl A, Klingebiel T, Bader P, Tichelli A, Schwabe D, Koehl U. Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(3):433–438. doi: 10.1038/bmt.2012.162. 56. Koehl U, Kalberer C, Spanholtz J, Lee DA, Miller JS, Cooley S, Lowdell M, Uharek L, Klingemann H, Curti A, Leung W, Alici E. Advances in clinical NK cell studies: donor selection, manufacturing and quality control. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1115178. doi: 10.1080/2162402X.2015.1115178. 57. Rizzeri DA, Storms R, Chen DF, Long G, Yang Y, Nikcevic DA, Gasparetto C, Horwitz M, Chute J, Sullivan K, Hennig T, Misra D, Apple C, Baker M, Morris A, Green PG, Hasselblad V, Chao NJ. Natural killer cell-enriched donor lymphocyte infusions from a 3-6/6 HLA matched family member following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(8):1107–1114. doi: 10.1016/j.bbmt.2010.02.018. 58. Heinze A, Grebe B, Bremm M, Huenecke S, Munir TA, Graafland L, et al. The synergistic use of IL-15 and IL-21 for the generation of NK cells from CD3/CD19-depleted grafts improves their ex vivo expansion and cytotoxic potential against neuroblastoma: perspective for optimized immunotherapy post haploidentical stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2019;10:2816. doi: 10.3389/fimmu.2019.02816. 59. Li X, He C, Liu C, Ma J, Ma P, Cui H, et al. Expansion of NK cells from PBMCs using 56mobilized 4-1BBL and interleukin-21. *Int J Oncol*. 2015;47(1):335–342. doi: 10.3892/ijo.2015.3005. 60. Lim O, Lee Y, Chung H, Her JH, Kang SM, Jung MY, Min B, Shin H, Kim TM, Heo DS, Hwang YK, Shin EC. GMP-compliant, large-scale expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013;8(1):e53611. doi: 10.1371/journal.pone.0053611. 61. Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Jr, Samsel L, Fan Y, Tawab A, Childs R. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11(3):341–355. doi: 10.1080/14653240902807034. 62. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0076781. 63. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, Singh H, Hurton L, Maiti SN, Huls MH, Champlin RE, Cooper LJ, Lee DA. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *Plos One*. 2012;7(1):e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264. 64. Harada H, Watanabe S, Saijo K, Ishiwata I, Ohno T. A Wilms tumor cell line, HFWT, can greatly stimulate proliferation of CD56+ human natural killer cells and their novel precursors in blood mononuclear cells. *Exp Hematol*. 2004;32(7):614–621. doi: 10.1016/j.exphem.2004.03.011. 65. Fujisaki H, Kakuda H, Imai C, Mullighan CG, Campana D. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol*. 2009;145(5):606–613. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07667.x. 66. Jiang B, Wu X, Li XN, Yang X, Zhou Y, Han H, Wei AH, Yan W. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21. *Cell Immunol*. 2014;290(1):10–20. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.04.011. 67. Phan MT, Lee SH, Kim SK, Cho D. Expansion of NK cells using genetically engineered K562 feeder cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1441:167–174. doi: 10.1007/978-1-4939-3684-7_14. 68. Spanholtz J, Preijers F, Tordoir M, Trilsbeek C, Paardekooper J, de Witte T, Schaap N, Dolstra H. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *Plos One*. 2011;6(6):e20740. doi: 10.1371/journal.pone.0020740. 69. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, Eldridge P, Leung WH, Campana D. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. 2009;69(9):4010–4017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712. 70. Lee DA. Cellular therapy: adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev*. 2019;290(1):85–99. doi: 10.1111/immr.12793. 71. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295:2097–2100. 72. Novitzky N, Thomas V. Allogeneic stem cell transplantation with T cell-depleted grafts for lymphoproliferative malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13:107–115. 73. Chalandon Y, Roosnek E, Mermillod B, Waelchli L, Helg C, Chapuis B. Can only partial T-cell depletion of the graft before hematopoietic stem cell transplantation mitigate graft-versus-host disease while preserving a graft-versus-leukemia reaction? A prospective phase II study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:102–110. 74. Perales MA, Jenq R, Goldberg JD, Wilton AS, Lee SS, Castro-Malaspina HR, Hsu K, Papadopoulos EB, van den Brink MR, Boulard F, Kernan NA, Small TN, Wolden S, Collins NH, Chiu M, Heller G, O'Reilly RJ, Kewalramani T, Young JW, Jakubowski AA. Second-line age-adjusted International Prognostic Index in patients with advanced non-Hodgkin lymphoma after T-cell depleted allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2010. 75. Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, Verdiani S, Malnati MS, Vitale M, Bottino C, Moretta L, Moretta A, Long EO. Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. *Immunity*. 1995;2:439–449. 76. Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science*. 1995;268:405–408. 77. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med*. 1987;316:889–897. 78. Khan KD, Emmanouilides C, Benson DM, Jr, Hurst D, Garcia P, Michelson G, Milan S, Ferketich AK, Piro L, Leonard JP, Porcu P, Eisenbeis CF, Banks AL, Chen L, Byrd JC, Caligiuri MA. A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:7046–7053. 79. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, Burger SR, Panoskaltsis-Mortari A, Keevey-Taylor CA, Zhang MJ, Miller JS. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32:177–186. 80. Veronika Bachanova, MD PhD, Joseph Maakaron, MD, David H. McKenna, MD, Qing Cao, MS, Todd E. DeFor, MS, Fiona He, MD, Murali Janakiram, MD, Rose Wangen, Zuzan Cayci, MD, Bartosz Grzywacz, MD, Ronit Simantov, MD, Tracey Lodie, PhD, Jeffrey S. Miller, MD IMMUNOTHERAPIES | NOVEMBER 5, 2020 Results of a Phase 1 Trial of GdA-201, Nicotinamide-Expanded Allogeneic Natural Killer (NK) Cells in Patients with Refractory Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) and Multiple Myeloma Blood (2020) 136 (Supplement 1): 6. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-142419>. 81. McKenna DH, Kadidlo DM, Kadidlo DM, Cooley S, Miller JS. Clinical production and therapeutic applications of alloreactive natural killer cells. *Methods Mol Biol*. 2012;882:491–507. 82. Vitolo U, Trnny M, Belada D, et al. Obinutuzumab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35:3529–3537. 83. Stephens DM, Li H, LeBlanc ML, et al. Continued risk of relapse independent of treatment modality in limited-stage diffuse large B-cell lymphoma: final and long-term analysis of Southwest Oncology Group Study S8736. *J Clin Oncol*. 2016;34:2997–3004. 84. Sant M, Minicozzi P, Mounier M, et al; EURO-CARE-5 Working Group. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO-CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15:931–942. 85. Philip T, Armitage JO, Spitzer G, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1987;316:1493–1498. 86. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28:4184–4190. 87. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol*. 2014;32:3490–3496. 88. van

Imhoff GW, McMillan A, Matasar MJ, et al. Ofatumumab versus rituximab salvage chemoimmunotherapy in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: The ORCHARRD Study. *J Clin Oncol*. 2017;35:544-551. 89. Thieblemont C, Briere J, Mounier N, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol*. 2011;29:4079-4087. 90. Epperla N, Maddocks KJ, Salhab M, et al. C-MYC-positive relapsed and refractory, diffuse large B-cell lymphoma: impact of additional "hits" and outcomes with subsequent therapy. *Cancer*. 2017;123:4411-4418. 91. Hitz F, Connors JM, Gascoyne RD, et al. Outcome of patients with primary refractory diffuse large B cell lymphoma after R-CHOP treatment. *Ann Hematol*. 2015;94:1839-1843. 92. Sauter CS, Matasar MJ, Meikle J, et al. Prognostic value of FDG-PET prior to autologous stem cell transplantation for relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2015;125:2579-2581. 93. Armand P, Welch S, Kim HT, et al. Prognostic factors for patients with diffuse large B cell lymphoma and transformed indolent lymphoma undergoing autologous stem cell transplantation in the positron emission tomography era. *Br J Haematol*. 2013;160:608-617. 94. Winter A, Rybicki L, Shah SN, et al. Prognostic value of pre-transplant PET/CT in patients with diffuse large B-cell lymphoma undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2018;59:1195-1201. 95. Vose JM, Carter S, Burns LJ, et al. Phase III randomized study of rituximab/carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (BEAM) compared with iodine-131 tositumomab/BEAM with autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed diffuse large B-cell lymphoma: results from the BMT CTN 0401 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31:1662-1668. 96. Vardhana SA, Sauter CS, Matasar MJ, et al. Outcomes of primary refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with salvage chemotherapy and intention to transplant in the rituximab era. *Br J Haematol*. 2017;176:591-599. 97. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130:1800-1808. 98. Mounier N, El Gnaoui T, Tilly H, et al. Rituximab plus gemcitabine and oxaliplatin in patients with refractory/relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not candidates for high-dose therapy. A phase II Lymphoma Study Association trial. *Haematologica*. 2013;98:1726-1731. 99. Vacirca JL, Acs PI, Tabbara IA, et al. Bendamustine combined with rituximab for patients with relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2014;93:403-409. 100. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer*. 2011;117:5058-5066. 101. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015;21:922-926. 102. Zinzani PL, Ribrag V, Moskowitz CH, et al. Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2017;130:267-270. 103. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20:31-42. 104. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. JULIET Investigators. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2019;380:45-56. 105. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Pivotal safety and efficacy results from transcend NHL 001, a multicenter phase 1 study of lisocabtagene maraleucel (liso-cel) in relapsed/refractory (R/R) large B cell lymphomas. *Blood*. 2019;134 (Supplement 1):241. 106. Silla L, Valim V, Pezzi A, da Silva M, Wilke I, Nobrega J, Vargas A, Amorin B, Correa B, Zambonato B, Scherer F, Merzoni J, Sekine L, Huls H, Cooper LJ, Paz A, Lee DA. Adoptive immunotherapy with double-bright (CD56bright/CD16bright) expanded natural killer cells in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a proof-of-concept study. *Br J Haematol*. 2021 Dec;195(5):710-721. doi: 10.1111/bjh.17751. Epub 2021 Sep 7. PMID: 34490616.

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.odt
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.docx
Outros	Carta_resposta_pendencias.doc
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.docx
Declaração de Pesquisadores	Documento_aceite_professor_orientador.pdf
Declaração de Pesquisadores	Documento_aceite_professor_orientador.pdf
Declaração de Pesquisadores	Documento_aceite_professor_orientador.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf
Outros	Carta_resposta_pendencias.pdf
Declaração de Pesquisadores	Documento_aceite_professor_orientador.pdf
Comprovante de Recepção	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_2008562.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.odt
Folha de Rosto	FR_20220379.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.pdf

Data de Submissão do Projeto: 17/11/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf

Versão do Projeto: 2

Folha de Rosto	FR_20220379.pdf
Outros	projeto_NK_mestrado_correcao_CEP.docx
Folha de Rosto	FR_20220379.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_NK_mestrado.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.odt
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.odt
Folha de Rosto	FR_20220379.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_NK_mestrado_correcao_CEP.docx
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_NK_mestrado_correcao_CEP.pdf
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf

Finalizar

Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: Sim
 Prazo: Até a publicação dos resultados

Data de Submissão do Projeto: 17/11/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2008562.pdf

Versão do Projeto: 2