

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**Edição de células endógenas na terapêutica - Utilização e perspectivas das
células CAR-T na terapia contra o câncer**

Jailda Santos Vasconcelos

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Orientador: Marco Antonio Stephano

São Paulo
2020

DEDICATÓRIA

À minha heroína e exemplo de vida, minha mãe Railda Santos Vasconcelos e ao meu falecido pai, que tanto me ensinou Jaime da Costa Vasconcelos. À minha irmã, Janaina Santos Vasconcelos e aos meus familiares que me apoiaram sempre. Aos meus amigos, que me acompanharam em toda a jornada universitária e ao meu namorado Rafael Marcondes Godofredo que esteve ao meu lado durante a elaboração desse trabalho e em tantas outras etapas desafiadoras da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Professores Elvira Maria Guerra Shinohara e Ricardo Ambrósio Fock por serem professores tão incríveis e por terem me inspirado a aprofundar os conhecimentos em onco-hematologia. Agradeço aos Professores Paolo di Mascio e Graziella Eliza Ronsein pela dedicação e confiança durante meus dois anos de Iniciação Científica e principalmente ao Professor Marco Antonio Stephano, por ter aceitado ser o meu orientador.

Obrigada Universidade de São Paulo e Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de fazer o curso de Farmácia-Bioquímica, estendendo os meus agradecimentos aos professores, à direção, aos técnicos dos laboratórios, aos setores administrativos, da limpeza e demais colaboradores da instituição.

Agradeço ao Hospital Universitário, à Farma Júnior, ao Instituto de Química, ao CNPQ e às Farmacêuticas Sanofi e Novartis, que me proporcionaram a chance de expandir os meus horizontes através dos estágios realizados.

Por fim, agradeço pela vida e pelo privilégio de estudar e trabalhar com o que eu amo.

“A vida lhe dá muito tempo para fazer o que você quer, se você ficar no momento presente.” – Deepak Chopra

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	1
RESUMO.....	2
1. INTRODUÇÃO	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1. Estratégias de pesquisa	6
3.2. Critérios de inclusão	7
3.3. Critérios de exclusão	7
4. RESULTADOS	7
5. DISCUSSÃO	9
5.1. Doenças onco-hematológicas	9
5.1.1. Fisiopatologia das doenças onco-hematológicas.....	10
5.1.2. Terapias convencionais vs terapias que envolvem edição de células endógenas.....	12
5.2. CAR-T	12
5.2.1. Resultados em estudo clínico	16
5.2.2. Eventos adversos	20
5.2.3. Perspectivas e regulamentação.....	20
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
8. ANEXOS.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

4-1BB: Receptor de glicoproteína transmembranar tipo 2 pertencente à família TNF

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs: *Antigen presenting cells* (células apresentadoras de antígenos profissionais)

BRCA: *Breast cancer* (gene supressor de tumor de mama)

CAR: *Chimeric antigen receptor* (receptor de antígenos quiméricos)

CAR-T: *T-Chimeric antigen receptor* (linfócito T com receptor de antígenos quiméricos)

Cas9: *CRISPR associated protein 9*

CD137: *Cluster of Differentiation 137* (membro da família de receptores TNF)

CD19: *Cluster of Differentiation 19* (antígeno de superfície de linfócitos B)

CD3ζ: Cadeia zeta da glicoproteína de superfície de célula T CD3

CPH: Células progenitoras hematopoéticas

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas)

CRS: Cytokine release syndrome (síndrome de liberação de citocinas)

DLBCL: *Diffuse large B-cell lymphoma* (linfoma difuso de grandes células B)

DMR: Doença mínima residual

FDA: *Food and Drug Administration* (EUA)

HSCT: *Hematopoietic stem cell transplantation* (transplante de medula óssea)

IL: Interleucina

LLA: Leucemia Linfóide Aguda

LLC: Leucemia Linfóide Crônica

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

LMC: Leucemia Mielóide Crônica

MO: Medula óssea

RC: Remissão completa

RCi: Remissão completa com recuperação hematológica incompleta

RG: Resposta global

TALENs: *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

TCR - *T-cell receptor* (receptor de células T)

TILs - *Tumor-infiltrating lymphocytes* (linfócitos cultivados a partir de fragmentos de tumores ressecados)

ZFNs: *Zinc Finger Nucleases*

RESUMO

VASCONCELOS, JS. **Edição de células endógenas na terapêutica - Utilização e perspectivas das células CAR-T na terapia contra o câncer**. 2020 no. f. 29. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: *CAR T-cell therapy, Engineering CAR-T; CAR Tcell immunotherapy; Human cancer*

INTRODUÇÃO: Com as terapias convencionais para tratamento de câncer busca-se alterar a dinâmica dos clones cancerígenos, introduzindo uma seleção de potentes drogas ou radiação. Essas terapias geralmente causam morte celular massiva e pouco específica, sem contar a seleção de variantes celulares resistentes ao tratamento (JEMAL, SIEGEL e WARD et al., 2008). Por sua vez, a terapia CAR-T é uma terapia imunocelular autóloga que envolve a reprogramação das células T do próprio paciente para identificar e eliminar células neoplásicas, e tem demonstrado resultados clínicos promissores em hematologias malignas (JUNG e LEE, 2018).

OBJETIVO: O trabalho busca apresentar a recente terapia que utiliza edição de células T endógenas para tratamento de câncer (CAR-T). Através desse levantamento espera-se entender quais tipos de câncer estão sendo mais pesquisados, assim contribuindo para o entendimento da nova terapia.

METODOLOGIA: A metodologia deste trabalho consistiu em pesquisa descritiva, por meio da busca ativa de artigos científicos em inglês e português publicados nos últimos 10 anos, nas diversas bases de dados científicas.

RESULTADOS: Durante a pesquisa foram localizadas 21 referências sobre a terapia CAR-T, todas em inglês ou português e somente um dos artigos encontrados foi publicado fora do período pré-determinado.

DISCUSSÃO: Conforme estudo realizado em 2018, a maioria dos pacientes tratados com CAR-T alcançou e manteve a remissão. Os pacientes participantes tinham LLA de células B recidiva ou refratária, com idade média de 11 anos (faixa de 3 à 23 anos), com contagem maior do que 5% de linfoblastos na medula óssea. Ambos *end points*, primário e secundário foram alcançados e a taxa de resposta global (RC/RCi) foi de 81% durante o acompanhamento médio de 13,1 meses (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

O “ELIANA trial” é um estudo que compila e atualiza os resultados realizados em 25 centros internacionais. Na análise de 75 pacientes pediátricos e jovens adultos com leucemia linfoblástica aguda de células B recidiva ou refratária infundidos com CAR-T, 60% dos pacientes atingiram RC e 21% dos pacientes atingiram RCi; Todos os pacientes infundidos com a melhor resposta global de RC/RCi foram negativos para DRM e as células T modificadas foram detectadas em pacientes por até 20 meses (ELIANA *trial*, 2018).

CONCLUSÃO: Através dos estudos levantados, pode-se concluir que estão sendo realizados mais estudos com CAR-T para tratamento das neoplasias hematológicas, e dentre eles, os estudos com pacientes com LLA são os mais comuns. Por outro lado, o desenvolvimento da próxima geração de células CAR-T usando tecnologias de edição genética irá aumentar o potencial terapêutico do tratamento com células CAR-T para ambos tumores, hematológicos e sólidos (JUNG e LEE, 2018).

Atualmente no Brasil, a implementação da terapia CAR-T está em estágios iniciais. Em março de 2020, a ANVISA disponibilizou a RDC 338, que regulamenta os requisitos mínimos para o pedido de registro de produtos de terapia avançada. Após o recebimento da documentação a ANVISA tem 365 dias para avaliação dos requerimentos enquadrados na categoria ordinária e 120 dias para avaliação dos requerimentos enquadrados na categoria prioritária.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença genética, com o crescimento de células tumorais iniciadas por mutações que ativam oncogenes. Este processo é combinado com a ativação genética ou não genética de genes que promovem a proliferação de tumores ou inativação de genes que as suprimem. Em muitos tipos de câncer, a oncogênese é acompanhada pelo acúmulo de mutações, que podem fornecer uma vantagem seletiva às populações de células cancerígenas, aumentando seu grau de diversidade genética e acelerando sua capacidade evolutiva (CHEN e MELLMAN, 2017).

No entanto, a diversidade mutacional das células neoplásicas não é necessariamente uma vantagem, pois quanto mais uma célula cancerígena diverge de uma célula normal, maior a probabilidade de ser reconhecida como estranha pelo sistema imunológico. Isso porque a resposta imune ao câncer depende de células T específicas para antígenos associados ao câncer, ou seja, quanto maior for a mutação, mais fácil é o reconhecimento de novos epítomos. Atualmente considera-se, inclusive, que a carga mutacional dos tumores contribui para o reconhecimento imunológico do câncer e pode, pelo menos em parte, determinar a resposta de uma pessoa à imunoterapia (CHEN e MELLMAN, 2017).

As células hospedeiras também são determinantes críticos do crescimento do câncer e as consequências da influência recíproca dele em seu organismo hospedeiro são profundas. Os efeitos sistêmicos de tumores em seu organismo hospedeiro, como anemia, febre, inflamação, coagulopatias, secreção de hormônios ectópicos e neuropatias alteram o metabolismo do hospedeiro e diminuem por consequência a sua imunidade antitumoral (FLINT, FEARON e JANOWITZ, 2017).

A elevada mortalidade das neoplasias é consequência de seu processo de reprodução clonal repetitivo com diversificação genética e seleção clonal. Apesar de grandes investimentos em pesquisa a sua erradicação, ou até mesmo seu controle em estágios avançados ainda não foram alcançados. Além disso, o grande entendimento da biologia e genética envolvida no câncer, bem como a sua complexidade celular e características evolutivas é de difícil tradução para a prática clínica (JEMAL, SIEGEL e WARD et al., 2008).

A leucemia é uma neoplasia maligna dos leucócitos, geralmente de origem desconhecida. Sua principal característica é o acúmulo de células neoplásicas na medula óssea, substituindo as células sanguíneas normais. Como as células neoplásicas não funcionam de maneira adequada, o organismo fica mais sujeito a

infecções, além de ocasionar fadiga, falta de ar, dor de cabeça e sangramentos, provenientes da produção prejudicada da série vermelha e plaquetária. A leucemia possui uma estimativa de 10.810 novos casos e 6.837 mortes por ano (INCA, 2020).

Com as terapias convencionais busca-se alterar a dinâmica dos clones cancerígenos, introduzindo uma seleção de potentes drogas (quimioterapia) ou radiação (radioterapia), que geralmente causam morte celular massiva e pouco específica, sem contar a seleção de variantes celulares resistentes ao tratamento (JEMAL, SIEGEL e WARD et al., 2008). Porém, as baixas taxas de sucesso com quimioterapia para doenças hematológicas refratárias exigiram novas abordagens terapêuticas com maior toxicidade para tumores e menor toxicidade para alvos saudáveis.

As primeiras abordagens imunoterápicas foram baseadas no transplante de células tronco hematopoéticas associadas à infusão de linfócitos cultivados à partir de fragmentos de tumores ressecados (TILs). Os linfócitos TILs são gerados pelo processamento estéril de uma amostra de tumor ressecado. Embora as técnicas variem, geralmente pequenos fragmentos do tumor (~2–3mm) são colocados em cultura com alta concentração de IL-2 durante cerca de 3 semanas, gerando linfócitos que reconhecem especificamente células tumorais e as eliminam in vivo (OTT, DOTTL e YEE. et al., 2019).

Por sua vez, a introdução de tecnologias de engenharia envolvendo o receptor de células T (TCR) tornou possível a produção in vitro de linfócitos específicos para um antígeno. As células T com receptores TCR alterados são uma das opções utilizadas no tratamento de diversas formas avançadas de câncer. O processo para essa terapia se inicia com o isolamento das células T do paciente (provenientes do tecido tumoral ou do sangue). Posteriormente, as cadeias isoladas α e β do TCR são inseridas em um vetor de lentivírus ou retrovírus, de forma a codificar as sequências desejadas de TCR $\alpha\beta$. Após a modificação, as células T são multiplicadas in vitro para então serem infundidas no paciente (PING, LIU e ZHANG, 2018).

A terapia com receptor de antígenos quiméricos (CAR) localizados nas células T é uma imunoterapia emergente, pois tem demonstrado resultados clínicos promissores em neoplasias hematológicas malignas, inclusive aquelas que envolvem as células B (JUNG e LEE, 2018). Se trata de uma terapia de câncer imunocelular autóloga que envolve a reprogramação das células T do próprio paciente com um transgene que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) para identificar e

eliminar células que expressam CD19 (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018). Desse modo, o desenvolvimento de tecnologias envolvidas na produção de terapias como TILs e TCRs apresentaram resultados de grande importância para a evolução da terapia CAR- T.

O histórico desse tipo de terapia iniciou-se em 2010, quando uma criança de 5 anos foi diagnosticada com leucemia linfoblástica aguda (LLA) de curso atípico. Após alguns meses de tratamento a criança teve uma recaída, para a qual um transplante de medula óssea foi recomendado. Entretanto, preocupados com os efeitos tóxicos do transplante, seu pais procuraram uma segunda opinião no Hospital Infantil da Pensilvânia. Lá eles souberam de uma nova terapia que envolvia a engenharia genética das próprias células T do paciente para matar células tumorais (CART-19), porém, ainda sem um ensaio clínico definido pela Food and Drug Administration (FDA) (ROSENBAUM, 2017).

Com mais semanas de quimioterapia, seus pais optaram por matriculá-la no estudo e ela se tornou a primeira criança a receber o CART-19. A terapia funcionou e a sobrevivência da criança ajudou a reavivar uma linha inteira de pesquisa. Em agosto de 2017, o FDA aprovou o tisagenlecleucel da Novartis, a primeira terapia de célula T de receptor de antígeno quimérico (CAR-T). Essa terapia possui duas indicações: linfoma difuso de grandes células B não-Hodgkin (DLBCL) e LLA recidivante ou refratária. Embora a indicação seja limitada, os resultados são impressionantes em uma população de pacientes com poucas opções: 83% das 63 crianças avaliáveis que receberam tisagenlecleucel no estudo de fase 2 da Novartis tiveram completa eliminação de células malignas em 3 meses (ROSENBAUM, 2017).

2. OBJETIVOS

Esse trabalho busca apresentar a recente terapia que utiliza edição de células T endógenas para tratamento de câncer (CAR-T). Através desse levantamento espera-se entender quais tipos de câncer estão sendo mais pesquisados, assim contribuindo para o entendimento da nova terapia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégias de pesquisa

A metodologia deste trabalho consistiu em pesquisa descritiva, por meio da busca ativa de artigos científicos dos últimos 10 anos nas bases de dados PubMed,

SciFinder, Web of Science e outras bases que apresentaram dados relevantes. Para isso foram utilizadas as seguintes palavras chaves e suas associações em inglês e português: *CAR-T cell therapy, Engineering CAR-T; CAR-T cell immunotherapy; Human cancer, T cells, chimeric antigen receptor, tisagenlecleucel*.

3.2. Critérios de inclusão

A literatura selecionada obedeceu aos seguintes critérios:

- Publicações em português e inglês;
- Publicações cujo conteúdo esteja em conformidade aos objetivos deste trabalho;
- Artigos e demais materiais publicados nos últimos 10 anos, ou anteriores caso sejam de grande relevância ao trabalho, com tratamento das informações de forma qualitativa.

3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídas da literatura selecionada:

- Publicações em outras línguas sem tradução para o inglês.
- Publicações fora do período determinado, sem relevância ao trabalho.

4. RESULTADOS

Durante a pesquisa foram localizadas 21 referências, (19 artigos) sobre a terapia CAR-T, dos quais 15 artigos falavam sobre resultados de eficácia da e foram utilizados para a discussão desse trabalho. Um dos artigos abordou de forma mais profunda a história do CAR-T, trazendo informações sobre a primeira paciente que recebeu a terapia.

Três dos artigos encontrados abordam o processo de produção das células T quiméricas com mais profundidade e outros três artigos trouxeram assuntos relacionados aos eventos adversos da terapia CAR-T. Duas referências com informações de prescrição da terapia aprovada também foram encontradas e utilizadas para a discussão. Por fim, três artigos abordaram a utilização da terapia CAR-T além das aplicações já aprovadas.

Todos os artigos encontrados estão em inglês ou português e somente um dos artigos encontrados foi publicado fora do período pré-determinado nos métodos.

Assunto	Quantidade de artigos	Autor(es)/ano
História do CAR-T	1	ROSENBAUM, 2017
Resultados de eficácia da terapia com o CAR-T	15	MILONE, FISH e CARPENITO et al., 2009* ATACA e ARSLAN, 2015 SRIVASTAVA e RIDDELL, 2015 KAWALEKAR, O'CONNOR e FRAIETTA et al., 2016 RODGERS, MAZAGOVA e HAMPTONA et al., 2016 FLINT, FEARON e JANOWITZ, 2017 LEVINE, MISKIN e WONNACOTT et al., 2017 ROSENBAUM, 2017 ELIANA trial, 2018 JUNE, O'CONNOR e KAWALEKAR et al., 2018 JUNG e LEE, 2018 MAUDE, LAETSCH e BUECHNER et al., 2018 PANG, HOU e YANG et al., 2018 PING, LIU e ZHANG, 2018 WEI, HAN e BO et al., 2019
Processo de produção das células T quiméricas	3	JUNG e LEE, 2018 LEVINE, MISKIN e WONNACOTT et al., 2017 WEI, HAN e BO et al., 2019
Eventos Adversos da terapia CAR-T	3	BONIFANT, JACKSON e BRENTJENS et al., 2016 RODGERS, MAZAGOVA e HAMPTONA et al., 2016 YU, YI e QIN et al., 2019

Outras aplicações para a terapia CAR-T (além das aprovações atuais)	3	GRIGOR, FERGUSON e HAGGAR et al., 2017 PANG, HOU e YANG et al., 2018 OTT, DOTTL e YEE. et al., 2019
Informações de prescrição	2	Kymriah® [<i>prescribing information</i>]. Novartis, 2018 Kymriah® - <i>Summary of product characteristics</i> . Novartis, 2018
Total de referências	21	-

Tabela 1: Lista dos artigos e demais resultados localizados durante a pesquisa. Foram localizadas 21 referências para os assuntos descritos acima (um mesmo artigo pode constar em mais de uma categoria).

*artigo fora do período pré-determinado nos métodos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Doenças onco-hematológicas

A leucemia é uma neoplasia maligna clonal com origem na medula óssea (MO). Os linfomas são os tumores que ocorrem em órgãos hematopoiéticos secundários (baço, gânglios, linfonodos), podendo invadir a medula óssea dar origem a uma leucemia.

A leucemia apresenta sinais característicos:

1 – Medula óssea hiperplásica: devido à proliferação desregulada com ou sem escalonamento.

2 – Displasia medular: apresenta diversas alterações morfológicas.

3 – Anaplasia: parada no processo de maturação celular, com surgimento dos blastos leucêmicos (RODAK, FRITSMA e KEOHANE, 2012; LEE, BITHEL e FOERSTER et al., 2007).

Nas leucemias agudas (LLA e LMA), há presença de 20% ou mais de blastos (células indiferenciadas) na medula óssea e sangue periférico, e as manifestações clínicas são: anemia, neutropenia, linfocitopenia, plaquetopenia, alterações metabólicas e superpopulação celular. Já as leucemias crônicas se caracterizam pela presença de células morfológicamente diferenciadas no sangue periférico e na medula

óssea (RODAK, FRITSMA e KEOHANE, 2012; LEE, BITHEL e FOERSTER et al., 2007).

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é caracterizada pela proliferação de células mielóides granulocíticas que mantêm sua capacidade de diferenciação. O clone anômalo se expande e infiltra o parênquima medular de modo lento, progressivo, em detrimento da proliferação das células normais. O diagnóstico é realizado através de hemograma com análise morfológica da extensão sanguínea, mielograma, biópsia da medula, avaliação citogenética, coloração para fibras de reticulina e marcadores genéticos (BCR/ABL1, JAK2, MPL). A LMC BCR-ABL1 negativa cursa em fases: fase crônica com blastos <5% (evolução por 3 a 5 anos) e fase acelerada, com blastos entre 10% a 19%. Nessa última fase, é comum que a doença torne-se refratária a terapêutica, com hepatomegalia e esplenomegalia. Também é a fase na qual a agudização da doença é mais comum (blastos > 20%, chamada de crise blástica) (RODAK, FRITSMA e KEOHANE, 2012; LEE, BITHEL e FOERSTER et al., 2007).

A Leucemia Linfóide Crônica (LLC) é caracterizada pela infiltração de células linfóides maduras na medula óssea e sangue periférico, além dos órgãos linfóides (gânglios linfáticos e baço). Os linfócitos têm pequeno índice de proliferação e param na fase G0 do ciclo celular. Como há aumento de sobrevivência e defeito no mecanismo de apoptose, há aumento progressivo de linfócitos na circulação porque as células se acumulam. A LLC pode ser classificada quanto à morfologia das células, imunofenotipagem, citogenética, alterações moleculares e quanto à origem (células B ou T). As leucemias com origem em células B possuem melhor prognóstico e as de células T são raras. O diagnóstico é realizado através de hemograma com linfócitos > 5000 e mielograma com >30% de linfócitos maduros (RODAK, FRITSMA e KEOHANE, 2012; LEE, BITHEL e FOERSTER et al., 2007).

5.1.1 Fisiopatologia das doenças onco-hematológicas

O Câncer é uma doença genética causada por mutações que ativam oncogenes e levam ao crescimento de tumores celulares. Esse processo é combinado com a ativação de genes que promovem a proliferação de tumores ou a desativação de genes que a suprimem. O acúmulo de mutações em muitos tipos de câncer gera uma vantagem seletiva às populações de células, pois aumenta seu grau de diversidade. Por outro lado, esse aumento de diversidade tem um custo: quanto mais

uma célula cancerígena diverge de uma célula normal, mais facilmente ela é reconhecida pelo sistema imune (CHEN e MELLMAN, 2017).

Em síntese, a carcinogênese pode ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos) ou iniciar-se de forma espontânea, por meio de mutações pontuais, rearranjo gênico, amplificação gênica, ou outras alterações epigenéticas. Dentre os carcinogênicos físicos, a energia solar e ionizante (raios X, raios gama) são os mais frequentes, e podem ter ações mutacionais diretas ou indiretas (intermediadas pela produção de radicais livres a partir da água ou do oxigênio) (Ministério da saúde, 2008).

Já os carcinogênicos biológicos são representados por diversos vírus de DNA (papiloma humano - HPV, de Epstein-Barr e o da hepatite B) e de RNA retrovírus (HTLV 1), este último, responsável pelo linfoma de células T. O mecanismo de infecção do vírus ocorre pela incorporação do seu DNA (ou, no caso dos retrovírus, do DNA transcrito de seu RNA pela enzima transcriptase reversa) ao da célula hospedeira, que passa a ser utilizada para a produção de novos vírus (Ministério da saúde, 2008).

Por fim, os carcinógenos químicos (particularmente aqueles presentes no tabaco e resultantes de sua combustão e metabolismo), assim como os azocorantes, aflatoxinas e benzeno, foram caracterizados como agentes de indução cancerígena química no homem e em animais (Ministério da saúde, 2008).

A carcinogênese ocorre através de etapas que se iniciam com a alteração no DNA, com uma mutação herdável em genes supressores de tumores (como os genes BRCA 1 e 2), protooncogenes (controle de vias de proliferação, diferenciação, migração e apoptose) ou genes de reparo. Após a etapa de iniciação, as células alteradas sofrem o efeito de agentes que promovem a expansão da população celular que carrega a mutação inicial. A essa etapa se dá o nome de promoção. Sequencialmente ocorre a etapa de manutenção, na qual as células alteradas são mantidas na população. Nessa etapa as mutações estão mais associadas ao aumento de capacidade proliferativa, de forma a dificultar a morte celular. Por fim, as células mutadas replicam-se indefinidamente, podendo adquirir capacidade de metastatização e formação de vasos sanguíneos/linfáticos. A metástase consiste na capacidade de invasão tecidual, etapa essa que consiste na progressão tumoral (Ministério da saúde, 2008).

5.1.2 Terapias convencionais vs terapias que envolvem edição de células endógenas

Uma das causas da leucemia é a presença do cromossomo Filadélfia. Este é um cromossomo anormal formado pela troca de material entre os cromossomos 9 e 22, formando um novo gene denominado BCR-ABL. As células com o gene BCR-ABL produzem uma proteína anormal que ajuda as células a crescerem. Os inibidores da tirosina quinase (TKIs) foram desenvolvidos para inibir a ação dessa proteína, são exemplos: Imatinibe, Dasatinibe e Nilotinibe (HAMERSCHLAK, 2008). Para os casos BCR-ABL negativos, outras alternativas terapêuticas são utilizadas, como Blinatumomabe e Inotuzumabe ozogamicina (PROSKOROVSKY, SU e FAHRBACH et al., 2019). Porém, por serem tratamentos sistêmicos pouco seletivos, essas quimioterapias atingem não somente as células cancerígenas, mas também as demais células sadias do organismo.

Por outro lado, o CAR-T se trata de uma terapia de câncer imunocelular autóloga que envolve a reprogramação das células T do próprio paciente com um transgene que codifica um receptor de antígeno quimérico (CAR) para identificar e eliminar células específicas que expressam CD19 (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018). Como a eliminação das células depende do reconhecimento da proteína de membrana CD19 (antígeno de superfície de linfócitos B mais comum), esta atua como biomarcador das células alvo (células neoplásicas), configurando a melhor seletividade desse mecanismo de ação.

5.2 CAR-T

O CAR-T (linfócitos T com receptor de antígenos quiméricos) é uma terapia celular que utiliza células T autólogas reprogramadas. A terapia consiste na edição das células T do próprio paciente, de forma a expressar um CAR (receptor de antígenos quiméricos) direcionado para eliminar células neoplásicas (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018).

A terapia aprovada nos Estados Unidos ganhou o nome de tisagenlecleucel, e seu CAR é composto por um fragmento de anticorpo de cadeia única murina que reconhece CD19 acoplado a domínios de sinalização intracelular de 4-1BB (CD137) e CD3 ζ (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018). Tisagenlecleucel possui indicação terapêutica para duas doenças. A primeira indicação é para tratamento de pacientes com linfoma difuso de grandes células B não-Hodgkin

(DLBCL) refratário, após duas ou mais linhas de terapia sistêmica. A segunda indicação é para tratamento de pacientes com idade superior a 25 anos com precursor de LLA refratária ou com recaída. Também é considerado na terapia de LLA para adultos jovens e uso pediátrico nos casos em que os pacientes:

- Não tiveram remissão seguindo o tratamento de primeira linha (refratário 1º).
- Tiveram recaída seguindo a segunda linha ou subsequente remissão completa (RC) pós quimioterapia.
- Tiveram recaída seguindo transplante de medula óssea (HSCT).
- Tem doença refratária ou recaída secundária/tardia e são elegíveis ou não para HSCT (Kymriah® [*prescribing information*], 2018).

A terapia tisagenlecleucel é um processo dinâmico de tratamento, que envolve tanto os médicos hematologistas, oncologistas e demais profissionais de saúde, quanto o centro de tratamento e a instalação laboratorial. Além disso, a produção de células CAR-T requer vários cuidados durante as etapas e testes de controle de qualidade, que são executados ao longo de todo o protocolo.

A terapia se inicia com o deslocamento do paciente devidamente diagnosticado ao centro de tratamento para realização da coleta das células T do próprio paciente. Primeiro, o processo de leucoferese é realizado separando os leucócitos e retornando o restante do sangue para a circulação. Depois que um número suficiente de leucócitos foi colhido, o produto de leucoferese é enriquecido para células T. Esse processo envolve a lavagem das células do tampão de leucoferese, que contém anticoagulantes. O enriquecimento dos linfócitos pode ser realizado subsequentemente por centrifugação, que separa as células por tamanho e densidade mantendo a viabilidade celular. Nessa etapa pode-se incluir a separação de subconjuntos de células T (contendo CD4/CD8), usando conjugados ou marcadores específicos de anticorpos (LEVINE, MISKIN e WONNACOTT et al., 2017).

Uma vez coletado e devidamente crioconservado, o material pode seguir para a instalação de fabricação aprovada pelo laboratório, onde as células do paciente são geneticamente reprogramadas em células CAR-T (Kymriah® [*prescribing information*], 2018).

A reprogramação das células T do paciente ocorre com um receptor de antígeno quimérico contendo um domínio ligação ao antígeno (fragmento variável de

cadeia única) e domínios coestimulatórios adicionais de receptores tais como CD28, OX40 e CD137 e 4-1BB. Esse domínio é responsável por aumentar a expansão e persistência da terapia. Alguns domínios intracelulares sinalizadores, como o CD3ζ, são necessários para a ativação e inicialização da célula T e atividade antitumoral (Kymriah® [*prescribing information*], 2018; JUNE, O'CONNOR e KAWALEKAR et al., 2018) Assim, a terapia CAR-T é projetada especificamente para melhorar a expansão precoce das células T e a resistência a longo prazo das células CAR-T (MILONE, FISH e CARPENITO et al., 2009).

A ativação padronizada de células T ocorre através de beads revestidas com anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28. As beads podem ser removidas da cultura através de separação magnética. Na presença de interleucina-2 e APCs, as células T podem crescer logaritmicamente em um biorreator de perfusão durante várias semanas. Durante o processo de ativação, as células T são incubadas com o vetor viral codificando o CAR e, após vários dias, o vetor é lavado da cultura. O vetor viral usa maquinaria viral para se conectar às células do paciente, e, ao entrar nas células, o vetor introduz material genético na forma de RNA. No caso da terapia com células CAR-T, esse material genético codifica o CAR. O RNA é transcrito de forma reversa para DNA e integra-se permanentemente no genoma das células do paciente. Assim, a expressão do CAR é mantida à durante a divisão celular das células no biorreator (LEVINE, MISKIN e WONNACOTT et al., 2017). Ao final do processo, cada bolsa de infusão contém um total de $1,2 \times 10^6$ a 6×10^8 células T viáveis positivas para CAR (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018).

Em paralelo, o paciente recebe quimioterapia com linfodepleção de forma a preparar o corpo para receber as células CAR-T durante uma única infusão, que pode ocorrer em ambiente hospitalar ou ambulatorial. A concentração de células T viáveis positivas para CAR utilizada na infusão depende da indicação e do peso corporal do paciente: para LLA, a indicação é de 0,2 a 5×10^6 células T viáveis positivas para CAR / kg de peso corporal para pacientes com menos de 50 kg e 0,1 a $2,5 \times 10^8$ células T viáveis positivas para CAR (não baseado no peso); para DLBCL, a indicação é de 0,6 a 6×10^8 células T viáveis positivas para CAR (não baseado no peso) (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018).

Após a infusão, o paciente deve ser monitorado de 2 a 3 vezes durante a primeira semana, permanecendo próximo ao Centro de Tratamento por pelo menos 4 semanas para monitoramento e manejo de possíveis eventos adversos. Além disso,

os pacientes também devem ser monitorados rotineiramente à longo prazo (Kymriah® [prescribing information], 2018). Abaixo um infográfico com as etapas da terapia CAR-T:

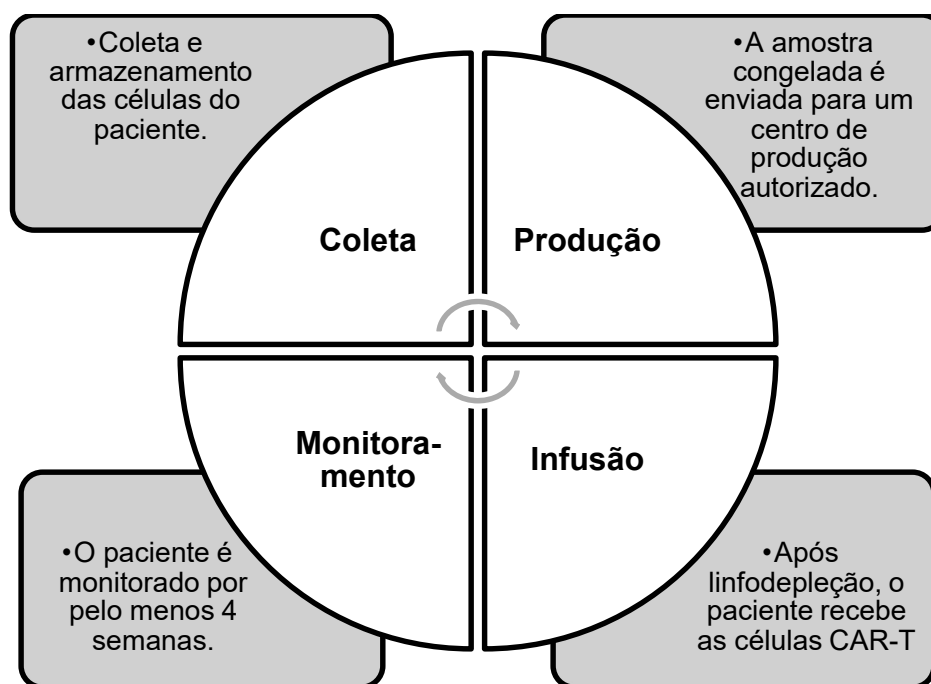


Figura 1: Fluxo com os processos realizados na terapia CAR-T. Adaptado de Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018.

A independência do reconhecimento do CAR via MHC traz à célula CAR-T uma vantagem antitumoral fundamental, porque um grande mecanismo de evasão do câncer é perda da apresentação do antígeno associado ao CPH pelas células tumorais. Alguns elementos diferenciam as gerações de CARs que foram desenvolvidos. CARs de primeira geração contêm CD3ζ, enquanto CARs de segunda geração possuem um endodomínio co-estimulatório (por exemplo, CD28 ou 4-1BB) fundido com CD3ζ. Por fim, CARs de terceira geração consistem em dois domínios co-estimulatórios ligados a CD3ζ (JUNE, O'CONNOR e KAWALEKAR et al., 2018; ATACA e ARSLAN, 2015).

Além disso, diferenças significativas foram evidenciadas na diferenciação e perfis metabólicos das células CAR usando CD28 ou 4-1BB como domínios de sinalização, sendo a glicólise aeróbica mais presente nas células com CD28 e a decomposição oxidativa de ácidos graxos mais presente nas células com 4-1BB (KAWALEKAR, O'CONNOR e FRAIETTA et al., 2016).

5.2.1 Resultados em estudo clínico

Em um estudo de coorte fase 2, com participação de 25 centros, realizado em 2018, a maioria dos pacientes tratados com CAR-T alcançou e manteve a remissão completa. Nesse estudo, 75 pacientes entre crianças e adultos jovens com leucemia linfoblástica aguda de células B recidiva ou refratária receberam infusão de tisagenlecleucel, obtendo-se uma taxa de resposta global em 3 meses de 81%, com 61 pacientes que tiveram uma resposta ao tratamento e doença residual mínima negativa. Além disso, a persistência do tisagenlecleucel no sangue foi observada por até 20 meses (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

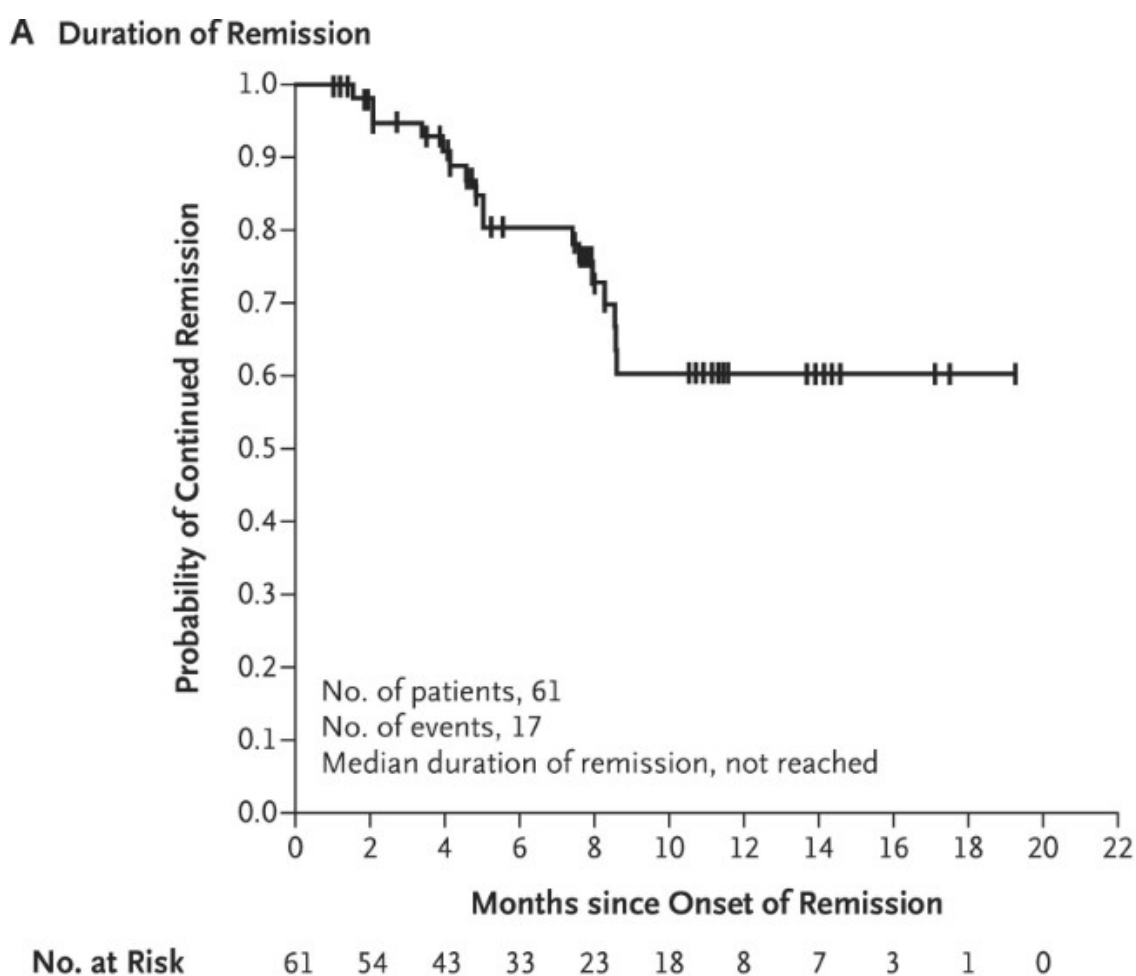


Figura 2: O gráfico demonstra a duração da remissão, nos 61 pacientes que tiveram remissão completa (RC) ou remissão completa com recuperação hematológica incompleta (RCi) (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

A taxa de sobrevida livre de eventos nesse estudo é definida como o tempo entre a infusão de tisagenlecleucel e o primeiro dos seguintes eventos: ausência de

resposta, recaída antes da resposta ser mantida por pelo menos 28 dias, recaída após ter remissão completa ou remissão completa com recuperação hematológica incompleta. 32 pacientes não tiveram eventos no momento do corte de dados. A taxa de sobrevida livre de eventos foi de 73% em 6 meses e 50% em 12 meses. Já a sobrevida global foi de 90% em 6 meses 76% em 12 meses. A sobrevida global entre os 75 pacientes que receberam uma infusão é considerada desde a data da infusão de tisagenlecleucel até a data da morte por qualquer causa, sendo que dezenove pacientes morreram após a infusão de tisagenlecleucel. A síndrome de liberação de citocinas ocorreu em 77% dos pacientes, dos quais, 48% receberam tocilizumabe. Eventos neurológicos ocorreram em 40% dos pacientes, que foram tratados com cuidados de suporte, sem nenhum edema cerebral relatado (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

B Event-free and Overall Survival

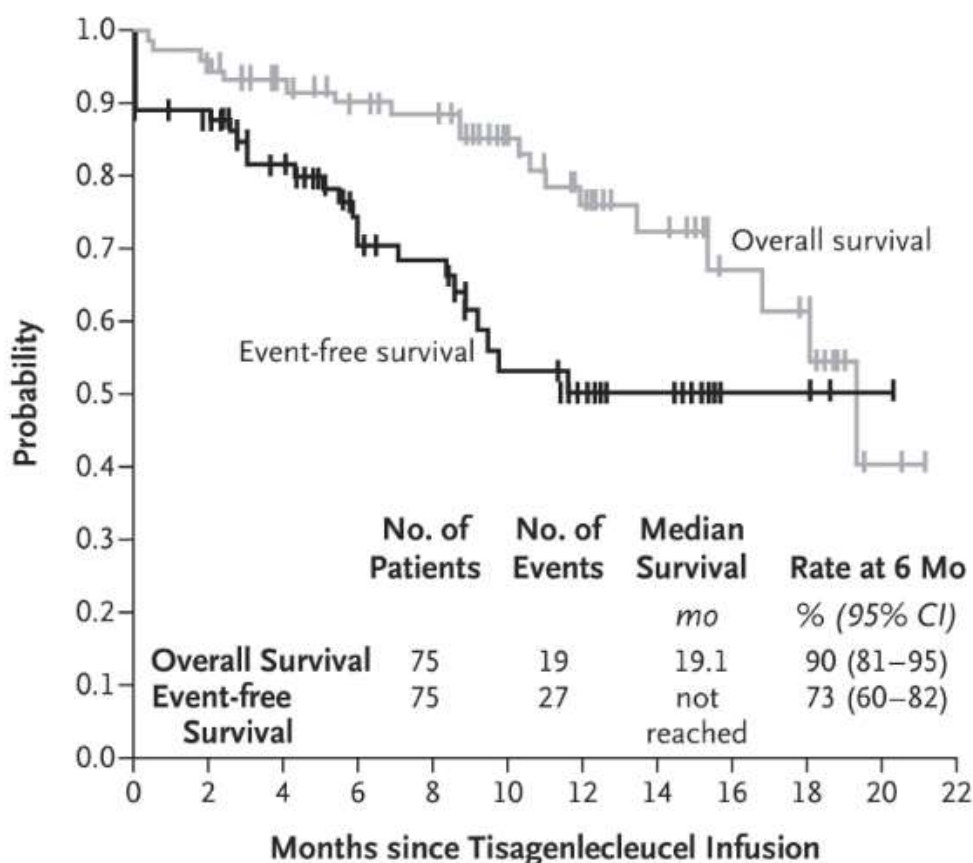


Figura 3: O gráfico demonstra a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global dos 75 pacientes que receberam a infusão de tisagenlecleucel (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

O “ELIANA trial” é o estudo que compila os resultados realizados em 25 centros. Na análise atualizada de 75 pacientes pediátricos e jovens adultos com

leucemia linfoblástica aguda de células B recidiva ou refratária infundidos com tisagenlecleucel com acompanhamento médio de 13,1 meses, 60% dos pacientes atingiram RC e 21% dos pacientes atingiram RCi; Todos os pacientes infundidos com a melhor resposta global de RC/RCi foram negativos para DRM e as células T modificadas foram detectadas em pacientes por até 20 meses (ELIANA trial, 2018).

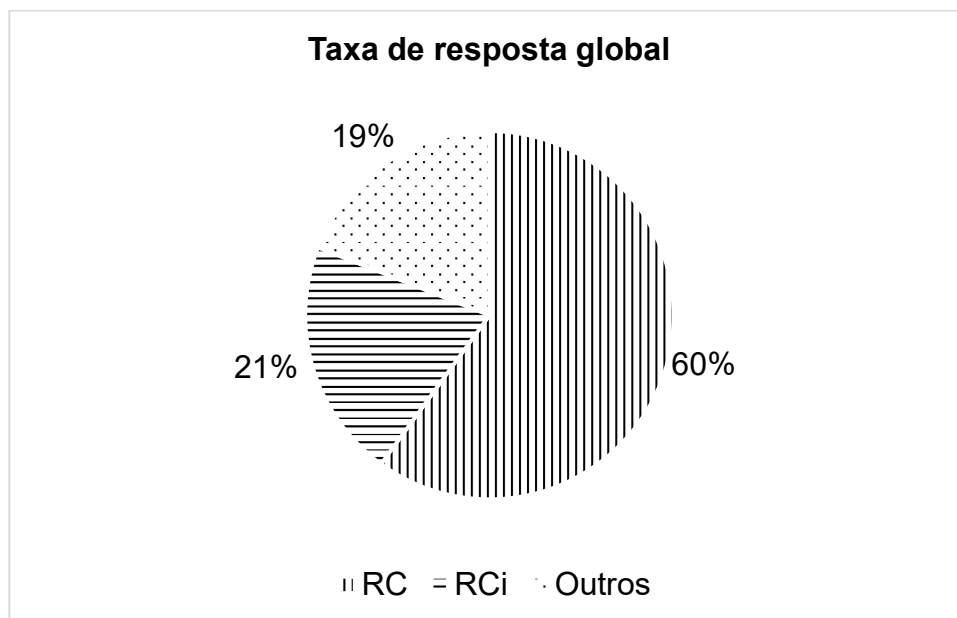


Figura 4: O gráfico representa as taxas de resposta global, definida como a soma das taxas de remissão completa (RC) e a taxa de remissão com recuperação incompleta do hemograma (RCi) dos pacientes durante 13,1 meses de tratamento. Adaptado de ELIANA trial, 2018.

Ao comparar 3 estudos, o Eliana trial traz como resultados 82% de resposta global (RG) em 50 pacientes em 3 meses de tratamento, 83% de resposta global em 63 pacientes em 6 meses de tratamento e 81% de resposta global em 75 pacientes em 3 meses ou mais de tratamento.

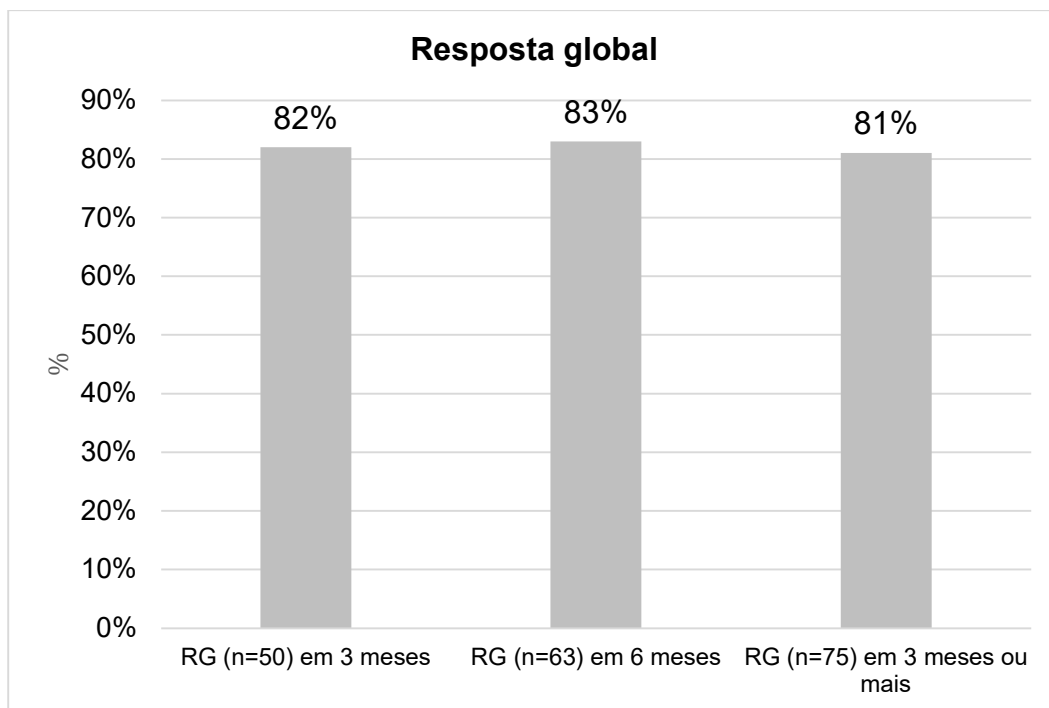


Figura 5: Taxa de remissão dos pacientes de acordo com o tempo de tratamento.

Por fim, o estudo traz a probabilidade de sobrevida após 12 meses de tratamento, sendo o resultado de sobrevida livre de eventos em 75 pacientes de 50%, a sobrevida livre de recaída em 51 pacientes de 59% e a sobrevida global de 76%.

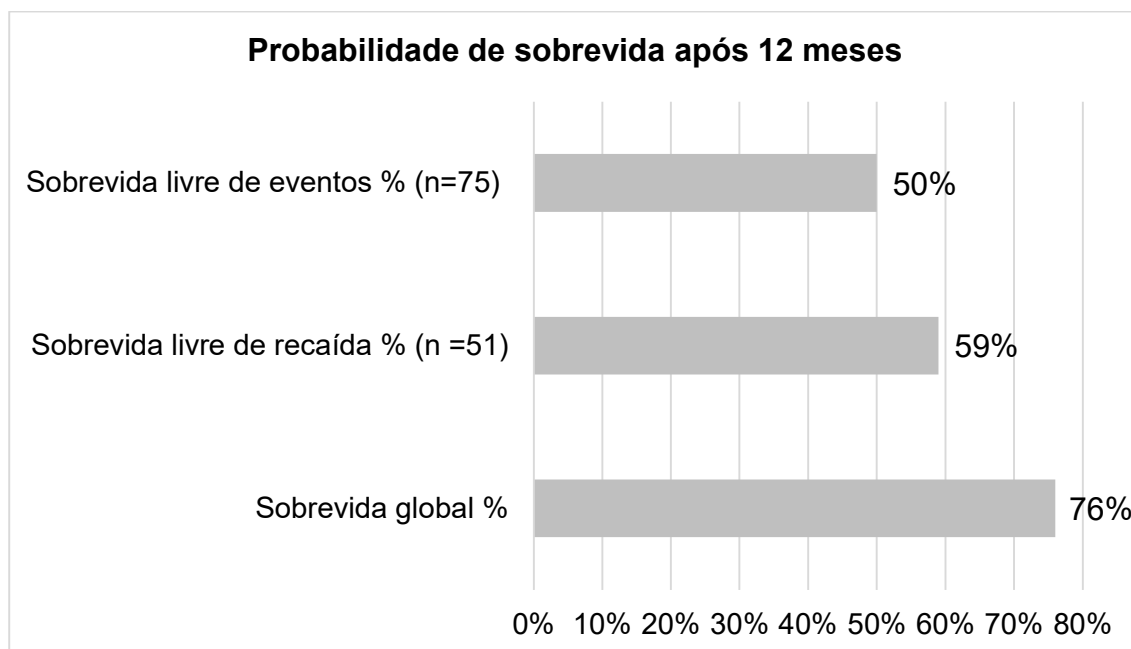


Figura 6: Probabilidade de sobrevida após 12 meses de tratamento sub-classificada em sobrevida livre de eventos, sobrevida livre de recaída e sobrevida global.

5.2.2 Eventos adversos

Os eventos adversos após as terapias baseadas em células T podem ter intensidades variadas ou até mesmo persistir durante a vida útil da célula T geneticamente modificada. Um exemplo seria o reconhecimento celular não neoplásico, pois a maioria dos alvos das células CAR-T possui expressão compartilhada em tecidos normais e algum grau de toxicidade (BONIFANT, JACKSON e BRENTJENS et al., 2016). Buscando diminuir os eventos adversos ou prevenir sua ocorrência, uma série de estratégias de segurança foram desenvolvidas, incluindo genes suicidas, receptor Notch sintético, CAR em contato, reconhecimento combinatório de antígeno-alvo, CAR inibitório, entre outros (YU, YI e QIN et al., 2019).

Em quase todos os casos, o desenvolvimento de síndrome de liberação de citocinas ocorreu entre 1 e 10 dias após a infusão do tisagenlecleucel (início mediano em 3 dias), com tempo médio para resolução de 7 dias. Hipogamaglobulinemia e agamaglobulinemia são possíveis eventos adversos em pacientes com RC após a infusão de tisagenlecleucel. Devido aos eventos adversos relacionados aos níveis de imunoglobulina, o monitoramento deve ser realizado, junto às precauções de infecção, profilaxia com antibióticos e reposição de imunoglobulina por idade e diretrizes padrão. A maioria dos eventos neurológicos ocorreu dentro de 8 semanas após a infusão de tisagenlecleucel e foi transitória (Kymriah® - *Summary of product characteristics*, 2018).

No ELIANA *trial*, 40% dos pacientes apresentaram eventos neurológicos, dos quais 13% de grau 3 e nenhum de grau 4; 95% dos pacientes apresentaram eventos hematológicos, dos quais: 77% apresentaram síndrome de liberação de citocinas (CRS), 40% pirexia, 39% apetite diminuído, 36% neutropenia febril e 36% dor de cabeça (ELIANA *trial*, 2018).

5.2.3 Perspectivas e regulamentação

Mesmo nos países onde foi aprovado, o acesso à terapia CAR-T ainda é limitado, devido ao complexo processo de produção, com opções de alvos limitada e respostas anti-tumores insuficientes contra tumores sólidos. Avanços nas tecnologias de edição genética, como aquelas desenvolvidas por *Zinc Finger Nucleases (ZFNs)*, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)* e *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9)* permitem outras estratégias para combate dessas limitações (JUNG e LEE, 2018).

Uma segunda limitação das terapias envolvendo células CAR-T é que elas exigem superfície extracelular alvo nas células tumorais (JUNE, O'CONNOR e KAWALEKAR et al., 2018) e os antígenos são frequentemente expressos a baixos níveis. O nível mais baixo de densidade de antígeno alvo necessário para induzir a ativação efetiva de células T varia para diferentes antígenos-alvo e construções de CAR, dependendo da expressão de CAR, afinidade de ligação, restrições espaciais, expressão de células tumorais de adesão e ligantes co-estimulatórios (SRIVASTAVA e RIDDELL, 2015).

Também existem limitações relacionadas à falta de controle sobre sua ativação e expansão in vivo. Isso porque as células CAR-T sofrem uma rápida proliferação (expansão de até 104 vezes) ao encontrar células positivas para o antígeno no paciente, o que resultou em casos graves de síndrome de lise tumoral (SLT) e síndrome de liberação de citocinas (CRS) (RODGERS, MAZAGOVA e HAMPTON et al., 2016). Por isso, a especificidade dos alvos selecionados deve ser boa o suficiente para evitar que as células CAR-T causem danos sérios aos órgãos, sem deixar de lado a estabilidade da expressão de antígenos, que também é fundamental (WEI, HAN e BO et al., 2019).

O primeiro país a aprovar a utilização de CAR-T na terapia contra o câncer foi os Estados Unidos em 2017, onde a terapia já é utilizada no tratamento de crianças e jovens com leucemia linfóide aguda e adultos com linfoma difuso de células B (Novartis, 2017). No Brasil, um homem de 62 anos foi o primeiro paciente a receber um tratamento totalmente individualizado contra câncer, mas no momento, não existe aprovação para a terapia CAR-T no país.

Em março de 2020, a ANVISA disponibilizou a RDC 338, que regulamenta os requisitos mínimos para o pedido de registro de produtos de terapia avançada. Para isso, é necessário a apresentação de documentos como o certificado de autorização de funcionamento (AFE) das empresas envolvidas na fabricação do produto, certificação de boas práticas de fabricação, modelo de bula a ser empregada no Brasil, modelos de embalagens primária e secundária, dados de monitoramento pós-registro obtidos de estudos clínicos e não clínicos, plano de gerenciamento de riscos e relatório técnico (RDC Nº 338, 2020).

Por ser uma terapia celular que envolve produto de terapia gênica, tisagenlecleucel é classificado como produto de terapia avançada classe II. Sendo assim, além dos requisitos mínimos citados anteriormente, para o registro do produto

deve-se apresentar documentos relacionados à qualidade e estudos clínicos e não clínicos realizados, informações sobre todas as etapas de produção e armazenamento, estudos de estabilidade e biodisponibilidade além de estudos relacionados à potenciais efeitos imunogênicos e teratogênicos (RDC Nº 338, 2020).

Após o recebimento da documentação que instrui o pedido de registro simplificado de produto de terapia avançada classe II, a ANVISA tem o prazo de 365 dias para avaliação dos requerimentos enquadrados na categoria ordinária e 120 dias para avaliação dos requerimentos enquadrados na categoria prioritária. O registro de produto de terapia avançada classe II tem validade de cinco anos, podendo ser renovado mediante avaliação de benefício-risco e demais exigências sanitárias vigentes. Após a segunda renovação, o registro concedido tem validade de dez anos (RDC Nº 338, 2020).

6. CONCLUSÃO

A partir desse trabalho foi realizada a apresentação de uma das terapias que utilizam edição de células endógenas para tratamento de câncer. O CAR-T, é uma terapia de câncer imunocelular autóloga que envolve a reprogramação das células T do próprio paciente para identificar e eliminar células que expressam uma proteína de membrana específica. Através dos estudos levantados, pode-se concluir que estão sendo realizados mais estudos com CAR-T para tratamento das neoplasias hematológicas, e dentre eles, os estudos com pacientes com LLA são os mais comuns.

Conforme estudo realizado em 2018, a maioria dos pacientes tratados com tisagenlecleucel alcançou e manteve a remissão, mostrando a terapia CAR-T como um tratamento potencialmente definitivo. Os pacientes no estudo tinham LLA de células B recidiva ou refratária tinham idade média de 11 anos (faixa de 3 à 23 anos), com mais de 5% de linfoblastos na medula óssea. Ambos *end points*, primário e secundário foram alcançados e a taxa de resposta global (RC/RCi) foi de 81% (IC95%: 71% -89%; $p < 0,001$) durante o acompanhamento médio de 13,1 meses (MAUDE, LAETSCH, BUECHNER et al., 2018).

O desenvolvimento da próxima geração de células CAR-T usando tecnologias de edição genética irá aumentar o potencial terapêutico do tratamento com células CAR-T para ambos tumores, hematológicos e sólidos (JUNG e LEE, 2018). Porém, devido à variabilidade e ao pequeno tamanho dos ensaios clínicos que investigam a

terapia CAR-T, existe a necessidade de uma revisão sistemática para avaliar sua eficácia e segurança (GRIGOR, FERGUSON e HAGGAR et al., 2017). Além disso, a capacidade de identificar neoantígenos através da tecnologia CAR-T é considerada atualmente em estudos de possíveis vacinas contra o câncer (OTT, DOTTI e YEE. et al., 2019).

Em março de 2020, a ANVISA disponibilizou a RDC 338, que regulamenta os requisitos mínimos para o pedido de registro de produtos de terapia avançada e os requisitos adicionais para registro de produtos de terapia avançada classe II, no qual o tisagenlecleucel se enquadra (RDC Nº 338, 2020).

A terapia tisagenlecleucel é um processo dinâmico de tratamento, que envolve diversos profissionais de saúde, centro de tratamento e a instalação laboratorial, requerendo vários cuidados durante as etapas e testes de controle de qualidade. Ao expandir esse complexo processo de fabricação para tratar mais pacientes em um número maior de centros clínicos, deve-se considerar uma avaliação cuidadosa, de forma a garantir a eficiência da produção sem comprometer a integridade e a potência do produto. Como as células CAR-T podem ser usadas para atingir vários tipos de câncer, a escala de produção do vetor e das células CAR-T também dependerá da incidência de cada indicação (LEVINE, MISKIN e WONNACOTT et al., 2017).

A utilização da terapia celular CAR-T em neoplasias hematológicas estimulou a expansão dessa tecnologia para os tumores sólidos. No entanto, algumas dificuldades de aplicação foram encontradas, como: falta de alvos eficazes e elegíveis; microambiente imunossupressor que afetam as células T e heterogeneidade dos tumores sólidos. Embora a exploração do tratamento com células CAR-T em tumores sólidos não seja tão definitiva quanto na pesquisa de malignidades hematológicas, alguns estudos têm alcançado resultados promissores (PANG, HOU e YANG et al., 2018).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATACA, P. e ARSLAN, O. Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy in Hematology. **Turk J Hematol**, v. 32 p.285-294, 2015

BONIFANT, C.; JACKSON, H.; BRENTJENS, R. e CURRAN, K. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. **Molecular Therapy — Oncolytics**, v. 3, p. 16011, 2016

CHEN, D. e MELLMAN, I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. **Nature**, v. 541, p.328-330, 2017

ELIANA trial. Disponível em: <https://novartis.gcs-web.com/static-files/110bee95-5916-483f-a0c9-20128105005f>. Acesso em: 02.jan. 2020

FLINT, T.; FEARON, D.; e JANOWITZ, T. Connecting the Metabolic and Immune Responses to Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v.23, n.5 p.451- 464, 2017

GRIGOR, E.; FERGUSON, D.; HAGGAR, F.; KEKRE, N.; ATKINS, H.; SHORR, R.; HOLT, R.; HUTTON, B.; RAMSAY, T.; SEFTEL, M.; JONKER, D.; DAUGAARD, M.; THAVORN, K.; PRESSEAU, J. e LALU, M. Efficacy and safety of chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in patients with haematological and solid malignancies: protocol for a systematic review and meta-analysis **BMJ Open**, v. 7, 2017

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Leucemia. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>. Acesso em: 25.abr.2020

HAMERSCHLAK, N. Leukemia, cytogenetics, genetics, prognostic factors. **J Pediatr**, v. 84, 4 Suppl, S52-57, 2008

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer Statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 58, p. 71–96, 2008

JUNE, C.; O’CONNOR, R.; KAWALEKAR, O.; GHASSEMI, S.; MILONE, M.. CAR T cell immunotherapy for human câncer. **Science**, v. 359, p. 1361–1365, 2018

JUNG , I. e LEE, J. Unleashing the Therapeutic Potential of CAR-T Cell Therapy Using Gene-Editing Technologies. **Mol. Cells**, v. 41, n.8, p. 717-723, 2018

KAWALEKAR, O.; O'CONNOR, R.; FRAIETTA, J., et al. Distinct signaling of coreceptors regulates specific metabolism pathways and impacts memory development in CAR T cells. **Immunity**, v.44, n.2, p. 380-390, 2016

Kymriah® [prescribing information]. Disponível em: <https://www.fda.gov/files/vaccines%2C%20blood%20%26%20biologics/published/Package-Insert---KYMRIAH.pdf>. Acesso em 20.jan.2020

Kymriah® - Summary of product characteristics. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_en.pdf. Acesso em: 25.jan.2020

LEE, R.; BITHEL, T.; FOERSTER, J., ATHENS, W. e LUKENS, J. **Wintrobe's Clinical Hematology**. Edição 12. Editora Manole, 2007.

LEVINE, B. L.; MISKIN, J.; WONNACOTT, K. e KEIR, C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. **Molecular Therapy: Methods & Clinical Development**, v. 4, 2017

MAUDE, S.; LAETSCH T. e BUECHNER, J. et.al.. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 378, n.5, p. 439-448, 2018

MILONE, M.; FISH J.; CARPENITO C., CARROLL, R.; BINDER, G.; TEACHEY, D.; SAMANTA, M.; LAKHAL, M.; GLOSS, B.; DESNOYERS, G.; CAMPANA, D.; RILEY, J.; GRUPP, S. e JUNE, C. Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T-cells and increased antileukemic efficacy in vivo. **Molecular Therapy** , v.17, n. 8, p.1453-1464, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/acoes-de-enfermagem-para-o-controle-do-cancer>. Acesso em: 15.jan.2020

Novartis receives first ever FDA approval for a CAR-T Cell Therapy, Kymriah™ (CTL019) for children and young adults with B-cell ALL that is refractory or has relapsed at least twice. Disponível em: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-first-ever-fda-approval-car-t-cell-therapy-kymriahtm-ctl019-children-and-young-adults-b-cell-all-refractory-or-has-relapsed-least-twice>. Acesso em: 12.mar.2020

OTT, A. DOTTI, G. YEE, C. e GOFF, S. An Update on Adoptive T-Cell Therapy and Neoantigen Vaccines, **ASCO Educational Book**, p. 70-78, 2019

PANG, Y.; HOU, X.; YANG, C.; LIU, Y. e JIANG, G. Advances on chimeric antigen receptor modified T-cell therapy for oncotherapy. **Molecular Cancer**, 17:91, 2018

PING, Y.; LIU C.e ZHANG, Y. T-cell receptor-engineered T cells for cancer treatment: current status and future directions. **Protein Cell**, n. 9, v. 3: p. 254–266, 2018

PROSKOROVSKY, I.; SU, Y; FAHRBACH, K.; VANDENDRIES, E.; PAGÉ, V., ONYEKWERE, U. WANG, Y.;CAPPELLERI, J.C e STELLJES, M. Indirect Treatment Comparison of Inotuzumab Ozogamicin Versus Blinatumomab for Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. **Adv Ther**, v. 36, n. 8, p.2147–2160, 2019

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 338, DE 20 DE FEVEREIRO DE 2020 (Publicada no DOU nº 38, de 26 de fevereiro de 2020)

RODAK, B.F; FRITSMA, G.;KEOHANE, E. **Hematology, Clinical Principles and Applications**. Elsevier Saunders, 2012.

RODGERS, D.; MAZAGOVA M.; HAMPTONA, E.;CAOB, Y.; RAMADOSSA, N.; HARDYA, I.;SCHULMANA, A.; DUA, J.; WANGA, F.; SINGERA, O.; MAA, J.; NUNEZA, V.; SHENA, J.; WOODSA, A.; WRIGHTA, T.; SCHULTZA, P.; KIMA, C. e YOUNGA, T. Switch-mediated activation and retargeting of CAR-T cells for B-cell malignancies **PNAS**, v.12, p.459–468, 2016

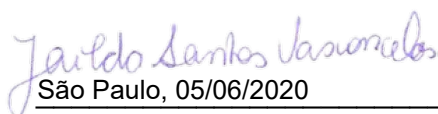
ROSENBAUM, L. Tragedy, Perseverance, and Chance — The Story of CAR-T Therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 14, p. 1313-1315, 2017

SRIVASTAVA, S. e RIDDELL, S. Engineering CAR-T cells: Design concepts. **Trends in Immunology**, v.36, n.8, 2015

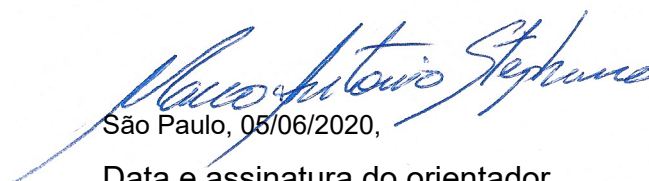
WEI, J.; HAN, X.; BO, J e HAN, W. Target selection for CAR-T therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, 12:62, 2019

YU, S.; YI, M.; QIN, S. e WU, K. Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity **Molecular Cancer** 18:125, 2019

8. Anexos


São Paulo, 05/06/2020

Data e assinatura da aluna


São Paulo, 05/06/2020,

Data e assinatura do orientador