

Project 14: Generation of T lymphocytes and NK cells from pluripotent cells

Principal Investigator: *Dimas Tadeu Covas*

Abstract

The experience of our group in generating induced pluripotent stem cells (iPS) allows the generation of pluripotent cells from a particular patient. These cells have the potential to differentiate in vitro into various cell types, providing an alternative source for obtaining cells of the immune system. Moreover, its indefinite capacity for self-renewal can greatly facilitate the production scheduling of cells, offering unique opportunities to overcome many of the obstacles encountered using conventional sources of cells.

In this subproject, we are proposing the differentiation of iPS cells into NK cells and T lymphocytes, two cell types widely used in cancer immunotherapies. There is considerable interest in the use of NK cells in cancer immunotherapy. However, to obtain sufficient numbers of cells for continuous administration in patients is still a significant limitation. NK cells are obtained from the differentiation of pluripotent cells differentiation by the method of two steps: formation of embryoid bodies using defined conditions, followed by expansion of NK cells by co-cultic mbIL-21 cells with artificial antigen-presenting cells. This methodology allows the production of mature and functional NK cells from pluripotent cells.

We will also induce the differentiation into T cells, in this case the iPS will be co-cultured with OP9 DL1 . Nevertheless, their final commitment to the T-cell lineage requires their introduction into fetal thymus organ cultures, so as to provide a microenvironment conducive to TCR gene rearrangement and subsequent positive selection of a diverse CD4+ and CD8+ T-cell repertoire.

Although pluripotent stem cells may serve as a potentially unlimited source of naive T cells for adoptive transfer, the requirement for adequate thymic microenvironment to support V (D) J recombination and positive selection raises ethical and pragmatic barriers for use in clinical protocols.

The T cells generated in vitro from pluripotent cells have a repertoire of T cells in an unpredictable receptor (TCR) rearrangement of TCR genes that randomly occurs and the cells are positively selected by unknown mechanisms during differentiation in vitro. This limitation could be circumvented using iPS containing an endogenous rearranged TCR specific for a particular antigen. However, this is a cumbersome approach that requires cloning T cells specific for an antigen. Furthermore, as TCRs recognize antigen presented by particular HLA molecules, the clinical use of T cells which recognize the antigen by means of an endogenous TCR is limited by the need to match its specificity for HLA receptor patient.

Genetic engineering of T lymphocytes to express CAR (chimeric antigen receptor) has emerged recently as a promising approach to rapidly generate T cells directed to tumors. Human T cells that express a CAR directed to CD19 antigen, which is expressed in the vast majority of leukemias and lymphomas, can eradicate B cell diseases.

Goals

Differentiation of iPS cells into NK cells and T lymphocytes, the phenotypic and functional characterization of these cells in vitro and the assessment of safety and therapeutic efficacy in preclinical models. After the establishment of lymphocyte differentiation, lymphocytes generated will be modified with anti-CD20 CAR

Specific Goals

- 1) *Generate iPS from skin biopsies and blood cells.*
- 2) *Characterization of the pluripotency of the cells generated by gene expression, immunocytochemistry, and formation of embryoid bodies formation of teratomas.*
- 3) *Establish the protocol for differentiation of iPS cells into NK cells and T lymphocytes*
- 4) *morphological, phenotypic and cell expression analysis of the differentiated cell lines.*
- 5) *To develop protocols for cryopreservation of differentiated cells.*
- 6) *Evaluation of efficacy in vitro and in vivo.*

Implementation schedule

Specific Goals	Semesters											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												
4												
5												
6												

Researchers:

Maristela Delgado Orellana

Simone Kashima

Virgínia Picanço

References

Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*(2013)

Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* (2004) 5:410–710.

Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* (2002) 17:749–5610.

Subprojeto 14: Geração de linfócitos T e células NK a partir de células pluripotentes

Pesquisador Responsável: *Dimas Covas*

Introdução

A experiência do nosso grupo em gerar células pluripotentes induzidas (iPS) permite a geração de células pluripotentes de um paciente específico, com o potencial de se diferenciar *in vitro* em vários tipos celulares, fornecendo uma fonte alternativa de obtenção de células do sistema imune. Além disso, sua capacidade indefinida de auto-renovação pode facilitar muito o escalonamento da produção de células, oferecendo oportunidades únicas para superar muitos dos obstáculos encontrados usando as fontes convencionais de células.

Neste subprojeto, estamos propondo a diferenciação de células iPS em células NK e linfócitos T, dois tipos celulares amplamente utilizados em imunoterapias do câncer. Há um grande interesse na utilização de células NK em imunoterapia do câncer. No entanto, a obtenção de um número suficiente de células para a administração contínua nos pacientes ainda é uma limitação significativa. Células NK serão obtidas a partir da diferenciação de células pluripotentes pelo método de diferenciação em duas etapas: formação de corpos embrióides usando condições definidas, seguido da expansão das células NK pelo co-cultivo com células mBIL-21 *artificial antigen-presenting cells*. Esta metodologia permite a produção de células NK maduras e funcionais a partir de células pluripotentes.

Além de células NK, será induzida a diferenciação em células T. As células iPS serão co-cultivadas com células estromais OP9-DL1 para obtenção de progenitores de células T. No entanto, a maturação final para a linhagem de células T requer a sua introdução em culturas de órgãos de timo fetal, de modo a fornecer um micro-ambiente propício para o rearranjo de genes de TCR e subsequente seleção positiva de uma diversidade de células CD4⁺ e CD8⁺. Embora células-tronco pluripotentes podem servir como uma fonte potencialmente ilimitada de células T naive para transferência adotiva, a exigência de um microambiente tímico adequada para apoiar a recombinação V(D)J e seleção positiva coloca barreiras éticas e pragmáticas para a utilização em protocolos clínicos.

As células T geradas *in vitro* a partir de células pluripotentes têm um repertório de receptor de células T imprevisível (TCR) por rearranjo de genes de TCR que ocorre aleatoriamente e as células são selecionadas positivamente por mecanismos desconhecidos durante a diferenciação *in vitro*. Esta limitação poderia ser contornada utilizando iPS contendo um TCR endógeno rearranjado específico para um determinado antígeno. No entanto, esta é uma abordagem trabalhosa que requer a clonagem de células T específicas para um antígeno. Além disso, como TCRs reconhecem antígenos apresentados por moléculas específicas de HLA, o uso clínico de células T que reconhecem o antígeno por meio de um TCR endógeno é limitada pela necessidade de se combinar com a sua especificidade para o HLA do paciente receptor. A engenharia genética de linfócitos T para expressar CAR (*chimeric antigen receptor*) emergiu, recentemente, como uma abordagem promissora para gerar rapidamente células T direcionadas a tumores. Células T humanas que expressam um CAR orientada para o antígeno CD19, que é expresso na grande maioria de leucemias e linfomas, podem erradicar doenças de células B.

Objetivo

Diferenciação de células iPS em células NK e em linfócitos T, a caracterização fenotípica e funcional dessas células *in vitro* e a avaliação da segurança e eficácia terapêutica em modelos pré-clínicos. Após o estabelecimento da diferenciação linfocítica, os linfócitos gerados serão modificados com CAR anti-CD20

Metas:

- 1) Gerar iPS a partir de biópsia de pele e de células do sangue.
- 2) Caracterizar a pluripotência das células geradas por expressão genica, imunocitoquímica, formação de corpos embrióides e formação de teratomas.
- 3) Esboçar o protocolo de diferenciação de células iPS em células NK e linfócitos T.
- 4) Caracterização morfológica, fenotípica e do perfil de expressão das células diferenciadas.
- 5) Desenvolver protocolos de criopreservação das células diferenciadas.
- 6) Avaliação da eficácia *in vitro* e *in vivo*.

Cronograma de execução referente a 6 anos de projeto

Metas	Semestres											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	■	■										
2		■	■	■	■							
3			■	■	■							
4			■	■	■							
5				■	■	■						
6				■	■	■						

Pesquisadores Colaboradores:

Maristela Delgado Orellana

Simone Kashima

Virgínia Picanço

Referências:

Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJ, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med*(2013)

Schmitt TM, de Pooter RF, Gronski MA, Cho SK, Ohashi PS, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro. *Nat Immunol* (2004) 5:410–710.

Schmitt TM, Zuniga-Pflucker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* (2002) 17:749–5610.