

SOUHRN

Pozadí problematiky:

Adoptivní terapie pomocí T-buněk s chimerickými antigenními receptory (CAR) specifickými na CD19 představuje slibnou léčbu relabujících nebo refrakterních malignit. Celkové odpovědi dosáhlo přes 80% pacientů s B-buněčnou akutní lymfoblastickou leukémií (B-ALL) nebo ne-Hodgkinovými lymfomy (NHL). Přesto je terapie leukémií a solidních nádorů pomocí CAR-T buněk limitována řadou faktorů, jako je únik nádorových klonů způsobený ztrátou cílového antigenu, sníženou proliferací a přežitím CAR-T buněk *in vivo*, sníženou infiltrací CAR-T buněk do oblasti nádoru, samotným imunosupresivním prostředím nádoru, malou paletou antigenních cílů a vedlejšími účinky spojenými s léčbou CAR-T lymfocyty. Z těchto důvodů jsou testovány nové přístupy pro zvýšení bezpečnosti a účinnosti CAR-T buněk včetně modifikací k překonání imunitní suprese.

Předpoklady a cíle:

(i) Bispecifické CAR receptory, které exprimují dvě vazebné domény specifické pro dva různé antigeny, zabrání úniku maligních klonů. (ii) CAR receptory s indukibilní expresí cytokinu IL-21, která je pod kontrolou NFAT promotoru, zvýší aktivitu a protinádorový účinek CAR-T buněk. (iii) Začleněním sebevražedného epitopu přímo do CAR receptoru zvýší terapeutickou bezpečnost CAR-T buněk.

Metody:

Pro přípravu CAR receptorů byly využity molekulárně biologické metody. Pro přenos transgenů a stabilní expresi v primárních T-buňkách byly použity lentivirové vektory nebo transpozonový systém PiggyBac. Byly připraveny dva CAR receptory bispecifické pro CD19 a CD20 a dále *in vitro* testovány jejich protinádorové účinky. Byly připraveny CAR vektory specifické na CD19 nebo antigen PSMA s indukovatelnou nebo konstitutivní expresí IL-21. Byla ověřena indukovatelná sekrece IL-21 po aktivaci CAR receptoru antigenem. Do extracelulárních částí CAR receptorů byla vložena řada epitopů, receptory byly následně porovnány a dále testovány.

Výsledky:

Pokusy *in vitro* potvrdily specifickou aktivaci biCAR-T lymfocytů nádorovými buňkami, které overexprimují antigeny CD19 a nebo CD20. Cytolytická aktivita biCAR-T buněk a

jejich odpověď v produkci INF- γ byly srovnatelné nebo zvýšené v porovnání s lymfocyty exprimující monospecifický CAR receptor. T-buňky byly modifikované tak, že po aktivaci receptorů CAR nebo TCR, sekretovaly IL-21, který byl pod kontrolou aktivačního faktoru NFAT. Multi-epitopy zařazené do CAR receptoru umožnily pozitivní expanzi CAR+ buněk, jejich snadnou detekci, ale i purifikaci CAR-T buněk pomocí magnetické separace během jejich výroby. Dále tyto epitopy mohou zprostředkovávat selekci *in vivo* po jejich infuzi v závislosti na protilátkách

Závěry:

V práci byly navrženy a úspěšně zkonstruovány různé vektory pro použití v buněčné terapii pomocí CAR-T buněk. Bispecifické CAR-T lymfocyty vykazovaly *in vitro* protinádorové účinky proti antigenům CD19 a CD20. Mohly by tak snížit míru relapsů při léčbě B-ALL a ne-Hodgkinových lymfomů. Indukovaný cytokin IL-21 zvýšil počet infiltrujících T-buněk v nádorových modelech nejen *in vitro*, ale i *in vivo*. CAR receptory s vloženými multi-epitopy představují slibnou strategii, jak zlepšit výrobní proces CAR-T buněk, tak i bezpečnostní pojistku při jejich klinickém použití.

Klíčová slova: chimerický antigenní receptor, CAR-T buňky, adoptivní imunoterapie, transpozonový systém PiggyBac, lentivirová transdukce, bispecifické CAR receptory, multi-epitopy